



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL –**  
**PGBIOEXP**

**SANDRA ROSA LIMA GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS E SUBGENÓTIPOS DO VÍRUS DA**  
**HEPATITE B EM PORTADORES CRÔNICOS DO ESTADO DE RONDÔNIA**

**PORTO VELHO – RO**

**2017**



**SANDRA ROSA LIMA GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS E SUBGENÓTIPOS DO VÍRUS DA  
HEPATITE B EM PORTADORES CRÔNICOS DO ESTADO DE RONDÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Juan Miguel VillalobosSalcedo

Co-orientadora: Dra. Deusilene Souza Vieira Dalla'cqua

Porto Velho

2017

**SANDRA ROSA LIMA GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS E SUBGENÓTIPOS DO VÍRUS DA  
HEPATITE B EM PORTADORES CRÔNICOS DO ESTADO DE RONDÔNIA**

**Orientador:** Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo

**Co-orientadora:** Dra. Deusilene Souza Vieira Dall A'cqua

**Examinador:Assinatura:**.....

**Nome:**.....

**Instituição:**.....

**Examinador:Assinatura:**.....

**Nome:**.....

**Instituição:**.....

**Examinador:Assinatura:**.....

**Nome:**.....

**Instituição:**.....

Dedico esta dissertação à minha família, em especial, minha mãe Deuzete,  
minha avó Eliza (em memória) e meu marido Orlando,  
por todo carinho, amor e paciência.  
Nenhuma palavra conseguirá expressar a minha gratidão.  
Amo vocês com todo meu coração!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me capacitar e me proporcionar sabedoria e paciência para desenvolver este trabalho. Sou grata senhor, pela força que me destes para chegar até aqui, por não me deixar fraquejar e por me manter de pé diante de todas as provações.

Agradeço aos meus pais, Deuzete Maria de Lima Gomes e José Eudes Pereira Gomes, por serem o meu alicerce, minha paz e minha fortaleza. Obrigada Mãe e Pai por todas as orações em meu nome, pela paciência e por todo amor com que me cuidam. Sou única para vocês, e vocês são únicos para mim. A felicidade de vocês está acima da minha. Vou lutar e vencer, sempre, por vocês.

Agradeço ao meu marido, Orlando Fernandes, por todo amor, cuidado, carinho e confiança que deposita em mim. Obrigada meu amor, por ser parceiro em todas as minhas escolhas, por me dar motivos para continuar e para sorrir, todos os dias das nossas vidas. Amo você!

Agradeço a minha família, seria injusta se citasse nomes, pois todos de alguma maneira me ajudaram a alcançar essa graça. Obrigada tias, madrinhas, primos, afilhado pela família maravilhosa que são para mim. Amo vocês!

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo e Dra. Deusilene Souza Vieira Dall A'cqua por me conduzirem na realização deste trabalho, e pelo incentivo na busca pelo conhecimento. Sou grata por ter tido a oportunidade de aprender com vocês!

Agradeço a Dra. Michelle de Oliveira e Silva e ao Dr. Gabriel Melim, pela valiosa contribuição neste trabalho, por toda paciência e disponibilidade que demonstraram desde o primeiro momento em que busquei ajuda. Agradeço de coração por todo aprendizado que adquiri com ambos nesse período, que foi curto, mas muito importante para minha formação. Saibam que são pessoas muito especiais! Obrigada por tudo!

Agradeço aos meus amigos, em especial, minhas amigas Cícera Alexsandra e Evelin Camila, por toda a ajuda e incentivo, pelas alegrias e tristezas compartilhadas e por serem a representação mais verdadeira de amizade que eu tenho. Sou grata amigas, pela vida de vocês e pela nossa amizade!

Agradeço a toda equipe do laboratório de Virologia Molecular, especialmente aos alunos de iniciação científica Débora Lopes e Lucas Sapiecinski, por sempre estarem dispostos a ajudar quando necessário, por todos os ensinamentos compartilhados e todos os momentos vividos nesses dois anos. Vocês moram no meu coração.

Agradeço ao Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM) e a FIOCRUZ-RO, por fornecerem espaço e suporte para desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a Universidade Federal de Rondônia e a todo o quadro de docentes do Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental por todo auxílio e conhecimento compartilhado.

Agradeço as instituições financiadoras CNPq e CAPES pelo suporte proporcionado durante a realização do mestrado.

Agradeço ao Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ-AM) pela realização das reações de sequenciamento apresentadas neste trabalho.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela contribuição e disponibilidade em participar da avaliação desta dissertação.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada a todos!

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) é um problema de saúde global, com prevalência de 400 milhões de pessoas afetadas e pelo menos 1 milhão de mortes por ano. O HBV é um vírus hepatotrópico pertencente à família Hepadnaviridae e gênero *Orthohepadnavirus*. Seu genoma é composto por uma molécula de DNA circular parcialmente duplicada, com aproximadamente 3.200 pares de base e quatro regiões sobrepostas de leitura aberta. Clinicamente, o HBV pode manifestar-se em hepatite aguda ou crônica com progressão da doença principalmente para cirrose e hepatocarcinoma (HCC). O HBV possui uma ampla diversidade genética e é classificado em dez genótipos, designados de A a J, de acordo com a variabilidade das suas sequências, com distribuições geográficas distintas. Os genótipos do HBV podem influenciar nas características clínicas da doença e na resposta ao tratamento, assim como a presença de recombinantes inter ou intra-genotípicos e mutantes virais. O objetivo desse estudo é caracterizar os genótipos e subgenótipos do HBV, possíveis recombinantes e variantes virais em portadores crônicos do estado de Rondônia. Nesta proposta foram analisadas 40 amostras de soro de pacientes crônicos do HBV coletadas no ambulatório de hepatites virais do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM). As amostras incluídas neste estudo foram submetidas à extração de DNA e posteriormente à amplificação molecular por PCR de dois fragmentos dos genes S, P, C e X de 1.500 e 1.700 pb. Os produtos amplificados foram purificados e submetidos ao sequenciamento. A genotipagem viral foi realizada utilizando o programa MEGA 7.0 e a análise para a detecção de sequências virais recombinantes foi realizada com os programas SplitsTree4 e RDP4. A amplificação molecular foi possível de ser realizada para 17 casos. A presença do fragmento maior foi observada para 17 amostras, enquanto para o fragmento menor em 7 amostras. Um total de 12 sequências foram obtidas no sequenciamento de DNA. Foram encontrados a presença dos genótipos A, D e F na população estudada. A genotipagem das amostras mostrou uma maior frequência do genótipo A (50%; 6/12), seguido do genótipo D (33,4%; 4/12) e F (16,6%; 2/12). Dentro do genótipo A, o subgenótipo mais prevalente foi o A1 (83,4%; 5/6) e no D o D3 (50%; 2/4), enquanto para o genótipo F o único subgenótipo encontrado foi o F2. Na análise de mutações no genoma do HBV foram encontradas 10 substituições de nucleotídeos no gene C, 5 substituições de aminoácidos no gene S e 3 substituições de nucleotídeos no gene X. As alterações clínicas associadas à presença das substituições encontradas nesta análise incluem a redução ou ausência da secreção de HBeAg, progressão da hepatite B crônica para hepatocarcinoma e escape imunológico. Os dados obtidos nesse estudo refletem a diversidade genética do vírus da hepatite B, observada principalmente pela presença de variantes virais na população de Rondônia.

**Palavras chaves:** vírus da hepatite B. genotipagem. portadores crônicos.



## ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is a global health problem, with a prevalence of 400 million people affected and at least 1 million deaths a year. HBV is a hepatotropic virus belonging to the family Hepadnaviridae and genus Orthohepadnavirus. Its genome is composed of a duplicate partial circular DNA molecule with approximately 3,200 base pairs and four overlapping open reading regions. Clinically, HBV may manifest in acute or chronic hepatitis with progression of the disease mainly to cirrhosis and hepatocarcinoma (HCC). HBV has a wide genetic diversity and a classification in ten genotypes, designated from A to J, according to a variability of their sequences, with different geographic distributions. HBV genotypes can influence the clinical characteristics of the disease and the response to treatment, as well as a presence of inter- or intra-genotypic and viral mutant recombinants. The objective of this study is to characterize HBV genotypes and subgenera, referring to the research and viral variants in chronic Portuguese of the state of Rondônia. In this proposal, 40 serum samples from chronic HBV patients collected at the hepatitis virus outpatient clinic of the Research Center for Tropical Medicine of Rondônia (CEPEM) were analyzed. As samples included in the study were subjected to DNA extraction and subsequent to the molecular amplification of two fragments of the S, P, C and X genes of 1,500 and 1,700 bp. The amplified products were purified and subjected to sequencing. Viral genotyping was performed using the MEGA 7.0 program and analysis for the detection of recombinant viral sequences was performed with the SplitsTree4 and RDP4 programs. Molecular amplification was possible for 17 cases. The presence of the larger fragment was observed for 17 samples, whereas for the smaller fragment in 7 samples. A total of 12 sequences were obtained in DNA sequencing. The presence of genotypes A, D and F were found in the studied population. Sample genotyping showed a higher frequency of genotype A (50%, 6/12), followed by genotype D (33.4%, 4/12) and F (16.6%, 2/12). Within genotype A, the most prevalent subgenotype was A1 (83.4%, 5/6) and in D D3 (50%; 2/4), while for genotype F the only subgenotype found was F2. In the analysis of mutations in the HBV genome were found 10 nucleotide substitutions in the C gene, 5 amino acid substitutions in the S gene, and 3 nucleotide substitutions in the X gene. Clinical changes associated with the presence of substitutions found in this analysis include reduction or absence of HBeAg secretion, progression from chronic hepatitis B to hepatocarcinoma, and immune leakage. The data obtained in this study reflect the genetic diversity of the hepatitis B virus, observed mainly by the presence of viral variants in the population of Rondônia.

**Key words:** hepatitis B virus. genotyping. chronic carriers.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- ALT- Alanina aminotransferase
- Anti-HBc- Anticorpo contra proteína do “core” do HBV
- Anti-HBe- Anticorpo contra proteína “e” do HBV
- Anti-HBs- anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
- AST- Aspartato aminotransferase
- AuAg- Antígeno Austrália
- cccDNA- DNA circular covalentemente fechado (do inglês *circular covalently closed DNA*)
- BCP- Promotor Núcleo Basal
- HCC- Carcinoma hepatocelular
- HCV- Vírus da Hepatite C (do inglês, *hepatitis C virus*)
- HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, *human immunodeficiency virus*)
- HBcAg- Antígeno “core” do vírus da hepatite B
- HBeAg- antígeno “e” do vírus da hepatite B
- HBsAg- Antígeno de superfície do vírus da hepatite B ou antígeno “s” do vírus da hepatite B
- HBV- Vírus da hepatite B (do inglês, *hepatitis B virus*)
- IgG- Imunoglobulinas da classe G
- IgM- Imunoglobulinas da classe M
- NTCP- Polipeptídeo Cotransportador de Taurocolato de Sódio
- OBI- Infecção oculta pelo HBV
- OMS- Organização Mundial de Saúde
- ORF- Fase de leitura aberta (do inglês, *open reading frame*)
- PCR- Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)
- TGO- Transaminase Glutâmico Oxalacética
- TGP- Transaminase Glutâmico Pirúvica

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Distribuição global da hepatite B .....	15
<b>Figura 2-</b> Representação das partículas virais e subvirais do HBV.....	17
<b>Figura 3-</b> Estrutura da partícula do vírus da hepatite B.....	18
<b>Figura 4-</b> Organização genômica do vírus da hepatite B.....	19
<b>Figura 5-</b> Distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos do HBV.....	22
<b>Figura 6-</b> Representação esquemática do ciclo de replicação do HBV.....	25
<b>Figura 7-</b> Mutações de resistência aos antivirais.....	29
<b>Figura 8-</b> Curso sorológico típico da infecção aguda por HBV.....	33
<b>Figura 9-</b> Curso sorológico típico da infecção crônica por HBV.....	34
<b>Figura 10-</b> Curso sorológico da infecção oculta por HBV.....	35
<b>Figura 11-</b> Diagnóstico da hepatite B.....	39
<b>Figura 12-</b> Eletroforese em gel de agarose da PCR do fragmento do HBV.....	54
<b>Figura 13-</b> Eletroforese em gel de agarose da PCR do fragmento do HBV.....	54
<b>Figura 14-</b> Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S/S e P.....	57
<b>Figura 15 -</b> Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S2, S e P.....	58
<b>Figura 16-</b> Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S1, Pré-S2 e P.....	59
<b>Figura 17 -</b> Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene Pré- C/C.....	60
<b>Figura 18 -</b> Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene S e P....	61
<b>Figura 19 -</b> Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene S e P, P e X.....	62
<b>Figura 20-</b> Análise de rede referente ao fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S/S e P.....	64
<b>Figura 21-</b> Análise de rede referente ao fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S2, S e P.....	65
<b>Figura 22-</b> Análise de rede referente ao fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S1, Pré-S2 e P.....	66
<b>Figura 23-</b> Análise de rede referente ao fragmento do gene Pré-C/C.....	67
<b>Figura 24-</b> Análise de rede referente ao fragmento do gene S e P.....	68
<b>Figura 25-</b> Análise de rede referente ao fragmento do gene S e P, P e X.....	69

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1-</b> Resumo da associação entre os genótipos e subgenótipos do HBV, distribuição geográfica e implicações clínicas.....	23
<b>Tabela 2-</b> Descrição dos pares de iniciadores utilizados na PCR.....	47
<b>Tabela 3-</b> Sequências dos genótipos e subgenótipos do HBV utilizados nas análises com seus respectivos números de acesso ao GenBank e países de origem dos isolados.....	49
<b>Tabela 4-</b> Mutações associadas à resistência às drogas analisadas nas amostras LV1501, LV15376 e LV13431.....	51
<b>Tabela 5-</b> Substituições de nucleotídeos e de aminoácidos analisados no estudo associados às suas respectivas alterações clínicas.....	52
<b>Tabela 6-</b> Genótipos e subgenótipos dos pacientes incluídos neste estudo.....	55
<b>Tabela 7-</b> Características demográficas, sorológicas e de relevância clínica disponíveis nos prontuários analisados no estudo.....	71
<b>Tabela 8-</b> Substituições de nucleotídeos e aminoácidos encontrados nas sequências analisadas no estudo.....	72

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	14
1.1	ASPECTOS HISTÓRICOS.....	14
1.2	EPIDEMIOLOGIA DO HBV.....	14
1.2.1	<b>No mundo.....</b>	14
1.2.2	<b>No Brasil.....</b>	15
1.3	VÍRUS DA HEPATITE B.....	16
<b>1.3.1</b>	<b>Genoma do HBV.....</b>	18
<b>1.3.2</b>	<b>Genótipos do HBV.....</b>	20
<b>1.3.3</b>	<b>Replicação do HBV.....</b>	23
1.4	MUTAÇÕES NO GENOMA DO HBV.....	26
<b>1.4.1</b>	<b>Mutações na região pré-S/S.....</b>	26
<b>1.4.2</b>	<b>Mutações na região Pré-C/C.....</b>	27
<b>1.4.3</b>	<b>Mutações na região da polimerase (P).....</b>	28
<b>1.4.4</b>	<b>Mutações na região X.....</b>	30
1.5	INFECÇÃO MÚLTIPLA E RECOMBINAÇÃO.....	31
1.6	TRANSMISSÃO DO HBV.....	32
1.7	QUADRO CLÍNICO.....	32
<b>1.7.1</b>	<b>Infecção aguda.....</b>	33
<b>1.7.2</b>	<b>Infecção crônica.....</b>	34
<b>1.7.3</b>	<b>Infecção oculta.....</b>	35
1.8	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE B.....	36
<b>1.8.1</b>	<b>Diagnóstico inespecífico.....</b>	36
<b>1.8.2</b>	<b>Marcadores sorológicos do HBV.....</b>	36
1.8.2.1	HBsAg/Anti-HBs.....	36
1.8.2.2	HBeAg/Anti-HBe.....	37
1.8.2.3	HBcAg/Anti-HBc Total (IgG e IgM).....	37
<b>1.8.3</b>	<b>Marcadores moleculares do HBV.....</b>	38
1.9	TRATAMENTO.....	39
<b>1.9.1</b>	<b>Diretrizes terapêuticas nacionais estabelecidas pelo ministério da saúde para o tratamento da hepatite B crônica.....</b>	40
1.10	PROFILAXIA DA HEPATITE B.....	41
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	43
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	44
3.1	OBJETIVO GERAL.....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	45
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	45
4.2	LOCAL DO ESTUDO.....	45
4.3	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	45
4.4	AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	45
4.5	EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL.....	46
4.6	QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO.....	46
4.7	REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO.....	47

4.8	ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	47
4.9	PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	48
4.10	REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO.....	48
4.11	EDIÇÃO, ALINHAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	48
4.12	CARACTERIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS, SOROLÓGICAS E CLÍNICAS.....	50
4.13	ANÁLISE DESCRITIVA DE MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIAS ÀS DROGAS.....	51
4.14	ANÁLISE DESCRITIVA DE SUBSTITUIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS RELACIONADAS ÀS ALTERAÇÕES CLÍNICAS.....	52
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
5.1	AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	54
5.2	ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	55
<b>5.2.1</b>	<b>Genotipagem das amostras.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Análise de recombinação.....</b>	<b>63</b>
5.3	DADOS DEMOGRÁFICOS, SOROLÓGICOS E DE RELEVÂNCIA CLÍNICA.....	70
5.4	ANÁLISE DAS SUBSTITUIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS.....	72
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>96</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

A primeira descrição sobre a natureza infecciosa das hepatites virais foi publicada em 1885, por Lurmann, durante uma “epidemia de icterícia” em trabalhadores de estaleiros de Bremen, na Alemanha, vários meses após uma campanha de vacinação contra a varíola (LURMANN, 1885; MACCALLUM, 1972).

Em 1937, Findlay e MacCallum também relataram surtos de icterícia em pessoas que receberam a vacina contra febre amarela meses após sua administração. Posteriormente, em 1947, o termo hepatite B foi sugerido por MacCallum e aprovado pela Organização Mundial de Saúde (MACCALLUM, 1972; DA FONSECA, 2010; GERLICH, 2013).

A primeira sugestão sobre a descoberta de marcadores da hepatite B foi proposta, em 1963, pelo médico e geneticista norte-americano Baruch Blumberg, que ao estudar anticorpos contra lipoproteínas séricas em pacientes transfundidos, observou um novo antígeno na amostra de soro de um paciente aborígine australiano, o que deu origem ao nome Antígeno Austrália (AgAu). Este achado só foi publicado em 1965, no “*Journal of the American Medical Association (JAMA)*” com o título “*A New antigen in Leukemia sera*” (BLUMBERG, HARVEY, 1965). Em seguida, a relação do AgAu com o vírus da hepatite B foi confirmada, sendo posteriormente chamado de antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (PRINCE, 1968; GERLICH, 2013).

### 1.2 EPIDEMIOLOGIA DO HBV

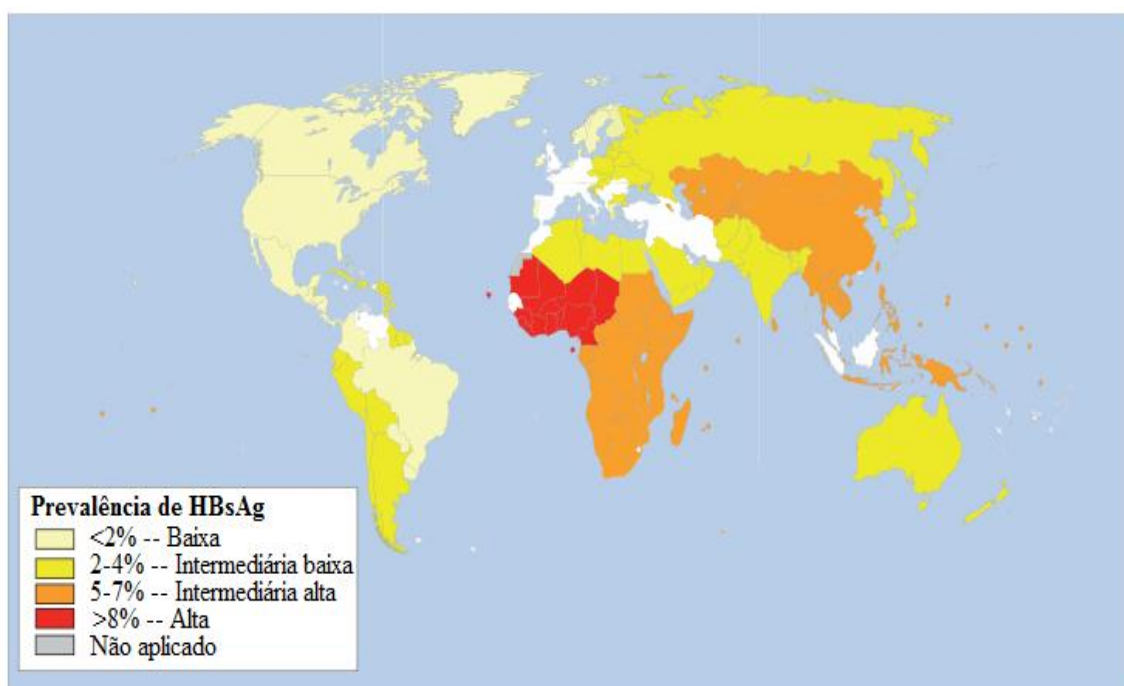
#### 1.2.1 No mundo

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) é um problema de saúde mundial, com prevalência de 400 milhões de pessoas afetadas e pelo menos 1 milhão de mortes por ano (NELSON, EASTERBROOK, MCMAHON, 2016; YU et al., 2016).

A endemicidade da hepatite B é classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de acordo com a prevalência do marcador sorológico de viremia, o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). Atualmente, a OMS, categoriza a endemicidade da hepatite B em baixa, intermediária-baixa, intermediária-alta e alta (WHO, 2015; SOUTO, 2016).

A prevalência do vírus da hepatite B é mais alta nas regiões da África Ocidental, sendo considerada uma área de alta endemicidade ( $> 8\%$  de prevalência), as regiões da África do Sul, Central, Leste da África Subsaariana e Leste Asiático, são consideradas de endemicidade intermediária-alta (5 a 7% de prevalência), áreas com prevalência intermediária-baixa (2% a 4%) incluem o Leste Europeu e Mediterrâneo Oriental. As Américas e regiões da Europa Ocidental são considerados de baixa endemicidade, com prevalência do HBsAg geralmente menor que 2%, conforme demonstrado na figura 1. Ao longo do tempo foi possível observar uma diminuição global da prevalência do HBsAg na maioria dos países, porém com aumentos notáveis na África e países da Europa Oriental (LOCARNINI et al., 2015; BLUM, 2016; NELSON; EASTERBROOK; MCMAHON, 2016).

Figura 1: Distribuição global da hepatite B.



Legenda: As cores representam a distribuição do antígeno de superfície do HBV (HBsAg). As áreas identificadas de vermelho são locais de alta prevalência com uma porcentagem superior a 8%. As regiões marcadas em alaranjado são consideradas de prevalência intermediária-alta com variação de 5 a 7%. As áreas identificadas de amarelo são locais de prevalência intermediária-baixa com variação de 2 a 4%. Regiões que apresentam percentual abaixo de 2% são classificadas como de baixa prevalência. Fonte: Adaptado de Locarnini, 2015.

### 1.2.2 No Brasil

Segundo o Ministério da Saúde entre o período de 1999 e 2015, mais de 196.000 casos de hepatite B foram notificados no Brasil, sendo que destes, o maior



número está concentrado na região Sudeste (35,5%), acompanhada das regiões Sul (31,4%), Norte (14,3%), Nordeste (9,4%) e Centro-Oeste (9,3%). Ao realizar uma comparação entre a proporção dos casos nos últimos três anos, verificou-se um padrão semelhante com um discreto aumento na proporção de casos na região Norte (BRASIL, 2016).

Estima-se que existam cerca de dois milhões de portadores crônicos do HBV no Brasil. Na região amazônica, particularmente no Acre, sul do Amazonas, Rondônia, Pará e noroeste de Mato Grosso 5% a 15% da população são portadores crônicos do vírus representando uma das incidências mais elevadas do mundo (CRUZ, SHIRASSU, MARTINS, 2009; SILVA et al., 2012; VIEIRA et al., 2015; SOUTO, 2016).

### 1.3 VÍRUS DA HEPATITE B

O vírus da hepatite B (HBV) é um vírus hepatotrópico pertencente à família Hepadnaviridae, a qual inclui uma variedade de vírus de aves e mamíferos semelhantes, e gênero *Orthohepadnavirus*. O HBV possui características estruturais peculiares, como: morfologia, material genético, organização do genoma e replicação (SHEN, YAN, 2014; YOU et al., 2014).

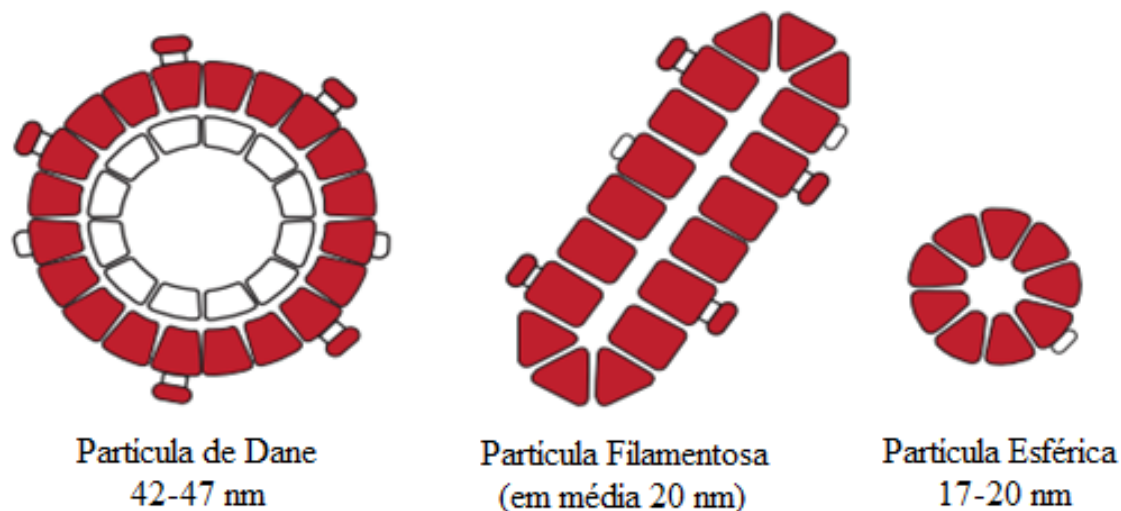
Ao contrário de outros vírus, o HBV produz três tipos distintos de partículas. Tais partículas podem ser esféricas de duplo invólucro (42 a 47 nm de diâmetro), filamentosas (20 nm de diâmetro) e esféricas (17 a 20 nm de diâmetro). As partículas com duplo invólucro de 42 a 47 nm, também denominadas de partículas de Dane, descritas pela primeira vez em 1970 por Dane, são as partículas verdadeiramente infecciosas, devido ser a única que contém o genoma do HBV para realizar a replicação viral (DANE, CAMERON, BRIGGS, 1970; DATTA et al., 2012).

Em infecções comuns pelo vírus da hepatite B (HBV) ocorre a produção excessiva de partículas não infecciosas. As partículas esféricas de 20 nm são produzidas até 1000 a 100.000 vezes mais que as partículas de Dane e as partículas filamentosas são produzidas em quantidades inferiores. A glicoproteína de superfície viral (HBsAg) é o principal componente das partículas esféricas e filamentosas, o que as caracteriza como altamente imunogênicas (BLUMBERG, 1977; DATTA et al., 2012).

A explicação para o excesso de partículas não infecciosas bem como sua função biológica ainda está sendo elucidada. Contudo, sabe-se que essas partículas

podem neutralizar os anticorpos produzidos pelo hospedeiro e dessa forma, aumentar a capacidade das partículas infecciosas para invadir as células de tropismo. As partículas virais (infecciosas) e subvirais (não infecciosas) estão representadas na figura 2 (CHAI et al., 2008; HU, LIU, 2017).

Figura 2: Representação das partículas virais e subvirais do HBV.

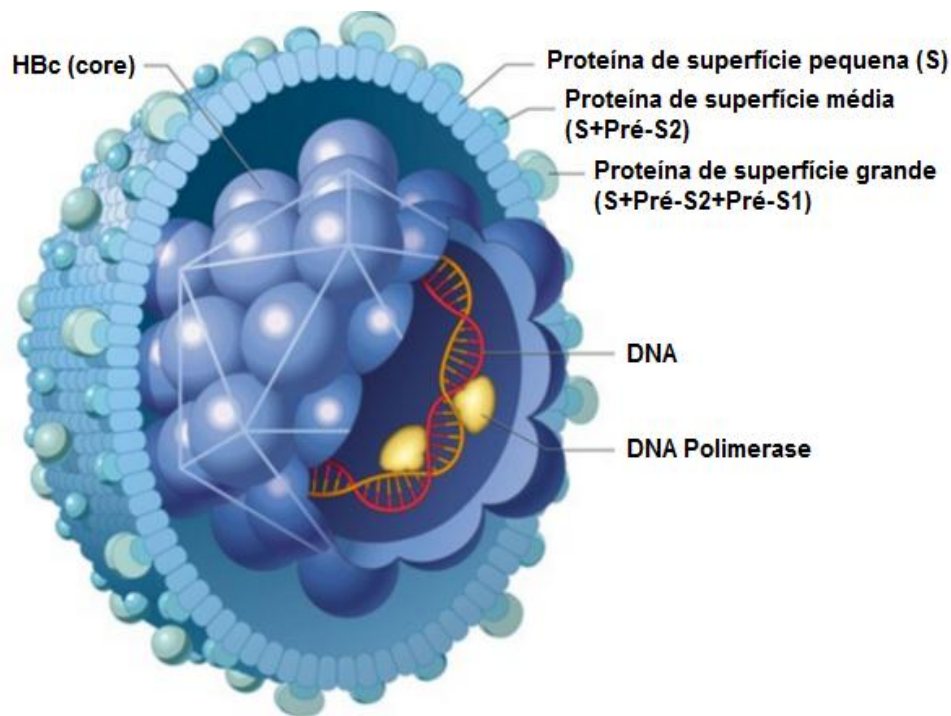


Legenda: Representação esquemática das diferentes formas das partículas infecciosas e não infecciosas do vírus da hepatite B. A partícula viral completa (partícula de Dane) mede 42 a 47 nm de diâmetro, a partícula filamentosa possui em média 20 nm e a partícula esférica aproximadamente 17 a 20 nm. Fonte: Adaptado de Brasil, 2015.

A partícula infecciosa (ou partícula de Dane) mede aproximadamente 42 nm de diâmetro e é constituída por um envelope lipoproteico com três proteínas de superfície distintas: grande (L), média (M) e pequena (S) que dão origem a glicoproteína de superfície viral (HBsAg). Na região mais interna está presente o nucleocapsídeo de aproximadamente 30 nm de diâmetro composto pelas proteínas do core (HBcAg), o DNA viral e a enzima DNA polimerase (BRASIL, 2015; JIANG et al., 2016).

O nucleocapsídeo e o envelope viral são sintetizados individualmente em compartimentos celulares distintos, interagindo subsequentemente para formar o vírion. As três proteínas do envelope viral são sintetizadas por uma única região de leitura aberta. A proteína de superfície grande engloba o domínio Pré-S1, Pré-S2 e S, a proteína média consiste do domínio Pré-S2 e S e a proteína pequena do domínio S. Essas proteínas de superfície constituem não só o envelope de partículas virais, mas também, compõe a estrutura de partículas subvirais, sem o genoma do HBV. A figura 3 ilustra a estrutura da partícula viral infecciosa (LE POGAM; SHIH, 2002; PATIENT et al., 2007; JIANG et al., 2016).

Figura 3: Estrutura da partícula do vírus da hepatite B (HBV).

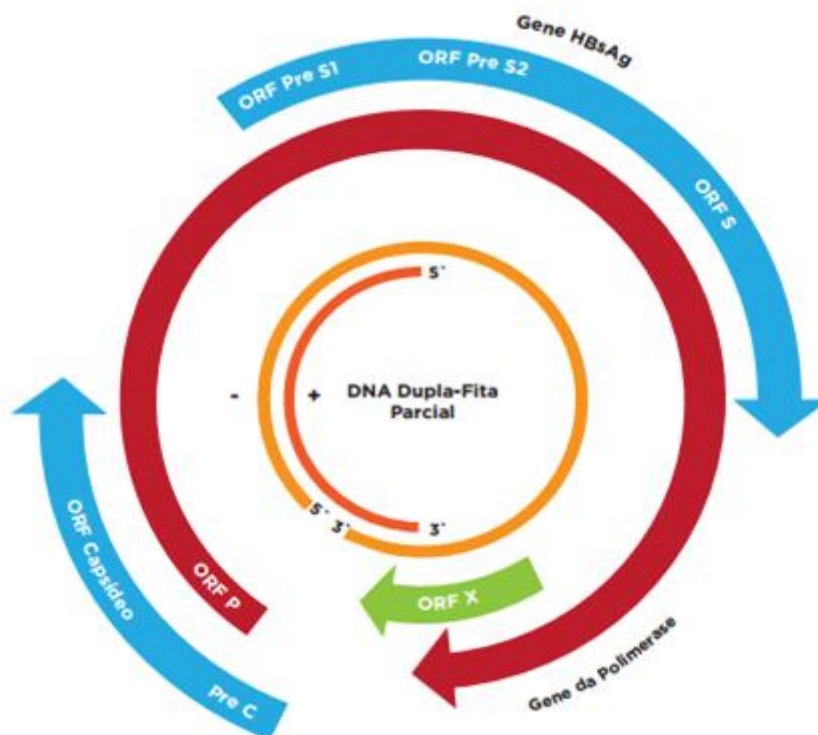


Legenda: A partícula viral do HBV possui aproximadamente 42nm de diâmetro, na parte externa está localizado o envelope lipoproteico, onde as proteínas de superfície, S, M e L estão organizadas. Na parte mais interna a proteína do core forma o nucleocapsídeo que possui função de proteger o genoma e a enzima viral. Fonte: Adaptado de Brasil, 2008.

### 1.3.1 Genoma do HBV

O genoma do HBV é composto por uma molécula de DNA circular parcialmente duplicada, com aproximadamente 3.200 pares de base. A fita completa possui polaridade negativa e a fita incompleta polaridade positiva correspondente a 50-70% do comprimento total da fita. Contém quatro regiões sobrepostas de leitura aberta (do inglês, *open reading frame* - ORF) que codificam o gene da proteína de superfície (S), o gene da polimerase (P), o gene das proteínas nucleares (Pré-C/C) e o gene X, de acordo com a figura 4 (GAO, DUAN, COFFIN, 2015; OHNO et al., 2015).

Figura 4: Organização genômica do vírus da hepatite B (HBV).



Legenda: O genoma do HBV codifica quatro regiões abertas de leitura (ORF), o gene S é responsável pela síntese das proteínas de superfície, o gene P origina a polimerase viral, o gene X codifica a proteína HBx e o gene C as proteínas HBe e HBc. Fonte: Brasil, 2015.

O gene S codifica as três proteínas de superfície do envelope do vírus denominadas proteína grande (L), proteína média (M) e proteína pequena (S). A proteína grande (L) é codificada pela tradução do domínio pré-S1, pré-S2 e S. O domínio pré-S1 é o substrato para a fixação do receptor viral. A tradução do domínio S e pré-S2 dão origem a proteína média (M). A proteína pequena (S) ou HBsAg é codificada apenas pela tradução do domínio S e considerada o principal componente do envelope, por induzir a produção dos anticorpos Anti-HBs (DATTA et al., 2012; LAMONTAGNE, R. J.; BAGGA, S.; BOUCHARD, 2015).

O gene C codifica o antígeno HBcAg, a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo. A região Pré-C/C é transcrita para uma proteína de fusão de pré-core / núcleo. Durante a entrada no retículo endoplasmático, alguns aminoácidos da proteína pré-core são clivados por uma peptidase sinal. Quando transportados para o compartimento de Golgi, os aminoácidos adicionais são removidos para formar o antígeno HBe. Este antígeno é secretado no soro e usado como marcador de replicação viral (QUARLERI, 2014; BAQAI et al., 2015; COPPOLA et al., 2015).

O gene P codifica a polimerase viral, uma enzima responsável pela replicação do genoma, com atividade de transcrição reversa. A polimerase viral possui quatro domínios: um domínio terminal, que serve como um iniciador de proteína para a transcrição reversa do RNA pré-genômico viral, uma região espaçadora sem nenhuma função aparente, o domínio da polimerase, que tem uma atividade de transcrição reversa e o domínio de RNase H, responsável pela degradação da matriz de RNA durante a transcrição reversa (DATTA et al., 2012; COPPOLA et al., 2015).

O gene X codifica a proteína HBx que possui função reguladora capaz de ativar a transcrição de genes virais e celulares com função importante no estabelecimento da infecção e replicação viral. Além disso, estudos mais recentes demonstraram que a proteína HBx parece estar envolvida nos processos de carcinogênese (GAO; DUAN; COFFIN, 2015; GENG et al., 2015; LIU, KOH, LEE, 2016).

### **1.3.2 Genótipos do HBV**

Anteriormente, o HBV era classificado em nove subtipos sorológicos em conformidade aos determinantes antigênicos do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) em adw (adw2 e adw4), ayw (ayw1, ayw2, ayw3 e ayw4), adr (adrq+ e adrq-) e ayr (NORDER et al., 2004; SITNIK et al., 2004). Um estudo comparativo entre sequências completas de nucleotídeos de 18 cepas do HBV realizado por Okamoto e colaboradores, em 1988, deu origem à classificação dos primeiros genótipos do vírus. Desde então, o HBV tem sido classificado em 10 genótipos (A-J), de acordo com a variabilidade das suas sequências, com distribuições geográficas distintas. Alguns genótipos do HBV podem ainda ser classificados em subgenótipos. As sequências do HBV variam em torno de 8% entre os genótipos, e 4% entre os subgenótipos (YANO; AZUMA; HAYASHI, 2015; ZHANG et al., 2015).

O Genótipo A é encontrado na África Subsaariana, Europa do Norte e África Ocidental (SUNBUL, 2014). Esse genótipo é subdividido em sete subgenótipos (A1-A7). Os subgenótipos A1, A3, A4 e A5 são endêmicos na África, especialmente na África ocidental, enquanto o subgenótipo A2 é endêmico na Europa (CAO, 2009). O subgenótipo A6 inclui cepas de pacientes africanos-belgas de Congo e Ruanda e o

subgenótipo A7 foi achado em Ruanda e Camarões (KIM; REVILL; AHN, 2011; ALVARADO-MORA; REBELLO PINHO, 2013).

Os genótipos B e C são frequentes na Ásia (LIN, KAO, 2011; SUNBUL, 2014). Os subgenótipos B2 e C2 são endêmicos na maior parte da Ásia. O subgenótipo B1 é endêmico no Japão. O subgenótipo C4 é encontrado em aborígenes da Austrália e frequentemente denominado como a estirpe de aborígenes australianos. Os subgenótipos B3-B8, C1, C3 e C5-C8 foram isolados no sul da Ásia, principalmente na Indonésia e nas Filipinas(CAO, 2009). No Brasil, especificamente nos estados de São Paulo e Paraná, houve uma grande migração de descendentes da Ásia Oriental, portanto, os genótipos C (subgenótipo C2) e B são encontrados nessas regiões (ALVARADO-MORA; REBELLO PINHO, 2013).

O genótipo D é prevalente na África, Europa, países do Mediterrâneo, e na Índia(SUNBUL, 2014; OZARAS et al., 2015). O subgenótipo D1 é predominante na etnia muçulmana. O subgenótipo D2 é endêmico na Rússia e na região do Báltico. Os subgenótipos D2, D3 e D5 foram encontrados na Índia. Os subgenótipos D4 e D6 são endêmicos na Oceania e na Indonésia, respectivamente. Um subgenótipo descoberto mais recentemente D7 foi encontrado na Tunísia (CAO, 2009; LIN; KAO, 2011).

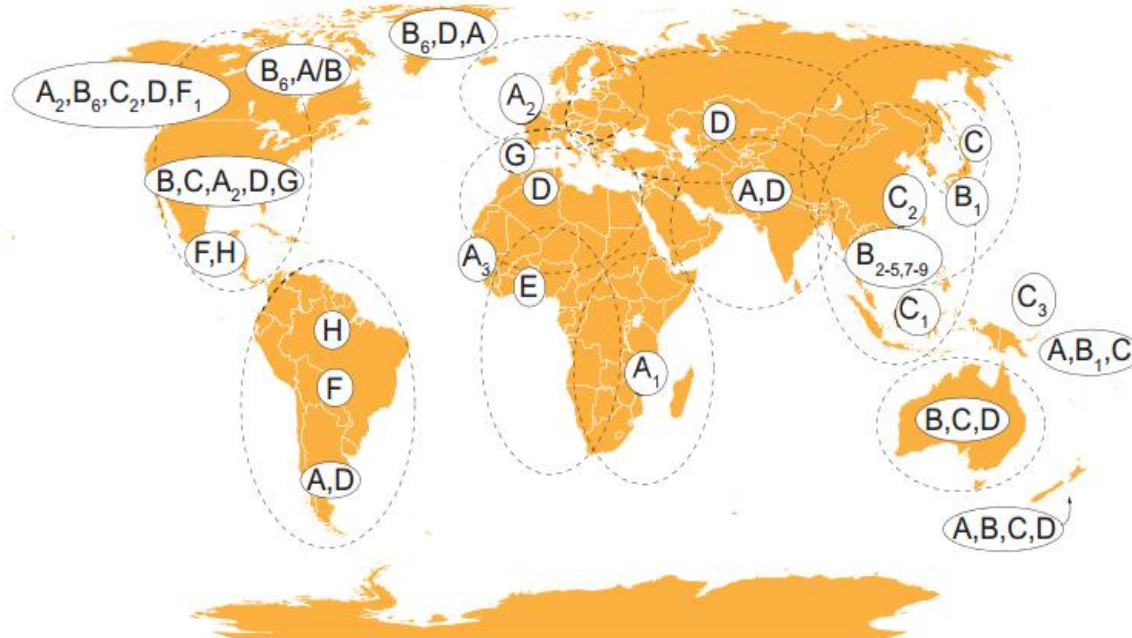
O genótipo E é endêmico na África Ocidental e Central (OZARAS et al., 2015). Os genótipos F, G e H são endêmicos na América, sendo o genótipo G mais relatado na França, Alemanha e Estados Unidos e o genótipo H é mais comumente encontrado na América do Sul e Central (KAO, 2011; KRAMVIS, 2014).

Recentemente, dois novos genótipos foram caracterizados: I no Vietnã e Laos e o genótipo J de um paciente japonês que residia em Bornéu, proposto como um vírus recombinante isolado em humanos e gibão, nas Ilhas Ryukyu, no Japão (KRAMVIS, 2014; TIAN; JIA, 2016).

Várias estirpes do genótipo F foram isolados em diferentes países da América, particularmente entre populações ameríndias, e quatro subgenótipos foram descritos com divergência genética entre 4,3-6,1%. Embora haja uma alta prevalência do genótipo H no México, em outros países da América Latina, o genótipo F prevalece com exceção do Brasil, onde o genótipo A é o mais endêmico. A figura 5 representa a

distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos da hepatite B (DIAS et al, 2012; ALVARADO-MORA; REBELLO PINHO, 2013).

Figura 5: Distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos do HBV.



Legenda: O Genótipo A é encontrado na África Subsaariana, Europa do Norte e África Ocidental. Os genótipos B e C são frequentes na Ásia. O genótipo D é prevalente na África, Europa, países do Mediterrâneo, e na Índia. O genótipo E é endêmico na África Ocidental e Central. Os genótipos F, G e H são endêmicos na América. Os genótipos I e J não são apresentados porque não foram ratificados pela ICTV; O genótipo I é encontrado no Vietnã e Lao, enquanto o genótipo J foi identificado a partir de uma pessoa japonesa que residia em Borneu. Fonte: Locarnini, 2015.

A associação entre os diferentes genótipos do HBV com a progressão da doença e a resposta às terapias antivirais tem sido relatada. O genótipo A está associado a um maior risco de evolução para a cronicidade em infecções por HBV adquiridas em adultos jovens e idosos (ITO et al., 2014). O genótipo B tem sido descrito como o mais prevalente em adultos jovens com HCC (KAO et al., 2000). O genótipo C está associado à soroconversão do HBeAg mais tardia e doença do fígado mais avançada (KAO et al., 2004). O genótipo D é particularmente associado com as mutações pré-core e HBeAg negativo na hepatite B crônica (CHU et al., 2003). Os genótipos prevalentes em parte da África Ocidental, Central e América do Sul, E, F, G e H são pouco estudados. O resumo da associação entre os genótipos, subgenótipos, distribuição geográfica e implicações clínicas dos genótipos são descritas na tabela 1 (KAO, 2011; CROAGH; DESMOND; BELL, 2015).

Tabela 1: Resumo da associação entre os genótipos e subgenótipos do HBV, distribuição geográfica e implicações clínicas.

Genótipo	Subgenótipo	Distribuição Geográfica	Implicações Clínicas
<b>A</b>	A1-A7	África Subsaariana, Europa do Norte e África Ocidental.	Está associado ao desenvolvimento de HCC e cirrose em adultos jovens e pessoas idosas.
<b>B</b>	B1-B8	Japão, leste asiático, Alasca, Norte do Canadá e Groelândia.	Está associado ao desenvolvimento de HCC e cirrose em adultos jovens.
<b>C</b>	C1-C8	China, Coreia, Sudeste Asiático, Japão, Ilhas do Pacífico Sul e Austrália.	Está associado ao desenvolvimento de HCC e cirrose. A soroconversão de HBeAg ocorre mais tardiamente do que em outros genótipos.
<b>D</b>	D1-D7	Rússia, Oriente Médio, Mediterrâneo, Mongólia, África do Norte, Europa, Subcontinente indiano, Ártico, América do Norte e do Sul e Austrália.	Está associado a mutações pré-core, HBeAg negativo, HCC e cirrose em idosos.
<b>E</b>	-	África Ocidental e Central.	-
<b>F</b>	F1-F4	América Central, América do Sul e Alasca.	-
<b>G</b>	-	Europa, Estados Unidos e América do Norte.	-
<b>H</b>	-	América Central e Região Amazônica.	-
<b>I</b>	-	Vietnã e Laos.	-
<b>J</b>	-	Ilhas Ryukyu do Japão.	-

Fonte: Adaptado de Ozaras et al, 2015.

### 1.3.3 Replicação do HBV

O vírus da hepatite B infecta preferencialmente hepatócitos. Os proteoglicanos de heparan sulfato (PGHS) e o cotransportador de taurocolato de sódio (NTCP) foram recentemente identificados como receptores para a entrada viral do HBV, o que contribuiu para a compreensão dos mecanismos moleculares da infecção (YANG et al., 2015; INOUE; TANAKA, 2016; LI; URBAN, 2016).



O ciclo de replicação do HBV inicia-se com a entrada do vírus na célula hospedeira, mediada pela ligação do domínio Pré-S1 do envelope viral ao receptor de superfície celular, através do mecanismo de endocitose regulado por clatrin (INOUE; TANAKA, 2016; KIM; KANG; KIM, 2016).

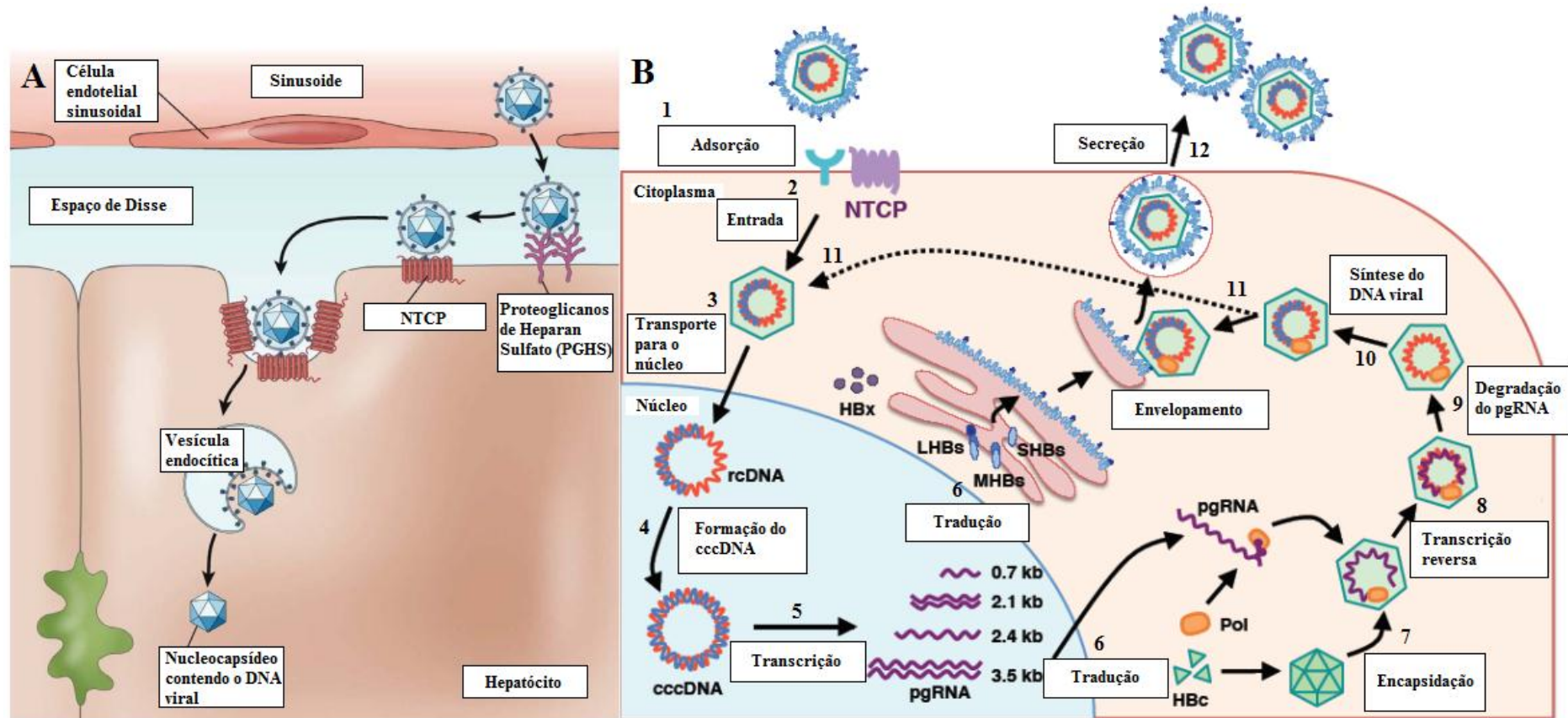
Após invadir a célula, o vírus sofre desencapsulamento e o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma. Logo depois, ocorre a importação da partícula viral para o núcleo. Na membrana nuclear, ocorre um processo de desintegração do capsídeo viral com a consequente liberação do material genético para o seu interior (KIM; KANG; KIM, 2016; TONG; REVILL, 2016).

Dentro do núcleo, a fita incompleta de DNA é reparada e convertida a uma estrutura denominada de cadeia circular covalentemente fechada ou cccDNA, molécula responsável pela persistência viral e recorrência da infecção por HBV. O cccDNA serve de molde para a transcrição dos RNAs mensageiros virais: o RNA pré-genômico (RNAPg), o RNA pré-core, o RNA Pré-S/S e o RNA HBx. A partir do RNAPg ocorre a síntese das proteínas do núcleo e da polimerase, assim como a produção do DNA do HBV através de transcrição reversa (SEEGER, MASON, 2016; KO, MICHLER, PROTZER, 2017).

Os RNAs virais transcritos a partir do cccDNA no núcleo, são transportados até o citoplasma e traduzidos em proteínas virais. O RNAPg e a polimerase viral são encapsulados, pelo auxílio de chaperonas celulares, e em seguida inicia-se a transcrição reversa a partir do RNAPg para gerar a fita completa de DNA de polaridade negativa. O RNAPg é simultaneamente degradado pela atividade de uma RNase H e a fita de DNA incompleta de polaridade positiva é sintetizada a partir do molde recém transcrito de cadeia negativa (INOUE, TANAKA, 2016; TONG, REVILL, 2016).

Uma vez formada a partícula viral, o nucleocapsídeo pode interagir com as proteínas do envelope no retículo endoplasmático para formar vírions maduros que serão segregados da célula hospedeira, ou como alternativa, pode retornar ao núcleo do hepatócito, servindo como novas fontes de cccDNA, conforme ilustrado na figura 6 (SEEGER; MASON, 2016; KO; MICHLER; PROTZER, 2017).

Figura 6: Representação esquemática do ciclo de replicação do HBV.



Legenda: A- Interação do domínio Pré-S1 do HBV através de uma ligação inespecífica a proteoglicanos de heparan sulfato e específica ao cotransportador de taurocolato de sódio (NTCP). B- (1) Adsorção, o vírus reconhece a célula através da interação do domínio Pré-S1 a receptores específicos. (2) Entrada, o vírus entra na célula através do mecanismo de endocitose mediado por clatrina e em seguida, sofre desencapsulamento (3) O nucleocapsídeo é transportado até o núcleo celular, na membrana nuclear ocorre a desintegração do capsídeo viral (4) Através do processo de reparo da cadeia relaxada de DNA (rcDNA) ocorre a formação do cccDNA, (5) transcrição dos RNAs mensageiros e RNAs pg, (6) tradução das proteínas virais, (7) encapsidação do RNAs pg e da polimerase viral (8) transcrição reversa a partir do RNAs pg para a síntese da fita de DNA negativa (completa) (9) Degradação do RNAs pg (10) síntese da fita de DNA positiva (incompleta) a partir do molde recém transcrito de cadeia negativa, (11) envolvimento ou reimportação da partícula viral para o núcleo, (12) secreção dos vírions. Fonte: Adaptado de Urban et al., 2014; Adaptado de Watashi et al., 2014.

## 1.4 MUTAÇÕES NO GENOMA DO HBV

As mutações podem ocorrer em qualquer gene do HBV e causas relativas ao hospedeiro, como a resposta imune do indivíduo ou tratamento com antivirais, e as características do próprio vírus, como a capacidade de replicação, podem determinar essas mutações (CALIGIURI et al., 2016). A ausência de atividade revisora e corretora da transcriptase reversa resultam em erros espontâneos na replicação do vírus, favorecendo o aumento das taxas de mutações. Dessa forma, várias mutações podem ser observadas no genoma do HBV durante a infecção a longo prazo, e esses mutantes estão relacionados à diferentes apresentações clínicas da doença (CHOTIYAPUTTA, LOK, 2009; YU et al., 2016).

### 1.4.1 Mutações na região Pré-S/S

A região pré-S/S codifica as três proteínas presentes na superfície do vírus da hepatite B. Essa região apresenta uma taxa relativamente alta de mutações se comparada às outras ORFs. As mutações pontuais que ocorrem no gene pré-S/S podem afetar a secreção e a expressão do antígeno de superfície viral (HBsAg), podendo levar a falha na sua detecção. Adicionalmente, essas mutações podem exercer um efeito negativo sobre o HBsAg, suprimindo a replicação viral (LADA et al., 2006; POLLICINO et al., 2007; HUANG et al., 2012; ZHU et al., 2016).

As substituições de aminoácidos (aa) dessa região estão frequentemente relacionadas ao determinante “a” localizado no aa124-147 da proteína S. O determinante “a” é rico em cisteína formada por duas voltas de ligação dissulfeto para sustentar a estrutura conformacional e antigenicidade do HBsAg. As posições dos aminoácidos entre 99 e 169 são chamadas de grande região hidrofílica (FCM), em que o “a” determinante está situado, sendo o alvo principal de neutralização dos anticorpos (CALIGIURI et al., 2016; ZHU et al., 2016).

As mutações que provocam mudança conformacional dentro do determinante “a” afetam a antigenicidade do HBsAg, principalmente para a indução de anticorpos, sendo responsável pelo escape imune, escape vacinal, escape a terapia com imunoglobulina humana específica anti-hepatite B, resultados sorológicos falsos-

negativos e desenvolvimento de HCC (WU et al., 2012; KIM et al., 2013; COPPOLA et al., 2015; CALIGIURI et al., 2016).

Várias mutações na região S têm sido descritas na literatura. A maioria dessas mutações está localizada na região S e com menor frequência nas regiões pré-S1 e pré-S2. As mutações na região S têm sido identificadas em vários genótipos do HBV, enquanto que as mutações encontradas nas outras duas regiões têm sido mais observadas em pacientes com genótipo C (HUANG et al., 2012; COPPOLA et al., 2015; MIRABELLI et al., 2015).

A mutação pontual mais frequentemente relatada é a mutação que ocorre dentro do “a” determinante, G145R, responsável pelo escape vacinal, podendo infectar indivíduos anti-HBs positivos por reduzir a ligação do anticorpo anti-HBs (CHAKRAVARTY et al., 2002; THAKUR et al., 2005). Além dessa mutação, a K141E e a T131I podem afetar a estrutura do HBsAg. Mais recentemente outras substituições do “a” determinante foram descritas e associadas ao escape vacinal, isto é: T116N, P120S/E, I/T126A/N/I/S, Q129H/R, M133L, K141E, P142S e D144A/E) (BASUNI et al., 2004; STICCHI et al., 2013; GAO; DUAN; COFFIN, 2015).

#### **1.4.2 Mutações na região Pré-C/C**

A região Pré-C/C do HBV está dividida em pré-core e core. A proteína pré-core contém toda sequência da proteína do núcleo mais 29 aminoácidos no seu N-terminal. Os primeiros 19 desses 29 aminoácidos servem como peptídeo sinal para dirigir a proteína para o retículo endoplasmático (RE), onde é clivada e posteriormente transportada até a superfície celular para ser segregada como um antígeno solúvel (KAY, ZOULIM, 2007; LAZAREVIC, 2014).

Algumas mutações da região Pré-C/C têm sido associadas a eventos clínicos significativos, tais como a soroconversão de HBeAg e a progressão da doença hepática. Anteriormente, a perda de HBeAg era considerada um marcador de fim de replicação viral e resolução da infecção. Porém, estudos realizados recentemente indicaram que a perda de HBeAg pode ser seguida de replicação e evolução da doença do fígado (KIM et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

As mutações que ocorrem na região do promotor núcleo basal (BCP) parecem modular a secreção de HBeAg a nível de transcrição e as mutações que ocorrem na região pré-core bloqueiam a produção de HBeAg a nível de tradução. Observa-se que as mutações do BCP são detectadas na fase tardia da infecção em que o HBeAg encontra-se positivo, enquanto que as mutações pré-core surgem durante a soroconversão para anti-HBe. Com isso, a ordem sugerida dos eventos é que o vírus inicialmente reduz a expressão de HBeAg através da mutação na região BCP e, em seguida, suprime a expressão completa de HBeAg com as mutações pré-core (LAZAREVIC, 2014; TSENG et al., 2015).

A mutação mais encontrada na região pré-core é a mutação G1896A, responsável pela supressão de HBeAg a nível de tradução. A mutação mais comum na região BCP é a mutação dupla A1762T e G1764A com consequente diminuição da expressão de HBeAg, além de representarem risco elevado para o desenvolvimento de HCC (BUCKWOLD et al., 1997; PARK et al., 2014; GAO; DUAN; COFFIN, 2015). Outras mutações individuais na região pré-C/C estão associadas ao aumento da capacidade de replicação e diminuição da expressão de HBeAg, incluindo as mutações T1753V (C/A/G), C1766T, T1768A, G1862T e G1899A (SAINOKAMI et al., 2007; LIAO et al., 2012; ZHANG et al., 2016).

### **1.4.3 Mutações na região da polimerase (P)**

A região P codifica a proteína da polimerase viral. Com exceção dos intérferons todos os outros medicamentos aprovados para o tratamento do HBV são análogos de nucleosídeos que têm como alvo a atividade da enzima DNA polimerase. O tratamento com essas drogas é normalmente eficaz e bem tolerado. No entanto, a resistência a alguns desses fármacos é um problema que afeta a terapia a longo prazo (YUEN et al., 2007; ZHANG et al., 2016).

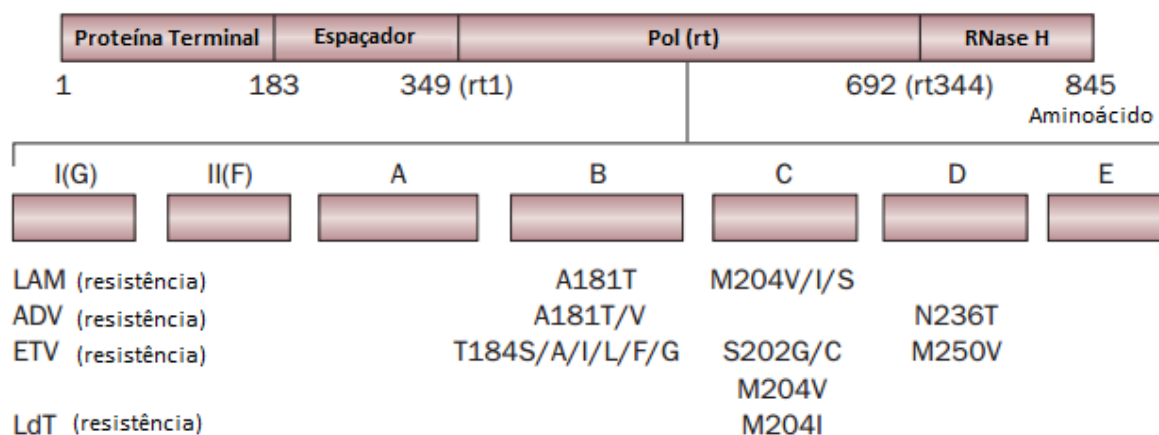
Os análogos de nucleosídeos têm uma estrutura semelhante aos nucleotídeos naturais, porém com uma mudança no grupo do anel de açúcar ou de base, de modo que o análogo possa competir com os nucleotídeos naturais na ligação da polimerase (LAZAREVIC, 2014; GAO; DUAN; COFFIN, 2015).

A resistência às drogas antivirais está relacionada à uma combinação de fatores virais e do hospedeiro que incluem a meia-vida longa de hepatócitos infectados (30 a

100 dias), a variabilidade genética natural do HBV e a seleção de mutações adaptativas que reduzem a sensibilidade dos mutantes para os efeitos inibidores de um fármaco (ZOULIM; LOCARNINI, 2009; LAZAREVIC, 2014).

Até o momento, quatro importantes vias de resistência às drogas foram identificadas: a via de L-nucleosídeos que é caracterizada pela mutação:rtM204V/I que resulta em resistência à lamivudina (LAM) e telbivudina (LDT), a via açúcar acíclico/fosfonato de alquilo a qual é identificada pela presença de substituição da mutação rtN236T que conduz resistência ao adefovir (ADF) e susceptibilidade reduzida ao tenofovir (TDF), o caminho que é compartilhado por ambas L-nucleosídeos (LAM, LDT, sensibilidade reduzida ao TDF) e ADF pelo surgimento de rtA181T/V, o percurso D-cyclopentante que é caracterizada pela presença de mutações rtL180M e rtM204V/I, sendo que esta última pode estar acompanhada de mutações compensatórias (rtL80V/I, rtI169T, rtV173L, rtV173L, rtT184S/L, rtS202I, rtQ215S), capazes de restaurar a capacidade de replicação para níveis próximos do tipo selvagem. A figura 7 demonstra as mutações de resistência aos antivirais utilizadas no tratamento da hepatite B crônica (LOCARNINI, 2008; TENNEY et al., 2009; GAO; DUAN; COFFIN, 2015).

Figura 7: Mutações de resistência aos antivirais.



Legenda: A polimerase do HBV compreende quatro regiões: uma proteína terminal para iniciar a replicação do HBV, um espaçador com função desconhecida, uma região de transcriptase reversa para replicação viral e uma região RNase H para degradação do RNA pré-genômico. A região da transcriptase reversa (rt 1-344) é dividida em domínios de A-G. Abreviações: LAM, lamivudina; ADV, adefovir; ETV, entecavir; LdT, telbivudina.

Devido à sobreposição dos genes da polimerase e do envelope do genoma do HBV, o tratamento com análogos de nucleosídeos pode levar ao aparecimento de

mutantes complexos do HBV, que abrigam mutações tanto na região RT da polimerase quanto nas proteínas do envelope. Mutações triplas (rtV173L+rtL180M+rtM204V) provocam alterações de aminoácidos no gene de superfície e promovem um efeito comparável ao escape vacinal do mutante G145R. Mutações adicionais atualmente conhecidas como mutações de resistência clássica (rtN53T, rtS78T, rtS85F, rtS135T, rtA181I, rtA200V, rtK212Q, rtL229V / F, rtM309K), podem contribuir para o desenvolvimento de resistência aos medicamentos (TORRESI et al., 2002; YEH, 2010; LAZAREVIC, 2014).

#### 1.4.4 Mutações no gene X

O gene X codifica uma proteína não estrutural multifuncional denominada proteína X. A proteína HBx contém 465 pb e apresenta uma função na transativação da transcrição de vários genes celulares e virais sendo necessária para a transcrição eficiente do RNA viral a partir do cccDNA presente nos hepatócitos infectados (KIM; LEE; KIM, 2016).

A proteína HBxAg desempenha um papel importante na replicação do HBV, o que representa um fator de risco para o desenvolvimento de HCC através da inibição do proteossoma, da transativação dos promotores do HBV, da indução a autofagia e da ativação da polimerase dependente de sinalização de  $Ca^{2+}$ . HBx pode auxiliar no estabelecimento e manutenção da infecção crônica, alterando os padrões da imunidade natural, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da doença hepática crônica e para a persistência do vírus. Além disso, HBx é capaz de inativar o gene supressor tumoral p53 podendo aumentar o risco de desenvolver HCC (CHIRILLO et al., 1997; HU et al., 1999; WANG; ZENG; CHEN, 2016).

As mutações que ocorrem na região X podem afetar outras regiões como a região promotora do núcleo (BCP), devido a sua sobreposição, e a capacidade de ligação de proteínas do hospedeiro. Vários tipos de mutações nessa região estão associados à gravidade clínica dos pacientes com infecção crônica, sendo mais comumente encontradas no genótipo C (LEE et al., 2011; XIE et al., 2014).

A mutação na região BCP A1762T/G1764A é uma das mais frequentes e resulta na substituição de dois aminoácidos na região XK130M e V131I associadas ao risco de HCC. Outras mutações na região X também estão relacionadas com a evolução da

doença hepática, tais como: V5M/L, P38S, H94Y, I127T/N (KIM, 2014; KIM; LEE; KIM, 2016; LEE et al., 2016).

### 1.5 INFECÇÃO MÚLTIPLA E RECOMBINAÇÃO

A recombinação do vírus da hepatite B é consequência da co-infecção de um hospedeiro com mais de um genótipo ou subgenótipo. Sendo assim, diferentes estirpes de HBV podem compartilhar seu material genético dentro da célula hospedeira. A recombinação ocorre com mais frequência em regiões em que há dois ou mais genótipos circulantes e em locais onde o índice de cronicidade é elevado. As estirpes recombinantes tem sido relatadas em maior número na Ásia Oriental e África, onde a endemicidade do HBV é considerada alta (SIMMONDS, MIDGLEY et al., 2005; POURKARIM et al., 2014).

Atualmente são conhecidas mais de 30 linhagens recombinantes. A recombinação pode ocorrer entre estirpes com elevada homologia genética, ou seja, quando um indivíduo é infectado com dois subgenótipos diferentes de um único genótipo. Esse tipo de recombinação, denominada de intra-genotípica, é mais comum entre os subgenótipos B2 e B5 e entre os subgenótipos B1 e B6. Além disso, a recombinação pode ocorrer entre duas cepas de genótipos distintos, o que caracteriza a recombinação inter-genotípica (SIMMONDS, MIDGLEY et al., 2005; POURKARIM et al., 2014).

A existência de recombinação pode resultar em erros na classificação da genotipagem ou subgenotipagem do HBV. Em vários casos, estirpes recombinantes do HBV já foram classificadas como novos genótipos ou subgenótipos. A explicação para esse equívoco pode estar relacionada à avaliação incompleta da amostragem, com pequeno conjunto de dados, e análises de sequências de genoma parcial, o que resulta em falsas filogenias. (KURBANOV et al., 2008; AHN; YUEN; REVILL, 2009; SCHAEFER; MAGNIUS; NORDER, 2009).

A análise de recombinação é um aspecto virológico importante e por esse motivo deve ser avaliada cuidadosamente. Para isso, vários métodos de análises filogenéticas e bioinformática têm sido descritos para detectar possíveis evidências de recombinação (POSADA, 2000; POURKARIM et al., 2014).



## 1.6 TRANSMISSÃO DO HBV

O vírus da hepatite B (HBV) é considerado bastante infeccioso, visto que apenas uma só partícula viral pode infectar o ser humano. Inicialmente o vírus circula no sangue e replica-se nos hepatócitos com uma produção de vírions em média de  $10^{11}$  (100.000.000.000 cópias/mL) vezes por dia, mais infeccioso que o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da hepatite C (HVC). O HBV é estável e resistente ao meio ambiente, podendo permanecer vivo até uma semana fora do organismo humano (FONSECA, 2007; LAMONTAGNE, R. J.; BAGGA, S.; BOUCHARD, 2015).

A transmissão do vírus da hepatite B ocorre principalmente por contato com sangue contaminado ou outros líquidos corporais. Dessa forma, a infecção pode acontecer por relação sexual, transfusão de sangue ou hemoderivados, uso de drogas injetáveis, compartilhamento de seringas, acidentes de laboratório com material perfurocortante e transmissão de mãe para filho intrauterina, perinatal ou pós-parto. A transmissão perinatal é responsável pela grande maioria dos casos de disseminação do HBV em locais de alta endemicidade com taxa de até 90% de chance de evolução para o estado crônico da doença (NELSON; EASTERBROOK; MCMAHON, 2016; CHAMROONKUL; PIRATVISUTH, 2017).

## 1.7 QUADRO CLÍNICO

A infecção causada pelo vírus da Hepatite B pode resultar em quadros clínicos distintos, incluindo a hepatite aguda e crônica. Após o período de incubação que pode variar de 45 a 180 dias, os indivíduos infectados desenvolvem quadro de hepatite aguda, em grande parte dos casos subclínica e anictérica (FERREIRA, 2000).

O risco de desenvolver hepatite crônica é maior na infância em decorrência da imaturidade do sistema imunológico e imunotolerância provocada pela passagem transplacentária do HBeAg. As chances de evolução da hepatite B para a forma crônica são maiores que 90% em recém-nascidos de mães HBeAg-positivos, seguidas de 25% a 35% em lactantes e crianças menores de 5 anos e 6% em crianças com idade entre 5 e 15 anos (NI, 2011; CHOE; CHOE, 2014; KRAMVIS, 2016).

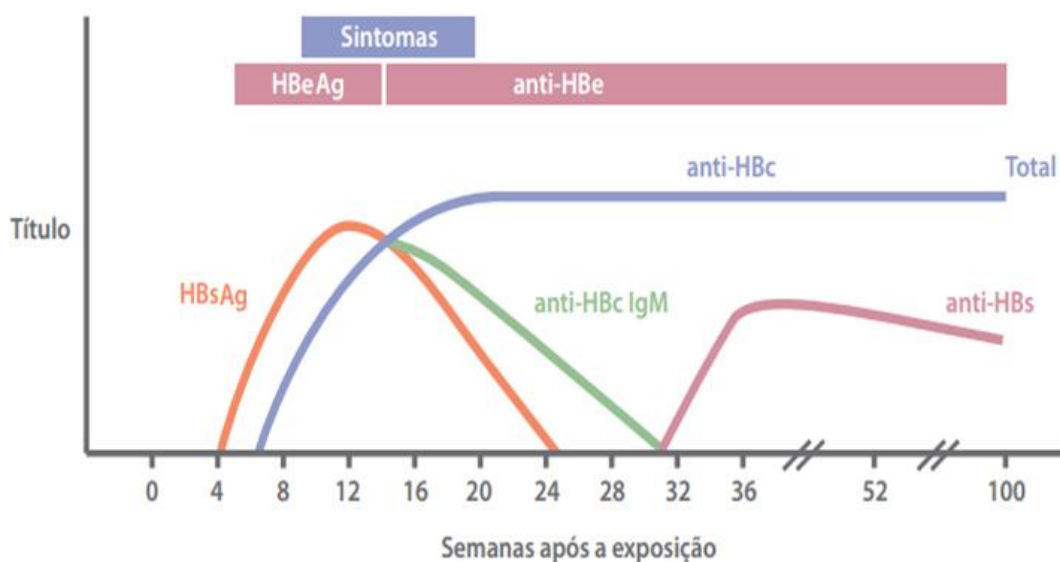
Nos adultos a infecção pelo vírus da hepatite B é geralmente auto-limitada sendo que menos de 5% evoluem para a forma crônica da doença, e cerca de

1% evoluem para insuficiência hepática. Além da idade, o curso clínico da infecção por HBV depende de outros fatores como: sexo, gravidez e estado imune do hospedeiro. A história natural da infecção é mediada pela interação entre o vírus e a resposta imunológica do hospedeiro, o que contribui para a eliminação do vírus (LIANG, 2009; HAN et al., 2014).

### 1.7.1 Infecção aguda

A fase inicial da infecção aguda pelo HBV é marcada pelas altas taxas de replicação durante as semanas ou meses que precedem o reconhecimento imunológico. Após essa fase, ocorre uma resposta imune intensa capaz de suprimir a replicação viral e eliminar grande parte do HBV presente nas células hepáticas, caracterizando a hepatite aguda. A detecção dos antígenos virais (HBsAg e HBeAg) ocorre 4 a 10 semanas após o período de incubação. A intensa replicação ativa o sistema imune e contribui para o surgimento dos anticorpos anti-HBc. O aparecimento dos anticorpos anti-HBs marca o final da fase aguda e impede a infecção de novos hepatócitos, conforme demonstrado na figura 7 (GUIDOTTI; CHISARI, 2006; GERLICH, 2013).

Figura 8: Curso sorológico típico da infecção aguda por HBV.



Legenda: Após o período de incubação, o HBsAg é o primeiro marcador presente na circulação, posteriormente, surge o anticorpo anti-HBc. O HBsAg pode permanecer positivo na fase aguda por até 180 dias, período que então desaparece da circulação, e posteriormente ao período de janela imunológica surge o anticorpo anti-HBs. Fonte: Adaptado de Brasil, 2008.

### 1.7.2 Infecção crônica

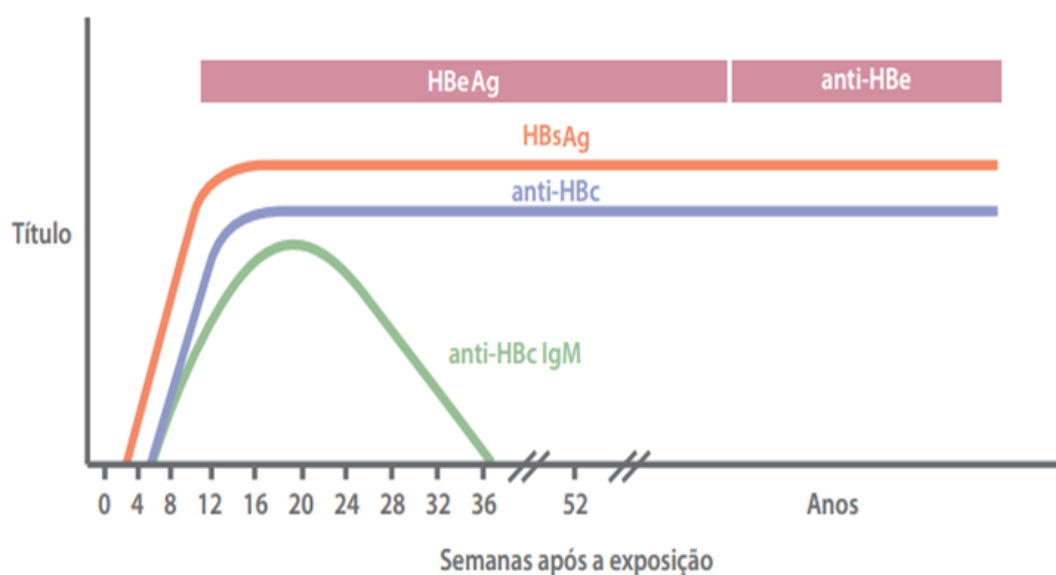
A hepatite B crônica é definida pela persistência do HBsAg por um período de seis meses ou mais na circulação. Em geral a infecção crônica pelo HBV pode ser dividida em quatro fases: imunotolerância, imunorreação, portador inativo e reativação (LOK; HEATHCOTE; HOOFNAGLE, 2001; HOOFNAGLE et al., 2007).

A fase imunotolerante ocorre mais em crianças que adquirem o HBV através da transmissão perinatal ou nos primeiros anos de vida, sendo caracterizada por elevada replicação viral, sem evidência de agressão hepática (AST e ALT normais) devido à tolerância do sistema imune (HUI et al., 2007; MCMAHON, 2009).

Na fase imunorreativa ocorre o esgotamento da tolerância imunológica com consequente dano hepático. Observa-se o aumento das aminotransferases e a presença de HBeAg, indicando replicação viral (LIAW; CHU, 2009; MCMAHON, 2009),

A fase de portador inativo é marcada pela diminuição da replicação viral, soroconversão de HBeAg e normalização das aminotransferases. Muitos portadores inativos permanecem assim por toda a vida e uma pequena porcentagem evolui para a fase de reativação, com retorno da replicação e atividade inflamatória do fígado. A figura 8 demonstra o curso sorológico da infecção crônica por HBV (CROAGH; LUBEL, 2014; WU; CHANG, 2015).

Figura 9: Curso sorológico típico da infecção crônica por HBV.



Legenda: O HBsAg pode persistir por um período de seis meses ou mais na circulação caracterizando a infecção crônica. O anticorpo Anti-HBc pode permanecer positivo indefinidamente, independente da evolução para resolução ou cronificação da doença. Fonte: Adaptado de Brasil, 2008.

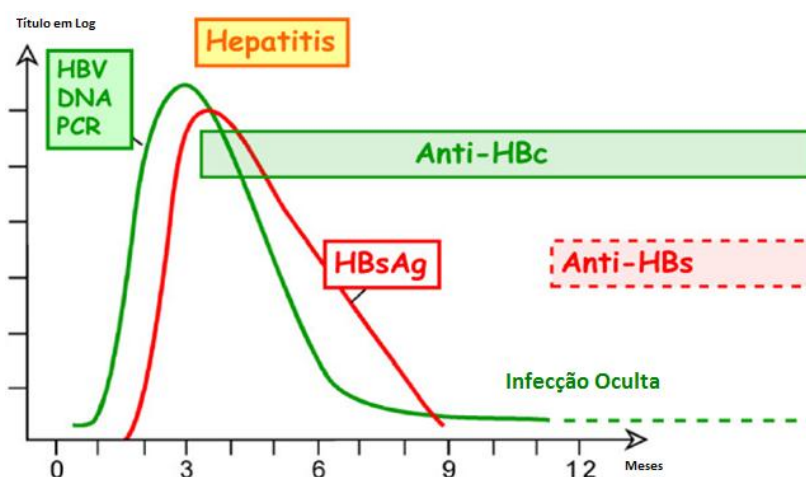
### 1.7.3 Infecção oculta

A infecção oculta pelo vírus da hepatite B (OBI) é definida pela persistência do DNA-HBV no fígado de indivíduos negativos para o antígeno de superfície do HBV (HBsAg) com quantidade de DNA-HBV no soro geralmente inferior a 200 UI/mL. A OBI pode ser classificada em dois grupos: soropositivos para o Anti-HBs e para o Anti-HBc e soronegativos para o anti-HBs e anti-HBc (HOOFNAGLE, 1978; RAIMONDO et al., 2008; ZHU et al., 2016).

O mecanismo exato da OBI ainda não se encontra completamente elucidado, porém algumas evidências sugerem que a persistência intra-hepática do cccDNA, a intensa supressão da replicação viral e a integração do DNA do HBV nos cromossomos do hospedeiro são fatores que contribuem para a OBI. O risco principal da OBI está relacionado à transmissão do vírus da hepatite B por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e de mães infectadas ou HBsAg ocultas aos recém-nascidos (SAID, 2011; KWAK, 2014; MORALES-ROMERO; VARGAS; GARCÍA-ROMÁN, 2014).

O diagnóstico da OBI é baseado na amplificação do DNA/HBV, extraído de fígado ou de amostras de sangue. Entretanto, como a obtenção de tecido hepático é um procedimento invasivo, o diagnóstico mais comum da OBI é realizado através de amostras de soro (NISHIKAWA; OSAKI, 2013; KWAK, 2014).

Figura 10: Curso sorológico da infecção oculta por HBV.



Legenda: A infecção oculta por HBV é caracterizada pela expressão em baixos níveis de DNA-HBV (detectado por PCR) e sorologicamente pode ser soropositiva quando são reagentes para o anti-HBc e/ou anti-HBs ou soronegativa quando o anti-HBc e anti-HBs forem não reagentes. Fonte: Adaptado de Gerlich, 2013.

## 1.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE B

### 1.8.1 Diagnóstico inespecífico

As aminotransferases, alanina aminotransferases ou transaminases glutâmico-pirúvica (ALT ou TGP) e aspartato aminotransferases ou transaminases glutâmico-oxalacética (AST ou TGO) são considerados marcadores sensíveis da presença de atividade inflamatória do fígado, mas não são específicas para nenhum tipo de hepatite. A elevação dos níveis de ALT/TGP, não se correlaciona com a gravidade da doença. Na fase aguda, as aminotransferases podem elevar-se até dez vezes mais do limite do valor de referência. Além disso, outras alterações inespecíficas, como elevação de bilirrubinas, fosfatase alcalina e discreta linfocitose podem ser observadas (SANTOS; ROCHA; FERREIRA, 2009; BRASIL, 2015).

### 1.8.2 Marcadores sorológicos do HBV

O diagnóstico laboratorial da hepatite B é realizado através de testes sorológicos em busca da detecção do vírus em suas diferentes fases evolutivas, sendo realizada a pesquisa de antígenos e anticorpos. Esses testes não servem apenas para o diagnóstico da infecção, mas também para a avaliação do estado clínico do paciente e monitoração da terapêutica específica (FERREIRA, 2000).

Várias técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico sorológico da infecção por HBV, entretanto, as mais utilizadas na atualidade são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e a quimiluminescência. Outra alternativa é a pesquisa dos antígenos virais HBsAg e HBcAg no tecido hepático (marcadores virais teciduais) através da técnica de imunohistoquímica (LOPES; SCHINONI, 2011; BRASIL, 2015).

#### 1.8.2.1 HBsAg/Anti-HBs

O HBsAg é o primeiro marcador sorológico a aparecer indicando infecção ativa. Esse marcador aparece no soro no prazo de 4 a 10 semanas após a infecção e pode persistir por mais de 6 meses, caracterizando a infecção crônica. O anticorpo Anti-HBs é detectado geralmente após o desaparecimento do HBsAg e confere imunidade a longo prazo. Nos pacientes com imunidade adquirida através da vacinação, o anti-HBs é o único marcador sorológico detectado no soro. Na infecção passada por HBV, o anti-

HBs está presente em conjunto com o anti-HBc IgG (LIANG, 2009; SONG; KIM, 2016).

#### 1.8.2.2 HBeAg/Anti-HBe

Há pouco tempo, o HBeAg e o Anti-HBe eram utilizados apenas para avaliar infecciosidade e replicação viral, contudo a sua utilização para este fim tem sido substituída principalmente por ensaios de detecção do DNA-HBV. A soroconversão para anti-HBe está relacionada com a remissão da doença hepática, no entanto, a replicação viral é mantida em indivíduos com a soroconversão de HBeAg devido a mutações na região Pré-Core e Core no genoma do HBV, o que leva a inibição ou diminuição da produção de HBeAg. Apesar disso, a detecção desse marcador continua sendo um achado importante para auxiliar na avaliação da infecção crônica em indivíduos com ou sem a presença do HBeAg (KAO, 2008; DÉNY; ZOULIM, 2010).

#### 1.8.2.3 HBcAg/Anti-HBc total (IgG e IgM)

O HBcAg é um antígeno intracelular, e por esta razão não é identificado no soro. Os anticorpos contra a proteína do núcleo (anti-HBc) aparecem logo após o HBsAg (1 a 2 semanas) e podem persistir após a fase aguda indicando contato prévio com o vírus. Após seis meses de infecção aguda o anti-HBc IgM desaparece da circulação. O anti-HBc IgG permanece detectável em pacientes curados e com infecção crônica pelo HBV (VILLAR et al., 2015; SONG; KIM, 2016).

Alguns pacientes HBsAg-negativos são positivos para o anti-HBc IgG, sem anticorpos anti-HBs, neste caso, deve ser considerado o anti-HBc isolado. O anti-HBc isolado pode ser visto em três situações: durante o período de janela imunológica na fase aguda, quando o anti-HBc IgM é predominante, após o término da infecção aguda com diminuição de anti-HBs para níveis indetectáveis e quando ocorre a diminuição dos títulos de HBsAg após um longo período de infecção crônica por HBV. Com o intuito de avaliar a presença de anti-HBc isolado, deve-se testar a amostra para anti-HBc, HbsAg, anti-HBe e anti-HBs. Se a amostra apresentar resultado positivo para o anti-HBc isolado, ela deverá ser testada para anti-HBc IgM, a fim de extinguir a possibilidade de infecção recente por HBV (RAIMONDO et al., 2007; SONG; KIM, 2016).

### 1.8.3 Marcadores moleculares do HBV

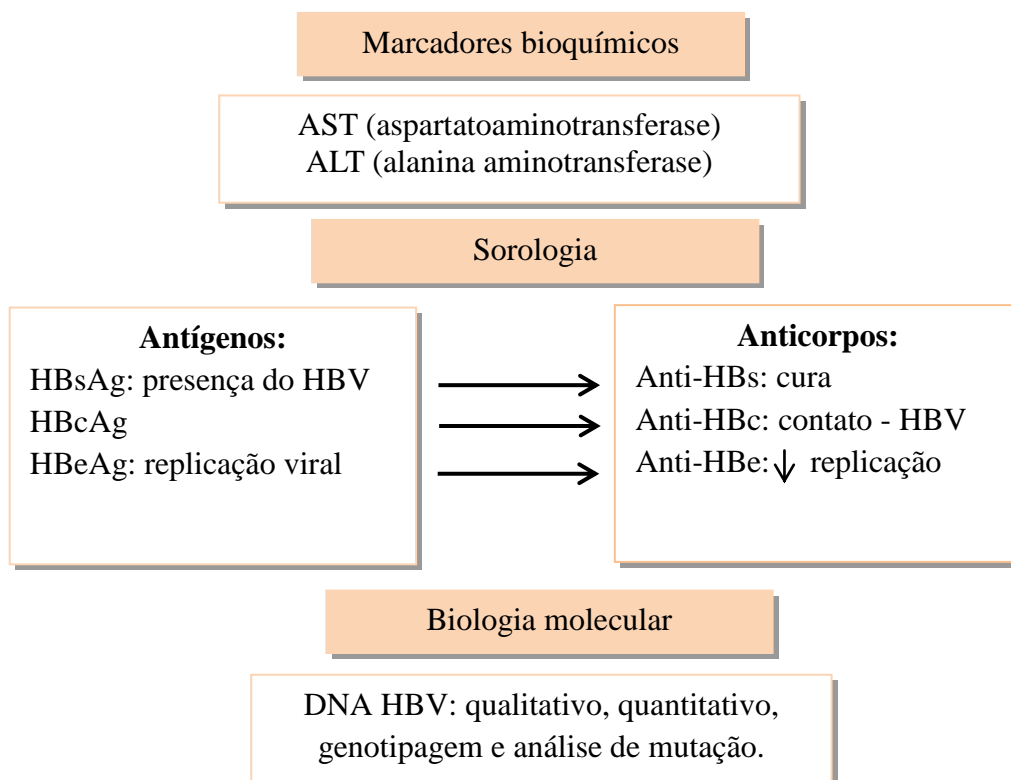
Com o aumento da prevalência e do surgimento de infecções sorologicamente negativas para o HBV e o aparecimento de mutantes de escape, a detecção de DNA-HBV ganhou mais espaço na medicina clínica (LIU, YAO, 2015).

A detecção de DNA-HBV no sangue periférico é um marcador fidedigno de atividade do HBV. Ele é detectável na fase precoce da infecção (um mês após a infecção por HBV) e aumenta até o nível de pico (mais do que  $10^8$  cópias/mL), aproximadamente três meses após a infecção e, em seguida, diminui gradualmente na infecção crônica ou desaparece após a recuperação da infecção (VILLAR et al., 2015; SONG; KIM, 2016).

Os métodos qualitativos e quantitativos para detecção de DNA-HBV são úteis na prática clínica de rotina para: avaliar a taxa de replicação do HBV em infecções crônicas, avaliar o prognóstico da doença e definir o início do tratamento e monitorá-lo a fim de identificar resistência aos análogos de nucleosídeos (VALSAMAKIS, 2007; LIU; YAO, 2015).

Atualmente, há uma variedade de técnicas moleculares utilizadas para a identificação e quantificação de DNA-HBV, tais como: captura híbrida, reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real. A PCR em tempo real pode detectar carga viral inferior a 10-15 UI/ml e superior a  $10^7$ - $10^8$  UI / mL. Por esse motivo tem sido o método padrão utilizado para detectar e quantificar o DNA do HBV. A figura 10 resume os marcadores utilizados no diagnóstico inespecífico e específico do HBV (CALIENDO et al., 2011; DATTA; CHATTERJEE; VEER, 2014).

Figura 11: Diagnóstico da Hepatite B.



Legenda: As aminotransferases (AST e ALT) são marcadores bioquímicos de lesão hepática, aplicada no diagnóstico inespecífico da infecção pelo HBV. O diagnóstico específico é realizado através de sorologia na identificação de anticorpos e antígenos virais juntamente com as técnicas de biologia molecular. Adaptado de Santos, 2016.

## 1.9 TRATAMENTO

Os fármacos utilizados no tratamento da hepatite B crônica têm como objetivo suprimir a replicação viral e consequentemente prevenir a progressão da doença hepática para cirrose e hepatocarcinoma (HCC). Apesar disso, a terapia não consegue erradicar o HBV devido a persistência do cccDNA nos hepatócitos infectados (TACKE; KROY, 2016; SANDHU et al., 2017).

Os medicamentos registrados na atualidade são divididos em dois grupos: os imunomoduladores que incluem o interferon-alfa (IFN-alfa) e o IFN-alfa peguilado (IFN-PEG) e cinco análogos de nucleosídeos (NAs): lamivudina (LMV), Telbivudina (LdT), entecavir (ETV), adefovir dipivoxil (ADV) e tenofovir (TDF), que atuam como inibidores competitivos da enzima transcriptase reversa (WARD et al., 2016; SU, LIU, 2017).



Os análogos de nucleosídeos possuem diferentes barreiras de resistência, justificando o alto índice de falha terapêutica no passado devido a resistência de determinadas estirpes virais para as drogas mais antigas LMV, LdT e ADV. Dessa forma, novas drogas e estratégias de tratamento tem sido discutidas para enfrentar adequadamente a infecção pelo HBV (TACKE; KROY, 2016; SORIANO et al., 2017).

### **1.9.1 Diretrizes terapêuticas nacionais estabelecidas pelo Ministério da Saúde para o tratamento da hepatite B crônica**

O tratamento atual da hepatite B crônica é realizado com os análogos de nucleosídeos entecavir e tenofovir. Essas drogas proporcionam uma supressão sustentada da replicação e possuem uma barreira maior de resistência (WARD et al., 2016; SORIANO et al., 2017).

O tenofovir é a droga de primeira escolha para o tratamento para a hepatite B crônica. É considerado um potente supressor viral e possui alta barreira genética de resistência contra as mutações do HBV. Apesar disso, a terapia a longo prazo com a utilização de tenofovir tem sido associada a toxicidade renal, hipofosfatemia e desmineralização óssea. Seu uso é contra indicado em pacientes com patologias renais, osteoporose e demais doenças ósseas. Em cinco anos de terapia, portadores de cirrose hepática apresentam melhora clínica e histológica, todavia, recomenda-se cautela na utilização desse fármaco (GARA et al., 2012; KE et al., 2014; BRASIL, 2017; SORIANO et al., 2017).

Nos casos em que há contra indicações do uso de tenofovir ou presença de alterações renais devido seu uso, é indicado o tratamento com entecavir. O entecavir é um agente antiviral bem tolerado, porém, demonstra uma redução na sua eficácia quando há presença de mutações, principalmente, em pacientes tratados previamente com lamivudina e telbivudina (LEE et al., 2014; BRASIL, 2017; KAYAASLAN; GUNER, 2017).

O interferon-alfa peguilado (IFN-PEG) também é utilizado no tratamento atual da hepatite B crônica. Essa droga faz parte de um grupo de proteínas e glicoproteínas que possui atividade antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora. É indicado para o tratamento alternativo de 48 semanas em pacientes com HBeAg positivo. O tratamento com o IFN-PEG é contra indicado em pacientes que consomem álcool e drogas ou

possuem disfunção tireoidiana, neoplasia recente ou insuficiência hepática (KIM et al., 2016; BRASIL, 2017).

Em decorrência do desenvolvimento de resistência, a lamivudina, a telbivudina e o adefovir não são mais recomendados para o tratamento da hepatite B crônica no Brasil. O tratamento dos pacientes que já estão em uso dessas drogas deve ser substituído, principalmente, por tenofovir, devido a possível resistência cruzada com entecavir (RIZZETTO, 2016; TACKE; KROY, 2016; BRASIL, 2017).

Através das terapias atuais, é possível alcançar a “cura funcional” da infecção crônica por HBV com soroconversão de HBsAg e viremia indetectável. Novas opções terapêuticas que eliminem ou inativem os reservatórios genômicos de cccDNA e ativem respostas imunes contra o HBV são necessárias para obter a “cura definitiva” da infecção (ZOULIM; LEBOSSÉ; LEVRERO, 2016; SORIANO et al., 2017).

#### 1.10 PROFILAXIA DA HEPATITE B

A prevenção da hepatite B tem como objetivo a redução dos casos de hepatite, seja ela aguda ou crônica e, conseqüentemente, as complicações geradas pelo agravo dessa infecção. Esses fatores dependem da triagem realizada nos bancos de sangue, sêmen, tecidos e conscientização da população e profissionais de saúde. É necessário realizar uma análise sobre a prevalência da infecção entre os grupos de risco e algumas condições que incluem: transmissão perinatal, hepatites agudas e crônicas, portadores assintomáticos do HBV e pacientes com progressão da doença para cirrose e hepatocarcinoma celular (HCC) (FERREIRA; SILVEIRA, 2004; LOPES; SCHINONI, 2011)

As gestantes precisam ser avaliadas para identificação precoce da infecção a fim de executar as medidas necessárias para evitar ou minimizar a disseminação do vírus. Para isso, devem ser realizados os testes pós-vacinação dos recém-nascidos de mães HBsAg positivas e se necessário realizar a re-vacinação (CHAMROONKUL; PIRATVISUTH, 2017)

Com relação à hepatite crônica, o diagnóstico precoce pode diminuir os riscos de transmissão da infecção e melhorar o prognóstico dos pacientes através da terapia

antiviral, o que contribui para a diminuição da progressão da doença hepática (FERREIRA, DA SILVEIRA, 2004).

A medida mais eficaz para a prevenção da infecção pelo vírus da hepatite B continua sendo a vacinação. A vacina foi implementada em 1992 sendo oferecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e tem sido incorporada nos programas de vacinação nacionais (GERLICH, 2013). Nas populações específicas, ou seja, de alto risco (homossexuais, presidiários e usuários de drogas) há necessidade de esclarecimento sobre os riscos da hepatite B. A dose inicial da vacina deve ser aplicada nas primeiras 12-24 horas de vida ou após a exposição, com eficácia de 70 a 90% aproximadamente. Seguindo o esquema de vacinação, mais duas aplicações com o período de intervalo de um mês e seis meses após a primeira dose devem ser realizadas (SANTOS; ROCHA; FERREIRA, 2009; LOPES; SCHINONI, 2011).

## 2 JUSTIFICATIVA

A hepatite B é considerada um problema de saúde global, com aproximadamente 400 milhões de pessoas afetadas em todo o mundo (YU et al., 2016). Apesar da sua importância, os estudos epidemiológicos sobre as hepatites virais no Brasil são escassos, o que subestima a sua verdadeira prevalência (SILVA et al., 2015).

Atualmente, estima-se que há cerca de dois milhões de portadores crônicos do HBV no Brasil, sendo que grande parte desses casos estão localizados na região amazônica, particularmente nos estados do Acre, sul do Amazonas, Rondônia, Pará e Noroeste do Mato Grosso (CRUZ, SHIRASSU, MARTINS, 2009; SILVA et al., 2012; VIEIRA et al., 2015; SOUTO, 2016).

Os estudos sobre a variabilidade genética do vírus da hepatite B têm resultado em avanços significativos na última década (LAZAREVIC, 2014). Vários fatores virais, incluindo os genótipos do HBV, presença de mutações específicas e eventos de recombinação têm sido associados à progressão da doença hepática e a resposta ao tratamento com antivirais (LIN; KAO, 2011; POURKARIM et al., 2014; CROAGH; DESMOND; BELL, 2015).

A eficácia da vacina contra o HBV tem sido desafiada pela descoberta de vírus mutante que pode conduzir a evasão da imunidade induzida pela vacina. Além disso, a presença de mutações em regiões específicas do genoma pode ser responsável pela evolução clínica indesejada como o surgimento de infecção oculta, constituindo um risco para a segurança das transfusões realizadas em bancos de sangue devido a não detecção do HBV-DNA no soro (GAO; DUAN; COFFIN, 2015; CALIGIURI et al., 2016).

Por isso, ressalta-se a importância de identificar os genótipos do HBV e detectar a presença de mutações e vírus recombinante para auxiliar no manejo clínico dos pacientes e na elaboração de novos protocolos terapêuticos, a fim de alcançar a cura definitiva da hepatite B.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Caracterizar filogeneticamente os genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B em portadores crônicos do estado de Rondônia.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar através da análise filogenética os genótipos e subgenótipos do HBV circulantes na população estudada.
- Analisar as substituições de nucleotídeos e de aminoácidos relacionadas à progressão da doença hepática, escape imunológico ou vacinal e a resistência à terapia antiviral.
- Avaliar a evidência de recombinação entre os genótipos e subgenótipos do HBV.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), com o número do processo 097/09. Os pacientes que procuraram atendimento médico no ambulatório de hepatites do CEPEM foram informados, durante a primeira consulta, que poderiam ter seus dados clínicos e laboratoriais, registrados em prontuários individuais e disponibilizados para estudos científicos de hepatites virais. A princípio, foi obtido o consentimento escrito dos pacientes para participar desta pesquisa específica. A pesquisa foi realizada de acordo com os princípios estipulados pela Assembleia Médica Mundial de 1975 e do Ministério da Saúde (Resolução 466/12).

### **4.2 LOCAL DO ESTUDO**

O estudo foi realizado com pacientes portadores da hepatite B atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), localizado na BR 364, Km 3,5 na cidade de Porto Velho, considerado o centro de referência no Estado para o diagnóstico e tratamento das hepatites virais.

### **4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO**

Foram incluídos neste estudo pacientes com evidência de infecção crônica pelo HBV, com HBsAg positivo por um período de seis meses ou mais, de ambos os sexos, com idade entre 18-60 anos, atendidos entre o período de janeiro de 2008 a dezembro de 2011. Durante a coleta da amostra biológica, os sujeitos estiveram expostos a risco mínimo, com complicações que não interferiram na sua atividade física ou intelectual de rotina. Foram excluídos deste estudo grávidas, indígenas e deficientes mentais. Após o esclarecimento sobre o objetivo do trabalho e sua relevância, todos assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE).

### **4.4 AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Foram analisadas 40 amostras de soros obtidas a partir de punção venosa de um volume de 10 mL de sangue coletado em tubos estéreis do tipo “Vacutainer” sem anticoagulantes. Estas amostras foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente, para retração do coágulo. Após este período as amostras foram centrifugadas por 10 minutos (min) a 4000 rpm. Em seguida o soro foi distribuído em duas alíquotas de 1,5 mL cada e armazenado em freezer -80°C. Uma alíquota foi utilizada para realização dos testes sorológicos e a outra armazenada na soroteca para estudos moleculares posteriores. O coágulo foi autoclavado e posteriormente descartado.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL

Para a extração do DNA viral foi utilizado o kit comercial QIAamp (Quiagen-USA), o qual foi adicionado 20µL de QIAGEN Protease, 200µL da amostra (soro) e 200µL de Tampão de Lise(AL) em tubo de 1,5 mL tipo eppendorf, o qual foi homogeneizado por 15 segundos e incubado a 56°C por 10 minutos. Depois de centrifugado por 5 segundos, acrescentou-se 200µL de etanol P.A (96%), e em seguida homogeneizado novamente por 15 segundos. O conteúdo foi transferido para a coluna para centrifugação a uma rotação de 8.000 rpm durante 1 minuto. O material filtrado foi descartado e adicionado à coluna 500µL do tampão de lavagem1(AW1) que foi posteriormente centrifugado por 1 minutos a 8.000 rpm. Após o descarte do material filtrado foi adicionado à coluna 500µL do tampão de lavagem2(AW2)seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. O filtrado foi descartado novamente e a coluna colocada num tubo de lavagem limpo e centrifugada a 14.000 rpm por 3 minutos até secar a membrana completamente.

A etapa de eluição foi realizada com adição de 200µL do tampão de eluição(AE), transferindo a coluna para um microtubo novo de capacidade para 1,5 mL. Em seguida foi incubado à temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 minuto. O DNA extraído foi armazenado em freezer -20°C, conforme as especificações do fabricante.

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

Após a extração, a fim de estimar a concentração de DNA (em nanogramas – ngs) e a relação 260/280 (concentração de DNA em relação às proteínas), o ácido

nucleico foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000-2000c), utilizando-se 2 µL do DNA.

#### 4.7 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO

O DNA extraído foi amplificado por PCR (Reação em cadeia da polimerase) utilizando os iniciadores S1, AS1, S2, AS2 e S3, descritos por Tran e colaboradores(2006) (Tabela 3), para obtenção de dois fragmentos de aproximadamente 1.500 e 1.700 pb (pares de base).

A reação foi realizada a partir de 2,5 µL (2,5-11,6 ng/µL) de DNA, com volume final de 25 µL, sendo 1 mM do Tampão 10x concentrado da enzima (25 mM Tris-HCL [pH 8,0], 35 mM KCL), 0,3 mM dNTPs, 0,3 mM de cada iniciador e 5 U/µL de HotMaster™ Polimerase.

As amplificações foram realizadas no termociclador ABI Prism 7500 Veriti (Applied Biosystems) com temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 93°C por 20 segundos, 52,5°C por 45 segundos, 68°C por 2 minutos e 30 segundos e uma extensão final de 7 minutos a 68°C. Para todas as amplificações foram utilizados controles positivos, o qual continha um DNA controle do HBV com carga viral conhecida, e um controle negativo, sem a presença do DNA viral.

Tabela 2: Descrição dos pares de iniciadores utilizados na PCR.

Iniciadores	Sequência	Amplicon (pb)	Região
<b>S1</b>	CTTTTTCACCTCTGCCTAATCA	1.700	Pol, X, Pré S2, Pré-Core, Pré S1 e S
<b>AS1</b>	GGGACTGCGAATTTTGGC		
<b>S2</b>	TCCCCAACCTCCAATCAC	1.500	Pré-S2, Pol, S, BCP e X
<b>S3</b>	TCCCAAATCTCCAGTCAC		
<b>AS2</b>	AAAAAGTTGCATGGTGCTGGT		

#### 4.8 ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO

Os produtos das PCRs foram corados com Gel Red 10X e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TAE 1X(Tris40mM, Acetate 20mM, EDTA 1mM). Posteriormente, o gel foi submetido à luz ultravioleta para visualização.



#### 4.9 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Os produtos das PCRs das amostras positivas, foram purificados utilizando 2 $\mu$ L de ExoSAP – IT e 5  $\mu$ L (78,6-252,5 ng/ $\mu$ L) do DNA amplificado, mantidos por incubação durante 30 minutos a 37°C. A etapa para inativação da enzima foi realizada mantendo o material a 80°C por 15 minutos.

#### 4.10 REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando a técnica de Sanger, disponível na plataforma de sequenciamento de DNA ABI 3130 da subunidade RPT01H do Instituto Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Amazônia.

Conforme orientação do fabricante, o conjunto de reagentes BigDye Terminator Cycle v.3.1 foi adicionado à 10-40 ng do produto de PCR purificado e 3.2 mol de cada iniciador para realização da reação de sequenciamento.

#### 4.11 EDIÇÃO, ALINHAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências de DNA obtidas neste estudo foram editadas e alinhadas às sequências de referência dos genótipos e subgenótipos do HBV do *GenBank* (46 sequências) (Tabela 4) utilizando o programa MEGA versão 7.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016). Na análise dos eletroferogramas, as posições que mostraram dúvida de nucleotídeos, como a presença de duplicação de picos ou baixa resolução foram consideradas como “*missing data*”.

Para caracterização dos genótipos e subgenótipos do HBV as sequências obtidas foram submetidas ao programa BLASTIN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*), uma ferramenta com algoritmo para comparar sequências nucleotídicas a partir de um banco de dados de sequências, implementada em <http://blastncbi.nlm.nih.gov>.

Adicionalmente, as sequências foram submetidas ao programa HBVdt (HBV data base) (HAYER et al., 2013), um banco de dados especializado que oferece ferramentas integradas de análise, incluindo a genotipagem, e compara sequências do

HBV de 16 genomas completos, não recombinantes que representam os 8 genótipos do vírus (A-H), disponível em <https://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/>.

Análises filogenéticas concatenadas foram realizadas para as amostras cujas ambas regiões aqui estudadas foram possíveis de ser amplificadas e sequenciadas. Para construção das árvores filogenéticas foi adotado o método baseado em distância *Neighbor-Joining* (NJ), modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) incluindo as substituições do tipo transições + transversões. Para o teste de confiabilidade da topologia da árvore filogenética foi adotado o *Bootstrap* com 1000 replicações.

Uma análise de rede foi realizada utilizando o programa Splits Tree4 (HUSON, BRYANT, 2005) para obter uma representação gráfica de sequências sugestivas de recombinação. Nessa análise, cada aresta (que corresponde aos braços de uma árvore filogenética), representa um *split*. A dimensão de cada aresta na rede é equivalente ao peso para cada *split*. Esse peso é calculado pela razão entre o número médio de substituições e o número de sítios. O método de *neighbor-net*, baseado em distância genética, foi empregado nessa análise.

As amostras que apresentaram evidência de recombinação observadas na rede foram submetidas às análises de recombinação inter e intra-genotípica de HBV utilizando o programa RDP versão 4.91 (*Recombination Detection Program*) (MARTIN et al., 2015). A identificação de possíveis eventos de recombinação e sequências parentais foi feita com os métodos RDP, Geneconv, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq, Análise de Probabilidade de Recombinação em DNA (LARD) e PhylPro implementados no programa RDP4 com análise automatizada de Bootscan.

Tabela 3: Sequências dos genótipos e subgenótipos do HBV utilizados nas análises com seus respectivos números de acesso ao GenBank e países de origem dos isolados.

Genótipo	Subgenótipo	Nº de Acesso ao Genbank	PAÍS
A	A1	JQ023663	BRASIL
		KJ854707	BRASIL
	A2	AB937798	JAPÃO
		X02763	BRASIL
	A3	AM184126	FRANÇA
		EU054331	ÁFRICA
	A4	KM606737	CUBA
	A5	FJ692613	ÁFRICA
	A6	GQ331048	BÉLGICA
	B1	AB828708	JAPÃO

<b>B</b>	B2	AB981582	JAPÃO
	B3	AB976562	INDONÉSIA
	B4	AB368295	JAPÃO
	B5	JX661477	CHINA
	B6	KP659255	CANADA
	B7	GQ358140	INDONÉSIA
	B8	GQ358144	INDONÉSIA
	<b>C</b>	C1	KT347089
C2		HQ622095	BRASIL
C3		KU695743	AUSTRÁLIA
C4		KF873545	AUSTRÁLIA
C5		EU410081	GERMÂNIA
C6		GQ358156	INDONÉSIA
C7		JX661492	CHINA
C8		JX661490	CHINA
<b>D</b>	D1	GU456684	IRÃ
		AF121240	BRASIL
	D2	KX260231	BRASIL
	D3	KT347090	ÁFRICA
		KP090181	BRASIL
	D4	KF192841	ÍNDIA
		KJ470898	BRASIL
	D5	KP322603	CHINA
<b>E</b>	D6	KF170740	ÁFRICA
	D7	FJ904447	TUNÍSIA
<b>F</b>	E	GQ161822	ÁFRICA
	F1	EU670262	PERU
		DQ823095	ARGENTINA
	F2	KC494405	BRASIL
		KT896494	BRASIL
	F3	FJ589067	COLOMBIA
		KP995125	VENEZUELA
	F4	KJ676694	ARGENTINA
<b>G</b>		HE981181	BRASIL
		HE981176	FRANÇA
<b>H</b>		AB298362	JAPÃO

#### 4.12 CARACTERIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS, SOROLÓGICAS E CLÍNICAS

Os prontuários disponíveis dos pacientes incluídos nas análises moleculares virais foram avaliados a fim de obter as informações referentes às variáveis demográficas, clínicas e sorológicas.

As variáveis demográficas avaliadas foram idade e sexo, para determinar a frequência da infecção crônica entre pacientes do sexo masculino e feminino e a idade média dos indivíduos infectados.

Dentre as variáveis sorológicas foram avaliadas os principais marcadores utilizados no diagnóstico da hepatite B, incluindo: o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), o antígeno marcador de replicação viral (HBeAg), o anticorpo contra o antígeno de superfície da hepatite B (Anti-HBs), o anticorpo contra o antígeno marcador de replicação viral (Anti-HBe) e o anticorpo contra o antígeno do core (Anti-HBc Total).

As variáveis clínicas consideradas foram referentes à presença de doença decorrente da evolução da hepatite B crônica, ou seja, hepatocarcinoma (HCC) e cirrose hepática.

#### 4.13 ANÁLISE DESCRITIVA DE MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA ÀS DROGAS

As análises das mutações relacionadas à resistência às drogas utilizadas no tratamento da hepatite B crônica, como: Entecavir (ENT), Tenofovir (TNF), Lamivudina (LAM) e Adefovir (ADV) foram realizadas manualmente pela tradução das sequências de nucleotídeos obtidas utilizando a ferramenta *Translated Protein Sequences* do programa MEGA 7.0 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) e comparadas a uma sequência de referência disponível no NCBI (número de acesso ao *Genbank* HE974381). A tabela 5 mostra as mutações de resistência avaliadas nas amostras LV1501, LV15376 e LV13431 desse estudo.

Tabela 4: Mutações associadas à resistência às drogas analisadas nas amostras LV1501, LV15376 e LV13431.

<b>Análogos de nucleosídeos</b>	<b>Mutações de resistência</b>	<b>Referência</b>
<b>Lamivudina</b>	I169T	Bartholomeusz; locarnini, 2006.
	V173L	Bartholomeusz; locarnini, 2006.
	L180M	Bartholomeusz; locarnini, 2006.
	T184G	Bartholomeusz; locarnini, 2006.
	S202G	Bartholomeusz; locarnini, 2006.
	M204V/I	Bartholomeusz; locarnini, 2006.
	M250V	Zoulim; Locarnini, 2009.
<b>Adefovir</b>	A181V/T	Borroto-esoda; Miller; Arterburn, 2007.
	N236T	Borroto-esoda; Miller; Arterburn, 2007.
<b>Entecavir</b>	I169T	Villet et al., 2006
	V173L	Villet et al., 2006

	L180M	Villet et al., 2006
	T184G	Zoulim; Locarnini, 2009.
	S202G	Zoulim; Locarnini, 2009.
	M204V/I	Villet et al., 2006
	M250V	Zoulim; Locarnini, 2009.
<b>Tenofovir</b>	N236T	Borroto-esoda; Miller; Arterburn, 2007.

#### 4.14 ANÁLISE DESCRITIVA DE SUBSTITUIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS RELACIONADAS ÀS ALTERAÇÕES CLÍNICAS

As análises das substituições de nucleotídeos e aminoácidos relacionadas às alterações clínicas foram realizadas manualmente utilizando o programa MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), sendo que para análise de substituição de aminoácidos foi utilizada a ferramenta *Translated Protein Sequences*, e comparadas a uma sequência de referência disponível no NCBI (número de acesso ao *Genbank* HE974381). A tabela 6 mostra as substituições de nucleotídeos e aminoácidos consideradas nesse estudo.

Tabela 5: Substituições de nucleotídeos e de aminoácidos analisados no estudo associadas às suas respectivas alterações clínicas.

<b>Região</b>	<b>Substituições</b>	<b>Alterações clínicas</b>	<b>Referência</b>
	<b>Nucleotídicas</b>		
S	S17A	Escape imune	Kim et al., 2013.
	P32L	Escape imune	Kim et al., 2013.
	T143S	Escape imune	Darmawan et al., 2015.
	G145A	Escape imune	Lin et al., 2013.
	G145R	Escape imune	Lin et al., 2013.
	C147W	Escape imune	Weinberger et al., 2000.
	M197T	Escape imune	Mirabelli et al., 2015.
	Y206C/H	Escape imune	Mirabelli et al., 2015.
	F220L	Escape imune	Mirabelli et al., 2015.
	T189I	Escape imune	Olinger et al., 2007.
	F161Y	Escape imune	Wu et al., 2012.
	A184V	Escape imune	Olinger et al., 2007.
	S207N	Escape imune	Weinberger et al., 2000.
	C1914G	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Malik et al., 2012.
G1994A/C	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Kim et al., 2012.	

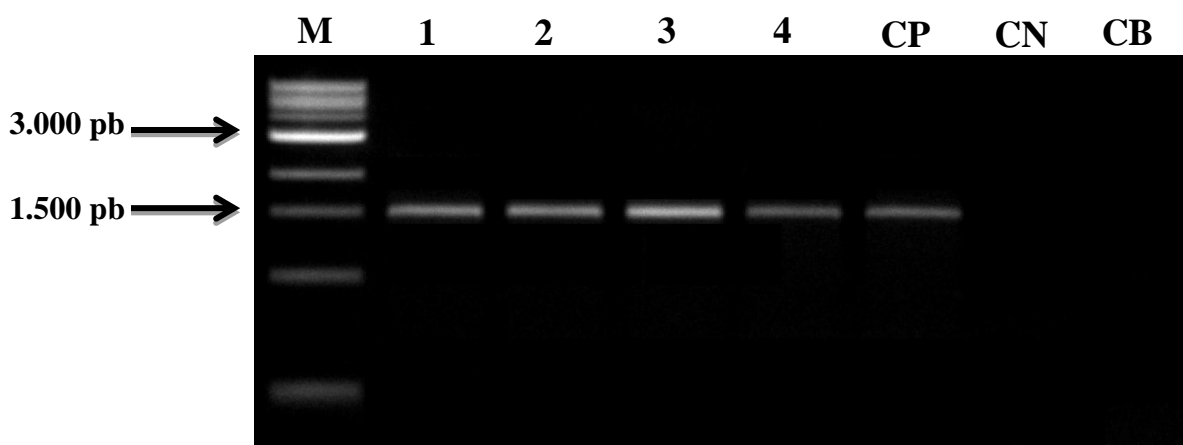
	G2027A	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Kim et al., 2012.
	C2048T/G	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Kim et al., 2012.
	C2049A	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Kim et al., 2012.
	G2291C/A	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Kim et al., 2012.
	C2292A/G	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Kim et al., 2012.
	T2293C	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Kim et al., 2012.
	C2304A	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Wu et al., 2014.
C	T2441C	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Kim et al., 2012.
	C2442A	Redução da secreção de HBeAg e HCC	Kim et al., 2012.
	C1913A, C1914A/T	HCC	Kim et al., 2012.
	G1915A/C	HCC	Xie et al., 2015.
	C1914G	HCC	Malik et al., 2012.
	C2134T	HCC	Xie et al., 2015.
	A2149T/C	HCC	Kim et al., 2012.
	T2176C	HCC	Xie et al., 2015.
	A2189T/C, C2191T	HCC	Wu et al., 2014.
	C2198A	HCC	Kim et al., 2012.
	C2221T	HCC	Xie et al., 2015.
	C2245T	HCC	Xie et al., 2015.
	C2288A	HCC	Xie et al., 2015.
	C2444A/T, A2445G	HCC	Kim et al., 2012.
	G1461A/T/C	HCC	Arbuthnot; Capovilla; Kew, 2000.
	A/G1479C/T/G	HCC	Xie et al., 2014.
	C1485T	HCC	Arbuthnot; Capovilla; Kew, 2000.
X	C1504G, C1505G	HCC	Muroyama et al., 2006.
	G1521A/C	HCC	Cho et al., 2011.
	T1544A/C	HCC	Arbuthnot; Capovilla; Kew, 2000.
	G1613A	HCC	Arbuthnot; Capovilla; Kew, 2000.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA

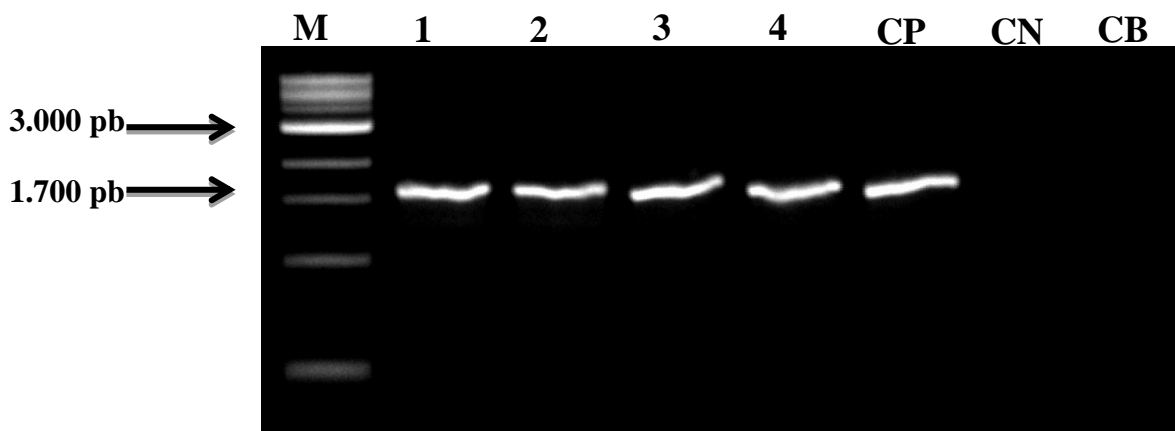
A amplificação molecular das 40 amostras de soro positivas para o marcador sorológico da hepatite B (HBsAg) incluídas neste estudo foi observada para 17 casos. A presença do fragmento de 1.700pb foi observada para 17 amostras, enquanto o fragmento de 1.500 foi amplificado para 7 amostras (Figuras 11 e 12). O sequenciamento de DNA mostrou seqüências de boa qualidade para 12 destes 17 casos.

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose da PCR do fragmento do HBV.



Legenda: Foto da eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR corados com GelRed (1,0%) mostrando um fragmento de aproximadamente 1.500 pb do genoma do HBV. M: Marcador de peso molecular 1kb (DNA Ladder – Sigma Aldrich); 1 – 4 amostras de pacientes; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; CB: Controle Branco.

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose da PCR do fragmento do HBV.



Legenda: Foto da eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR corados com GelRed (1,0%) mostrando um fragmento de aproximadamente 1.700 pb do genoma do HBV. M: Marcador de peso molecular 1 kb (DNA Ladder – Sigma Aldrich); 1 – 4 amostras de pacientes; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; CB: Controle Branco.

## 5.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

### 5.2.1 Genotipagem das amostras

A genotipagem dos 12 casos cujas sequências foram obtidas neste estudo mostrou o genótipo A presente em 50% da população (6/12), seguido pelo genótipo D com frequência de 33,4% (4/12) e o genótipo F com 16,6% (2/12). Dentro do genótipo A, o subgenótipo A1 foi encontrado em 83,4% das amostras (5/6), sendo que não foi possível subgenotipar umas das amostras incluídas no genótipo A. Dentro do genótipo D, o subgenótipo D3 foi observado em 50% (2/4) das amostras, seguido pelo subgenótipo D2 25% (1/4) e D4 25% (1/4), enquanto para o genótipo F o único subgenótipo encontrado foi o F2 (2/2). Os genótipos e subgenótipos encontrados nas amostras analisadas estão resumidos na tabela 7.

Tabela 6: Genótipos e subgenótipos dos pacientes incluídos neste estudo.

Amostra	Genótipo	Subgenótipo
LV9183	A	A1
LV1501	A	A1
LV15376	A	A1
LV8281	D	D4
LV15598	D	D3
LV13431	D	D3
LV8657	F	F2
LV1843	A	A1
LV7145	A	-
LV14860	A	A1
LV14250	D	D2
LV1225	F	F2

As regiões genéticas virais utilizadas nas análises filogenéticas para cada paciente estão descritas no quadro 1.

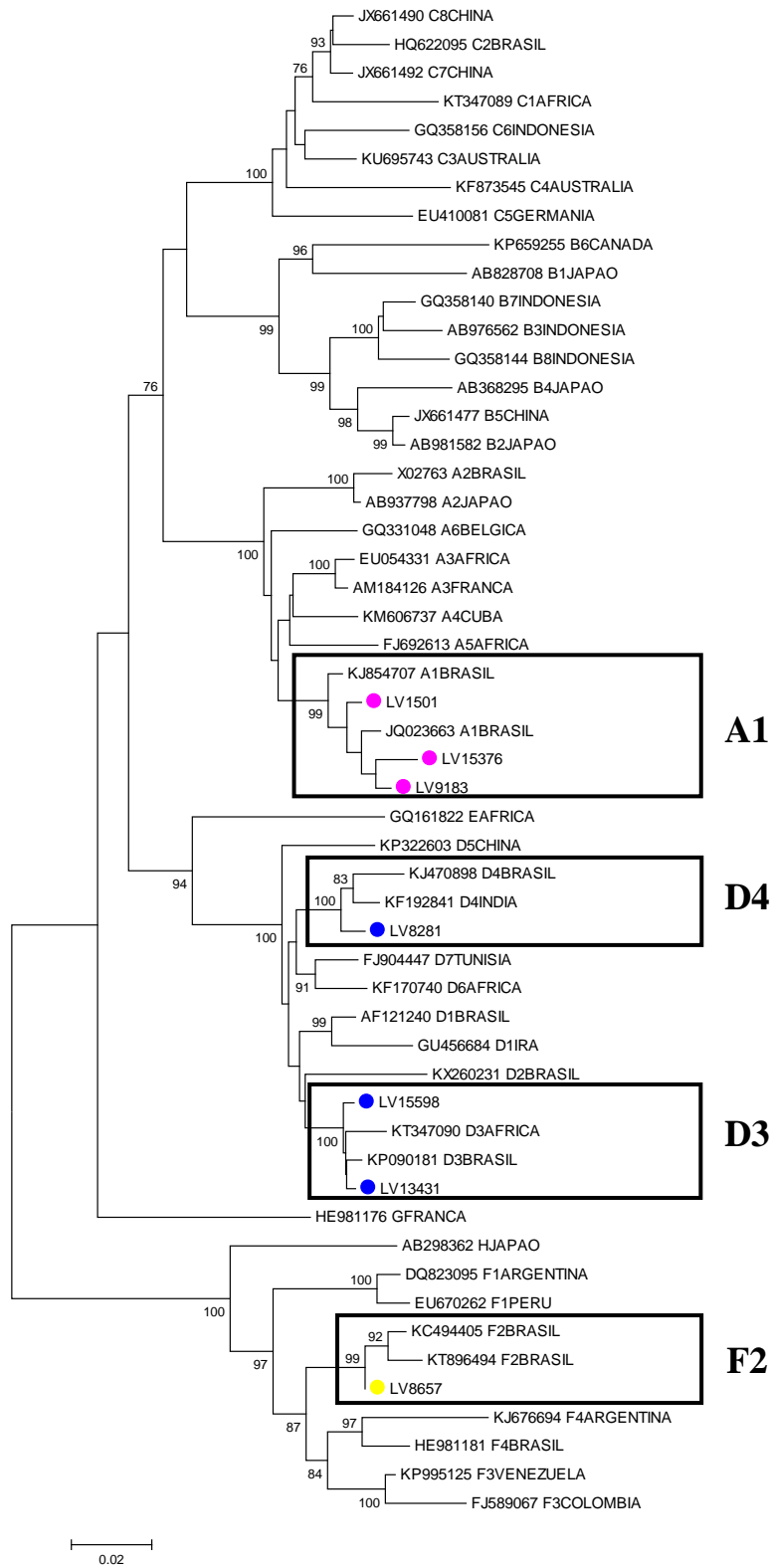
Todas as árvores filogenéticas obtidas mostraram a monofilia dos oito genótipos do HBV, sendo observado na análise de *NJ* a monofilia dos subgenótipos do A, D e F (Figuras 14 a 19).



Quadro 1: Regiões das sequências obtidas a partir do sequenciamento dos fragmentos amplificados para cada paciente (indicadas pelo “X”) e suas respectivas localizações nucleotídicas em relação aos genes reconhecidos para o genoma de referência HE974381 (código do Genbank).

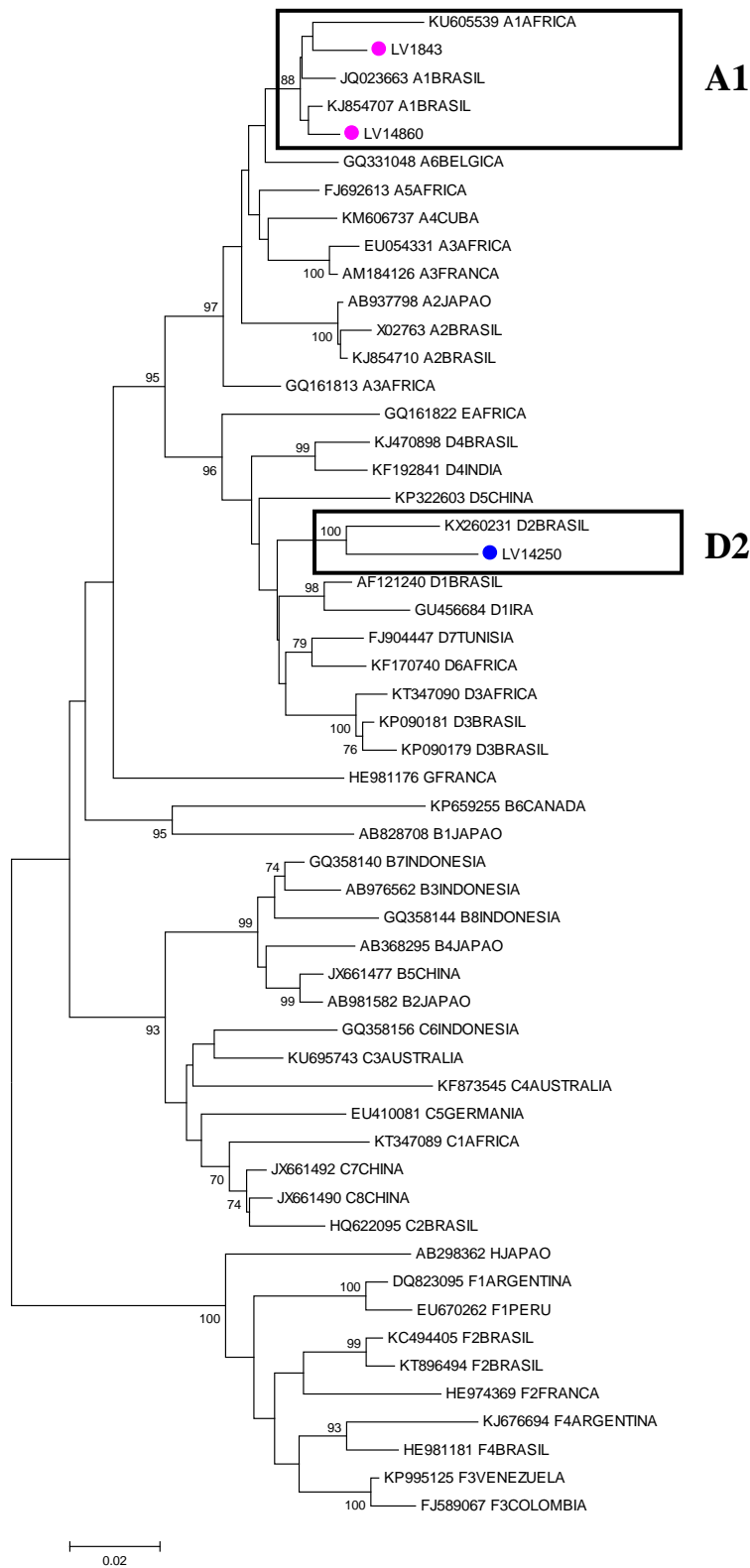
<b>REGIÕES ANALISADAS (LOCALIZAÇÃO NUCLEOTÍDICA)</b>										
<b>Amostras</b>	<b>Fragmento 1 (1.181 pb)</b>		<b>Fragmento 2 (608 pb)</b>		<b>Fragmento 3 (518 pb)</b>		<b>Fragmento 4 (213 pb)</b>	<b>Fragmento 5 (244 pb)</b>	<b>Fragmento 6 (614 pb)</b>	
	Pré-C/C e P (1929-2535)	Pré-S/S e P (2891-3467)	Pré-C/C e P (1926-2334)	Pré-S2, S e P (3277-3475)	Pré-C/C e P (2179-2396)	Pré-S1, Pré- S2 e P (2981-3280)	Pré-C/C (2044-2256)	S e P (636-879)	S e P (572-1016)	P e X (1453-1621)
LV9183	X	X								
LV1501	X	X						X		
LV15376	X	X						X		
LV8281	X	X								
LV15598	X	X								
LV13431	X	X							X	X
LV8657	X	X								
LV1843			X	X						
LV14860			X	X						
LV14250			X	X						
LV1225					X	X				
LV7145							X			

Figura 14: Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S/S e P.



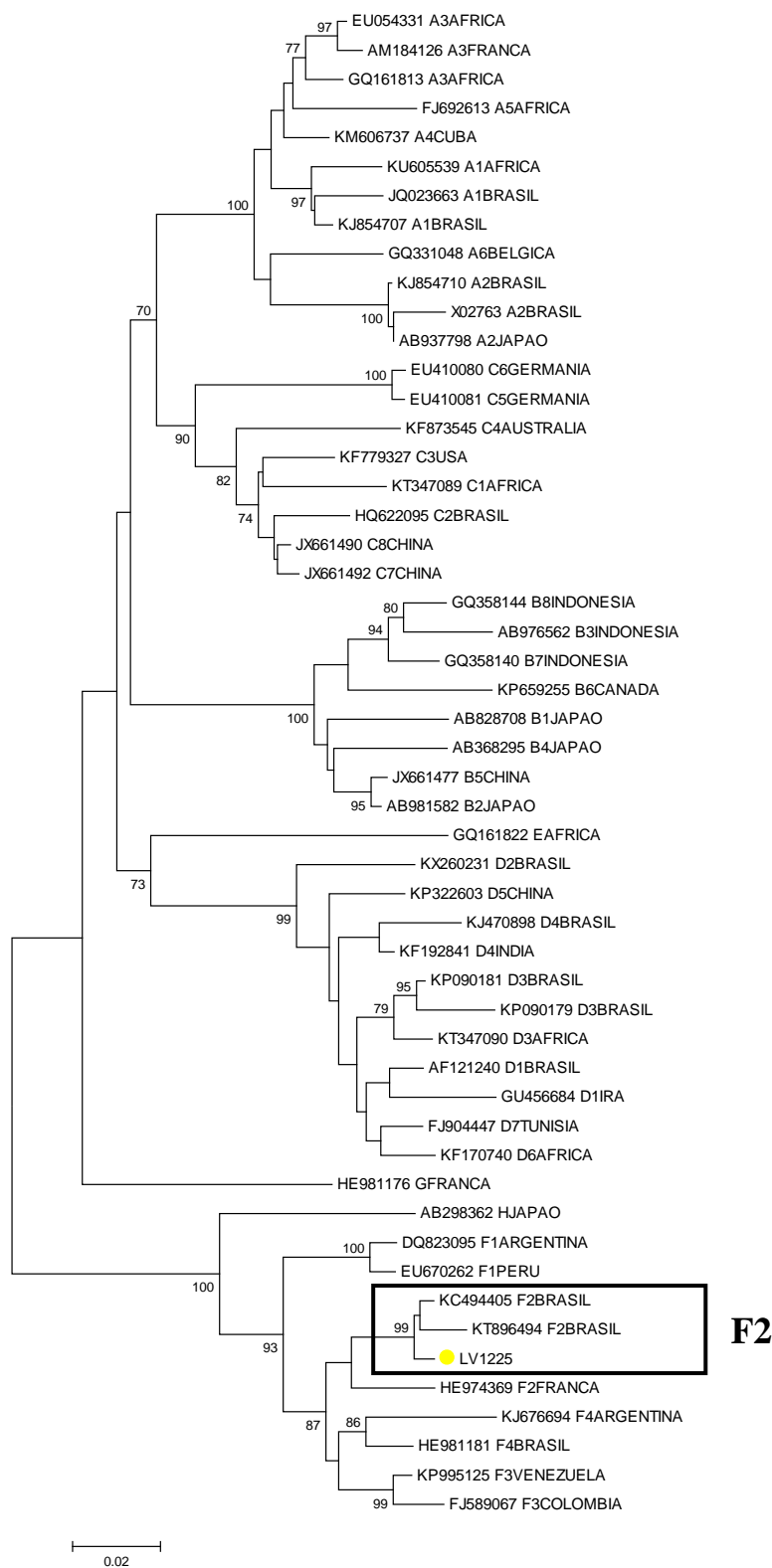
Legenda: Árvore filogenética construída utilizando o método de *Neighbor-Joining* demonstrando as amostras sequenciadas neste estudo referentes à análise do fragmento 1 (Quadro1) e seqüências de referência do HBV. Os genótipos A (●), D (●) e F (●) com seus respectivos subgenótipos foram mostrados. Valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas abaixo de 70 foram ocultados.

Figura 15: Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S2, S e P.



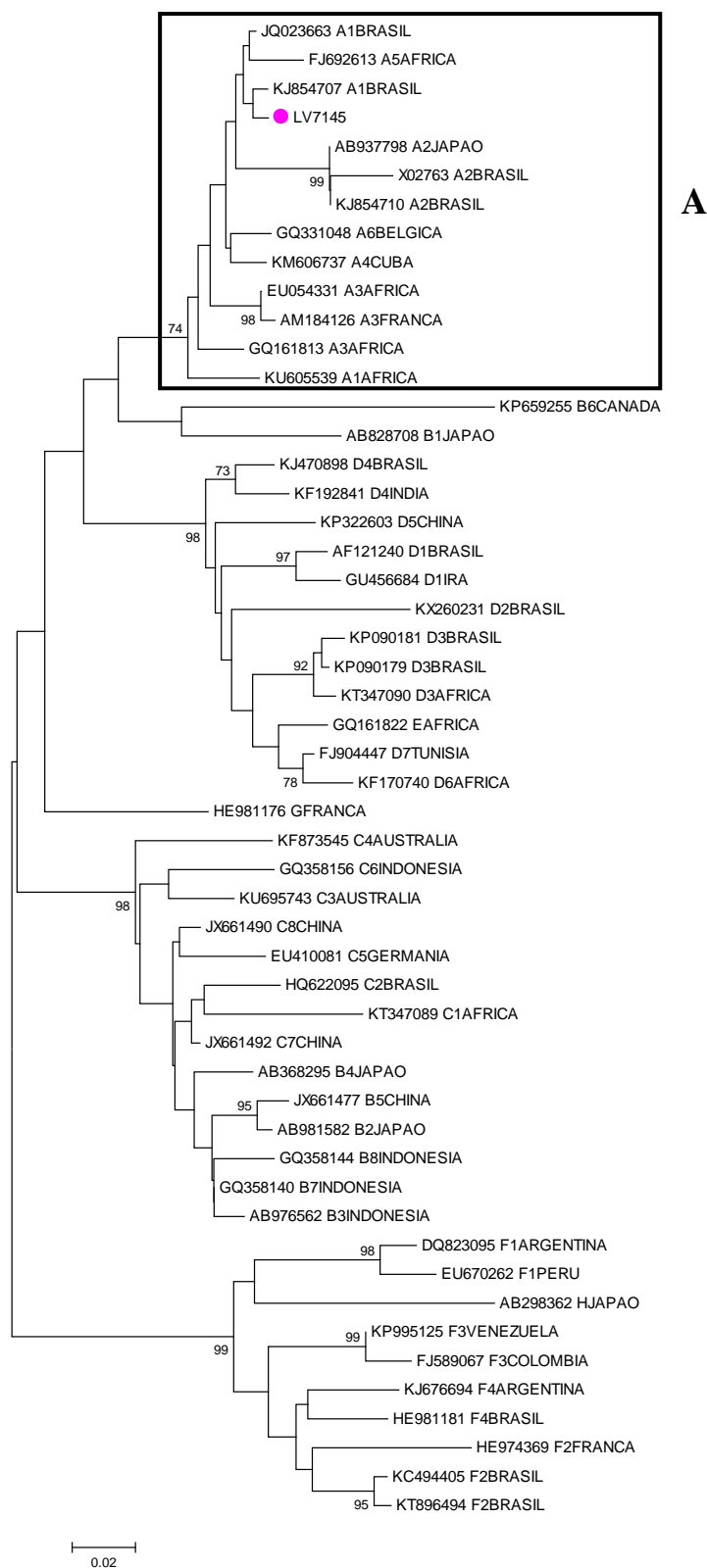
Legenda: Árvore filogenética construída utilizando o método de *Neighbor-Joining* demonstrando as amostras sequenciadas neste estudo referentes à análise do fragmento 2 (Quadro1) e seqüências de referência do HBV. Os genótipos A (●) e D (●) com seus respectivos subgenótipos foram mostrados. Valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas abaixo de 70 foram ocultados.

Figura 16: Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S1, Pré S2 e P.



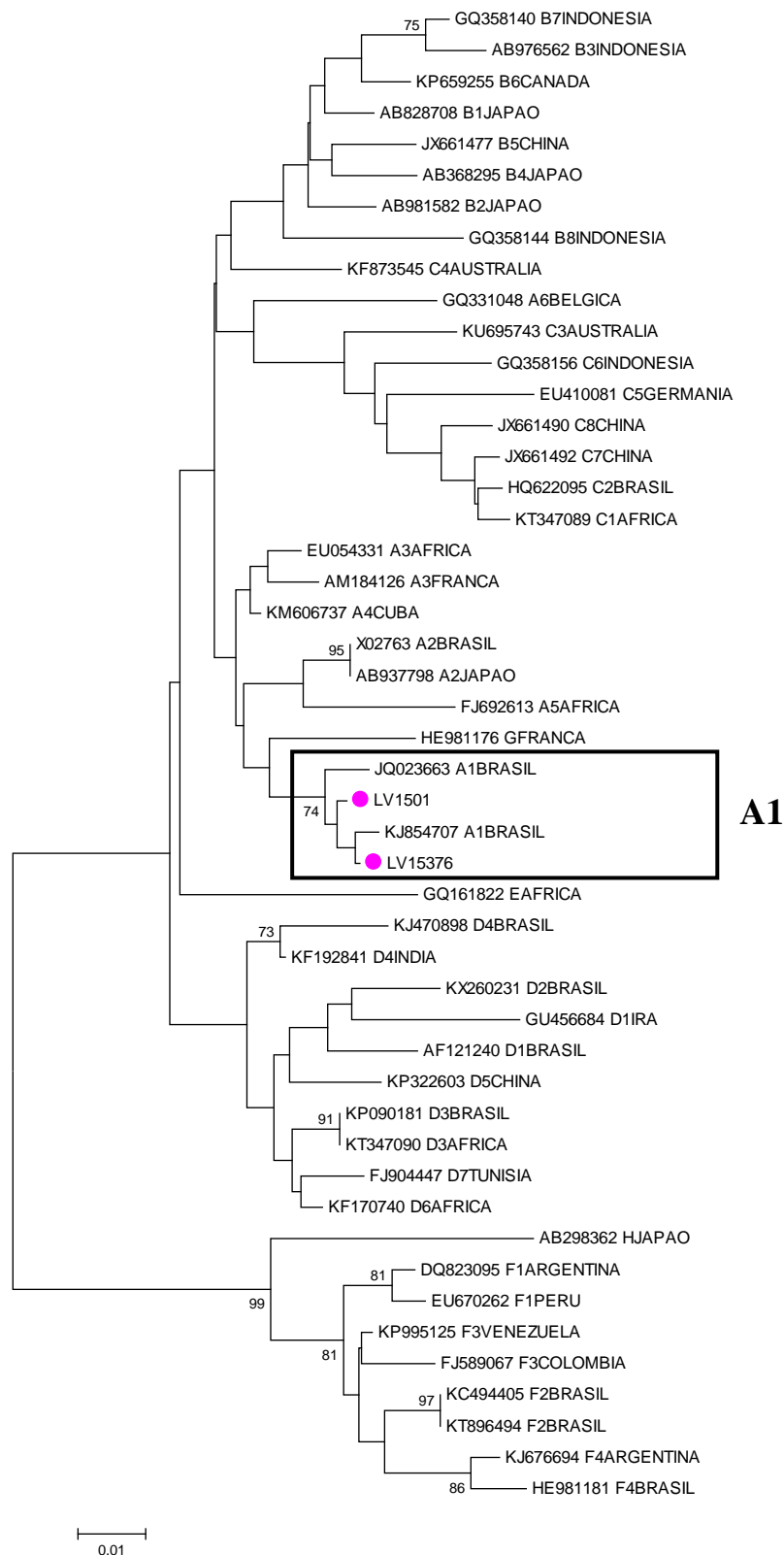
Legenda: Árvore filogenética construída utilizando o método de *Neighbor-Joining* demonstrando as amostras sequenciadas neste estudo referentes à análise do fragmento 3 (Quadro1) e sequências de referência do HBV. O genótipo F (●) com seu respectivo subgenótipo foi mostrado. Valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas abaixo de 70 foram ocultados.

Figura 17: Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene Pré-C/C.



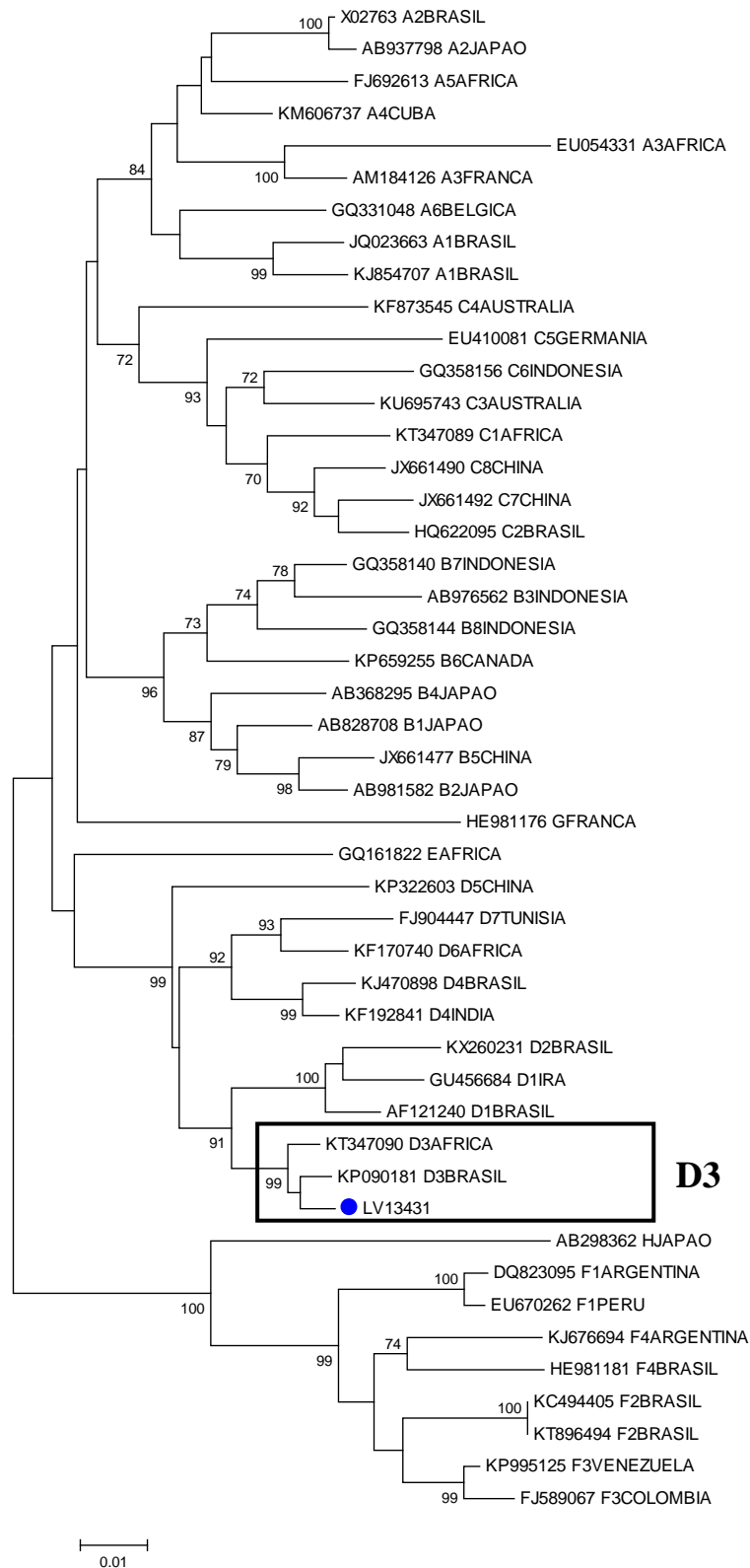
Legenda: Árvore filogenética construída utilizando o método de *Neighbor-Joining* demonstrando as amostras sequenciadas neste estudo referentes à análise do fragmento 4 (Quadro1) e seqüências de referência do HBV. O genótipo A (●) foi mostrado. Valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas abaixo de 70 foram ocultados.

Figura 18: Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene S e P.



Legenda: Árvore filogenética construída utilizando o método de *Neighbor-Joining* demonstrando as amostras sequenciadas neste estudo referentes à análise do fragmento 5 (Quadro1) e seqüências de referência do HBV. O genótipo A (●) com seu respectivo subgenótipo foi mostrado. Valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas abaixo de 70 foram ocultados.

Figura 19: Árvore filogenética referente à análise do fragmento do gene S e P, P e X.



Legenda: Árvore filogenética construída utilizando o método de *Neighbor-Joining* demonstrando as amostras sequenciadas neste estudo referentes à análise do fragmento 6 (Quadro1) e seqüências de referência do HBV. O genótipo D (●) com seu respectivo subgenótipo foi mostrado. Valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas abaixo de 70 foram ocultados.

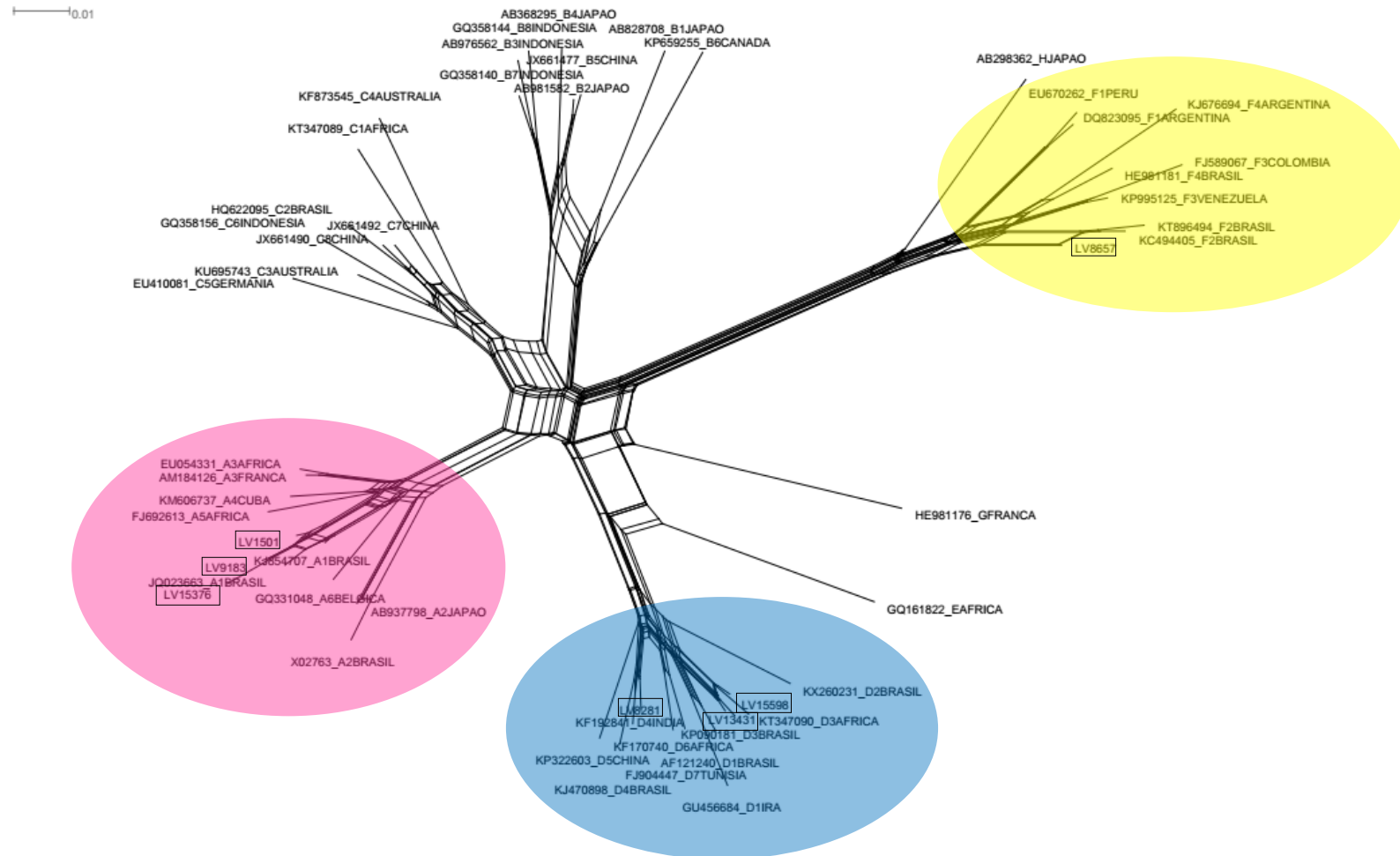
### **5.2.2 Análise de recombinação**

As análises de rede mostraram duas amostras com evidência de recombinação, observadas nas figuras 20 e 21 para as amostras LV8657 e LV14250, respectivamente. As mesmas análises para os demais fragmentos não demonstraram evidências de recombinação (Figuras 22 a 25).

As análises de recombinação utilizando o programa RDP não demonstraram evidências de recombinação inter ou intra-genotípica para as amostras LV8657 e LV14250.

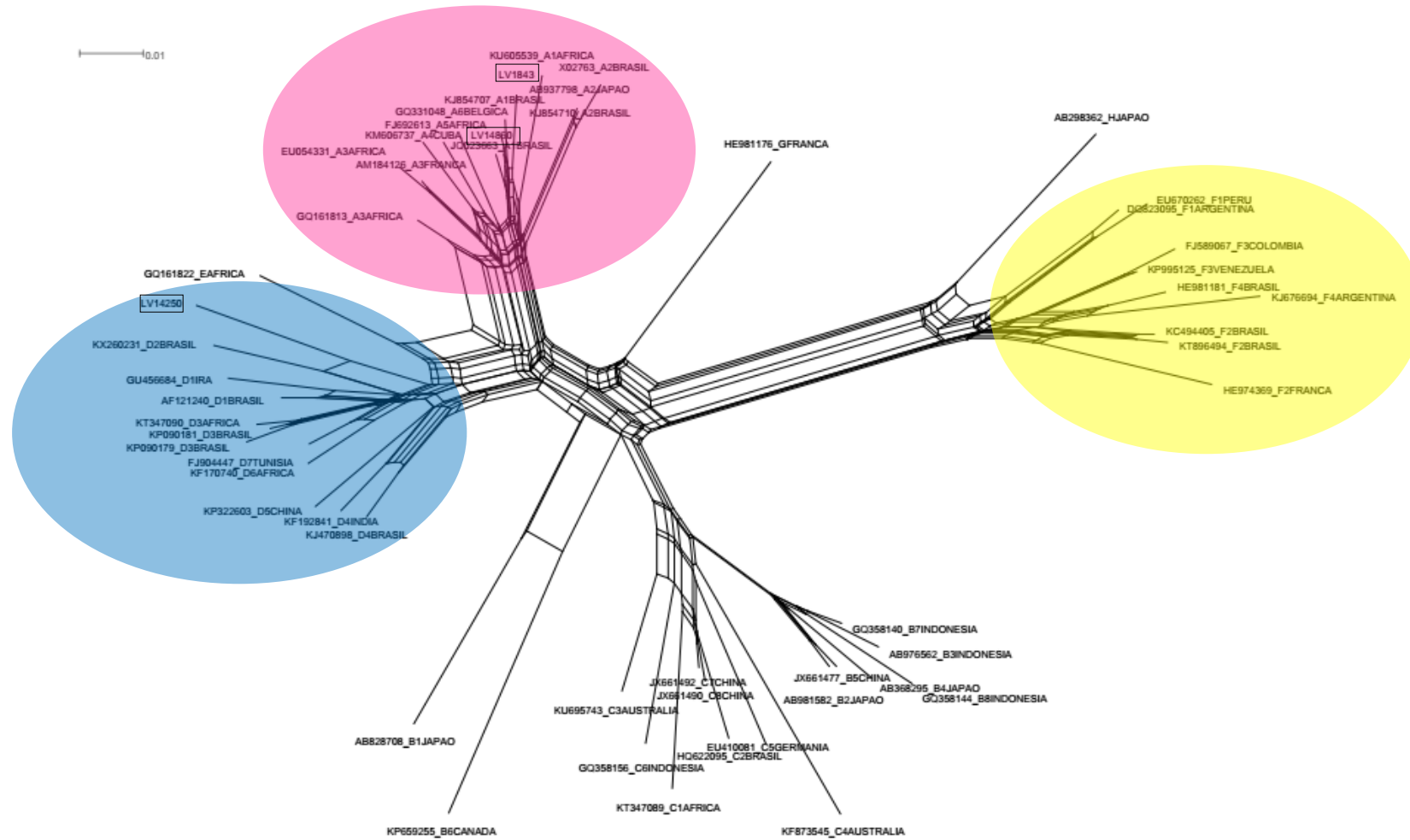


Figura 20: Análise de rede referente ao fragmento do gene do gene Pré-C/C e P, Pré-S/S e P.



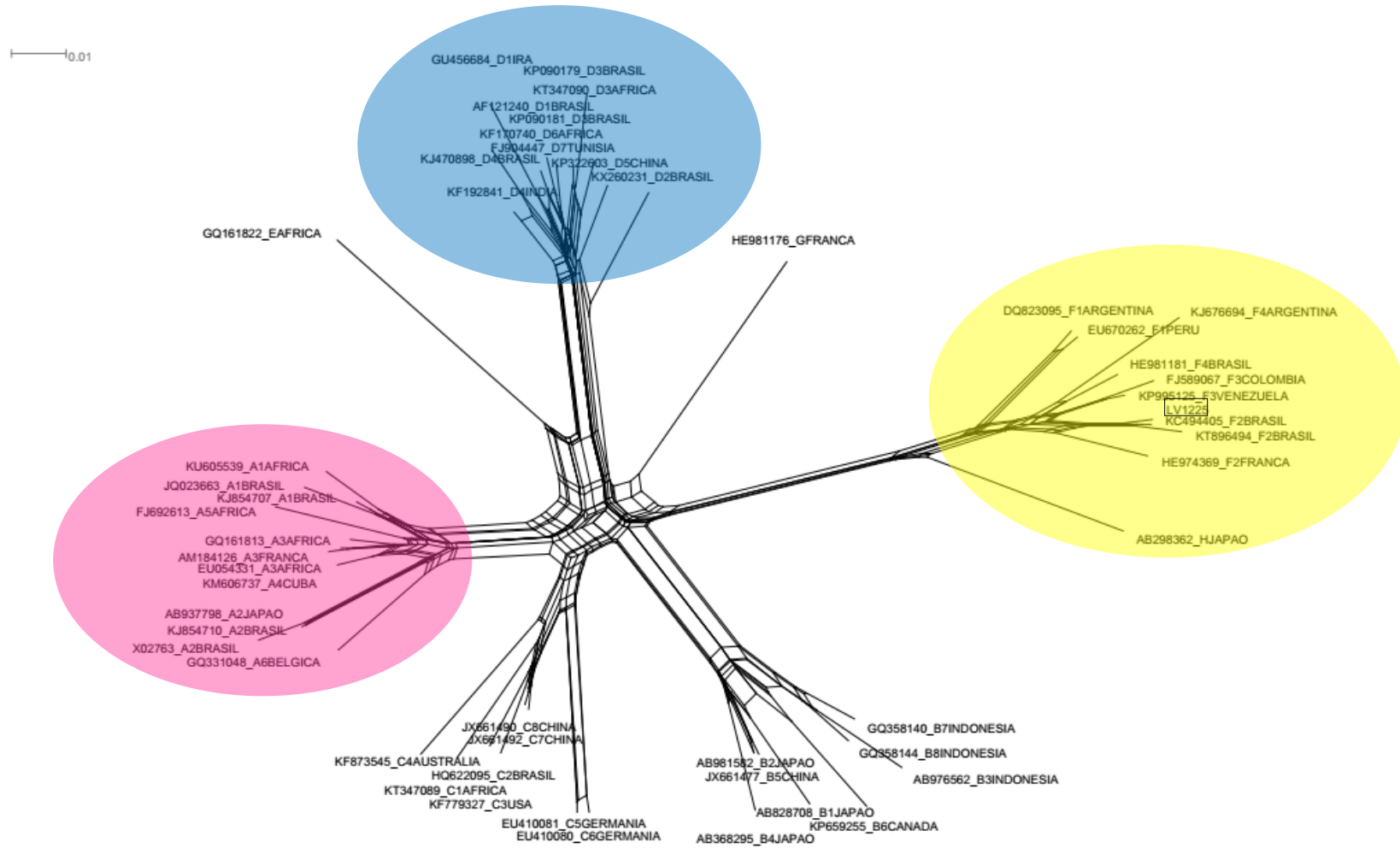
Legenda: Análise de rede utilizando método *Neighbor-Net* mostrando os agrupamentos referentes aos genótipos A (●), D (●) e F (●) do HBV.

Figura 21: Análise de rede referente ao fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S2, S e P.



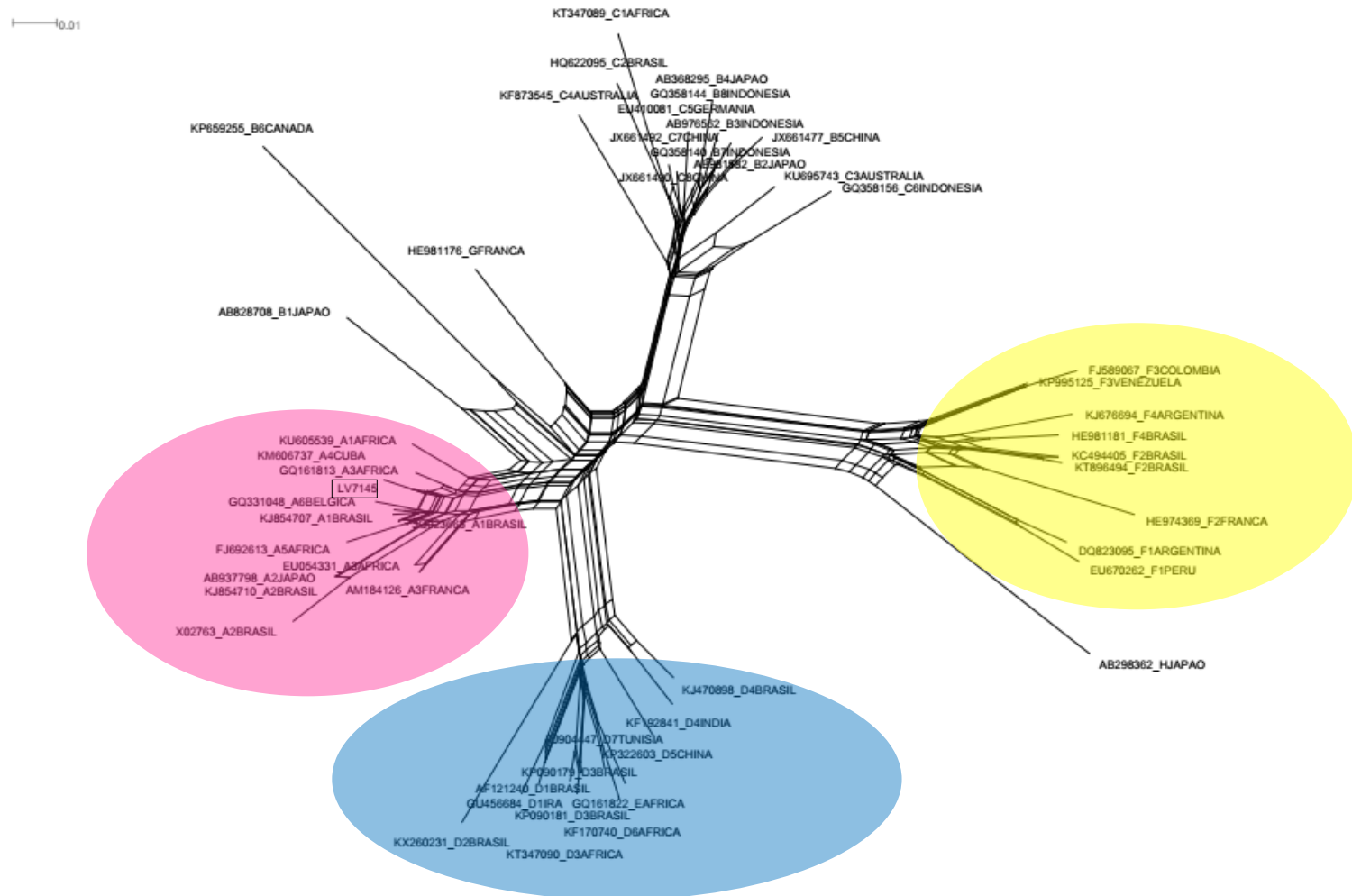
Legenda: Análise de rede utilizando método *Neighbor-Net* mostrando os agrupamentos referentes aos genótipos A (●), D (●) e F (●) do HBV.

Figura 22: Análise de rede referente ao fragmento do gene Pré-C/C e P, Pré-S1, Pré-S2 e P.



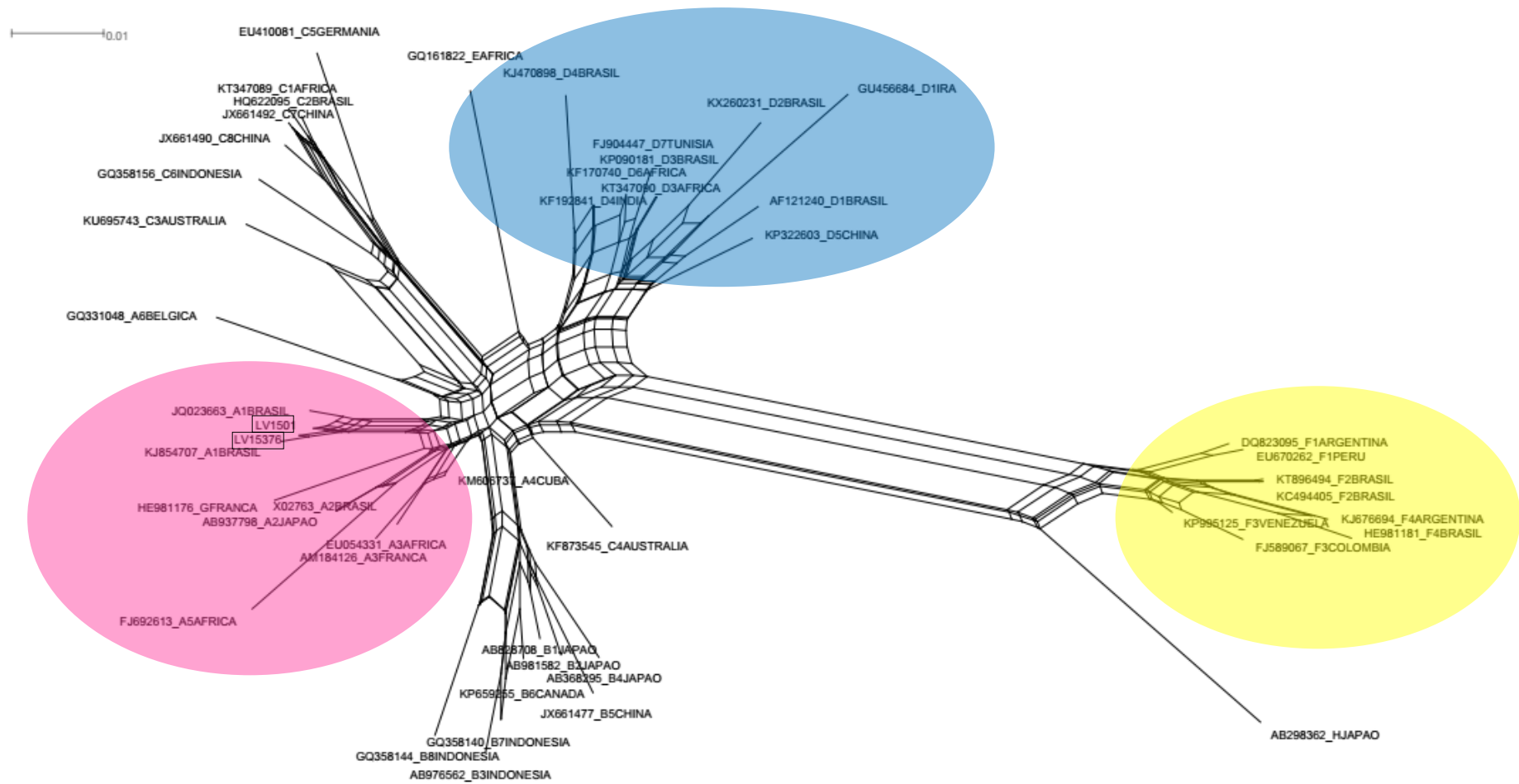
Legenda: Análise de rede utilizando método *Neighbor-Net* mostrando os agrupamentos referentes aos genótipos A (●), D (●) e F (●) do HBV.

Figura 23: Análise de rede referente ao fragmento do gene Pré-C/C.



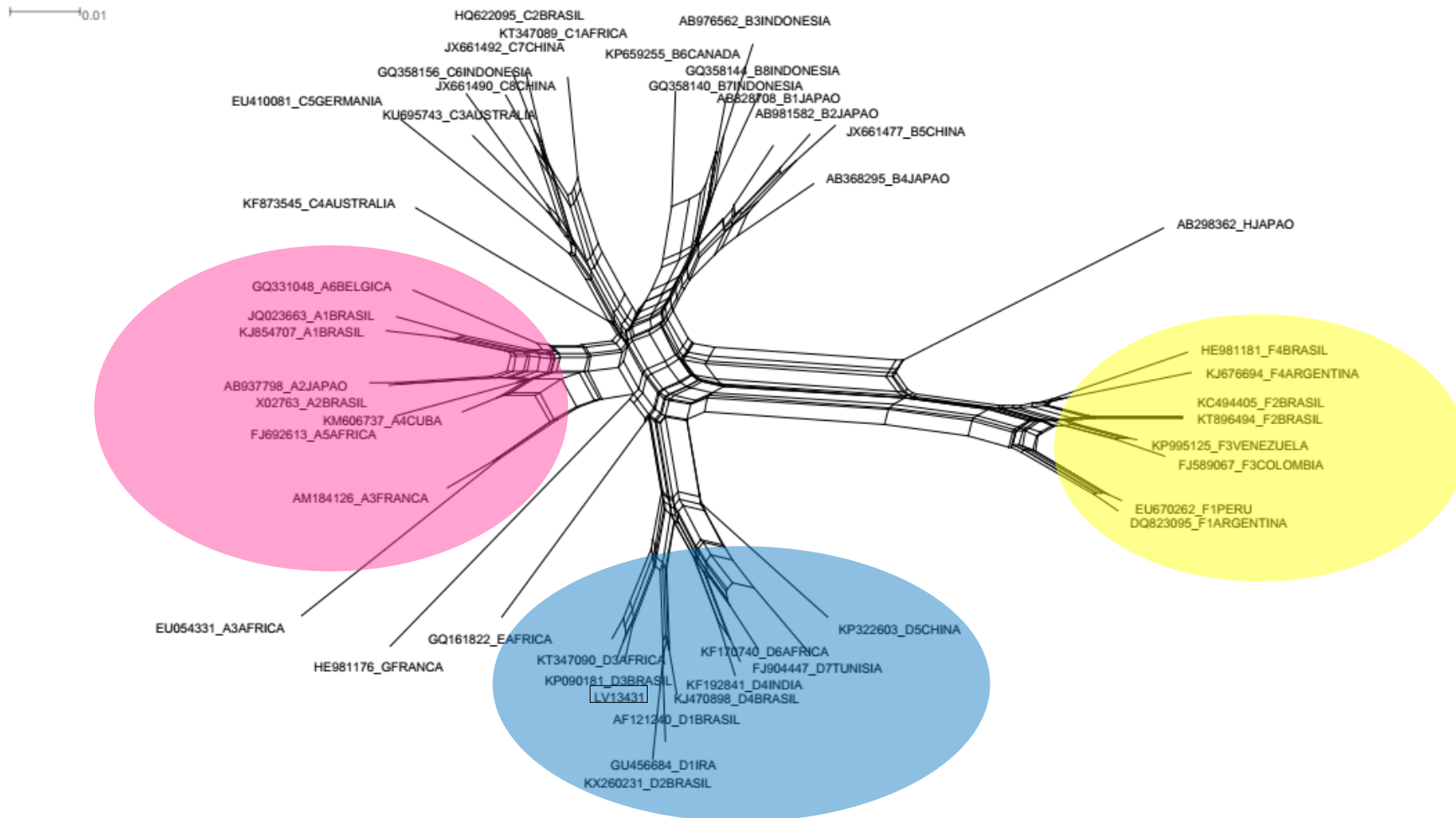
Legenda: Análise de rede utilizando método *Neighbor-Net* mostrando os agrupamentos referentes aos genótipos A (●), D (●) e F (●) do HBV.

Figura 24: Análise de rede referente ao fragmento do gene S e P.



Legenda: Análise de rede utilizando método *Neighbor-Net* mostrando os agrupamentos referentes aos genótipos A (●), D (●) e F (●) do HBV.

Figura 25: Análise de rede referente ao fragmento do gene S e P, P e X.



Legenda: Análise de rede utilizando método *Neighbor-Net* mostrando os agrupamentos referentes aos genótipos A (●), D (●) e F (●) do HBV.

### 5.3 DADOS DEMOGRÁFICOS, SOROLÓGICOS E DE RELEVÂNCIA CLÍNICA

Dos prontuários dos pacientes incluídos nas análises moleculares virais, nove estavam disponíveis para utilização. Destes pacientes, 66,7% (6/9) eram do sexo masculino e 33,3% (3/9) do sexo feminino, com idade média de 44 anos.

Todas as amostras incluídas no estudo mostraram o marcador HBsAg positivo há seis meses ou mais, sendo então os indivíduos portadores da hepatite B crônica. O HBeAg foi positivo para quatro dos nove pacientes, demonstrando que 44,4% estavam em fase ativa de replicação. Os pacientes que apresentaram resultados negativos para o HBeAg foram positivos para o anti-HBe, indicando que a soroconversão foi provavelmente acompanhada de supressão da replicação viral nesses pacientes. Os anticorpos produzidos contra o antígeno de superfície do HBV (Anti-HBs), que conferem imunidade ao vírus, foram negativos em todos os pacientes, enquanto que os anticorpos anti-HBc total, indicativos de contato com o HBV foram positivos.

Quanto à presença de doença decorrente da evolução da hepatite B crônica, 44,4% (4/9) dos pacientes apresentavam cirrose hepática e uma paciente apresentou concomitantemente cirrose e hepatocarcinoma.

Em relação aos análogos de nucleosídeos e imunomoduladores utilizados no tratamento da hepatite B crônica, o entecavir foi administrado em 66,6% (6/9) dos pacientes, seguido do intérféron-alfa (33,3%) (3/9), intérféron-alfa peguilado (22,2%) (2/9) e tenofovir (22,2%) (2/9). A lamivudina e o adefovir foram administrados em um único paciente. Além disso, 44,4% (4/9) dos pacientes fizeram uso de um análogo de nucleosídeo associado a um imunomodulador e um paciente fez uso de mais de um análogo de nucleosídeo, indicando que pode ter ocorrido resistência aos fármacos utilizados no início do tratamento. Os resultados demográficos, sorológicos e de relevância clínica estão resumidos na tabela 7.

Tabela 7: Características demográficas, sorológicas e de relevância clínica disponíveis nos prontuários avaliados no estudo.

<b>Paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>HBsAg</b>	<b>HBeAg</b>	<b>Anti-HBs</b>	<b>Anti-Hbe</b>	<b>Anti-HBc Total</b>	<b>ENT</b>	<b>TNF</b>	<b>LAM</b>	<b>ADV</b>	<b>INF-alfa</b>	<b>INF-Peg</b>	<b>HCC</b>	<b>Cirrose</b>
LV14250	F	60	+	-	-	+	+	S	N	N	N	N	N	S	S
LV1843	M	40	+	+	-	-	+	N	S	S	S	S	S	N	S
LV15376	M	31	+	-	-	+	+	N	S	N	N	S	N	N	N
LV1225	M	31	+	-	-	+	+	S	N	N	N	N	N	N	N
LV14860	M	58	+	-	-	+	+	S	N	N	N	N	N	N	S
LV8657	M	44	+	+	-	-	+	S	N	N	N	N	S	N	N
LV1501	M	30	+	+	-	-	+	S	N	N	N	N	N	N	N
LV8281	F	44	+	+	-	-	+	N	N	N	N	S	N	N	S
LV7145	F	58	+	-	-	+	+	S	N	N	N	N	N	N	N

Antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg); Antígeno marcador de replicação viral (HBeAg); Anticorpo contra o antígeno de superfície da hepatite B (Anti-HBs); Anticorpo contra o antígeno marcador de replicação viral (Anti-HBe); Anticorpo contra o antígeno do core (Anti-HBc total); Reagente para o marcador sorológico (+); Não reagente para o marcador sorológico (-); Entecavir (ENT); Tenofovir (TNF); Lamivudina (LAM); Adefovir (ADV); Intérféron-alfa (INF-alfa); Intérféron-peguilado (INF-peg); Hepatocarcinoma (HCC); Paciente tratado com o fármaco (S); Paciente não tratado com o fármaco (N).



#### 5.4 ANÁLISE DAS SUBSTITUIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

Na análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidos no estudo (Tabela 9) dos genes S, P, C e X, foram identificadas 10 substituições de nucleotídeos localizadas no gene C, 6 substituições de aminoácidos localizadas no gene S e 3 substituições de nucleotídeos no gene X. Não foram identificadas mutações de resistência localizadas na região RT do gene P nas amostras analisadas.

Neste estudo, o aminoácido mais variável foi o 17, no qual foi identificada substituição em 9 amostras. Esse sítio também foi o mais variável nas amostras do genótipo A (substituição S17A em 4 amostras) e no genótipo D (substituição S17A em todas as amostras do genótipo D).

As alterações clínicas associadas à presença das substituições encontradas na análise das sequências incluem a redução ou ausência da secreção de HBeAg, progressão da hepatite B crônica para hepatocarcinoma e escape do sistema imunológico.

Tabela 8: Substituições de nucleotídeos e aminoácidos encontrados nas sequências analisadas no estudo.

Paciente	Substituição/ Posição	Nucleotídeo/Aminoácido substituído	Localização	Alterações Clínicas
LV14250	G2291C/A	C	Gene C	Redução da secreção de HBeAg e HCC
	C2134T	T	Gene C	HCC
	A2189T/C	T	Gene C	HCC
	S17A	A	Gene S	Escape imune
LV1843	T2293C	C	Gene C	Redução da secreção de HBeAg e HCC
	T2441C	C	Gene C	Redução da secreção de HBeAg e HCC
	C2134T	T	Gene C	HCC
	A2149T/C	T	Gene C	HCC
	T2176C	C	Gene C	HCC
	S17A	A	Gene S	Escape imune
	P32L	L	Gene S	Escape imune
LV15376	S17A	A	Gene S	Escape imune
	F161Y	Y	Gene S	Escape imune
	A184V	V	Gene S	Escape imune
	S207N	N	Gene S	Escape imune
LV1225	C2191T	T	Gene C	Redução da secreção de HBeAg e HCC

	C2245T	T	Gene C	HCC
LV14860	T2293C	C	Gene C	Redução da secreção de HBeAg e HCC
	A2149T/C	T	Gene C	HCC
	T2176C	C	Gene C	HCC
	C2245T	T	Gene C	HCC
	S17A	A	Gene S	Escape imune
	P32L	L	Gene S	Escape imune
LV8657	S17A	A	Gene S	Escape imune
LV1501	T2293C	C	Gene C	Redução da secreção de HBeAg e HCC
	T2441C	C	Gene C	Redução da secreção de HBeAg e HCC
	C2134T	C	Gene C	HCC
	A2149T/C	T	Gene C	HCC
	T2176C	C	Gene C	HCC
	S17A	A	Gene S	Escape imune
	S32L	L	Gene S	Escape imune
	A184V	V	Gene S	Escape imune
	S207N	N	Gene S	Escape imune
LV8281	C2134T	T	Gene C	HCC
	A2149T/C	C	Gene C	HCC
	A2189T/C	T	Gene C	HCC
	C2221T	T	Gene C	HCC
	S17A	A	Gene S	Escape imune
	P32L	L	Gene S	Escape imune
LV7145	A2149T/C	T	Gene C	HCC
	T2176C	C	Gene C	HCC
LV9183	C2134T	T	Gene C	HCC
	A2149T/C	T	Gene C	HCC
	T2176C	C	Gene C	HCC
	T2293C	C	Gene C	Redução da secreção de HBeAg e HCC
LV15598	T2441C	C	Gene C	Redução da secreção de HBeAg e HCC
	C2134T	T	Gene C	HCC
	A2149T/C	C	Gene C	HCC
	A2189T/C	T	Gene C	HCC
	C2221T	T	Gene C	HCC
	C2245T	T	Gene C	HCC
	S17A	A	Gene S	Escape imune

LV13431	T2441C	C	Gene C	Redução da secreção de HBeAg e HCC
	C2134T	T	Gene C	HCC
	A2149T/C	C	Gene C	HCC
	A2189T/C	T	Gene C	HCC
	C2221T	T	Gene C	HCC
	C2245T	T	Gene C	HCC
	S17A	A	Gene S	Escape imune
	P32L	L	Gene S	Escape imune
	T143S	S	Gene S	Escape imune
	A184V	V	Gene S	Escape imune
	G1461A/T/C	T	Gene X	HCC
	C1485T	T	Gene X	HCC
	T1544A/C	A	Gene X	HCC

## 6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a realizar uma caracterização dos genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B em portadores crônicos do estado de Rondônia para avaliar simultaneamente a distribuição genotípica, presença de recombinação e variantes do HBV. A caracterização molecular do HBV é importante para determinar as origens evolutivas e a variabilidade genética do vírus.

As amostras avaliadas neste estudo mostraram a preponderância dos genótipos A, D e F. Estudos prévios sobre a distribuição dos genótipos e subgenótipos do HBV no Brasil e na Amazônia também relataram o predomínio desses genótipos (MORAES, GOMES, NIEL, 1996; SITNIK et al., 2004; ALCALDE et al., 2009; SANTOS et al., 2010; DIAS et al., 2012). Esses resultados corroboram com as origens étnicas da população brasileira que tem influência africana, europeia e indígena.

A frequência do genótipo A neste estudo foi de 50%, semelhante ao estudo de Sitnik e colaboradores (2004) que encontrou o referido genótipo em 49,5% dos pacientes utilizando amostras de diversas regiões brasileiras. Estudos sobre a distribuição genotípica do HBV na região norte também revelaram uma predominância do genótipo A, mais especificamente do subgenótipo A1 (MELLO et al., 2007; DIAS et al., 2012).

O subgenótipo A1 foi observado em 83,4% das amostras, maior que a detectada por Mello e colaboradores (2007) (68,2%) e semelhante a um estudo mais recente realizado por Chachá e colaboradores (2017) na cidade de Ribeirão Preto (82,7%). Estes achados estão associados à presença de populações afrodescendentes introduzidas nas Américas durante o período da escravidão (MOTTA-CASTRO et al., 2005).

Vale ressaltar que não foi possível subgenotipar uma das amostras incluídas no genótipo A, possivelmente devido à região obtida mostrar baixa variabilidade genética para esta inferência.

As sequências do HBV do subgenótipo A1 analisadas nesta pesquisa estão agrupadas em diferentes grupos na árvore filogenética, contudo ambas estão associadas às sequências brasileiras. Estes resultados indicam que há uma provável variação na entrada deste subgenótipo no estado de Rondônia.

O genótipo D foi encontrado em 33,4% das amostras, sendo o segundo genótipo mais freqüente na população estudada. Algumas pesquisas também apresentaram

resultados semelhantes no Maranhão por Barros e colaboradores(2014) (28%) e no Amazonas por Dias e colaboradores(2012) (35%). Apesar disso, a frequência do genótipo D foi maior em um estudo realizado em 2010 em Rondônia por Santos e colaboradores (42,8%), assim como em grande parte dos estudos realizados na região sul do país no estado de Santa Catarina por Mello e colaboradores(2007) (84,2%) e Gusatti e colaboradores (2015) (97%), no Rio Grande do Sul por Becker e colaboradores(2010) (60,4%) e no Paraná por Bertolini e colaboradores (2012) (82,9%) e De Mello e colaboradores(2014) (66,7%).

A elevada prevalência do genótipo D é incomum na América do Sul, onde o genótipo A, no Brasil, e F, em outros países da América do Sul, são os mais prevalentes. A hipótese mais recente sobre a introdução do genótipo D no Brasil tem sido sugerida pela imigração de europeus no final do século XIX principalmente para a região Sul do país, uma vez que o genótipo D é um dos mais prevalentes na Europa. Essa hipótese, explica a alta endemicidade desse genótipo na região Sul do Brasil (GUSATTI et al., 2015).

O subgenótipo D3 foi encontrado em 50% das amostras classificadas com o genótipo D, seguido pelos subgenótipos D2 e D4, que apresentaram a mesma proporção (25%). Os subgenótipos D2, D3 e D4 possuem distribuição ampla, porém tem sido descritos em outros estudos na América do Sul e no Brasil (BARBINI et al., 2013; BARROS et al., 2014; OZARAS et al., 2015). Esses resultados coincidem com os encontrados em Rondônia por Santos e colaboradores(2010), onde o subgenótipo mais prevalente foi o D3, assim como em Ribeirão preto no estudo de Chachá e colaboradores (2017) (73,7%). Em contrapartida, no Maranhão, o subgenótipo mais prevalente no estudo de Barros e colaboradores(2014) foi o D4 (87,8%).

O genótipo F foi o menos frequente nesse estudo (16,6%). Essa frequência é semelhante à observada em várias regiões do Brasil por Mello e colaboradores(2007) (13%) e em Rondônia por Santos e colaboradores(2010) (20%), e maior que a observada no Amazonas por Dias e colaboradores(2012) (5%) e no Paraná por Bertolini e colaboradores(2012) (1,3%). Esses resultados diferem de outros países da América Latina como Venezuela, Colômbia e Chile, onde o genótipo F é o mais frequente (DEVESA et al., 2008; ALVARADO MORA et al., 2011; VENEGAS et al., 2011). Essa discrepância está relacionada à história evolutiva do genótipo F, provavelmente

originado de populações ameríndias. Isso indica que houve uma contribuição mais baixa da população indígena nativa no Brasil, mesmo na região Norte, onde essa população compreende grande parte da população total (NAUMANN et al., 1993; BLITZ et al., 1998).

Todas as sequências do genótipo F pertencem ao subgenótipo F2, condizente com o estudo realizado em diferentes localidades brasileiras por Mello e colaboradores(2013)que revelou o predomínio desse subgenótipo nas cinco regiões geográficas brasileiras, principalmente na região norte, onde todas as amostras analisadas (29/29) corresponderam ao subgenótipo F2.

A determinação dos genótipos e subgenótipos do HBV tem sido importante para avaliar a progressão da hepatite B crônica e os resultados terapêuticos. Em um estudo realizado na Europa por Sánchez-Tapias e colaboradores (2002) os pacientes com genótipo A apresentaram diminuição do DNA do HBV durante o tratamento da infecção mais freqüente do que pacientes com genótipo D. Outro estudo realizado no Alasca por Livingston e colaboradores(2007) demonstrou que os indivíduos infectados com os genótipos C, D e F apresentam maiores taxas de complicações, incluindo o hepatocarcinoma, se comparados ao genótipo A.

Em relação a estudos realizados em outras localidades do mundo, como no Japão por Ito e colaboradores(2014), o genótipo A foi associado a um risco maior de evolução para a cronicidade se comparado aos demais genótipos. Num estudo realizado por Kao e colaboradores(2004), na Ásia, pacientes com genótipo C apresentaram uma fase mais prolongada do HBeAg e complicações da doença hepática do que os pacientes com genótipo B. Enquanto no estudo de Chu e colaboradores (2003), nos Estados Unidos, o genótipo D foi associado ao HBeAg negativo e mutações Pré-Core, atribuindo a este estado sorológico o risco de desenvolvimento de cirrose hepática.

Neste estudo, as características demográficas, sorológicas e de relevância clínica foram descritas a fim de corroborar os dados da pesquisa. Entretanto, não foi possível realizar uma associação entre as variáveis observadas e os resultados obtidos, devido principalmente ao número de casos estudados.

Por isso, são necessárias mais pesquisas para avaliar a influência dos genótipos na progressão da hepatite em infecções relacionadas principalmente aos genótipos A, D,

E, F, G e H, devido à existência de um número limitado de estudos nas regiões de alta endemicidade desses genótipos (KAO, 2011; POURKARIM et al., 2014).

Além dos genótipos, outro fator virológico importante são as mutações no genoma do HBV, especialmente substituições de nucleotídeos e aminoácidos associadas à resposta a terapia antiviral, escape imunológico, falha na detecção de HBsAg e desenvolvimento de cirrose hepática e hepatocarcinoma (CAO, 2009; ZOULIM; LOCARNINI, 2009; KIM et al., 2013; GAO; DUAN; COFFIN, 2015; XIE et al., 2015).

Esta análise revelou a presença de substituições que estão associadas a diversas alterações clínicas, o que aponta a presença de cepas circulantes com essas características que podem influenciar no curso clínico da infecção crônica pelo HBV.

As substituições de aminoácidos observadas no gene S das amostras analisadas S17A, P32L, F161Y, A184V, S207N e T143S estão associadas ao escape imunológico e infecção oculta causada pelo HBV. De acordo com o estudo realizado por Weinberger e colaboradores (2000), Olinger e colaboradores (2007), Wu e colaboradores (2012) Kim e colaboradores (2013) e Darmawan e colaboradores (2015), essas mutações provocam uma mudança conformacional no HBsAg e afetam o reconhecimento imunológico induzido pela vacina, a terapia com imunoglobulina humana específica anti-hepatite B e a detecção do HBV através de testes sorológicos.

No gene C, as substituições observadas G2291C/A, C2134T, A2189T/C, T2293C, T2441C, A2149T/C, T2176C, C2191T, C2245T, C2221T estão relacionadas ao carcinoma hepatocelular e cirrose hepática, conforme observado por Kim e colaboradores (2012), Wu e colaboradores (2014) e Xie e colaboradores (2015). Além de demonstrar influência sobre a gravidade clínica da hepatite B crônica, algumas dessas substituições podem ainda alterar o estado sorológico do HBeAg, afetando a expressão ou a excreção desse marcador, o que também pode contribuir para a progressão da doença hepática (LIAO et al., 2012; TSENG et al., 2015; KIM et al., 2016).

As substituições localizadas no gene X encontradas neste estudo G1461A/T/C, C1485T e T1544A/C são associadas principalmente ao hepatocarcinoma celular. Alguns estudos como o de Arbutnot, Capovilla, Kew, (2000) e Li e colaboradores (2015) relataram a presença dessas substituições associadas à hepatocarcinogênese.

As sequências em que foi possível analisar a região RT do gene da polimerase, não demonstraram a presença de mutações que conferem resistência aos fármacos administrados na população estudada.

O estudo apresentou algumas limitações importantes quanto ao insucesso na amplificação de todas as amostras de soro reagentes para o marcador sorológico HBsAg, o número de sequências obtidas a partir do sequenciamento com boa qualidade e a presença de diferentes regiões para realização das análises filogenéticas, o que permitiu realizar um estudo de caráter descritivo das informações obtidas na pesquisa.

Apesar disso, os dados encontrados nesse estudo refletem a diversidade genética do vírus da hepatite B, observada principalmente pela presença de variantes virais. Por isso, ressalta-se a importância de realizar estudos epidemiológicos a fim de avaliar a variabilidade do HBV na população brasileira, assim como, a distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos.



## 7. CONCLUSÃO

- Os genótipos A, D e F foram encontrados na população estudada, sendo que o genótipo A e o subgenótipo A1 foi o mais frequente dentre todas as amostras analisadas.
- Não foram observadas evidências de recombinação inter ou intra-genotípica entre as sequências analisadas no estudo.
- Algumas substituições de aminoácidos e nucleotídeos foram encontradas, sendo associadas principalmente ao escape imunológico, progressão da hepatite B crônica para hepatocarcinoma e redução ou ausência do marcador de replicação viral HBeAg.
- A diversidade genética do HBV avaliada nesse estudo mostra a importância de realizar estudos epidemiológicos para analisar a variabilidade viral, a fim de compreender melhor a heterogeneidade deste vírus e a distribuição geográfica dos genótipos, subgenótipos e variantes do HBV.

## REFERÊNCIAS

- AHN, S. H.; YUEN, L.; REVILL, P. Clarification required for the definition of hepatitis B virus subgenotypes C1 and C2. **Intervirol**, v. 52, n. 6, p. 321–322, 2009.
- ALCALDE, R.; MELO, F. L.; NISHIYA, A.; FERREIRA, S. C.; LANGHI, M. D.; FERNANDES, S. S.; MARCONDES, L. A.; DUARTE, A. J. S.; CASSEB, J. Distribution of hepatitis B virus genotypes and viral load levels in Brazilian chronically infected patients in São Paulo City. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 269–272, 2009.
- ALVARADO-MORA, M. V.; REBELLO PINHO, J. R. Distribution of HBV genotypes in Latin America. **Antiviral Therapy**, v. 18, n. 3 PARTB, p. 459–465, 2013.
- ALVARADO MORA, M. V.; ROMANO, C. M.; GOMES-GOUVEA, M. S.; GUTIERREZ, M. F.; BOTELHO, L.; CARRILHO, F. J.; PINHO, J. R. R. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: A Bayesian inference on the genotype F. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 103–108, 2011.
- ARBUTHNOT, P.; CAPOVILLA, A.; KEW, M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 15, n. 4, p. 357–68, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10824878>>.
- BAQAI, S. F.; PROUDFOOT, J.; YI, D. H.; MANGAHAS, M.; GISH, R. G. High rate of core promoter and precore mutations in patients with chronic hepatitis B. **Hepatology International**, v. 9, n. 2, p. 209–217, 2015.
- BARBINI, L.; ELIZALDE, M.; TORRES, C.; CAMPOS, R. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus in Mar del Plata city, Argentina. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 152–163, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.007>>.
- BARROS, L. M. F.; GOMES-GOUVEA, M. S.; KRAMVIS, A.; MENDES-CORREIA, M. C. J.; DOS SANTOS, A.; SOUZA, L. A. B.; SANTOS, M. D. C.; CARRILHO, F. J.; DE JESUS DOMICINI, A.; PINHO, J. R. R.; DE SOUZA PAIVA FERREIRA, A. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 24, p. 68–75, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.007>>.
- BARTHOLOMEUSZ, A.; LOCARNINI, S. Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects. **Seminars in Liver Disease**, v. 26, p. 162–170, 2006. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/sld/doi/10.1055/s-2006-939758>>.
- BASUNI, A. A.; BUTTERWORTH, L.; COOKSLEY, G.; LOCARNINI, S.; CARMAN, W. F. Prevalence of HBsAg mutants and impact of hepatitis B infant immunisation in four Pacific Island countries. **Vaccine**, v. 22, n. 21–22, p. 2791–2799, 2004.
- BECKER, C. E.; MATTOS, A. A.; BOGO, M. R.; BRANCO, F.; SITNIK, R.; KRETZMANN, N. A. Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 47, n. 1, p. 13–17, 2010. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20520969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20520969)>.
- BERTOLINI, D. A.; GOMES-GOUVEA, M. S.; CARVALHO-MELLO, I. M. V. G. de; SARACENI, C. P.; SITNIK, R.; GRAZZIOTIN, F. G.; LAURINDO, J. P.; FAGUNDES, N. J. R.; CARRILHO, F. J.; PINHO, J. R. R. Hepatitis B virus genotypes from European origin

explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1295–1304, 2012.

BLITZ, L.; PUJOL, F. H.; SWENSON, P. D.; PORTO, L.; ATENCIO, R.; ARAUJO, M.; COSTA, L.; MONSALVE, D. C.; TORRES, J. R.; FIELDS, H. A.; LAMBERT, S.; VAN GEYT, C.; NORDER, H.; MAGNIUS, L. O.; ECHEVARRÍA, J. M.; STUYVER, L. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 648–651, 1998.

BLUM, H. E. History and Global Burden of Viral Hepatitis. **Digestive Diseases**, v. 34, n. 4, p. 293–302, 2016.

BLUMBERG, B. S. Australia Antigen and the Biology of. n. 6, p. 275–296, 1976.

BLUMBERG, B. S.; ALTER, H. J. A “new” antigen in leukemia sera. **Jama**, v. 191, n. 7, p. 541–546, 1965. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/jama.1965.03080070025007>>.

BORROTO-ESODA, K.; MILLER, M. D.; ARTERBURN, S. Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials. **Journal of Hepatology**, v. 47, n. 4, p. 492–498, 2007.

BRASIL. Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais. **Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais**, p. 68, 2015.

BRASIL, M. da S. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para a Hepatite B e Coinfecções. 2017. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543784.2017.1333105>>.

BUCKWOLD, V. E.; XU, Z.; YEN, T. S. B.; OU, J. H. Effects of a frequent double-nucleotide basal core promoter mutation and its putative single-nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 8, p. 2055–2065, 1997.

CALIENDO, A. M.; VALSAMAKIS, A.; BREMER, J. W.; FERREIRA-GONZALEZ, A.; GRANGER, S.; SABATINI, L.; TSONGALIS, G. J.; WANG, Y. F.; YEN-LIEBERMAN, B.; YOUNG, S.; LURAIN, N. S. Multilaboratory evaluation of real-time PCR tests for hepatitis B virus DNA quantification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 2854–2858, 2011.

CALIGIURI, P.; CERRUTI, R.; ICARDI, G.; BRUZZONE, B. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 145–154, 2016.

CAO, G.-W. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 15, n. 46, p. 5761–5769, 2009.

CHACHÁ, S. G. F.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; MALTA, F. de M.; FERREIRA, S. da C.; VILLANOVA, M. G.; SOUZA, F. F.; TEIXEIRA, A. C.; PASSOS, A. D. da C.; PINHO, J. R. R.; MARTINELLI, A. de L. C. Distribution of HBV subgenotypes in Ribeirão Preto, Southeastern Brazil: a region with history of intense Italian immigration. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, n. x x, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867016305931>>.

CHAI, N.; CHANG, H. E.; NICOLAS, E.; HAN, Z.; JARNIK, M.; TAYLOR, J. Properties of Subviral Particles of Hepatitis B Virus. **Journal of Virology**, v. 82, n. 16, p. 7812–7817, 2008. Disponível em: <[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2519590&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2519590&tool=pmcentrez&render_type=abstract)>.

CHAKRAVARTY, R.; NEOGI, M.; ROYCHOWDHURY, S.; PANDA, C. K. Presence of hepatitis B surface antigen mutant G145R DNA in the peripheral blood leukocytes of the family members of an asymptomatic carrier and evidence of its horizontal transmission. **Virus Research**, v. 90, n. 1–2, p. 133–141, 2002.

CHAMROONKUL, N.; PIRATVISUTH, T. Hepatitis B During Pregnancy in Endemic Areas: Screening, Treatment, and Prevention of Mother-to-Child Transmission. **Pediatric Drugs**, v. 19, n. 3, p. 173–181, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40272-017-0229-1>>.

CHIRILLO, P.; PAGANO, S.; NATOLI, G.; PURI, P. L.; BURGIO, V. L.; BALSANO, C.; LEVRERO, M. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 15, p. 8162–7, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CHO, E. Y.; CHOI, C. S.; CHO, J.-H.; KIM, H. C. Association between Hepatitis B Virus X Gene Mutations and Clinical Status in Patients with Chronic Hepatitis B Infection. **Gut and liver**, v. 5, n. 1, p. 70–6, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3065097&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.

CHOE, H. J.; CHOE, B. H. What physicians should know about the management of chronic hepatitis B in children: East side story. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 13, p. 3582–3589, 2014.

CHOTIYAPUTTA, W.; LOK, A. S. F. Hepatitis B virus variants. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 6, n. 8, p. 453–62, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19581904>>.

CHU, C. J.; KEEFFE, E. B.; HAN, S. H.; PERRILLO, R. P.; MIN, A. D.; SOLDEVILA-PICO, C.; CAREY, W.; BROWN, R. S.; LUKETIC, V. A.; TERRAULT, N.; LOK, A. S. F. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. **Hepatology**, v. 38, n. 3, p. 619–628, 2003.

COPPOLA, N.; ONORATO, L.; MINICHINI, C.; DI CAPRIO, G.; STARACE, M.; SAGNELLI, C.; SAGNELLI, E. Clinical significance of hepatitis B surface antigen mutants. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 27, p. 2729–2739, 2015.

CROAGH, C. M.; DESMOND, P. V.; BELL, S. J. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. **World J Hepatol**, v. 7, n. 3, p. 289–303, 2015.

CROAGH, C. M. N.; LUBEL, J. S. Natural history of chronic hepatitis B: Phases in a complex relationship. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 30, p. 10395–10404, 2014.

CRUZ, C. R. B.; SHIRASSU, M. M.; MARTINS, W. P. Comparação do Perfil Epidemiológico das Hepatites B e C em um Serviço Público de São Paulo. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 3, p. 225–229, 2009. Disponível em: <<http://producao.usp.br/handle/BDPI/3997>>. Acesso em: 7 maio. 2017.

DA FONSECA, J. C. F. História da hepatite viral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 322–330, 2010.

DANE, D. S.; CAMERON, C. H.; BRIGGS, M. Virus-Like Particles in Serum of Patients With Australia-Antigen-Associated Hepatitis. **The Lancet**, v. 295, n. 7649, p. 695–698, 1970.

DARMAWAN, E.; TURYADI; EL-KHOBAR, K. E.; NURSANTY, N. K.; THEDJA, M. D.; MULJONO, D. H. Seroepidemiology and occult hepatitis B virus infection in young adults in Banjarmasin, Indonesia. **J Med Virol**, 2015.

DATTA, S.; CHATTERJEE, S.; VEER, V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 40, p. 14615–14625, 2014.

DATTA, S.; CHATTERJEE, S.; VEER, V.; CHAKRAVARTY, R. Molecular Biology of the Hepatitis B Virus for Clinicians. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 2, n. 4, p. 353–365, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jceh.2012.10.003>>.

DE MELLO, F. M. M. A.; KUNIYOSHI, A. S. O.; LOPES, A. F.; GOMES-GOUV??A, M. S.; BERTOLINI, D. A. Hepatitis b virus genotypes and mutations in the basal core promoter and pre-core/core in chronically infected patients in southern brazil: A cross-sectional study of hbv genotypes and mutations in chronic carriers. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 701–708, 2014.

DÉNY, P.; ZOULIM, F. Hepatitis B virus: From diagnosis to treatment. **Pathologie Biologie**, v. 58, n. 4, p. 245–253, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0369811410000635>>.

DEVESA, M.; LOUREIRO, C. L.; RIVAS, Y.; MONSALVE, F.; CARDONA, N.; DUARTE, M. C.; POBLETE, F.; GUTIERREZ, M. F.; BOTTO, C.; PUJOL, F. H. Subgenotype Diversity of HepatitisBVirus American Genotype F in Amerindians From Venezuela and the General Population of Colombia. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 4799–4804, 2008.

DIAS, A.; OLIVEIRA, C.; CASTILHO, M.; SILVA, M.; BRAGA, W. Molecular characterization of the hepatitis B virus in autochthonous and endogenous populations in the We. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 9–12, 2012.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Da. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da preven. **Rev Bras Epidemiol**, v. 7, n. 4, p. 473–87, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-790X2004000400010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000400010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

FERREIRA, M. S. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 4, p. 389–400, 2000. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822000000400010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822000000400010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

FONSECA, J. C. F. História natural da hepatite crônica B Natural history of chronic hepatitis B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 672–677, 2007.

GAO, S.; DUAN, Z.-P.; COFFIN, C. S. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 8, p. 1086–96, 2015. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v7/i8/1086.htm%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26052397%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4450185>>.

GARA, N.; ZHAO, X.; COLLINS, M. T.; CHONG, W. H.; KLEINER, D. E.; JAKE LIANG, T.; GHANY, M. G.; HOOFNAGLE, J. H. Renal tubular dysfunction during long-term adefovir or tenofovir therapy in chronic hepatitis B. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 2012.

GENG, M.; XIN, X.; BI, L.-Q.; ZHOU, L.-T.; LIU, X.-H. Molecular mechanism of hepatitis B virus X protein function in hepatocarcinogenesis. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 38, p. 10732–10738, 2015.

GERLICH, W. H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 239, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3729363&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.

GUIDOTTI, L. G.; CHISARI, F. V. Immunobiology and Pathogenesis of Viral Hepatitis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 1, n. 1, p. 23–61, 2006. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100230>>.

GUSATTI, C. S.; COSTI, C.; HALON, M. L.; GRANDI, T.; MEDEIROS, A. F. R.; SILVA, C. M. D.; GOMES, S. A.; SILVA, M. S. N.; NIEL, C.; ROSSETTI, M. L. R. Hepatitis B virus genotype D isolates circulating in Chapecó, Southern Brazil, originate from Italy. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–14, 2015.

HAN, Y.-T.; SUN, C.; LIU, C.-X.; XIE, S.-S.; XIAO, D.; LIU, L.; YU, J.-H.; LI, W.-W.; LI, Q. Clinical features and outcome of acute hepatitis B in pregnancy. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 368, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4096733&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.

HAYER, J.; JADEAU, F.; DELÉAGE, G.; KAY, A.; ZOULIM, F.; COMBET, C. HBVdb: A knowledge database for Hepatitis B Virus. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 1–5, 2013.

HOOFNAGLE, J. H.; DOO, E.; LIANG, T. J.; FLEISCHER, R.; LOK, A. S. F. Management of hepatitis B: Summary of a clinical research workshop. **Hepatology**, v. 45, n. 4, p. 1056–1075, 2007.

HOOFNAGLE, J. H. et al. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at MEMORIAL UNIV OF NEWFOUNDLAND on July 2, 2014. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. **New England Journal of Medicine**, v. 281, 1978.

HU, J.; LIU, K. Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 56, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/9/3/56>>.

HU, Z.; ZHANG, Z.; DOO, E.; COUX, O.; GOLDBERG, a L.; LIANG, T. J. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. **Journal of virology**, v. 73, n. 9, p. 7231–7240, 1999.

HUANG, C. H.; YUAN, Q.; CHEN, P. J.; ZHANG, Y. L.; CHEN, C. R.; ZHENG, Q. B.; YEH, S. H.; YU, H.; XUE, Y.; CHEN, Y. X.; LIU, P. G.; GE, S. X.; ZHANG, J.; XIA, N. S. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 720–729, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.05.009>>.

HUI, C. K.; LEUNG, N.; YUEN, S. T.; ZHANG, H. Y.; LEUNG, K. W.; LU, L.; CHEUNG, S. K. F.; WONG, W. M.; LAU, G. K. Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase. **Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 395–401, 2007.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254–267, 2005.

INOUE, T.; TANAKA, Y. Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection – an update. **Microbial Cell**, v. 3, n. 9, p. 419–436, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28357379>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28357379>>.

ITO, K.; YOTSUYANAGI, H.; YATSUHASHI, H.; KARINO, Y.; TAKIKAWA, Y.; SAITO, T.; ARASE, Y.; IMAZEKI, F.; KUROSAKI, M.; UMEMURA, T.; ICHIDA, T.; TOYODA, H.; YONEDA, M.; MITA, E.; YAMAMOTO, K.; MICHITAKA, K.; MAESHIRO, T.; TANUMA, J.; TANAKA, Y.; SUGIYAMA, M.; MURATA, K.; MASAKI, N.; MIZOKAMI, M. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 89–97, 2014.

JIANG, B.; HIMMELSBACH, K.; REN, H.; BOLLER, K. Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. v. 90, n. 7, p. 3330–3341, 2016.

JOSÉ, F.; SOUTO, D. Review Article Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. v. 49, n. May 2015, p. 11–23, 2016.

KAO, J.-H. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 2, n. 4, p. 553–562, 2008.

KAO, J.-H. Molecular epidemiology of Hepatitis B virus. **Korean J Intern Med**, v. 26, p. 255–261, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2011.26.3.255>><http://www.kjim.or.kr>.

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, n. 3, p. 554–9, 2000. Disponível em: <<http://www.gastrojournal.org/article/S0016508500702617/fulltext>><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702206>>.

KAO, J. H.; CHEN, P. J.; LAI, M. Y.; CHEN, D. S. Hepatitis B Virus Genotypes and Spontaneous Hepatitis B e Antigen Seroconversion in Taiwanese Hepatitis B Carriers. **Journal of Medical Virology**, v. 72, n. 3, p. 363–369, 2004.

KAY, A.; ZOULIM, F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. **Virus Research**, v. 127, n. 2, p. 164–176, 2007.

KAYAASLAN, B.; GUNER, R. Adverse effects of oral antiviral therapy in chronic hepatitis B. **World Journal of Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 227–241, 2017.

KE, W.; LIU, L.; ZHANG, C.; YE, X.; GAO, Y.; ZHOU, S.; YANG, Y. Comparison of efficacy and safety of tenofovir and entecavir in chronic hepatitis B virus infection: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–8, 2014.

KIM, B.-J. Hepatitis B virus mutations related to liver disease progression of Korean patients. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 2, p. 460–7, 2014. Disponível em: <[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3923020&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3923020&tool=pmcentrez&render_type=abstract)>.

KIM, B. K.; REVILL, P. A.; AHN, S. H. HBV genotypes: Relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. **Antiviral Therapy**, v. 16, n. 8, p. 1169–1186, 2011.

KIM, D. H.; KANG, H. S.; KIM, K. Roles of hepatocyte nuclear factors in hepatitis B virus infection. v. 22, n. 31, p. 7017–7029, 2016.

KIM, D. W.; LEE, S. A.; HWANG, E. S.; KOOK, Y. H.; KIM, B. J. Naturally Occurring Precore/Core Region Mutations of Hepatitis B Virus Genotype C Related to Hepatocellular Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–8, 2012.

- KIM, H.; LEE, S.-A.; DO, S. Y.; KIM, B.-J. Precore/core region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. **World Journal of Gastroenterology**, 2016a.
- KIM, H.; LEE, S.-A.; KIM, B.-J. X region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 24, p. 5467–78, 2016. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v22/i17/4287.htm%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27350725%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4917607>>.
- KIM, H.; LEE, S. A.; KIM, D. W.; LEE, S. H.; KIM, B. J. Naturally Occurring Mutations in Large Surface Genes Related to Occult Infection of Hepatitis B Virus Genotype C. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- KIM, V.; ABREU, R. M.; NAKAGAWA, D. M.; BALDASSARE, R. M.; CARRILHO, F. J.; ONO, S. K. Pegylated interferon alfa for chronic hepatitis B: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 23, n. 3, p. 154–169, 2016b.
- KO, C.; MICHLER, T.; PROTZER, U. Novel viral and host targets to cure hepatitis B. **Current Opinion in Virology**, v. 24, n. Figure 1, p. 38–45, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625716301390>>.
- KRAMVIS, A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. **Intervirolgy**, v. 57, n. 3–4, p. 141–150, 2014.
- KRAMVIS, A. The clinical implications of hepatitis B virus genotypes and HBeAg in pediatrics. **Reviews in medical virology**, v. 26, n. 4, p. 285–303, jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27139263>>. Acesso em: 18 maio. 2017.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msw054>>.
- KURBANOV, F.; TANAKA, Y.; KRAMVIS, A.; SIMMONDS, P.; MIZOKAMI, M. When Should “I” Consider a New Hepatitis B Virus Genotype? **Journal of Virology**, v. 82, n. 16, p. 8241–8242, 2008. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00793-08>>.
- KWAK, M.-S. Occult hepatitis B virus infection. **World Journal of Hepatology**, v. 6, n. 12, p. 860, 2014. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v6/i12/860.htm>>.
- LADA, O.; BENHAMOU, Y.; POYNARD, T.; THIBAUT, V. Coexistence of Hepatitis B Surface Antigen (HBs Ag) and Anti-HBs Antibodies in Chronic Hepatitis B Virus Carriers: Influence of “a” Determinant Variants. **Society**, v. 80, n. 6, p. 2968–2975, 2006.
- LAMONTAGNE, R. J.; BAGGA, S.; BOUCHARD, M. J. HHS Public Access. v. 33, n. 4, p. 395–401, 2015.
- LAZAREVIC, I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 24, p. 7653–7664, 2014.
- LE POGAM, S.; SHIH, C. Influence of a putative intermolecular interaction between core and the pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus secretion. **Journal of virology**, v. 76, n. 13, p. 6510–6517, 2002.
- LEE, D.; LYU, H.; CHUNG, Y.-H.; KIM, J. A.; MATHEWS, P.; JAFFEE, E.; ZHENG, L.; YU, E.; LEE, Y. J.; RYU, S. H. Genomic change in hepatitis B virus associated with development of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 23, p. 5393, 2016. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v22/i23/5393.htm>>.



- LEE, J. H.; CHO, Y.; LEE, D. H.; LEE, M.; YOO, J. J.; CHOI, W. M.; CHO, Y. Y.; LEE, Y. Bin; YU, S. J.; YOON, J. H.; LEE, H. S.; KIM, Y. J. Prior exposure to lamivudine increases entecavir resistance risk in chronic hepatitis B patients without detectable lamivudine resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1730–1737, 2014.
- LEE, S.-A.; MUN, H.-S.; KIM, H.; LEE, H.-K.; KIM, B.-J.; HWANG, E.-S.; KOOK, Y.-H.; KIM, B.-J. Naturally occurring hepatitis B virus X deletions and insertions among Korean chronic patients. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 1, p. 65–70, jan. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.21938>>. Acesso em: 17 maio. 2017.
- LI, W.; GOTO, K.; MATSUBARA, Y.; ITO, S.; MUROYAMA, R.; LI, Q.; KATO, N. The characteristic changes in hepatitis B virus X region for hepatocellular carcinoma: A comprehensive analysis based on global data. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–16, 2015.
- LI, W.; URBAN, S. Review Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes : Basic insights and clinical implications Review. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 1, p. S32–S40, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.011>>.
- LIANG, T. J. NIH Public Access. v. 49, p. 1–17, 2009.
- LIAO, Y.; HU, X.; CHEN, J.; CAI, B.; TANG, J.; YING, B.; WANG, H.; WANG, L. Precore mutation of hepatitis B virus may contribute to hepatocellular carcinoma risk: Evidence from an updated meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–9, 2012.
- LIAW, Y. F.; CHU, C. M. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**, v. 373, n. 9663, p. 582–592, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60207-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60207-5)>.
- LIN, C.-L.; KAO, J.-H. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 26 Suppl 1, p. 123–130, 2011.
- LIN, Y. M.; JOW, G. M.; MU, S. C.; CHEN, B. F. Naturally occurring hepatitis b virus b-cell and t-cell epitope mutants in hepatitis b vaccinated children. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
- LIU, S.; S.Y.KOH, S.; G.L.LEE, C. Hepatitis B Virus X Protein and Hepatocarcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 940, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065230X09030048>>.
- LIU, Y.-P.; YAO, C.-Y. Rapid and quantitative detection of hepatitis B virus. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 42, p. 11954, 2015. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i42/11954.htm>>.
- LIVINGSTON, S. E.; SIMONETTI, J. P.; MCMAHON, B. J.; BULKOW, L. R.; HURLBURT, K. J.; HOMAN, C. E.; SNOWBALL, M. M.; CAGLE, H. H.; WILLIAMS, J. L.; CHULANOV, V. P. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, p. 5–11, 2007.
- LOCARNINI, S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. **Hepatology International**, v. 2, n. 2, p. 147–151, 2008.
- LOCARNINI, S.; HATZAKIS, A.; CHEN, D. S.; LOK, A. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. S1, p. S76–S86, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.01.018>>.
- LOK, A. S.; HEATHCOTE, E. J.; HOOFNAGLE, J. H. Management of hepatitis B: 2000—Summary of a workshop. **Gastroenterology**, v. 120, n. 7, p. 1828–1853, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508501701904>>.

LOPES, T. G. S. L.; SCHINONI, M. I. Aspectos gerais da hepatite B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 337–344, 2011. Disponível em: <[http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/5899%5Cnhttps://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/5715/1/5899-16364-1-PB\[1\].pdf%5Cnhttp://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/viewArticle/5899](http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/5899%5Cnhttps://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/5715/1/5899-16364-1-PB[1].pdf%5Cnhttp://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/viewArticle/5899)>.

LURMANN, A. Eine Icterusepidemie. **Ber Klin Wochenschr**, 22:20-23, 1885.

MACCALLUM, F. O. 1971 International Symposium on Viral Hepatitis. Historical perspectives. **Canadian Medical Association journal**, v. 106, n. 423, p. Suppl:423-6, 1972. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1945125&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.

MALIK, A.; SINGHAL, D. K.; ALBANYAN, A.; HUSAIN, S. A.; KAR, P. Hepatitis B virus gene mutations in liver diseases: A report from New Delhi. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

MARTIN, D. P.; MURRELL, B.; GOLDEN, M.; KHOOSAL, A.; MUHIRE, B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ve/ve/article/2568683/RDP4>>.

MCMAHON, B. J. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. **Hepatology**, v. 49, n. SUPPL. 5, p. 45–55, 2009.

MELLO, F. C. a; ARAUJO, O. C.; LAGO, B. V; MOTTA-CASTRO, A. R. C.; MORAES, M. T. B.; GOMES, S. A.; BELLO, G.; ARAUJO, N. M. Phylogeography and evolutionary history of hepatitis B virus genotype F in Brazil. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 236, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3751091&tool=pmcentrez&render type=abstract%5Cnhttp://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84880130753&partnerID=tZOtx3y1%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23855930%5Cnhttp://www.scopus.c>>.

MELLO, F. C.; SOUTO, F. J.; NABUCO, L. C.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A.; COELHO, H.; FRANZ, H.; SARAIVA, J.; VIRGOLINO, H. A.; MOTTA-CASTRO, A.; MELO, M. M.; MARTINS, R. M.; GOMES, S. A. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 103, 23 nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18036224>>. Acesso em: 28 abr. 2017.

MIRABELLI, C.; SURDO, M.; VAN HEMERT, F.; LIAN, Z.; SALPINI, R.; CENTO, V.; CORTESE, M. F.; ARAGRI, M.; POLLICITA, M.; ALTERI, C.; BERTOLI, A.; BERKHOUT, B.; MICHELI, V.; GUBERTINI, G.; SANTORO, M. M.; ROMANO, S.; VISCA, M.; BERNASSOLA, M.; LONGO, R.; DE SANCTIS, G. M.; TRIMOULET, P.; FLEURY, H.; MARINO, N.; MAZZOTTA, F.; CAPPIELLO, G.; SPANÒ, A.; SARRECCHIA, C.; ZHANG, J. M.; ANDREONI, M.; ANGELICO, M.; VERHEYEN, J.; PERNO, C. F.; SVICHER, V. Specific mutations in the C-terminus domain of HBV surface antigen significantly correlate with low level of serum HBV-DNA in patients with chronic HBV infection. **Journal of Infection**, v. 70, n. 3, p. 288–298, 2015.

MORAES, M. T.; GOMES, S. A.; NIEL, C. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brazil. **Arch Virol**, v. 141, n. 9, p. 1767–1773, 1996. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8893798](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8893798)>.

MORALES-ROMERO, J.; VARGAS, G.; GARCÍA-ROMÁN, R. Occult HBV infection: A faceless enemy in liver cancer development. **Viruses**, v. 6, n. 4, p. 1590–1611, 2014.

MOTTA-CASTRO, A. R. C.; MARTINS, R. M. B.; YOSHIDA, C. F. T.; TELES, S. A.; PANIAGO, A. M.; LIMA, K. M. B.; GOMES, S. A. Hepatitis B virus infection in isolated Afro-Brazilian communities. **Journal of Medical Virology**, v. 77, n. 2, p. 188–193, 2005.

MUROYAMA, R.; KATO, N.; YOSHIDA, H.; OTSUKA, M.; MORIYAMA, M.; WANG, Y.; SHAO, R. X.; DHAREL, N.; TANAKA, Y.; OHTA, M.; TATEISHI, R.; SHIINA, S.; TATSUKAWA, M.; FUKAI, K.; IMAZEKI, F.; YOKOSUKA, O.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Nucleotide change of codon 38 in the X gene of hepatitis B virus genotype C is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 45, n. 6, p. 805–812, 2006.

NAUMANN, H.; SCHAEFER, S.; YOSHIDA, C. F. T.; GASPAR, A. M. C.; REPP, R.; GERLICH, W. H. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. **Journal of General Virology**, v. 74, n. 8, p. 1627–1632, 1993.

NELSON, N. P.; EASTERBROOK, P. J.; MCMAHON, B. J. Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection and Impact of Vaccination on Disease. **Clinics in Liver Disease**, v. 20, n. 4, p. 607–628, 2016.

NI, Y.-H. Natural history of hepatitis B virus infection: pediatric perspective. **Journal of Gastroenterology**, v. 46, n. 1, p. 1–8, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00535-010-0304-7>>.

NISHIKAWA, H.; OSAKI, Y. Clinical significance of occult hepatitis B infection in progression of liver disease and carcinogenesis. **Journal of Cancer**, v. 4, n. 6, p. 473–480, 2013.

NORDER, H.; COUROUC??, A. M.; COURSAGET, P.; ECHEVARRIA, J. M.; LEE, S. D.; MUSHAHWAR, I. K.; ROBERTSON, B. H.; LOCARNINI, S.; MAGNIUS, L. O. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. **Intervirol**, v. 47, n. 6, p. 289–309, 2004.

OHNO, M.; OTSUKA, M.; KISHIKAWA, T.; YOSHIKAWA, T.; TAKATA, A.; KOIKE, K. Novel therapeutic approaches for hepatitis B virus covalently closed circular DNA. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 23, p. 7084–7088, 2015.

OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; SAKUGAWA, H.; SASTROSOEWIGNJO, R. I.; IMAI, M.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **J Gen Virol**, v. 69 ( Pt 10, p. 2575–2583, 1988.

OLINGER, C. M.; WEBER, B.; OTEGBAYO, J. A.; AMMERLAAN, W.; VAN DER TAELEM-BRULÉ, N.; MULLER, C. P. Hepatitis B virus genotype E surface antigen detection with different immunoassays and diagnostic impact of mutations in the preS/S gene. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 196, n. 4, p. 247–252, 2007.

OZARAS, R.; INANC BALKAN, I.; YEMISEN, M.; TABAK, F. Epidemiology of HBV subgenotypes D. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 39, n. 1, p. 28–37, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinre.2014.06.005>>.

PARK, Y. M.; JANG, J. W.; YOO, S. H.; KIM, S. H.; OH, I. M.; PARK, S. J.; JANG, Y. S.; LEE, S. J. Combinations of eight key mutations in the X/preC region and genomic activity of hepatitis B virus are associated with hepatocellular carcinoma. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 21, n. 3, p. 171–177, 2014.

PATIENT, R.; HOURIOUX, C.; SIZARET, P. Y.; TRASSARD, S.; SUREAU, C.;

ROINGEARD, P. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. **J Virol**, v. 81, n. 8, p. 3842–3851, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17267490>>.

POLLICINO, T.; RAFFA, G.; COSTANTINO, L.; LISA, A.; CAMPELLO, C.; SQUADRITO, G.; LEVRERO, M.; RAIMONDO, G. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 277–285, 2007.

POSADA, D. How does recombination affect phylogeny estimation? **Trends in biochemical sciences**, p. 489–490, 2000.

POURKARIM, M. R.; AMINI-BAVIL-OLYAEI, S.; KURBANOV, F.; VAN RANST, M.; TACKE, F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/ subgenotypes: Revised classification hurdles and updated resolutions. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7152–7168, 2014.

PRINCE, A. RELATION OF AUSTRALIA AND SH ANTIGENS. **The Lancet**, v. 292, n. 7565, p. 462–463, ago. 1968. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673668905126>>. Acesso em: 3 maio. 2017.

QUARLERI, J. Core promoter: A critical region where the hepatitis B virus makes decisions. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 2, p. 425–435, 2014.

RAIMONDO, G.; ALLAIN, J.-P.; BRUNETTO, M. R.; BUENDIA, M.-A.; CHEN, D.-S.; COLOMBO, M.; CRAXÌ, A.; DONATO, F.; FERRARI, C.; GAETA, G. B.; GERLICH, W. H.; LEVRERO, M.; LOCARNINI, S.; MICHALAK, T.; MONDELLI, M. U.; PAWLOTSKY, J.-M.; POLLICINO, T.; PRATI, D.; PUOTI, M.; SAMUEL, D.; SHOUVAL, D.; SMEDILE, A.; SQUADRITO, G.; TRÉPO, C.; VILLA, E.; WILL, H.; ZANETTI, A. R.; ZOULIM, F. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 652–657, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827808004790>>.

RAIMONDO, G.; POLLICINO, T.; CACCIOLA, I.; SQUADRITO, G. Occult hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 160–170, 2007.

RIZZETTO, M. Epatite crônica B: standard de terapia e perspectivas. n. May 2017, p. 355–359, 2016.

SAID, Z. N. A. An overview of occult hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 15, p. 1927–1938, 2011.

SAINOKAMI, S.; ABE, K.; SATO, A.; ENDO, R.; TAKIKAWA, Y.; SUZUKI, K.; OKAMOTO, H. Initial load of hepatitis B virus (HBV), its changing profile, and precore/core promoter mutations correlate with the severity and outcome of acute HBV infection. **Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 3, p. 241–249, 2007.

SÁNCHEZ-TAPIAS, J. M.; COSTA, J.; MAS, A.; BRUGUERA, M.; RODÉS, J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. **Gastroenterology**, v. 123, n. 6, p. 1848–1856, 2007.

SANDHU, P.; HAQUE, M.; HUMPHRIES-BICKLEY, T.; RAVI, S.; SONG, J. Hepatitis B Virus Immunopathology, Model Systems, and Current Therapies. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. April, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00436/full>>.

SANTOS, A. O. **Identificação de hepatite B oculta em indivíduos com anti-HBc isolado utilizando um método molecular ultrasensível.** 2016. 2016.

- SANTOS, A. O.; ALVARADO-MORA, M. V.; BOTELHO, L.; VIEIRA, D. S.; PINHO, J. R. R.; CARRILHO, F. J.; HONDA, E. R.; SALCEDO, J. M. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. **Virology journal**, v. 7, n. 1, p. 315, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2994811&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.
- SANTOS, L. V. dos; ROCHA, R. D. R.; FERREIRA, M. de F. R. HEPATITE B: aspectos gerais. **Pós em Revista**, p. 227–235, 2009.
- SCHAEFER, S.; MAGNIUS, L.; NORDER, H. Under construction: Classification of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes. **Intervirolgy**, v. 52, n. 6, p. 323–325, 2009.
- SEEGER, C.; MASON, W. S. HBV replication, pathobiology and therapy: Unanswered questions. **Journal of hepatology**, v. 64, n. 1 Suppl, p. S1-3, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016882781600009X>>.
- SHEN, T.; YAN, X.-M. Hepatitis B virus genetic mutations and evolution in liver diseases. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 18, p. 5435–5441, 2014. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/esps/%5Cnhttp://www.wjgnet.%5Cnhttp://dx.doi.>>.
- SILVA, A. C. B. e; SOUZA, L. F. B.; KATSURAGAWA, T. H.; LIMA, A. A. de; VIEIRA, D. S.; SALCEDO, J. M. V. Perfil soropidemiológico da hepatite B em localidades ribeirinhas do rio Madeira, em Porto Velho, Estado de Rondônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 51–59, 2015. Disponível em: <[http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-62232015000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232015000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.
- SILVA, A. L. Da; VITORINO, R. R.; ESPERIDIÃO-ANTONIO, V.; SANTOS, E. T.; SANTANA, L. A.; HENRIQUES, B. D.; GOMES, A. P. Hepatites virais: B, C e D: atualização \*. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, 2012.
- SIMMONDS P, MIDGLEY S; SIMMONDS P, M. S.; SIMMONDS, P.; MIDGLEY, S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. **Journal of virology**, v. 79, n. 24, p. 15467–15476, 2005. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/79/24/15467.short>>.
- SITNIK, R.; RENATO, J.; PINHO, R.; BERTOLINI, A.; BERNARDINI, A. P.; CAETANO, L.; BERTOLINI, D. A.; JOSE, F. Hepatitis B Virus Genotypes and Precore and Core Mutants in Brazilian Patients Hepatitis B Virus Genotypes and Precore and Core Mutants in Brazilian Patients. v. 42, n. 6, p. 2455–2460, 2004.
- SONG, J. E.; KIM, D. Y. Diagnosis of hepatitis B. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 18, p. 338–338, 2016. Disponível em: <<http://atm.amegroups.com/article/view/11691/12186>>.
- SORIANO, V.; BARREIRO, P.; BENITEZ, L.; PEÑA, J. M.; DE MENDOZA, C. New antivirals for the treatment of chronic hepatitis B. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 0, n. 0, p. 13543784.2017.1333105, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543784.2017.1333105>>.
- STICCHI, L.; CALIGIURI, P.; CACCIANI, R.; ALICINO, C.; BRUZZONE, B. Epidemiology of HBV S-gene mutants in the Liguria Region, Italy Implications for surveillance and detection of new escape variants. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 9, n. 3, p. 568–571, 2013.
- SU, T.-H.; LIU, C.-J. Combination therapy for chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 146–150, 2017. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827803003520>>.

SUNBUL, M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 18, p. 5427–5434, 2014.

TACKE, F.; KROY, D. C. Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 18, p. 334–334, 2016. Disponível em: <<http://atm.amegroups.com/article/view/11714/12182>>.

TENNEY, D. J.; ROSE, R. E.; BALDICK, C. J.; POKORNOWSKI, K. A.; EGGERS, B. J.; FANG, J.; WICHROSKI, M. J.; XU, D.; YANG, J.; WILBER, R. B.; COLONNO, R. 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, n. 5, p. 1503–1514, 2009.

THAKUR, V.; KAZIM, S. N.; GUPTAN, R. C.; HASNAIN, S. E.; BARTHOLOMEUSZ, A.; MALHOTRA, V.; SARIN, S. K. Transmission of G145R mutant of HBV to an unrelated contact. **Journal of Medical Virology**, v. 76, n. 1, p. 40–46, 2005.

TIAN, Q.; JIA, J. Hepatitis B virus genotypes: epidemiological and clinical relevance in Asia. **Hepatology International**, v. 10, n. 6, p. 854–860, 2016.

TONG, S.; REVILL, P. Review Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability Review. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 1, p. S4–S16, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.027>>.

TORRESI, J.; EARNEST-SILVEIRA, L.; CIVITICO, G.; WALTERS, T. E.; LEWIN, S. R.; FYFE, J.; LOCARNINI, S. A.; MANNS, M.; TRAUTWEIN, C.; BOCK, T. C. Restoration of Replication Phenotype of Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Mutants by Compensatory Changes in the “Fingers” Subdomain of the Viral Polymerase Selected as a Consequence of Mutations in the Overlapping S Gene. **Virology**, v. 299, n. 1, p. 88–99, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682202914480>>.

TRAN, N.; BERNE, R.; CHANN, R.; GAUTHIER, M.; MARTIN, D.; ARMAND, M. A.; OLLIVET, A.; TEO, C. G.; IJAZ, S.; FLICHMAN, D.; BRUNETTO, M.; BIELAWSKI, K. P.; PICHOU, C.; ZOULIM, F.; VERNET, G. European multicenter evaluation of high-density DNA probe arrays for detection of hepatitis B virus resistance mutations and identification of genotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2792–2800, 2006.

TSENG, T.-C.; LIU, C.-J.; YANG, H.-C.; CHEN, C.-L.; YANG, W.-T.; TSAI, C.-S.; KUO, S. F.-T.; VERBREE, F. C.; SU, T.-H.; WANG, C.-C.; LIU, C.-H.; CHEN, P.-J.; CHEN, D.-S.; KAO, J.-H. Higher proportion of viral basal core promoter mutant increases the risk of liver cirrhosis in hepatitis B carriers. **Gut**, v. 64, n. 2, p. 292–302, 2015. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2014-306977>>.

URBAN, S.; BARTENSCHLAGER, R.; KUBITZ, R.; ZOULIM, F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 147, n. 1, p. 48–64, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.030>>.

VALSAMAKIS, A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 426–439, 2007.

VENEGAS, M.; ALVARADO-MORA, M. V.; VILLANUEVA, R. A.; PINHO, J. R. R.; CARRILHO, F. J.; LOCARNINI, S.; YUEN, L.; BRAHM, J. Phylogenetic Analysis of Hepatitis B Virus Genotype F Complete Genome Sequences From Chilean Patients With Chronic Infection. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 4799–4804, 2011.

VIEIRA, G. D. D.; FLORÃO, M.; CASTRO, K. P. O.; ALVES, T. D. C.; VAICIUNAS, S.; HONDA, E. R.; CAMARGO, L. M. A.; SOUSA, C. M. De. HEPATITIS B IN RONDÔNIA

(WESTERN AMAZON REGION, BRAZIL): descriptive analysis and spatial distribution. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 52, n. 1, p. 18–21, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-28032015000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032015000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

VILLAR, L. M.; CRUZ, H. M.; BARBOSA, J. R.; BEZERRA, C. S.; PORTILHO, M. M.; SCALIONI, L. de P. Update on hepatitis B and C virus diagnosis. **World journal of virology**, v. 4, n. 4, p. 323–342, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4641225&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.

VILLET, S.; PICHOU, C.; VILLENEUVE, J. P.; TRÉPO, C.; ZOULIM, F. Selection of a Multiple Drug-Resistant Hepatitis B Virus Strain in a Liver-Transplanted Patient. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1253–1261, 2006.

WANG, Y.; ZENG, L. I.; CHEN, W. HBV X gene point mutations are associated with the risk of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **Mol Clin Oncol**, v. 4, n. 6, p. 1045–1051, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27284442>>.

WARD, H.; TANG, L.; POONIA, B.; KOTTILIL, S. Treatment of hepatitis B virus : an update. v. 11, p. 1581–1597, 2016.

WATASHI, K.; URBAN, S.; LI, W.; WAKITA, T. NTCP and beyond: Opening the door to unveil hepatitis B virus entry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 2892–2905, 2014.

WEINBERGER, K. M.; BAUER, T.; BÖHM, S.; JILG, W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 5, p. 1165–1174, 2000.

WU, C.; SHI, H.; WANG, Y.; LU, M.; XU, Y.; CHEN, X. A case of hepatitis B reactivation due to the hepatitis B virus escape mutant in a patient undergoing chemotherapy. **Virologica Sinica**, v. 27, n. 6, p. 369–372, 2012.

WU, J.-F.; CHANG, M.-H. Natural history of chronic hepatitis B virus infection from infancy to adult life -the mechanism of inflammation triggering and long-term impacts. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 92, 2015. Disponível em: <<http://www.jbiomedsci.com/content/22/1/92>>.

WU, J. F.; NI, Y. H.; CHEN, H. L.; HSU, H. Y.; CHANG, M. H. The impact of hepatitis B virus precore/core gene carboxyl terminal mutations on viral biosynthesis and the host immune response. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 9, p. 1374–1381, 2014.

XIE, Y.; LIU, S.; ZHAO, Y.; GUO, Z.; XU, J. X protein mutations in hepatitis B virus DNA predict postoperative survival in hepatocellular carcinoma. **Tumor Biology**, v. 35, n. 10, p. 10325–10331, 2014.

XIE, Y.; LIU, S.; ZHAO, Y.; ZHANG, L.; ZHAO, Y.; LIU, B.; GUO, Z. Precore/core region mutations in hepatitis B virus DNA predict postoperative survival in hepatocellular carcinoma. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–8, 2015.

YANG, Z. T.; HUANG, S. Y.; CHEN, L.; LIU, F.; CAI, X. H.; GUO, Y. F.; WANG, M. J.; HAN, Y.; YU, D. M.; JIANG, J. H.; ZHANG, D. H.; GONG, Q. M.; ZHANG, G. Q.; ZANG, G. Q.; LU, Z. H.; HUANG, L. H.; ZHANG, X. X. Characterization of full-length genomes of hepatitis B virus quasispecies in sera of patients at different phases of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 2203–2214, 2015.

YANO, Y.; AZUMA, T.; HAYASHI, Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 3, p. 583–592, 2015.

YEH, C. T. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy. **Antiviral Therapy**, v. 15, n. 3 PART B, p. 471–475, 2010.

YOU, C. R.; LEE, S. W.; JANG, J. W.; YOON, S. K. Update on hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 37, p. 13293–13305, 2014.

YU, L.; ZHANG, B.; CHENG, M.; ZHAO, X.; ZHANG, Q. Quantitative assessment of mutations in hepatitis B virus genome with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma development. 2016.

YUEN, M. F.; FONG, D. Y. T.; WONG, D. K. H.; YUEN, J. C. H.; FUNG, J.; LAI, C. L. Hepatitis B virus DNA levels at week 4 of lamivudine treatment predict the 5-year ideal response. **Hepatology**, v. 46, n. 6, p. 1695–1703, 2007.

ZHANG, A. Y.; LAI, C. L.; HUANG, F. Y.; SETO, W. K.; FUNG, J.; WONG, D. K. H.; YUEN, M. F.; YU, M. L. Evolutionary changes of hepatitis B virus Pre-S mutations prior to development of hepatocellular carcinoma. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–14, 2015.

ZHANG, Z. H.; WU, C. C.; CHEN, X. W.; LI, X.; LI, J.; LU, M. J. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 126–144, 2016.

ZHU, H.-L.; LI, X.; LI, J.; ZHANG, Z.-H. Genetic variation of occult hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 13, p. 3531, 2016. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v22/i13/3531.htm>>.

ZOULIM, F.; LEBOSSÉ, F.; LEVRERO, M. Current treatments for chronic hepatitis B virus infections. **Current Opinion in Virology**, v. 18, p. 109–116, 2016.

ZOULIM, F.; LOCARNINI, S. Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1593–1608.e2, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.063>>.



## ANEXO I

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO– TCLE**

O presente termo refere-se a um convite a participação do (a) Sr. (a)

\_\_\_\_\_ ou sob a responsabilidade de seu presente legal Sr. (a)

\_\_\_\_\_, a participar como sujeito de pesquisa intitulado: **VIGILÂNCIA DA RESISTÊNCIA AOS ANTIVIRAIS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA HEPATITE VIRAL CRÔNICA TIPO B EM PACIENTES DO AMBULATÓRIO ESPECIALIZADO DE HEPATITES DE PORTO VELHO, RONDÔNIA**, que tem o objetivo de analisar o vírus da doença denominada Hepatite B. Esse trabalho se justifica pelo fato da região de Porto Velho (Rondônia) ser endêmica para esta doença. O estudo compreenderá acompanhamento médico e exame de Hepatite B.

Com a sua autorização faremos a coleta de 10 mL de sangue na veia para os exames necessários, que serão realizados de graça, bem como o acesso ao seu prontuário apenas quando houver necessidade de informações de resultados sorológicos. A participação é voluntária, sem nenhum tipo de pagamento. O paciente tem todo direito de não participar deste estudo em qualquer momento da pesquisa, e isto não trará nenhum prejuízo, e que terá garantido o seu tratamento, conforme a rotina do serviço de saúde local. Os dados informados pelo paciente, como nome e endereço serão mantidos em absoluto sigilo.

O acompanhamento será feito por um profissional da equipe, que vai fazer perguntas sobre o seu estado de saúde e coletará sangue na veia para fazer exames laboratoriais. No momento ou depois da coleta, o braço poderá ficar com uma mancha roxa que desaparecerá em dentro de pouco tempo, sendo um desconforto e risco mínimo, mas que pode acontecer.

Os resultados serão analisados e utilizados para projetos de pesquisa e trabalhos científicos, visando à melhoria das condições de saúde da comunidade, e autorizo a publicação dos mesmos. O resultado será entregue ao paciente, e se for necessário, o mesmo será tratado e acompanhado, ou encaminhado ao serviço médico local para melhor acompanhamento.

O paciente receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Assim se o (a) Sr. (a) aceitar o convite para participar da pesquisa ( ou em caso do menor, permitir a participação do menor), por favor, preencha os espaços abaixo:

Eu, \_\_\_\_\_, fui devidamente esclarecido (a) do projeto de Pesquisa acima citado e aceito o convite para participar.

Assinatura do paciente ou representante legal



Impressão do polegar direito do paciente, caso ele não saiba escrever seu nome.

\_\_\_\_\_