Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

António Ludgero Correia Júnior

Prevalência, caracterização e distribuição dos genótipos, e perfil de mutações do *pré-core* do vírus da hepatite B em doadores de sangue do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2016

António Ludgero Correia Júnior

Prevalência, caracterização e distribuição dos genótipos, e perfil de mutações do pré-core do vírus da hepatite B em doadores de sangue do Rio de Janeiro

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto

Coorientador: Prof. Dr. Orlando da Costa Ferreira Júnior

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C824 Correia Júnior, António Ludgero.
Prevalência, caracterização e distribuição dos genótipos, e perfil de mutações do pré-core do vírus da hepatite B em doadores de sangue do Rio de Janeiro / António Ludgero Correia Júnior. - 2016.
80 f.

Orientador: Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto.
Coorientador: Orlando da Costa Ferreira Júnior.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Hepatite B - Teses. 2. Hepatite B - Prevenção e controle. 3. Doadores de sangue. 4. Vírus da Hepatite B - Genética. I. Sobrino Pôrto, Luís Cristóvão de Moraes. III. Orlando da Costa, Ferreira Júnior. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. VI. Título.

CDU 616.36-002

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

António Ludgero Correia Júnior

Prevalência, caracterização e distribuição dos genótipos, e perfil de mutações do pré-core do vírus da hepatite B em doadores de sangue do Rio de Janeiro

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de outubro de 2016.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

_____

Dra. Renata de Mello Perez

Policlínica Piquet Carneiro - UERJ

_____

Dra. Flávia Ferreira Fernandes

Hospital universitário Pedro Ernesto – UERJ

_____

Prof. Dr. Orlando da Costa Ferreira Júnior

Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof.ª Dra. Elisabeth Lampe

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que é meu amparo de todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Todo-O-Poderoso Deus pelas bênçãos, força, proteção e luz durante todo o tempo.

Aos meus pais, António Ludgero Correia e Maria Paula Freitas Alfama, aos meus irmãos, Kwami Samora e Aïcha Paula e aos meus sobrinhos Aïcha Carolina, Paula Regina, Aliah, Miguel e Vicky pelo carinho, suporte e amor incondicional.

Aos meus orientadores pelos sábios ensinamentos, paciência e orientação.

Aos amigos que de perto ou de longe têm uma palavra de conforto e incentivo sempre que eu preciso.

Aos colegas Raphael, Dra. Carmen, Liane, Deise e Amélia pela colaboração no desenvolvimento do estudo.

Meus sinceros agradecimentos aos meus caros colegas e ex-colegas do Laboratório HLA-UERJ por tornar o dia-a-dia no laboratório mais agradável.

Tudo posso Naquele que me fortalece.

Filipenses 4:13

Quem habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do onipotente descansará.

Salmos 91:1

Follow your bliss and the universe will open doors for you where there were only walls.

Joseph Campbell

RESUMO

LUDGERO-CORREIA, António. *Prevalência, caracterização e distribuição dos genótipos, e perfil de mutações do pré-core do vírus da hepatite B em doadores de sangue do Rio de Janeiro.* 2016. 80 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) continua sendo um grave problema de saúde global, afetando cerca de dois bilhões de pessoas. O HBV é classificado em 10 genótipos (de A a J) e possui distribuição geográfica diversa. Alguns genótipos estão relacionados com a evolução da infecção, severidade da doença e surgimento de mutações que podem afetar a capacidade de resposta do sistema imunológico e a eficiência do tratamento terapêutico. A mutação do *pré-core* mais relatada é a G1986A que leva à introdução prematura de um códon de finalização na região de *pré-core* impedindo a produção antígeno "e" da hepatite B (HBeAg). Doadores representam uma população saudável e são ideais para estudar infectividade viral, pois evita o viés de seleção de indivíduos que usam drogas antivirais. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência e tendência temporal da infecção por HBV entre os doadores de sangue de 2001 a 2011 na cidade do Rio de Janeiro, caracterizar a diversidade e evolução dos genótipos de HBV nesse período e analisar o perfil de mutações do pré-core do genoma do HBV. A primeira parte do estudo foi realizada em amostras de 109 doadores de sangue carreando marcadores do HBV no Rio de Janeiro de 2001 a 2011. Os resultados da sorologia foram confirmados por imunoensaio e a caracterização molecular foi realizada por PCR em tempo real e sequenciamento direto seguido da análise filogenética. Dos 109 doadores, 81% eram do sexo masculino e a média de idade foi de 35 anos. A faixa etária mais acometida foi acima dos 30 anos. Quatro genótipos foram detectados entre os 99 indivíduos cujas amostras foram genotipadas com sucesso: A (73,7%), D (16,2%), F (8,1%), e E (2,0%). A frequência de doadores infectados com o genótipo A diminuiu quase ao mesmo ritmo a frequência de doadores reagentes para HBsAg e anti-HBc. Além da diminuição do número de doadores infectados por HBV, encontramos dois indivíduos carreando o genótipo E. Para a realização da análise de mutação do *pré-core* foram utilizadas amostras de 23 indivíduos. A análise da mutação do *pré-core* revelou que 26,1% dos indivíduos (6/23) foram infectados com cepas apresentando a mutação G1896A, dos quais quatro eram do genótipo D. A presença de HBV genótipo E, incomum no Brasil, e de cepas de HBV carreando mutações do *pré-core* reforça a importância do banco de sangue como sentinela para a identificação de novos genótipos circulantes no país e sua pronta notificação, ajudando assim a melhorar o planejamento de políticas de saúde pública e impulsionar medidas de prevenção, tratamento e monitoramento da infecção.

RESUMO

LUDGERO-CORREIA, António. *Prevalência, caracterização e distribuição dos genótipos, e perfil de mutações do pré-core do vírus da hepatite B em doadores de sangue do Rio de Janeiro.* 2016. 80 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Palavras-chave: Doadores de sangue. Vírus da Hepatite B. Genótipo de HBV. Análise filogenética. Mutação do *pré-core*.

ABSTRACT

LUDGERO-CORREIA, António. *Prevalence, genotypes characterization and distribution, and precore mutation profile of hepatitis B virus among blood donors in Rio de Janeiro*. 2016. 80 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Hepatitis B virus (HBV) infection remains to be a serious global health problem, affecting around two billion people. HBV is classified into 10 genotypes (A to J) and has diverse geographical distribution. Some genotypes are related to the evolution of infection, disease severity, and the onset of mutations that can affect the immune system and therapeutic responsiveness. The most commonly reported precore mutation is the G1986A which leads to a premature introduction of a stop codon in the precore region preventing the production of hepatitis B e antigen (HBeAg). Donors represent a healthy population and are ideal for studying viral infectivity, as it avoids the bias of selecting individuals using antiviral drugs. The objective of this study was to determine the prevalence and temporal trend of HBV infection among blood donors from 2001 to 2011 in the city of Rio de Janeiro, to characterize the diversity and evolution of HBV genotypes in this period and to analyze the mutation profile of HBV precore.The first part of the study was conducted on serum from 109 blood donors carrying HBV markers in Rio de Janeiro from 2001-2011. The serology results were confirmed by immunoassay, and the molecular characterization was performed by real-time PCR and direct sequencing followed by phylogenetic analysis. Among 109 donors 81% were male, and the age average was 35 years. The most affected age group was older than 30 years. Four genotypes were observed among the 99 subjects whose samples were successfully genotyped: A (73.7%), D (16.2%), F (8.1%), and E (2.0%). The frequency of donors infected with genotype A decreased by almost the same rate as the frequency of donors positive for HBsAg and anti-HBc. In addition to the decrease of HBV infection, we found two individuals carrying HBV genotype E. To perform the analysis of precore mutation samples from 23 indiduals were used.The analysis of precore mutation revealled that 26.1% of individuals (6/23) were infected with strains presenting the G1896A mutation, of which four were genotype D. The presence of HBV genotype E, unusual in Brazil, and HBV strains carrying precore mutations reinforces the importance of blood bank as sentinel to identify new genotypes circulating into the country and its prompt notification, and thus help to improve the planning of public health policies that promotes prevention, treatment and the monitoring of infection.

Keywords: Blood donors. Hepatitis B Virus. HBV genotype. Phylogenetic analysis. Precore mutation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Evolução da lesão hepática mediada pelo vírus da hepatite B..... 19
Figura 2 Distribuição geográfica da infecção pelo vírus da hepatite B..... 22
Figura 3 Genoma do vírus da hepatite B..... 23
Figura 4 Distribuição mundial dos genótipos de HBV..... 27
Figura 5 Partículas do vírus da hepatite B..... 28
Figura 6 Estrutura da partícula infecciosa do HBV..... 29
Figura 7 Ciclo de vida do vírus da hepatite B..... 31
Figura 8 Surgimento de espécies mutantes do vírus da hepatite B..... 34
Figura 9 Árvore filogenética..... 53
Figura 10 Tendência temporal da infecção por HBV 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Papel das mutações no genoma do HBV no desfecho da infecção.. 33

Tabela 2 Iniciadores e as relativas condições de ciclagem usadas para cada reação empregada no estudo..... 43

Tabela 3 Sequências referências do genoma completo do HBV utilizado para realizar a análise de mutações do *pré-core* e de resistência às drogas..... 47

Tabela 4 Perfil da carga viral do HBV (mediana de Log_{10} UI/mL) de acordo com o sexo e a faixa etária..... 50

Tabela 5 Frequência de distribuição do genótipo A e do grupo de genótipo DEF de acordo com o sexo, faixa etária e carga viral..... 51

Tabela 6 Dados demográficos, sorológicos e moleculares da população participante da análise do *pré-core*..... 57

Tabela 7 Características sorológicas e virológicas das amostras G1896A..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/mL	Micrograma por mililitro
aa	Aminoácido
AgAu	Antígeno Australiano
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do core do HBV
anti-Hbe	Anticorpo contra o antígeno "e" do HBV
anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno da superfície do HBV
anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
anti-HIV	Anticorpo contra o vírus da imunodeficiência humana
anti-HTLV	Anticorpo contra o vírus T-linfotrópico humano
anti-T. cruzi	Anticorpo contra o Trypanosoma cruzi
BLAST	Ferramenta de busca de alinhamento local básico
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
cccDNA	DNA circular covalentemente fechado (do inglês, covalently closed circular DNA)
CNH	Comissão Nacional de Hemoterapia
cp/mL	Cópias por mililitro
CV	Carga viral
ddNTPs	Dideoxinucleotídeo trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EPM	Erro padrão da média
ETV	Entecavir
HAV	Vírus da hepatite A
HBcAg	Antígeno do core do HBV
HBeAg	Antígeno "e" do HBV
HBsAg	Antígeno da superfície do HBV
HBsAg-InvT	Inverso do Log_{10} da titulação HBsAg
HBV	Vírus da Hepatite B

HBx	Proteína reguladora X do HBV
HCC	Hepatocarcinoma
HCl	Hidrocloreto
HCV	Vírus da hepatite C
Hi-Di	Altamente deionizada (do inglês, *highly deionized)*
HRP	Enzima Horseradish peroxidase
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IC	Intervalo de confiança
ICBS	International Consortium for Blood Safety
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IQR	Amplitude interquartil
Kb	Quilobase (ou Kilobase)
MEGA	*Molecular evolutionary genetics analysis*
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAT	Teste de ácido nucleico (do inglês, *nucleic acid testing*)
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
ORF	Fases aberta de leitura (do inglês, *open reading frame*)
Pb	Par de bases
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, *phosphate buffered saline*)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pgRNA	Ácido ribonucleico pregenômico
pmol/µL	Picomoles por microlitro
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
ULR	Unidade de Luz Relativa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	**REVISÃO DA LITERATURA**.....	17
1.1	**História da hepatite B**.....	17
1.2	**Evolução clínica da hepatite B**.....	18
1.3	**Epidemiologia**.....	21
1.4	**Genoma viral**.....	23
1.4.1	Proteínas virais.....	23
1.4.1.1	Antígeno da superfície da hepatite B.....	24
1.4.1.2	Antígeno do *core* da hepatite B.....	24
1.4.1.3	Antígeno “e” da hepatite B.....	25
1.4.1.4	Proteína X reguladora da hepatite B.....	25
1.4.1.5	Proteína Pol ou polimerase viral.....	25
1.4.2	Genótipos e subtipos virais.....	26
1.5	**Partículas virais da hepatite B**.....	27
1.6	**Ciclo de vida**.....	29
1.7	**Mutações no genoma do HBV**.....	31
1.7.1	Mutações do *pré-core*.....	34
2	**OBJETIVOS**.....	36
2.1	**Objetivos gerais**.....	36
2.2	**Objetivos específicos**.....	36
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**.....	37
3.1	**População e locais do estudo**.....	37
3.2	**Testagem confirmatória HBsAg/anti-HBc e titulação HBsAg**.....	37
3.3	**Testagem sorológica para HBeAg e anti-HBe**.....	39
3.4	**Extração do DNA viral**.....	40
3.5	**Quantificação do DNA do HBV**.....	40
3.6	**Determinação dos genótipos de HBV**.....	41
3.6.1	Amplificação do gene *C* por semi-*nested*-PCR.....	41
3.6.2	Sequenciamento do fragmento do gene *C*.....	42
3.6.3	Análise filogenética.....	44

3.7 **Perfil de mutações do *pré-core***..... 44
3.7.1 Amplificação da região *pré-core* por semi-*nested*-PCR..... 45
3.7.2 Sequenciamento dos fragmentos do *pré-core*..... 46
3.7.3 Análise das mutações *pré-core*..... 47
3.8 **Análise estatística dos dados**..... 48
4 **RESULTADOS**..... 49
4.1 **Características demográficas dos doadores**..... 49
4.2 **Carga viral entre os doadores**..... 49
4.3 **Distribuição dos genótipos**..... 50
4.4 **Análise filogenética**..... 51
4.5 **Tendência temporal da infecção por HBV**..... 54
4.6 **Análise do perfil de mutação do *pré-core***..... 55
5 **DISCUSSÃO**..... 58
CONCLUSÕES..... 63
REFERÊNCIAS..... 64
APÊNDICE – Passos tomados para ajustar a frequência dos genótipos..... 72
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido..... 73
ANEXO B – Comité de ética em Pesquisa..... 74
ANEXO C – Artigo I submetido à revista Cadernos de Saúde Pública 78
ANEXO D – Artigo II submetido à revista *Archives of Virology*..... 79
ANEXO E – Artigo III submetido à revista *Brazilian Journal of Infectious Diseases*..... 80

INTRODUÇÃO

Hepatite B é um importante problema de saúde pública que afeta aproximadamente dois bilhões de pessoas em todo o mundo. As principais vias de infecção e transmissão são por relações sexuais desprotegidas, transmissão vertical, uso de drogas intravenosas, acidente com perfuro-cortantes infectados, por transfusão de sangue e hemoderivados (WHO 2001). A infecção pode evoluir para uma hepatite B aguda autolimitante ou hepatite aguda fulminante, ou ainda para uma hepatite crônica com evolução lenta e progressiva, que em alguns casos, dependendo de fatores e características virais e do hospedeiro, pode desenvolver cirrose hepática e câncer de fígado (Caligiuri, Sticchi et al. 2012; Souza, Drexler et al. 2014).

Alguns genótipos do vírus da hepatite B (HBV) podem ser associados a uma evolução diversa da doença e a não resposta terapêutica. O genótipo A tem uma tendência para cronificação da doença, enquanto o genótipo C frequentemente apresenta mutações virais. O genótipo D é comumente associado a mutações e cronificação da doença. Os genótipos C e D apresentam maior frequência de cirrose hepática e progressão da doença para hepatocarcinoma (HCC) quando comparados aos demais genótipos (Lin and Kao 2011; Sunbul 2014).

O diagnóstico da infecção pelo HBV é inicialmente através de testes sorológicos para detectar o antígeno de superfície (HBsAg) no soro. Na infecção aguda alguns marcadores séricos de HBV são detectáveis, incluindo DNA viral, HBsAg, antígeno “e” da hepatite B (HBeAg) e anticorpo da classe IgM contra o antígeno do core da hepatite B (anti-HBc IgM) (Samal, Kandpal et al. 2012). A presença do DNA viral em indivíduos HBsAg negativos, com ou sem a presença de anticorpos anti-HBc e/ou anticorpos contra o antígeno da superfície (anti-HBs) caracteriza a hepatite oculta (Hollinger and Sood 2010; Kim 2013).

Para identificar os diferentes genótipos e subtipos de HBV e detectar níveis muito baixos de HBsAg, ensaios laboratoriais mais sensíveis estão sendo cada vez mais requisitados. Para isso, o *International Consortium for Blood Safety* (ICBS) determinou um Painel Mestre de HBsAg que incluem uma gama representativa dos principais genótipos de HBV e subtipos de HBsAg (adw2-4, ayw1-4 e adr), e recomenda-se que as autoridades reguladoras elaborem painéis para kits de

avaliação que incluam espécies reativas de HBsAg com subtipos e genótipos de suas regiões. Caso contrário, a baixa sensibilidade dos imunoensaios em relação às variantes de HBV, tornaria a sua detecção suscetível apenas em termos quantitativos, ou seja, seria capaz de detectá-las a altas concentrações de HBV, mas não a baixas concentrações de antígeno (Scheiblauer, El-Nageh et al. 2010). Isso consistiria em um desafio para os centros de hemoterapia garantir a total segurança na doação/transfusão, uma vez que o risco de transmissão seria bem maior do que pelas outras vias, principalmente pela possibilidade de transmissão de vírus com altas cargas. Todavia, a partir da resolução da Comissão Nacional de Hemoterapia (CNH) de 2/5/1975, as transfusões passaram a ser mais seguras devido à obrigatoriedade de testar todas as doações para as infecções virais antes de ocorrer a transfusão (Farshadpour, Taherkhani et al. 2016).

A emergência de subtipos de vírus da hepatite B carreando mutações pode se tornar um problema de saúde global. Existem evidências de mutações contínuas nos indivíduos com infecção crônica, com elevadas taxas de substituições de nucleotídeos por sítio a cada ano. Algumas dessas mutações levam a alterações fenotípicas, como o que acontece quando ocorre uma mutação pontual na região *pré-core* do genoma viral originando a perda do antígeno “e” da hepatite B (HBeAg) – marcador da replicação viral. Contudo, permanecem pouco conhecidos os resultados das outras alterações durante o curso da infecção. As taxas de mutações variam de um indivíduo para o outro. Indivíduos com doença assintomática têm taxas muito baixas de mutação, talvez sugerindo que a resposta imune do hospedeiro pode levar à seleção de mutações preferenciais (Szmaragd, Foster et al. 2006). Estudos sentinela com o objetivo de identificar novos genótipos que entram no país não devem depender exclusivamente de infecção aguda por HBV. A identificação de portadores crônicos pode ser logisticamente mais simples, se os doadores de sangue forem a população-alvo de estudos para identificar novos genótipos do HBV, uma vez que os bancos de sangue são as principais fontes de dados para a avaliação dos padrões epidemiológicos da hepatite B no Brasil. Além disso, os doadores representam uma população saudável e são ideais para estudar as características da infectividade viral, pois evita o viés de seleção de indivíduos que usam drogas antivirais ou mais indivíduos expostos aos fatores de risco. A identificação dos genótipos de HBV e os níveis de carga viral são parâmetros importantes para a avaliação da severidade da doença hepática, para escolher a

terapia mais apropriada, e acompanhar a resposta terapêutica(Sitnik, Pinho et al. 2004).

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência e tendência temporal da infecção por HBV entre os doadores de sangue de 2001 a 2011 na cidade do Rio de Janeiro, caracterizar a diversidade e evolução dos genótipos de HBV nesse período e analisar o perfil de mutações do pré-core do genoma do HBV. Devido a seus métodos simplificados, esta abordagem é ideal para programas sentinelas destinado a controlar a introdução e circulação de novos genótipos de HBV, e pode ser aplicada a qualquer outra cidade ou país que disponham dos equipamentos necessários. Além disso, o estudo das tendências na prevalência da infecção pode fornecer dados importantes para a avaliação de estratégias de segurança sobre a doação de sangue e hemocomponentes e, eventualmente melhorá-las, assim como orientar na formulação de uma política de saúde mais eficaz, com o intuito de minimizar os riscos de infecções por transfusões.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 História da hepatite B

Registros de surtos de icterícia na história da humanidade remontam à China e Babilônia há milhares de anos atrás. A doença também foi descrita na Grécia por Hipócrates (Reuben 2002; Fonseca 2010). Contudo, os relatos não associavam a doença a um agente etiológico. Casos de surtos de icterícia foram subsequentemente relatados durante séculos, principalmente durante os períodos de guerra. A partir daí surgiram as denominações como “doença militar” e "icterícia campanha". A doença aparecia afetando todos os exércitos, continentes e faixa etária. O termo hepatite foi primeiramente introduzido por Bianchi no século XVIII (Reuben 2002).

Em 1865, surgiu o termo “icterícia catarral” decorrente da descrição de um paciente ictérico por Virchow. O termo sugeria a obstrução da drenagem biliar devido a uma inflamação na ampola de Vater. Esse conceito foi admitido por décadas (Sherlock 1984).

Em 1885 foi documentada cientificamente a existência de uma forma de hepatite provavelmente transmitida por via parenteral em trabalhadores do porto de Bremen na Alemanha, após receberem a vacina contra varíola que fora desenvolvida a partir de linfa humana. Esses indivíduos apresentaram icterícia, fadiga, anorexia e queixas digestivas. Apesar das evidências da presença de um agente infeccioso transmitido pela vacinação, o autor admitiu não ser capaz de explicar o conjunto das circunstâncias apresentadas (Schmid 2001; Fonseca 2010).

No início de 1908, surgiram as primeiras abordagens sobre uma causa viral para hepatites (McDonald 1918; Reuben 2002). A partir desse ponto, e principalmente na década de 40, se intensificaram os estudos para o entendimento da etiologia e epidemiologia da hepatite. Os resultados desses estudos revelaram duas doenças clinicamente e histologicamente semelhantes, mas com epidemiologia distinta. Baseando-se nas suas vias de transmissão, essas doenças foram diferenciadas como “hepatite infecciosa” e “hepatite sérica”. Posteriormente, MacCallum e Bradley rotularam as duas doenças como hepatite tipo A e hepatite

tipo B, respetivamente. A hepatite viral do tipo A (infecciosa) tornou-se o vírus da hepatite A (HAV) e o tipo B (sérico) tornou-se o vírus da hepatite B (HBV), e assim por diante (Reuben 2002; Fonseca 2010).

Blumberg e colaboradores (1965) revelaram a presença de uma proteína no soro de um aborígene australiano, que seria denominado de Antígeno Australiano (AgAu) (Blumberg, Alter et al. 1965). Esses pesquisadores comprovaram a existência dessas proteínas por microscopia eletrônica. O AgAu também foi encontrado em soro de pacientes leucêmicos e pacientes com Síndrome de Down. Mais tarde, o antígeno foi associado ao vírus da hepatite B e atualmente é denominado de antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (Reuben 2002; Fonseca 2010). Apesar dessas grandes descobertas, o estudo do HBV em soro de pacientes infectados teve o seu auge na década de 1970 com a descoberta de Dane quando identificou a partícula infecciosa do HBV (partículas de Dane) e com as descobertas de George Le Bouvier e de Brancoft quando descreveram os sorotipos de HBV (Reuben 2002). Almeida e colaboradores (1971) identificaram as estruturas das partículas do HBV por imunoelectromicroscopia (Almeida, Rubenstein et al. 1971), e anos mais tarde esse estudo veio a ser complementada com a descrição da biologia do HBV (Blumberg 1977).

A produção de uma vacina contra HBV teve seu início com o experimento de Krugman quando inativou o vírus pelo calor e inoculou o soro em crianças com retardo mental. A partir daí surgiram várias tentativas de produção de vacinas cada vez mais eficazes, até que em 1981 foi registrada a vacina produzida a partir de plasma de portadores saudáveis de HBsAg. Em 1986, esta vacina veio a ser substituída pela vacina produzida a partir de HBsAg recombinante e que é utilizada até hoje (Krugman, Giles et al. 1971; Krugman and Giles 1973; Reuben 2002).

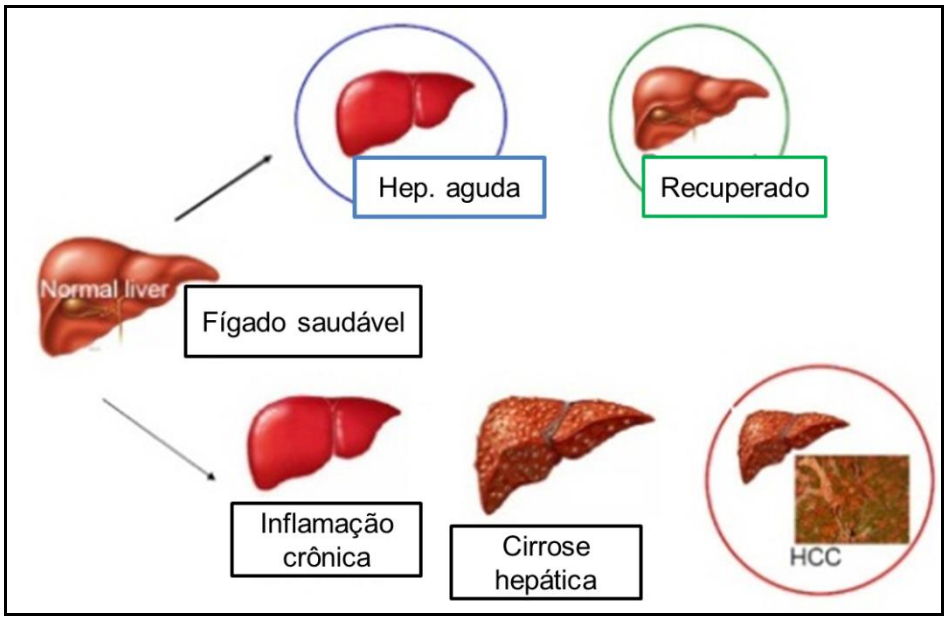
1.2 **Evolução clínica da hepatite B**

A hepatite é uma lesão do fígado onde há inflamação dos hepatócitos causadas por etiologias diversas. De entre elas estão a autoimunidade, agentes químicos e agentes infecciosos. Entre os agentes infecciosos estão cinco diferentes famílias de vírus (classificados como vírus de hepatites de A a G) que são

responsáveis pela maioria dos casos mundiais de hepatite viral. A infecção causada pelo vírus da hepatite B (HBV) é uma das mais importantes em números de morbidade e mortalidade (Abdo, Sanai et al. 2012; Park and Rehermann 2014; Sarpel, Baichoo et al. 2016).

Considerado um problema de saúde pública mundial em números absolutos, a infecção por HBV pode evoluir, em alguns indivíduos, para uma hepatite aguda que pode se resolver em semanas, sem consequências secundárias; pode ocorrer uma hepatite B fulminante em uma pequena proporção (1%), que pode ser fatal; e outros indivíduos (1% a 10%) podem desenvolver uma infecção crônica que causa uma hepatite lenta e progressiva, levando em alguns casos (de 0,5% a 0,8%) à insuficiência hepática, cirrose e hepatocarcinoma (HCC) após décadas de infecção (Figura 1) (Riviere, Ducroux et al. 2014). A taxa de mortalidade da hepatite B varia de 0,5% a 1% para as infecções agudas e de 15% a 25% para as infecções crônicas. A evolução da hepatite aguda para hepatite crônica acontece após falhas nas respostas imune humoral e celular do hospedeiro (Jeulin, Velay et al. 2013).

Figura 1 – Evolução da lesão hepática mediada pelo vírus da hepatite B



Legenda: Evolução da doença hepática na infecção aguda com auto-resolução e na infecção crônica levando à inflamação, desenvolvimento de cirrose hepática e hepatocarcinoma (HCC) em alguns casos.
Fonte: Adaptado de Jayalakshmi, Kalyanaraman et al., 2013.

As principais vias de infecção e transmissão do vírus são por relações sexuais desprotegidas, transmissão vertical, compartilhamento de seringas e agulhas entre usuários de drogas intravenosas, tatuagens, acidente com perfuro-cortantes infectados, transplantes de órgãos, hemodiálise, e por exposição direta a sêmen, sangue e hemoderivados e outros fluídos corporais infectados (Farshadpour, Taherkhani et al. 2016). A doença tem um período de incubação médio de 75 dias, variando de 30 a 180 dias (WHO 2013). A infecção primária na grande maioria dos adultos infectados acaba se autorresolvendo (aproximadamente 95% dos casos); o sistema imunológico responde aos antígenos virais resultando no *clearence* dos hepatócitos infectados e na remoção dos vírions da corrente sanguínea. A imunidade adquirida geralmente pode ser duradoura ou até mesmo permanente, conferindo proteção em caso de uma reinfecção. Os indivíduos que não alcançaram a autorresolução da infecção primária desencadeiam uma infecção persistente caracterizada por uma ativa replicação viral nos hepatócitos. As razões pelas quais a infecção se resolve ou não em alguns indivíduos são pouco compreendidas. Contudo, evidências clínicas sugerem que haja uma correlação com a variabilidade da resposta imunológica dos hospedeiros (Fields, Knipe et al. 1996).

A evolução da infecção e a severidade da doença estão relacionadas a fatores do hospedeiro tais como o gênero, raça, genética e fatores etário, nutricional e imunocompetência. Fatores relacionados ao vírus (cepa, via de contaminação e carga viral) também são importantes (Caligiuri, Sticchi et al. 2012). A infecção por HBV pode se apresentar de forma aguda ou crônica (Figura 1). As manifestações clínicas podem variar desde formas assintomáticas (na maioria dos casos) a sinais de alerta de doença hepática na fase terminal (Gebbing, Bergmann et al. 2015). A sintomatologia dos pacientes infectados inclui náusea, vômitos, perda do apetite, dor abdominal, fadiga e icterícia (Kokki, Smith et al. 2016). Os carreadores assintomáticos são os principais reservatórios da infecção e consistem na principal fonte de propagação do HBV para hospedeiros suscetíveis (Fields, Knipe et al. 1996).

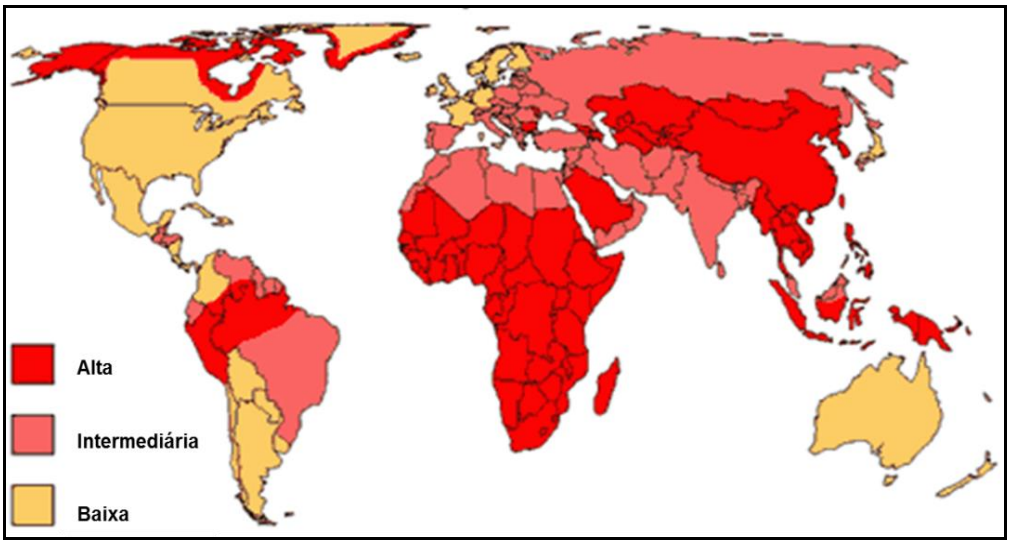
A sobrevida em alguns pacientes sintomáticos com hepatite crônica ativa e severa pode chegar a cinco anos, sendo que a maioria das mortes resulta de insuficiência hepática e suas complicações. O risco de desenvolvimento da hepatite crônica é maior nos pacientes imunocomprometidos e nos recém-nascidos (80% a 90%), 25% a 30% nas crianças menores de seis anos de idade, e menos de 5% nas

crianças mais velhas e em adultos imunocompetentes (Weinbaum, Williams et al. 2008). O risco de desenvolver HCC é acentuadamente aumentado nos pacientes que sobrevivem de 25 a 30 anos com infecção persistente. O HCC é a segunda causa de morte por neoplasia no mundo. Uma pesquisa nacional realizado por Carrilho e colaboradores (2010) revelou que 16% dos casos de HCC no Brasil são atribuídos à infecção por HBV (Carrilho, Kikuchi et al. 2010). As doenças hepáticas agudas e crônicas relacionadas ao vírus da hepatite estão entre as principais indicações de transplante de fígado, sendo uma alternativa que pode salvar a vida de pacientes com HCC e/ou doença hepática terminal(Ferrarese, Zanetto et al. 2016). Aliado a esse fator, o transplante gera altos custos ao Sistema Único de Saúde (SUS).

1.3 **Epidemiologia**

Estima-se que milhões de pessoas sejam portadores crônicos do vírus da hepatite B e que a cada ano cerca de 600.000 indivíduos morrem de doenças relacionadas (Contrera-Moreno, de Andrade et al. 2012; WHO 2015). A prevalência da hepatite B no mundo é dividida didaticamente em três regiões (Figura 2): de prevalência alta, prevalência intermediária e prevalência baixa. Em regiões de alta endemicidade, tais como no leste e sudeste asiático, África Subsaariana e em partes da América do Sul, mais de 8% da população são portadores crônicos do HBV (Scheiblauer, El-Nageh et al. 2010).

Figura 2 – Distribuição geográfica da infecção pelo vírus da hepatite B



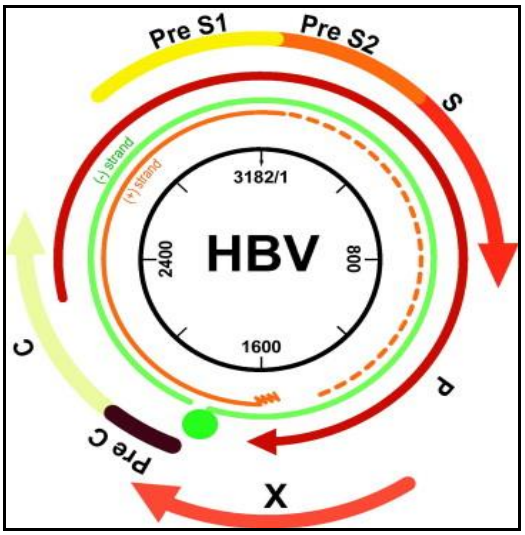
Legenda: As áreas em vermelho representam regiões onde a prevalência da infecção por HBV é alta (≥ 8%); áreas em rosa representam regiões de prevalência intermediária (2 a 7%); as regiões em laranja representam regiões onde a prevalência de HBV é baixa (< 2%). Para alguns países, a estimativa é feita sobre os dados da prevalência do antígeno da superfície do HBV (HBsAg).
Fonte: Gish e Cooper, 2011.

No Brasil, atualmente, a estimativa da prevalência de infecções por HBV da população em geral não é confiável, uma vez que um grande número de infecções virais é assintomático. Desta forma, os padrões epidemiológicos da infecção por HBV no Brasil têm sido avaliados principalmente utilizando dados de doadores de sangue, voluntários e grupos especiais ou de pesquisas realizadas em áreas geográficas restritas (Ximenes, Pereira et al. 2010). Embora o Brasil seja considerado um país de baixa endemicidade para a hepatite B, com a prevalência variando de 2% a 8%, a Amazônia é considerada altamente endêmica (Te e Jensen 2010). Entre os doadores de sangue no Brasil, a prevalência varia de 0,3% a 1,5% para o HBsAg e de 3,7% a 11,1% para o anti-HBc (Nascimento, Mayaud et al. 2008; Dos Anjos, Martins et al. 2011; Silveira, L. et al. 2011; Lindenberg, Motta-Castro et al. 2013).

1.4 Genoma viral

O HBV apresenta um DNA circular e parcialmente bicatenar de 3,2 kb, com quatro fases abertas de leitura (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) sobrepostas: as regiões gênicas *pré-C/C, pré-S/S*; *P* e *X* (Figura 3) (Zhang, Hou et al. 2013). Apesar das regiões codificante *pré-S/S* estarem contidas completamente dentro da região codificante da polimerase, ela são traduzidas em fases de leituras diferentes. As regiões *C* e *X* se sobrepõem à região *P, respectivamente,* em 1/4 e 1/3 do comprimento da sua sequência (Zhang, Wu et al. 2016).

Figura 3 – Genoma do vírus da hepatite B



Legenda: Esquema representativo do genoma circular e parcialmente bicatenar do vírus da hepatite B apresentando as fases abertas de leitura sobrepostas (P, *Pré-C/C, Pré-s1/Pré-s2/S* e *X*) e os respectivos comprimentos.
Fonte: Neuveut, Wei e Buendia, 2010.

1.4.1 Proteínas virais

Quatro conjuntos de mRNAs são transcritos a partir do DNA viral utilizando a maquinaria da célula hospedeira, a RNA polimerase II, dando origem às proteínas virais.

1.4.1.1 Antígeno da superfície da hepatite B

As regiões *Pré-S e S* codificam três diferentes proteínas do envelope, estruturalmente relacionadas, e que são sintetizadas a partir de diferentes códons de iniciação, sendo denominadas de proteínas grandes (ou L, do inglês *large*), médias (ou M, do inglês *medium*) e pequenas (ou S, do inglês *small*). As proteínas de superfície da hepatite B são compostas por três domínios: Pré-S1, Pré-S2 e S (Fields, Knipe et al. 1996; Jayalakshmi, Kalyanaraman et al. 2013; Zhang, Wu et al. 2016).

Clinicamente, a detecção do HBsAg no soro do indivíduo indica uma infecção por HBV em curso. Este marcador pode aparecer em até três semanas após a exposição ao vírus e persiste por mais de seis meses em caso de cronificação da infecção. Contudo, quando a doença evolui para a cura, o HBsAg pode desaparecer nos primeiros seis meses (C.D.C. 2005; WHO 2013). O anticorpo contra HBsAg (anti-HBs) é um neutralizador do HBV. A detecção deste marcador no soro do indivíduo indica um fator de proteção da progressão da doença, ou seja, resolução da infecção e imunidade. Este marcador aparece entre um a três meses após a vacinação ou após a resolução de uma infeção aguda (C.D.C. 2005; WHO 2013).

1.4.1.2 Antígeno do *core* da hepatite B

As regiões *Pré-C* e *C* codificam a proteína do *core* (antígeno do *core* da hepatite B, HBcAg) de 185 aa, que forma o invólucro proteico do nucleocapsídeo (Fields, Knipe et al. 1996; Jayalakshmi, Kalyanaraman et al. 2013).

A detecção de anticorpos contra HBcAg (anti-HBc) juntamente com o HBsAg no soro de indivíduos pode indicar uma infecção crônica por HBV (anti-HBc-IgG) ou uma infecção aguda (anti-HBc-IgM). O anti-HBc pode aparecer pouco antes do início dos sintomas ou a partir da sexta semana de exposição ao HBV. O anti-HBc-IgM desaparece com a resolução da infecção aguda, porém, o anti-HBc-IgG permanece detectável no soro do indivíduo que teve contato com o vírus (C.D.C. 2005; WHO 2013).

1.4.1.3 Antígeno “e” da hepatite B

As regiões *Pré-C* e *C* codificam outro produto derivado do mesmo molde de transcrição que o HBcAg porém de local de iniciação distinto; a proteína do pré-core, antígeno “e” da hepatite B (HBeAg) de 212 aa, voltada para a via secretora da célula, que é eventualmente encontrada no soro de indivíduos infectados (Fields, Knipe et al. 1996; Jayalakshmi, Kalyanaraman et al. 2013).

A detecção do HBeAg no soro de indivíduos indica uma infecção em curso com o vírus em replicação (alta infectividade). Este marcador aparece no início da infecção e pode permanecer detectável até dois meses em caso de uma infecção aguda com progressão para uma resolução, ou até seis meses em caso de infecção crônica (C.D.C. 2005; WHO 2013).

A detecção do anticorpo contra HBeAg, o anti-HBe, pode indicar um declínio da infectividade, um portador HBV inativo ou ainda portador de vírus com mutação no *pré-core*. O anti-HBe aparece poucas semanas após o desaparecimento do HBeAg (C.D.C. 2005; Naghavi, Wang et al. 2015).

1.4.1.4 Proteína X reguladora da hepatite B

A região *X* codifica uma pequena proteína reguladora (HBx) de 154 aa, que é um co-ativador transcripcional essencial na replicação viral e na modulação da expressão gênica viral e do hospedeiro (Fields, Knipe et al. 1996; Jayalakshmi, Kalyanaraman et al. 2013).

1.4.1.5 Proteína Pol ou polimerase viral

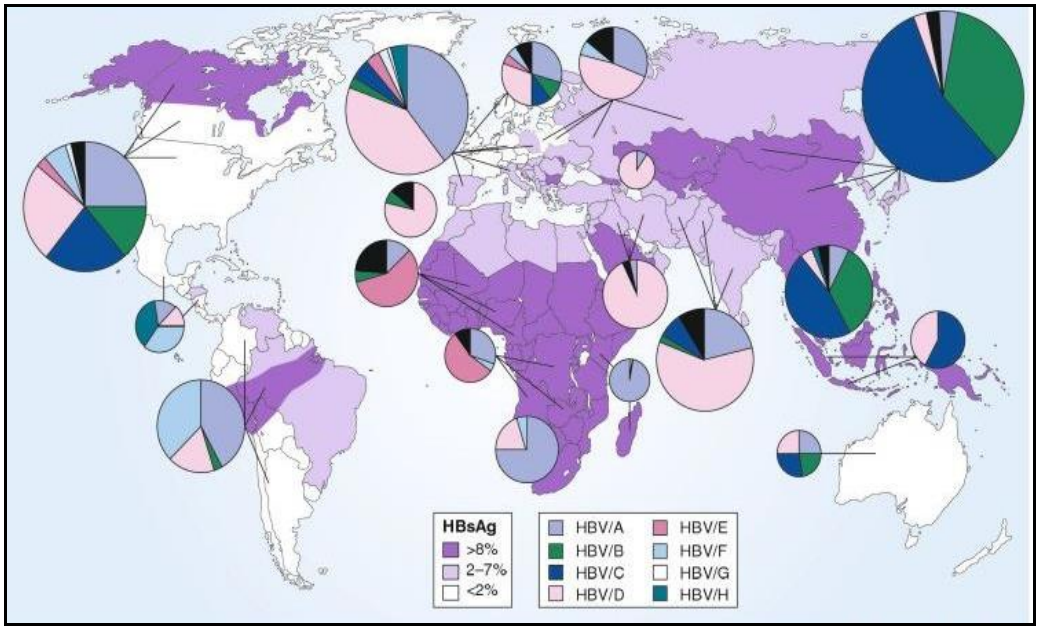
A região *P* codifica a polimerase viral, que é o principal responsável pela atividade enzimática na replicação gênica (Fields, Knipe et al. 1996; Jayalakshmi, Kalyanaraman et al. 2013).

1.4.2 Genótipos e subtipos virais

Devido à sua elevada capacidade de replicação e altas taxas de erros da transcriptase reversa, o HBV é capaz de se adaptar ao ambiente do hospedeiro. Esta adaptação levou ao surgimento de 10 genótipos em humanos, classificados de A a J, baseado na divergência em mais de 8% do genoma completo ou em mais de 4% do gene *S* (Schaefer 2007). Entre esses genótipos foram descritos nove subtipos sorológicos definidos a partir do HBsAg – marcador viral que indica uma infecção por HBV em curso – designados por ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+, e adrq– (Magnius and Norder 1995; Servant-Delmas, Mercier et al. 2010; Croagh, Desmond et al. 2015).

Os genótipos do HBV têm distribuição geográfica distinta (Figura 4): os genótipos A e D têm distribuição mundial; os genótipos B e C predominam no Leste e Sudeste da Ásia; o genótipo E na África Ocidental; o genótipo F é encontrado na população indígena da América Central e do Sul; o genótipo G foi encontrado na França e Estados Unidos da América; o genótipo H está restrito a América Central e do Sul; e os genótipos I e J são prevalentes no Leste da Ásia (Scheiblauer, El-Nageh et al. 2010; Pourkarim, Sharifi et al. 2014). No Brasil, os genótipos predominantes são A, D e F (Mello, Souto et al. 2007).

Figura 4 – Distribuição mundial dos genótipos de HBV



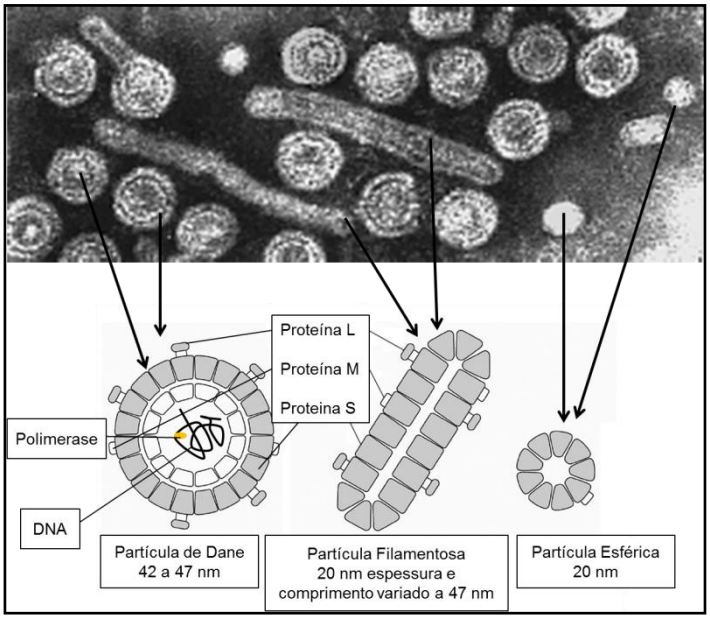
Legenda: A distribuição geográfica dos genótipos de HBV está representada pelo gráfico "pizza" e a prevalência mundial de HBsAg está representada pelas cores como sendo de baixa prevalência (< 2%), prevalência intermediária (2 a 7%) e de alta prevalência (> 8%).
Fonte: Expert Rev Vaccines© 2011 Expert Reviews Ltd.

1.5 **Partículas virais da hepatite B**

Células infectadas por HBV podem produzir três tipos de partículas virais com diferentes tamanhos e formatos (Figura 5): 1) as partículas de Dane (de 42 a 47 nm); 2) as esferas de 20 nm; e 3) os filamentos. No entanto, todos eles têm em comum o antígeno de superfície do HBV (HBsAg), que é encontrado em grandes quantidades no soro de hospedeiro infectado (de 50 a 300 µg/mL). A maior parte do *pool* de HBsAg circulante é composto pelas esferas de 20 nm, que podem atingir uma titulação superior a 10^{13}/mL. Essa enorme quantidade de antígenos virais na circulação facilita a sua detecção direta em um teste sensível para o diagnóstico da infecção por HBV. As esferas de 20 nm e os filamentos são compostos exclusivamente de HBsAg e lipídios derivados do hospedeiro. Devido à falta de material genético, essas duas partículas não são infecciosas. Por serem altamente imunogênicas e induzirem eficientemente a resposta do anti-HBs, essas partículas purificadas do soro de carreadores de HBV serviram como a forma inicial de vacina

contra HBV antes do desenvolvimento das preparações com HBsAg recombinante (Fields, Knipe et al. 1996; Gilbert, Beales et al. 2005).

Figura 5 – Partículas do vírus da hepatite B

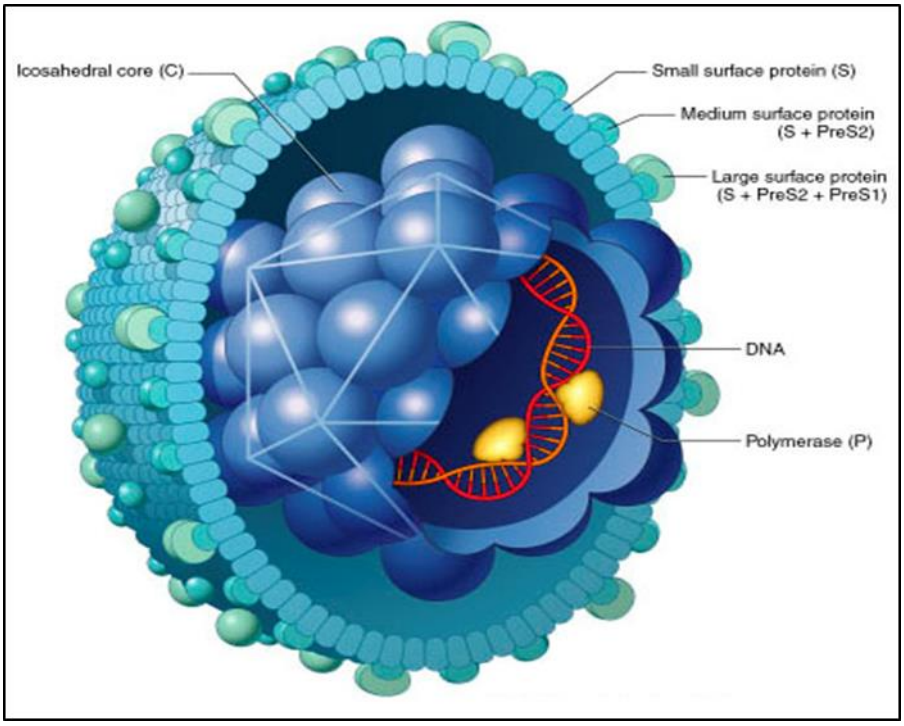


Legenda: Eletromicrografia de soro positivo para HBV revelando as três partículas morfologicamente distintas (em cima) e suas respectivas esquematizações apresentando as suas estruturas (em baixo).
Fonte: Adaptado de Lee e Ahn, 2011 e http://virology-online.com/viruses/HepatitisB.htm, acessado em 02/07/2016.

O HBV (partícula de Dane) é um vírus esférico de 42 a 47 nm, pertence à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*, e se assemelha a muitos retrovírus encontrados em animais devido à presença da enzima transcriptase reversa que o vírus utiliza para converter o RNA em DNA durante o seu ciclo de replicação (Weber 2005). O HBV é o menor vírus de DNA conhecido e pode se manter infeccioso por até sete dias fora do organismo (WHO 2013). O vírus é encontrado em altas concentrações no sangue, soro e exsudato de feridas. A concentração do vírus é moderada na secreção vaginal, sêmen e saliva. Contudo, a infecção via saliva não foi documentada. Nas fezes, urina, suor, lágrima e leite materno a concentração do vírus é baixa ou indetectável. Segundo a descrição de Gilbert e colaboradores (2005), essas partículas possuem um envelope de lipoproteína contendo as glicoproteínas de superfície, que é o alvo dos anticorpos

neutralizantes (Gilbert, Beales et al. 2005). Dentro do envelope se encontra o capsídeo ou *core* de 25 a 27 nm que contém dentro o DNA e a polimerase virais (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura da partícula infecciosa do HBV



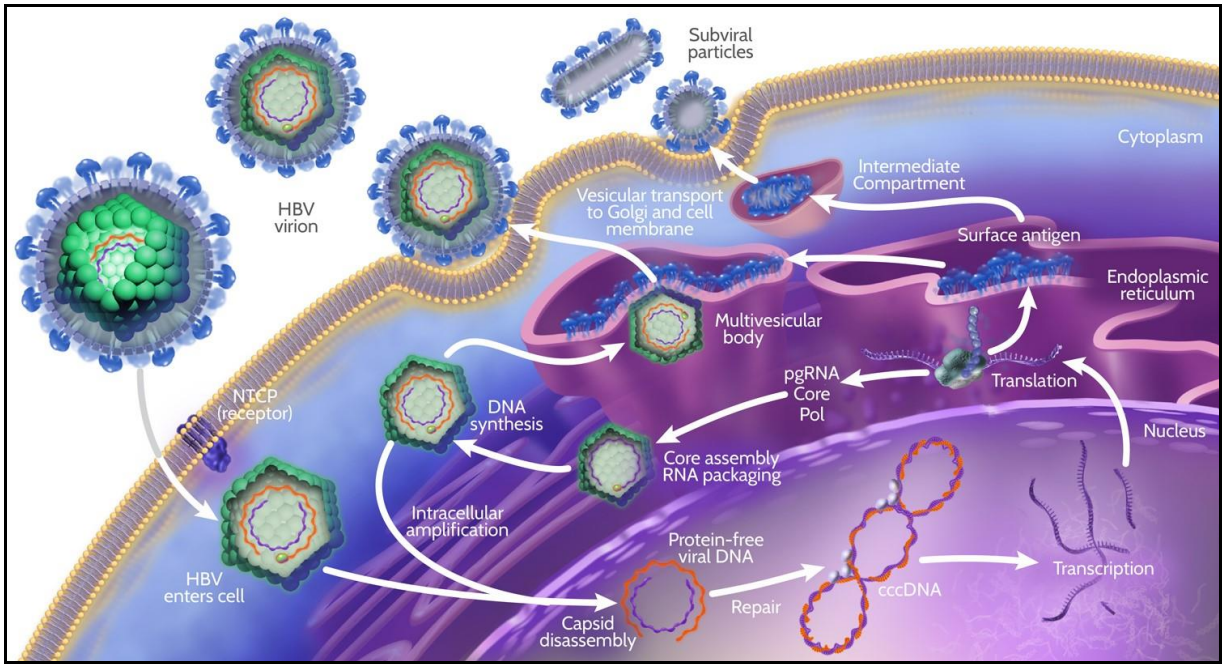
Legenda: Ilustração do vírus da hepatite B apresentando as suas estruturas: as proteínas de superfície S (*small surface protein*) mostrando apenas a subunidade S, as proteínas de superfície M (*medium surface protein*) mostrando as subunidades S e Pré-S2, e as proteínas de superfície L (*large surface protein*) mostrando as subunidades S, Pré-S2 e Pré-S1; o capsídeo ou *core* icosaedrico; a polimerase (Pol) e o DNA viral.
Fonte: Perkins, 2002.

1.6 **Ciclo de vida**

O ciclo de vida do vírus da hepatite B tem início com a entrada do vírus no hepatócito (Figura 7). O processo detalhado da ancoragem das glicoproteínas da superfície viral aos receptores do hepatócito do hospedeiro ainda não é conhecido. Após a ancoragem, o envelope viral se funde com a membrana do hepatócito e o vírion libera seu nucleocapsídeo contento o DNA e a polimerase virais no citoplasma. O nucleocapsídeo se move em direção ao núcleo e se dissolve, enquanto o seu conteúdo é translocado para o núcleo do hepatócito. No núcleo, o

DNA genômico do vírus é reparado (complementação da cadeia positiva do DNA parcialmente circular) e convertido em DNA circular covalentemente fechado (cccDNA, do ingês *covalently closed circular DNA*) que servirá de molde para a transcrição em RNA pré-genômico (pgRNA) pelo RNA polimerase II da célula hospedeira. Os RNA's resultantes darão origem aos produtos dos genes *P*, *C*, *pré-S/S* e *X*. No citoplasma, alguns pgRNA's são traduzidos para produzir as proteínas do *core* do HBV (HBcAg) e DNA polimerase. Em seguida, os pgRNA's são seletivamente encapsulados dentro das partículas do *core* juntamente com DNA polimerase. Dentro da estrutura, a polimerase dá início à síntese do DNA viral: o primeiro passo, chamado de *priming* (iniciador), consiste na formação de um *primer* (ou iniciador) para a síntese do DNA, onde uma deoxiguanosina trifosfato covalentemente ligada à polimerase se pareia com uma citosina da alça do RNA. Em seguida, duas moléculas de deoxi-adenosina são adicionadas à guanosina para formar uma pequena sequência iniciadora de três bases. A síntese da cadeia negativa do DNA então prossegue por transcrição reversa, enquanto que o RNA molde é degradado pela enzima RNAse H. Um pequeno segmento do pgRNA não é degradado e permanece acoplado à porção terminal do novo DNA de cadeia negativa. Esse fragmento de RNA é transferido para o início do novo DNA, que ainda permanece acoplado à polimerase, e servirá como o *primer* para a síntese da cadeia positiva do DNA. Enquanto os novos nucleocapsídeos se formam, as proteínas da superfície viral se acumulam na membrana do retículo endoplasmático (RE). Uma vez finalizada a síntese do DNA genômico, alguns dos novos nucleocapsídeos são reciclados, liberando antígenos HBcAg e o material genético entra para o núcleo repetindo essa parte do ciclo. Outros novos nucleocapsídeos brotam dentro do lúmen do RE ou na face proximal do complexo de Golgi onde carregam consigo uma capa lipídica contendo as proteínas HBsAg, formando assim envelope glicoproteico viral. Os novos vírus envelopados são então transportados por vesículas secretoras que ao se fundirem com a membrana celular os liberam para o meio extracelular. A partir daí, as novas partículas virais poderão infectar outros hepatócitos, espalhando a infecção por todo o fígado ou ser transmitido para outro indivíduo reiniciando assim o ciclo de infecção (Raney, Easton et al. 1991; Fields, Knipe et al. 1996; Lin and Kao 2016).

Figura 7 – Ciclo de vida do vírus da hepatite B



Legenda: A figura ilustra os passos do ciclo de vida do vírus da hepatite B: o vírion começa o seu ciclo de vida com sua entrada na célula hospedeira onde perde o seu envelope, passa pelo desencapsulamento no citoplasma, entrada do DNA e polimerase viral no núcleo, reparo do DNA, transcrição do cccDNA, a translocação do pgRNA e mRNA para o citoplasma onde ocorre a tradução, síntese do novo DNA viral e o encapsulamento. Alguns novos nucleocapsídeos montados são reciclados, perdendo o capsídeo e o material genético entra para o núcleo. Outros entram no RE, ganham o novo envelope e são liberados para fora da célula para nova infecção.

Fonte: Arbutus Biopharma Corporation, disponível no endereço http://www.getfilings.com/sec-filings/160309/Arbutus-Biopharma-Corp_10-K/, acessado em 04/09/2016.

1.7 Mutações no genoma do HBV

A erradicação do vírus da hepatite B conta com esquemas profiláticos de vacinação e esquemas terapêuticos com uso de drogas antirretrovirais. Contudo, a eliminação do vírus em pacientes portadores de HBV crônico continua sendo um grande desafio, sendo muitas das vezes necessário o uso de terapias de longo termo para suprimir o HBV em indivíduos que não alcançaram a soroconversão (Shih, Chou et al. 2016).

Durante a replicação viral, o vírus da hepatite B apresenta altas taxas de erros que ocorrem espontaneamente e que podem levar ao surgimento de mutações no genoma viral (Weber 2005; Jeulin, Velay et al. 2013). As mutações no genoma do HBV e seus efeitos moleculares e relevância clínica estão resumidas na Tabela 1.

Contudo, devido ao genoma característico do HBV (fases de leitura aberta sobrepostas), as taxas de mutações em vírus funcionais são menores quando comparado ao vírus da hepatite C, por exemplo. Por outro lado, devido a essa mesma característica genômica, alterações em uma posição pode afetar a estrutura e função de mais do que uma proteína viral. Ou seja, como o gene da polimerase (*Pol*) se sobrepõe ao gene *S* (que dá origem à proteína do envelope, HBsAg), e se esse *Pol* sofrer uma mutação advinda da pressão seletiva decorrente da terapia, consequentemente o gene *S* também sofrerá alteração (Warner and Locarnini 2008; Jeulin, Velay et al. 2013).

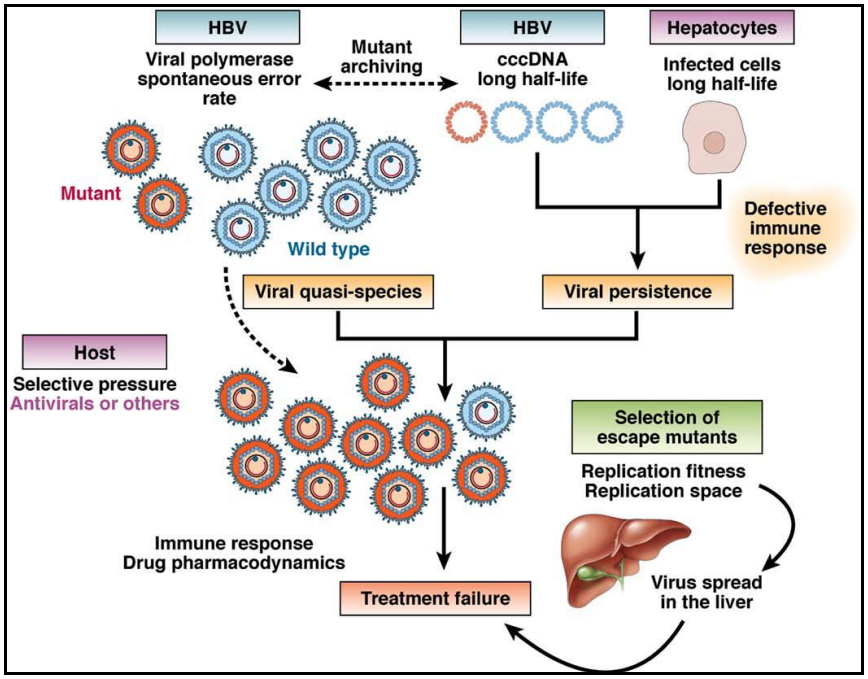
As pressões seletivas (naturais ou causadas pela terapia) podem levar ao surgimento de variantes fenotípicas do vírus carreando mutações que podem reduzir a eficiência de ligação do anticorpo contra o antígeno da superfície (anti-HBs) e de resistência aos antirretrovirais, por exemplo. A disseminação de vírus resistentes pode causar impactos na eficácia dos programas de imunização e do tratamento da hepatite B (Gomes-Gouvea, Ferreira et al. 2015). Outro fator relacionado ao surgimento de vírus carreando mutações é o espaço disponível para a propagação dos vírus. Na infecção crônica, o espaço é dado por volume de hepatócitos. O fígado de pacientes infectados por HBV se regenera após a perda de hepatócitos infectados com o vírus selvagem, gerando hepatócitos não infectados que são susceptíveis a novas infecções pelos vírus mutantes (Zoulim 2004; Sung, Wong et al. 2005). Além disso, a existência de quasispecies e vírus mutantes com adaptações compensatórias, e a persistência do cccDNA estão diretamente ligados ao surgimento de HBV mutantes (Figura 8) (Girones and Miller 1989; Whalley, Murray et al. 2001; Jayalakshmi, Kalyanaraman et al. 2013; Gomes-Gouvea, Ferreira et al. 2015).

Tabela 1 – Papel das mutações no genoma do HBV no desfecho da infecção

Região genômica do HBV	**Efeito molecular**	**Relevância clínica**
Pré-S/S	Mutações no *Pré-S1* e *Pré-S2*, e no gene *S*	Escape vacinal; Escape contra a resposta imune; Escape ao diagnóstico.
Pré-C/C	Mutações no códon de parada do *Pré-C* e na região promotora do *Core*	Negatividade do HBeAg; Persistência viral; Hepatite severa.
Pol	Mutações do gene *Pol* e no motivo YMDD	Latência viral; Persistência viral; Escape terapêutico (resistência aos antivirais)
Sequências regulatórias	Mutações na região promotora do *Core* e no Fator Nuclear Hepático 1-alfa (HFN1α)	Negatividade do HBeAg; Alta viremia; Hepatite severa.
Gene X	Gene *X* truncado (deleção de 8 pb na extremidade 3')	Escape contra a resposta imune; Alto risco de HCC.

Fonte: Adaptado de Jayalakshmi, Kalyanaraman et al., 2013.

Figura 8 – Surgimento de espécies mutantes do vírus da hepatite B



Legenda: Esquematização do surgimento de espécies resistentes ao tratamento e de quasispecies virais.
Fonte: Zoulim e Locarnini, 2009.

1.7.1 Mutações do *pré-core*

Além das variações polimórficas naturais e as mutações que conferem resistência aos antirretrovirais, o vírus da hepatite B pode também desenvolver mutações na região do *pré-core* (*Pré-C*) (Shi, Zhang et al. 2012). A mutação mais relatada nessa região é a substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 1896 do genoma viral (G1986A). Essa substituição leva à introdução prematura de um códon de finalização (*stop codon*) na região do *pré-core*, impedindo a produção do antígeno “e” da hepatite B, contudo sem afetar a replicação viral e a produção do HBcAg (Papatheodoridis and Hadziyannis 2001; Croagh, Desmond et al. 2015). A mutação G1896A consiste em mais um mecanismo de adaptação do vírus para evitar que o sistema imunológico o detecte e o elimine (Lok, Akarca et al. 1994). Apesar da mutação G1896A ser a mais comum, outras mutações do *pré-core* como a C1858T e G1899A têm sido relatadas (Lok, Akarca et

al. 1994). O nucleotídeo 1896 é importante para manter estável a estrutura do *stem-loop,* alça do RNA, ou também designada de épsilon (ε), que é necessária para a encapsidação do pgRNA (Taghavi, Tabibi et al. 2010; Croagh, Desmond et al. 2015). O nucleotídeo da posição 1858 se situa na cadeia ascendente do *stem-loop* e se pareia com o nucleotídeo da posição 1896 da cadeia descendente. Uma vez que o pareamento de timina (T) com adenina é mais estável do que T com G, os genótipos que possuem T1858 (genótipo D, por exemplo) têm maior probabilidade de desenvolver a mutação G1896A. Da mesma maneira, genótipos que possuem C1858 possuem menor probabilidade de desenvolver mutação do *pré-core,* como é o caso dos genótipos A, F2 e H (Kidd-Ljunggren, Miyakawa et al. 2002).

A falha na produção do HBeAg decorrente de mutações no *pré-core* e core é apontada como sendo a causa da diminuição do reconhecimento do HBV pelas células T citotóxicas e, consequentemente, inibe o *clearence* viral pelo sistema imunológico. O surgimento dessa mutação é postulado como sendo derivada da seleção da própria resposta imunológica. Contudo, o papel exato do surgimento da mutação na patogênese da hepatite B crônica permanece pouco claro (Papatheodoridis and Hadziyannis 2001). As mutações do *pré-core* estão associados à hepatite B aguda, fulminante e crônica (Carman, Fagan et al. 1991; Papatheodoridis and Hadziyannis 2001).

O diagnóstico seguro da presença de HBV carreando mutações do *pré-core* pode apenas ser feito por sequenciamento da região *pré-core* do genoma viral, uma metodologia muito robusta, porém pouco disponível na prática clínica (Papatheodoridis and Hadziyannis 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência e tendência temporal da infecção por HBV entre os doadores de sangue de 2001 a 2011 na cidade do Rio de Janeiro, caracterizar a diversidade e evolução dos genótipos de HBV nesse período e analisar o perfil de mutações do pré-core do genoma do HBV.

2.2 Objetivos específicos

- Confirmar a reatividade das amostras;
- Quantificar o número de cópias do material genético viral (carga viral);
- Caracterizar a diversidade e a evolução genotípica do HBV;
- Avaliar a presença da mutação G1896A na região do *pré-core.*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População e locais do estudo

Depois de analisar o banco de dados do hemocentro do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), foram identificados 146 indivíduos portadores dos marcadores para HBsAg e anti-HBc entre 92.163 doações de sangue entre janeiro de 2001 e novembro de 2011. O estudo foi realizado com amostras de soro de 109 dos 146 indivíduos mencionados acima: amostras de 37 indivíduos (25,3%) ou não foram encontrados no repositório de soro (n = 26) ou não tinham volume suficiente para mais testes (n = 11). As seguintes informações foram obtidas dos doadores: sexo, data e local de nascimento, e o ano da doação. Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os doadores (ANEXO A).

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (CAAE: 53488616.4.0000.5259) (ANEXO B).

3.2 Testagem confirmatória HBsAg/anti-HBc e titulação HBsAg

O Governo Federal Brasileiro requer que os ensaios serológicos devem ser utilizados para pesquisar HBsAg, anti-HBc e anti-HCV, anti-HIV-1/2, anti-HTLV-1/2, anticorpos anti-T. cruzi, e sífilis de todos os doadores. A realização do teste de ácidos nucleicos (NAT, do inglês *nucleic acid test*) para HIV e HCV foi exigida em 2011, contudo para o HBV foi exigida apenas em 2015.

Todas as amostras reagentes para HBsAg e anti-HBc no teste de triagem foram submetidas a um teste de confirmação usando uma estratégia de duplo imunoensaio. O uso de um segundo imunoensaio de formato ou reagentes diferentes aumenta a especificidade do processo de testagem e pode, mais facilmente, determinar se o resultado do teste de triagem foi um falso-positivo.

Assim, amostras reativas para ambos os ensaios foram consideradas como confirmadas para esses parâmetros.

Para a confirmação do HBsAg foi utilizado o kit de imunoensaio Bioelisa HBsAg 3.0 (BIOKIT S.A., Lliçàd'Amunt, Barcelona, Espanha). Além disso, para determinar a titulação do HBsAg foi realizada a diluição seriada do soro em PBS (soro puro, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000). O inverso do Log_{10} da titulação HBsAg do soro (HBsAg-InvT: T1 – 1:10, T2 – 1:100, T3 – 1:1000, T4 – 1:10000 e T5 – 1:100000) foi designado como sendo a menor titulação com um resultado reativo no ensaio Bioelisa HBsAg 3.0. Bioelisa HBsAg 3.0 é um método imunoenzimático direto, de tipo “sanduíche”, cujo fundo dos poços da microplaca são recobertos com anticorpos de cobaia anti-HBs para atuar como captura e que utiliza anticorpos de cabra anti-HBs conjugado com peroxidase. Se as amostras analisadas possuírem HBsAg, este se fixará ao anti-HBs no fundo da microplaca. Em seguida, a placa passa por lavagens para retirar o material não fixado e adicionado o anticorpo de cabra anti-HBs conjugado com peroxidase, que reagirá com um possível complexo antígeno-anticorpo formado na primeira incubação. Após a segunda incubação e posterior lavagem, o substrato enzimático que contém um cromogênio é adicionado, o que confere uma coloração azul se a amostra for positiva para HBsAg. Após a adição da solução de parada da reação (ácido sulfúrico), a coloração azul passa para amarela. A intensidade da cor é proporcional à concentração de HBsAg na amostra.

Como não existe um algoritmo de confirmação estabelecido para os resultados do teste anti-HBc, uma estratégia de duplo imunoensaio foi aplicada e o kit Bioelisa anti-HBc (BIOKIT SA, Lliçà d'Amunt, Barcelona, Espanha) foi selecionado, uma vez que possui um formato competitivo e é diferente do formato do ensaio indireto utilizado na triagem. Bioelisa anti-HBc é um método imunoenzimático competitivo para determinação de anticorpos para HBcAg no soro humano. O ensaio é baseado na competição entre anticorpos humanos presentes na amostra e IgG de coelho anti-HBc conjugado com enzima peroxidase (HRP) quando incubados juntos em poços revestidos com HBcAg recombinante. Após incubação e lavagem para remoção do material não fixado, o substrato enzimático que contém um cromogênio é adicionado, o que confere uma coloração azul se a amostra for negativa. Após a adição da solução de parada da reação (ácido sulfúrico), a coloração azul passa

para amarela. A presença de anti-HBc na amostra reduz o desenvolvimento da coloração proporcionalmente à sua concentração.

Todas as lavagens e leituras das microplacas foram realizadas na lavadora MW-12 e leitora MR-96 Mindray (Mindray do Brasil, Perdizes, São Paulo, Brasil), respetivamente.

3.3 Testagem sorológica para HBeAg e anti-HBe

A detecção qualitativa do HBeAg e do anti-HBe foi realizada pela técnica de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência utilizando os ensaios ARCHITECT HBeAg e ARCHITECT anti-HBe (Abbott Laboratórios do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), respectivamente.

A metodologia consiste, primeiramente, na combinação da amostra com o reagente de neutralização e as micropartículas paramagnéticas revestidas com anti-HBe. O HBeAg presente na amostra liga-se às micropartículas revestidas com anti-HBe. Por outro lado, o anti-HBe presente na amostra se liga ao HBeAg recombinante presente no reagente de neutralização. Neste caso, o HBeAg recombinante que não se ligar ao anti-HBe da amostra, vai se ligar às micropartículas revestidas com anti-HBe. Após a lavagem, o conjugado de anti-HBe marcado com acridínio é adicionado. Após outro ciclo de lavagem, as soluções pré-ativadora e ativadora são adicionadas à reação. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades de luz relativas (ULRs). As ULRs detectadas pela ótica do Sistema ARCHITECT possui uma relação direta com a quantidade de HBeAg na amostra e uma relação inversa com a quantidade de anti-HBe na amostra. A presença ou ausência de HBeAg ou anti-HBe na amostra é determinada por comparação do sinal de quimioluminescência na reação com o valor de *cutoff* determinado a partir da calibração de cada ensaio. Se o sinal quimioluminescente da reação for menor do que o *cutoff*, a amostra é considerada não reativa para HBeAg ou anti-HBe.

3.4 Extração do DNA viral

O DNA viral foi extraído a partir de 200µL de soro utilizando o kit *QIAamp MinElute Virus Spin* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.5 Quantificação do DNA do HBV

A quantificação do DNA viral ou carga viral (CV) do HBV das amostras extraídas foi determinada por PCR em Tempo Real (StepOne Plus, Real-Time PCR System, Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA), tendo como alvo o gene da polimerase viral (*Pol*). Todos os iniciadores, sonda e as condições de ciclagens utilizadas nas reações de quantificação do DNA viral estão apresentados na Tabela 2. As amostras foram analisadas em duplicata, em um volume de reação de 25,0µL contendo: 12,5µL de PCR master mix 2x (Taq-DNA-polimerase, tampão de reação, $MgCl_2$, dNTP e água nuclease-*free*); 0,25µL de cada iniciador (*forward* e *reverse*) a 25pmol/µL; 0,5µL da sequência sonda a 25pmol/µL; 6,5µL de água ultrapura; e 5,0µL de DNA. As reações foram realizadas sob as seguintes condições de ciclagem: 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e de anelamento a 60ºC por 60 segundos. O valor da carga viral foi determinado como a média das cópias/mL (cp/mL) obtidas entre as duplicatas depois de confrontadas com a regressão linear da curva padrão (Painel HBV AcroMetrix 0,5 mL, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizado no mesmo ensaio. O ensaio permite a discriminação da concentração da amostra variando entre 1,7 Log_{10} (50 cópias/mL) e 9,0 Log_{10} (1.000.000.000 cópias/mL). O valor da carga viral em cópias/mL pode ser convertido em UI/mL dividindo-o pelo fator de conversão de 3,41 (3,41 de cópias/mL = 1 UI/mL). O fator de conversão de 3,41 é uma aproximação baseada na média de fator de conversão através da faixa dinâmica do ensaio Abbott *RealTime* HBV, calibrado de acordo com o Padrão Internacional da OMS para o HBV.

3.6 **Determinação dos genótipos de HBV**

O DNA extraído das amostras de doadores infectados (carga viral >50 cp/mL) foi submetido à amplificação por semi-*nested*-PCR, tendo como alvo o gene *C* viral (*core*). Todos os iniciadores e as condições de ciclagens utilizadas nas reações de amplificação e de sequenciamento do gene *C* estão apresentados na Tabela 2.

3.6.1 Amplificação do gene *C* por semi-*nested*-PCR

A primeira etapa de amplificação (1º *round*) foi realizada em um volume de reação de 50,0µL contendo: 5,0µL de tampão de reação (10x); 2,5µL de MgCl2 a 50mM; 0,4µL de dNTPs a 25mM; 0,5µL de cada iniciador externos (*forward* e *reverse*) a 25pmol/µL; 0,3µL de Taq-DNA-polimerase a 5U/µL; 35,8µL de água ultrapura; e 5,0µL de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador ABI Veriti (Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes condições de ciclagem: etapa I – desnaturação por 1 minuto a 95°C; etapa II – 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56ºC por 15 segundos e a 72ºC por 30 segundos; etapa III – extensão final a 72°C por 7 minutos.

A partir dos produtos de amplificação (amplicons) gerados no 1º *round* foi realizada a segunda etapa de amplificação (2º *round*) em um volume de reação de 50,0µL: contendo 5µL de tampão de reação (10x); 2,5µL de MgCl2 a 50mM; 0,4µL de dNTPs a 25mM; 0,5µL de cada iniciador interno (*forward* e *reverse*) a 25pmol/µL; 0,3µL de Taq-DNA-polimerase a 5U/µL; 35,8µL de água ultrapura; e 5,0µL de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador ABI Veriti (Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes condições de ciclagem: etapa I – desnaturação por 1 minuto a 95°C; etapa II – 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56ºC por 15 segundos e a 72ºC por 30 segundos; etapa III – extensão final a 72°C por 7 minutos. Em seguida, os amplicons gerados no 2º *round* de amplificação foram analisados e quantificados por eletroforese em gel de agarose a 2% e purificados por meio de dispositivos de ultrafiltração (Amicon Ultra - 0,5 mL 30K Centrifugal Filters, Millipore, Billerica, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6.2 Sequenciamento do fragmento do gene *C*

Todas as reações de sequenciamento foram preparados utilizando o kit de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada em um volume de reação de 20,0µL contendo: 6,0µL de tampão de reação (5x); 2,0µL de BigDye (dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl2 e tampão Tris-HCl); 1,0µL de cada iniciador interno (*forward* ou *reverse*, separadamente para cada amostra) a 5pmol/µL; e os 11,0µL restantes são da água ultrapura mais o produto de PCR purificado (dependendo da quantificação de cada amostra). As reações foram realizadas em um termociclador ABI Veriti (Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes condições de ciclagem: etapa I – desnaturação por 1 minuto a 96°C; etapa II – 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50ºC por 5 segundos e a 60ºC por 30 segundos; etapa III – extensão final a 60°C por 4 minutos. O produto do sequenciamento foi então precipitado através de processos de desidratação por álcool seguindo as seguintes etapas: adicionar 20µL de Isopropanolol absoluto e centrifugar a 3.700 rpm por 1hora a 4ºC; em seguida “flicar” (inversão rápida) a placa para desprezar o álcool; envolver a placa em 3 folhas de papel toalha e dar um *spin* (rápida centrifugação de até 800rpm) para remover o álcool remanescente; adicional 200µL de etanol a 80% e centrifugar a 3700 rpm/30 min a 4ºC; “flicar” a placa para desprezar o álcool; envolver a placa em 3 folhas de papel toalha e dar um *spin* (rápida centrifugação de até 800rpm) para remover o álcool remanescente; aquecer a placa no termociclador por 5 min a 95ºC para evaporar o álcool residual (sem película e com a tampa do termociclador aberta); adicionar 20µL de formamida Hi-Di; desnaturar no termociclador por 5 min a 95ºC (quebra de ligações de hidrogênio); levar 1 minuto ao freezer para choque térmico; e em seguida, levar ao sequenciador para eletroforese capilar.

Tabela 2 - Iniciadores e as relativas condições de ciclagem usadas para cada reação empregada no estudo

Reação	Iniciadores	Sequência (5'–3')	Polaridade	Região do genoma viral	Posição no genoma viral	Desnaturação	Anelamento	Extensão
PCR em tempo real (Carga Viral)	HBV-CV-F3	CAGCGCATGCGTGGAACC	S	HBPol	1197-1214	95°C 15''	60°C 60''	72°C 30''
	Sonda-CV	TGCCGATCCATACTGCGGAACT	S	HBPol	1228-1249			
	HBV-CV-R3	CTCCAGACCTGCTGCGAGC	AS	HBPol	1266-1284			
Semi-*Nested* (Gene *C*) 1º *Round*	Externo-F1	GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTG	S	HBx	1746-1770	95°C 15''	56°C 15''	72°C 30''
	Externo-R1	GCGAGGCGAGGGAGTTCTTC	AS	Core/HBPol	2346-2365			
Semi-*Nested* (Gene *C*) 2º *Round*	Interno-F2	GCTTTAGGGCATGGACATTG	S	HBx/Pre-C	1860-1879	95°C 15''	58°C 15''	72°C 30''
	Externo-R1	GCGAGGCGAGGGAGTTCTTC	AS	Core/HBPol	2346-2365			
Sequenciamento (Gene *C*)	Interno-F2	GCTTTAGGGCATGGACATTG	S	HBx/Pre-C	1860-1879	96°C 10''	50°C 5''	60°C 4'
	Externo-R1	GCGAGGCGAGGGAGTTCTTC	AS	Core/HBPol	2346-2365			
	Interno-R2	CCTTTACCCCGTTGCTCGG	AS	HBPol	1109-1127			

Legenda: AS, Antisenso ou reverso (orientação da fita); C, gene do core viral; CV, Carga Viral; HBV, Vírus da hepatite B; S, Senso ou *forward* (orientação da fita). A genotipagem e as mutações da região *pré-core* foram determinados a partir de amplificações do gene *C.* A carga viral foi determinada a partir de amplificação do gene *Pol*

Fonte: O Autor, 2016.

3.6.3 Análise filogenética

Os fragmentos foram analisados por eletroforese capilar utilizando o sequenciador automatizado ABI 3500XL (Genetic Analyzer, Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA). Os eletroferogramas foram analisados com o auxílio do programa Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd., Brisbane, Austrália) e os genótipos de HBV das amostras foram inferidos usando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).

A árvore filogenética foi criada utilizando o método *Maximum Likelihood* baseado no modelo Tamura-Nei. As sequências foram editadas no software BioEdit e alinhadas com as sequências referências de HBV não-brasileiros dos diferentes genótipos e de diferentes áreas do mundo, obtidos a partir do GenBank do NCBI. As sequências referências foram utilizadas para inferir a origem, diversidade e evolução dos genótipos do HBV encontrados no estudo, através da analise da migração de cada amostra na árvore filogenética. A análise filogenética foi realizada utilizando o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 5.2, Center for Evolutionary Medicine and Informatics, Tempe, AZ, EUA).

3.7 **Perfil de mutações do *pré-core***

Das amostras dos 99 doadores com genótipo de HBV determinado, amostras de apenas 23 doadores diferentes tinham volume suficiente para realizar a análise das mutações do *pré-core*.

O DNA extraído das amostras de doadores infectados e com genótipo de HBV determinado foi submetido à amplificação por semi-*nested*-PCR, tendo como alvo o gene do *pré-core* para a avaliação do perfil de mutações na região do *pré-core*. Todos os iniciadores e as condições de ciclagens utilizadas nas reações de amplificação e de sequenciamento estão apresentados na Tabela 2.

3.7.1 Amplificação da região *pré-core* por semi-*nested*-PCR

Para o 1º *round* de amplificação do fragmento do *pré-core* foram utilizados os pares de iniciadores GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTG e GCGAGGCGAGGGAGTTCT-TC.

O 1º *round* do semi-*nested*-PCR foi realizado em um volume de reação de 50,0µL contendo: 5,0µL de tampão de reação (10x); 2,5µL de MgCl2 a 50mM; 0,4µL de dNTPs a 25mM; 0,5µL de cada iniciador externos (*forward* e *reverse*) a 25pmol/µL; 0,3µL de Taq-DNA-polimerase a 5U/µL; 35,8µL de água ultrapura; e 5,0µL de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador ABI Veriti (Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes condições de ciclagem: etapa I – desnaturação por 1 minuto a 95°C; etapa II – 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56ºC por 15 segundos e a 72ºC por 30 segundos; etapa III – extensão final a 72°C por 7 minutos.

A partir dos produtos de amplificação (amplicons) gerados no 1º *round* foi realizada a segunda etapa de amplificação (2º *round*) em um volume de reação de 50,0µL contendo: 5,0µL de tampão de reação (10x); 2,5µL de MgCl2 a 50mM; 0,4µL de dNTPs a 25mM; 0,5µL de cada iniciador interno (*forward* e *reverse*) a 25pmol/µL; 0,3µL de Taq-DNA-polimerase a 5U/µL; 35,8µL de água ultrapura; e 5,0µL de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador ABI Veriti (Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes condições de ciclagem: etapa I – desnaturação por 1 minuto a 95°C; etapa II – 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56ºC por 15 segundos e a 72ºC por 30 segundos; etapa III – extensão final a 72°C por 7 minutos. Os iniciadores utilizados no 2º *round* de amplificação do fragmento do *pré-core* foram utilizados os pares de iniciadores GCTTTAGGGCATGGACATTG e GCGAGGCGAGGGAGTTCTTC.

Em seguida, os amplicons gerados no 2º *round* de amplificação foram analisados e quantificados por eletroforese em gel de agarose a 2% e purificados por meio de dispositivos de ultrafiltração (Amicon Ultra - 0,5 mL 30K Centrifugal Filters, Millipore, Billerica, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.7.2 Sequenciamento dos fragmentos do *pré-core*

Todas as reações de sequenciamento foram preparados utilizando o kit de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada em um volume de reação de 20,0µL contendo: 6,0µL de tampão de reação (5x); 2,0µL de BigDye (dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl2 e tampão Tris-HCl); 1,0µL de cada iniciador interno (*forward* ou *reverse*, separadamente para cada amostra) a 5pmol/µL; e os restantes 11,0µL são de água ultrapura mais o produto de PCR purificado (dependendo da quantificação de cada amostra). As reações foram realizadas em um termociclador ABI Veriti (Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes condições de ciclagem: etapa I – desnaturação por 1 minuto a 96°C; etapa II – 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50ºC por 5 segundos e a 60ºC por 30 segundos; etapa III – extensão final a 60°C por 4 minutos. Para o sequenciamento do fragmento do *pré-core* foram utilizados os iniciadores GCTTTAGGGCATGGACATTG e GCGAGGCGAGGGAGTTCTTC.

O produto do sequenciamento foi então precipitado através de processos de desidratação por álcool seguindo as seguintes etapas: adicionar 20µL de Isopropanolol absoluto e centrifugar a 3.700 rpm/1hora a 4ºC; em seguida “flicar” (inversão rápida) a placa para desprezar o álcool; envolver a placa em 3 folhas de papel toalha e dar um *spin* (rápida centrifugação de até 800rpm) para remover o álcool remanescente; adicional 200µL de etanol a 80% e centrifugar a 3700 rpm/30 min a 4ºC; “flicar” a placa para desprezar o álcool; envolver a placa em 3 folhas de papel toalha e dar um *spin* (rápida centrifugação de até 800rpm) para remover o álcool remanescente; aquecer a placa no termociclador por 5 min a 95ºC para evaporar o álcool residual (sem película e com a tampa do termociclador aberta); adicionar 20µL de formamida Hi-Di; desnaturar no termociclador por 5 min a 95ºC (quebra de ligações de hidrogênio); levar 1 minuto ao freezer para choque térmico; e em seguida, levar ao sequenciador para eletroforese capilar.

3.7.3 Análise das mutações do *pré-core*

Os fragmentos foram analisados por eletroforese capilar utilizando o sequenciador automatizado ABI 3500XL (Genetic Analyzer, Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, EUA). Os eletroferogramas foram analisados com o auxílio do programa Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd., Brisbane, Austrália) e a análise das mutações do *pré-core* foi realizada com o auxílio do programa Geneious® 8.1.8 (Biomatters development team Copyright © 2005-2016 Biomatters Ltd) contrapondo as sequências em estudo a uma sequência referência do mesmo genótipo (Tabela 3).

Tabela 3 – Sequências do genoma completo do HBV utilizado para realizar a análise de mutações do pré-core e de resistência às drogas

Genótipo	Nº de acesso GenBank
A1	HE974363; KJ854696
A2	KU605532
D1	X85289
D3	KP090180
D4	KF192840
F1	KX264496
F2	KC494402; X69798
F4	KJ843185

Fonte: GenBank, NCBI.

3.8 Análise estatística dos dados

Todas as análises estatísticas foram realizadas em GraphPad Prism 5.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) utilizando testes não-paramétricos (teste de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparações múltiplas de Dunn) e testes paramétricos (teste t ou ANOVA univariada seguido pelo teste de Holm-Sidak ou teste de Tukey para comparações múltiplas, quando apropriado). Os dados foram apresentados como a média ± erro padrão da média (EPM) ou como a mediana e intervalo interquartil (IQR). As diferenças foram consideradas significativas para um valor de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas dos doadores

Durante o período do estudo, de janeiro de 2001 a novembro de 2011, o banco de sangue do HUCFF fez a triagem de 92.163 doações de sangue obtidas de 63.776 doadores diferentes. Após a triagem para HBsAg e anti-HBc, 146 indivíduos foram confirmados como sendo positivos para ambos os parâmetros (0,23; IC 95%: 0,19 – 0,27). A prevalência de HBsAg+anti-HBc foi menor entre as mulheres (0,17; IC 95%: 0,11 – 0,23) do que entre os homens (0,25; IC 95%: 0,21 – 0,30), mas a diferença foi limítrofe à significância estatística (p = 0,056). A faixa etária mais jovem, de 18 a 29 anos teve a menor prevalência de HBsAg+anti-HBc (0,19; IC 95%: 0,14 – 0,24) quando comparado com as outras faixas etárias: 30 a 39 (0,25; IC 95%: 0,18 – 0,33), de 40 a 49 (0,26; IC 95%: 0,18 – 0,35) e para idade igual ou superior a 50 anos (0,26; IC 95%: 0,14 – 0,38); no entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas (p = 0,367).

A média de idade dos 109 indivíduos incluídos no estudo (ver Metodologia) foi de 34,5 anos (IQR: 26,6 e 46,1 anos), e 21 eram do sexo feminino (19,3%). Os 37 doadores não-participantes do estudo (cujas amostras não estavam disponíveis) não diferiram estatisticamente dos 109 indivíduos participantes nem quanto ao sexo (feminino = 24,3%; p = 0,49) e nem quanto à idade (mediana 33,3; IQR: 26,2 e 45,4; p = 0,99).

4.2 Carga viral entre os doadores

A carga viral foi determinada em 104 amostras, das quais 97 (93,3%) apresentaram níveis quantificáveis de DNA de HBV, e sete (6,7%) tiveram níveis abaixo do limite de detecção para o ensaio. A carga viral de HBV não demonstrou diferença estatisticamente significativa quanto ao sexo ou faixa etária (Tabela 4).

Tabela 4 – Perfil da carga viral do HBV (mediana de Log_{10} cp/mL) de acordo com o sexo e a faixa etária

Categoria	Número de amostras quantificáveis	Mediana carga viral	Variação interquartil	Estatística
Sexo				
Feminino	16	2,86	2,21 – 3,25	NS†
Masculino	81	3,10	2,45 – 3,91	
Faixa etária				
18 – 29	33	3,11	2,21 – 4,07	NS‡
30 – 39	30	2,99	2,45 – 3,40	
40 – 49	24	2,97	2,44 – 4,12	
> 50	10	3,27	2,63 – 5,06	

Legenda: HBV, vírus da hepatite B; ng/mL, nanogramas por mililitro; NS, não significativo; cp/mL, unidades internacionais por mililitro. Os dados relativos ao sexo e a faixa etária foram estratificados em categorias distintas, a fim de realizar a comparação com a mediana de carga viral (Log_{10} cp/mL) das amostras quantificáveis. As análises estatísticas não foram significativas para o sexo e faixa etária, quando analisados com o teste de Mann-Whitney (†p = 0,33) e teste de Kruskal-Wallis (‡p = 0,83), respectivamente.

Fonte: O Autor, 2016

4.3 Distribuição dos genótipos

Quanta à genotipagem, não foi possível determinar o genótipo de HBV para 10 de 109 amostras, sendo que três não tinham volume para efetuar o ensaio, uma apresentou baixa carga viral (97 cópias/mL) e outras seis amostras apresentaram carga viral inferior ao limite de detecção. Das 99 amostras genotipados com sucesso, foram detectados os seguintes genótipos: genótipo A (n = 73), D (n = 16), e (n = 2), e F (n = 8). Como os genótipos D, E e F apresentaram baixa frequência quando comparados com o genótipo A, os três genótipos foram consolidados em um único grupo de genotípico denominado de genótipo DEF. Isso possibilitou uma comparação mais precisa entre a frequências do genótipo A versus os genótipos do grupo DEF considerando as variáveis demográficas e os resultados da carga viral. Como mostrado na Tabela 5, a distribuição de frequência dos genótipos A e DEF não diferiram estatisticamente quanto ao sexo (p = 0,225; teste de Fisher), faixa

etária (χ^2= 0,682; teste de qui-quadrado), ou quanto à carga viral (p = 0,854; teste de Mann-Whitney).

Tabela 5 – Frequência de distribuição do genótipo A e do grupo de genótipo DEF de acordo com o sexo, faixa etária e carga viral

Category	Genotypes		Statistics
	A	DEF	
Sexo			
Feminino	14	2	NS†
Masculino	59	24	
Faixa etária			
18 – 29	24	9	
30 – 39	23	8	NS‡
40 – 49	20	5	
> 50	6	4	
HBV-CV			
Mediana	3,06	3,04	NS#
IQR	2,45 – 3,91	2,53 – 3,78	

Legenda: DEF, denominação atribuída ao grupo formado pelos genótipos D, E e F; HBV, vírus da hepatite B; HBV-CV, carga viral do HBV; IQR, Amplitude interquartil; NS, não significativo; cp/mL, unidades internacionais por mililitro.

Nota: A frequência dos genótipos A e DEF foram comparadas de acordo com o sexo, faixa etária e HBV-CV (mediana de Log_{10} cp/mL). As análises estatísticas revelaram que não houve diferença para as categorias analisadas: sexo (†teste de Fisher, p = 0,225), faixa etária (‡teste Chi-quadrado, χ^2 = 0,682) e HBV-CV (#teste Mann-Whitney, p = 0,854).

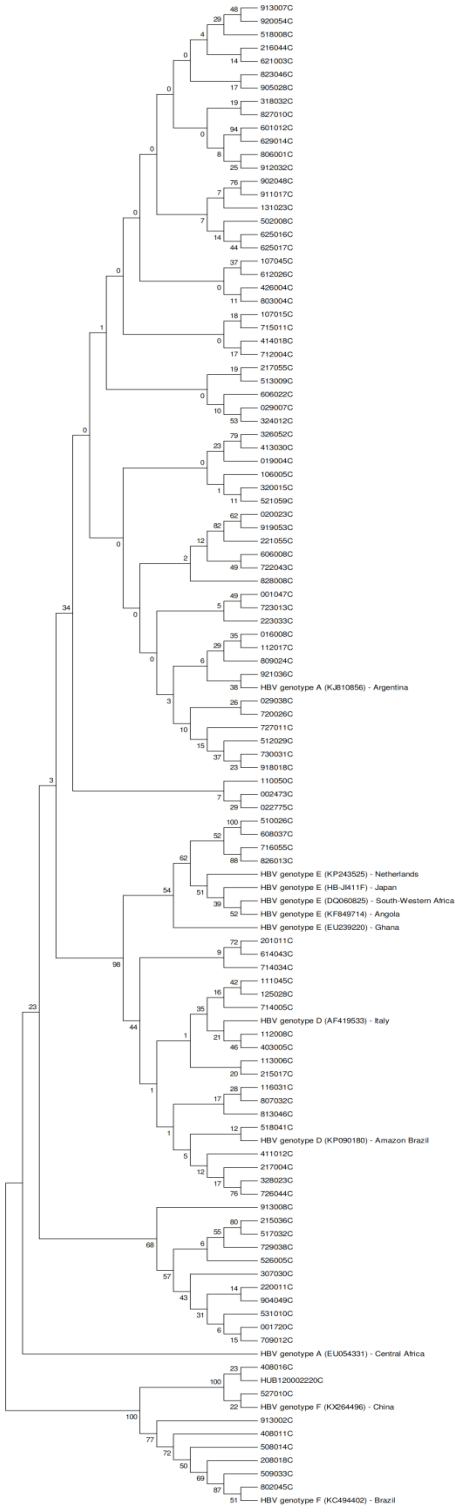
Fonte: O Autor, 2016.

4.4 Análise filogenética

A árvore filogenética dos genótipos de HBV apresenta o agrupamento das estirpes encontradas no estudo de acordo com as semelhanças com as sequências de referência (Figura 9). A análise revelou que as estirpes de genótipos A encontradas neste estudo se agruparam com as sequências de referência de variedades encontradas na Argentina (nº de registro no GenBank KJ810856). Apesar de se originarem do mesmo ramo ancestral, as cepas de genótipo A

encontrados em nosso estudo difere daquelas encontradas na África Central (nº de registro no GenBank EU054331). Os genótipos D encontrados neste estudo se agruparam com ambas as estirpes europeias encontrados na população italiana (nº de registro no GenBank AF419533) e as encontradas na região amazônica no norte do Brasil (nº de registro no GenBank KP090180). As cepas do genótipo F se agruparam com as estirpes encontradas na China (nº de registro no GenBank KX264496), e com os genótipos F isolados de diferentes regiões geográficas brasileiras (nº de registro no GenBank KC494402). Finalmente, os genótipos E se agruparam com a estirpe encontrada em um indivíduo japonês que viajou para a Zâmbia (nº de registro no GenBank HBJI411F), bem como as cepas de Angola (nº de registro no GenBank KF849714), Gana (nº de registro no GenBank EU239220), sudoeste africano (nº de registro no GenBank DQ060825), e ainda mais próximo de uma estirpe de genótipo E encontrada nos Países Baixos (nº de registro no GenBank KP243525).

Figura 9 – Árvore filogenética



Nota: Análise filogenética pelo método *Maximum Likelihood*. A história evolutiva foi inferida utilizando o método *Maximum Likelihood* baseado no modelo Tamura-Nei. A análise foi baseada em sequências referências de HBV não brasileiros e de diferentes genótipos e áreas geográficas do mundo obtidos a partir da NCBI GenBank. As análises evolutivas foram realizadas no programa MEGA 5.

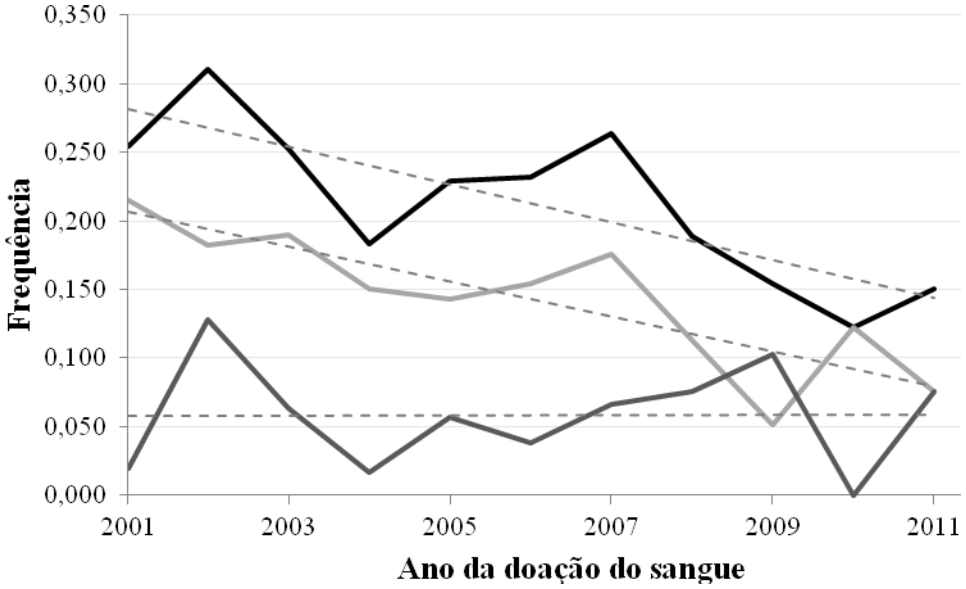
Fonte: O Autor, 2016.

Os genótipos A e DEF também foram comparados com a tendência de frequência de infecção ao longo do período de 11 anos. Para o ajuste das 40 amostras das quais não foi possível realizar a genotipagem (37 não estavam disponíveis para o estudo, e em outras três amostras não foram possíveis determinar o genótipo), a frequência de distribuição dos genótipos nessas doações foi ponderado sobre a frequência de distribuição anual verificadas nas doações cuja determinaçãor do genótipo foi possível. Outro grupo de amostras não genotipadas foi incluído como um grupo separado para o ajuste. Este grupo não genotipado foi composto às amostras cuja carga viral não foi detectada. O Apêndice A mostra todos os passos tomados para ajustar a frequência dos genótipos, usando o ano de 2001 como exemplo.

4.5 Tendência temporal da infecção por HBV

A Figura 10 mostra a distribuição anual da frequência ajustada para os grupos de genótipo A e DEF e para as amostras positivas para HBsAg+anti-HBc. A frequência de indivíduos HBsAg+anti-HBc positivos diminuiu de forma constante de 0,25% em 2001 para 0,15% em 2011. Ao mesmo tempo, o genótipo A também diminuiu de 0,22% em 2001 para 0,08% em 2011, quase no mesmo ritmo que a diminuição da frequência de positividade de HBsAg+anti-HBc. A frequência ajustada para o genótipo DEF não apresentou alterações durante o período de 2001 a 2011. No entanto, não é possível concluir sobre a tendência de um determinado genótipo em particular devido ao pequeno número de casos de genótipos D, E e F nas amostras estudadas, como mostrado anteriormente.

Figura 10 – Tendência temporal da infecção por HBV



Nota: O gráfico mostra a tendência temporal da infecção por HBV entre os doadores de sangue durante o período do estudo. A linha preta sólida indica a frequência ajustada de indivíduos reagentes para HBsAg e anti-HBc no período do estudo. A linha cinza clara sólida e fina indica o genótipo A, e a linha cinza escura sólida indica a frequência ajustada de genótipo DEF durante o período do estudo. As linhas tracejadas indicam a tendência linear para cada grupo analisado.

4.6 Análise do perfil de mutação da região do *pré-core*

Do total de 99 doadores cujas amostras foram genotipadas com sucesso no estudo, foi possível analisar o perfil de mutações da região do *pré-core* nas amostras de 23 (23,2%) doadores. Dos quais, 16 (69,6%) são homens e sete (30,4%) são mulheres, com a média de idade de 39 anos, variando de 18 a 59 anos. Não foi possível analisar as amostras dos demais doadores devido ao volume insuficiente de soro e DNA.

Para a análise de mutações do *pré-core* viral foram incluídas amostras de 23 doadores. A análise filogenética revelou três genótipos de HBV entre estes indivíduos, sendo: genótipo A (n = 13), genótipo D (n = 5) e genótipo F (n = 5). A carga viral foi determinada para 21 das 23 amostras, sendo 20 (87,0%) com carga viral detectável e duas (8,7%) com carga viral abaixo do limite de detecção. Apenas uma amostra (4,3%) não tinha volume suficiente para a realização do ensaio de

quantificação do DNA de HBV. Não foi observada diferença estatística de carga viral entre os genótipos (p = 0,55; análise de variância univariada) e nem entre os sexos (p = 0,64; teste t).

A mutação G1896A do *pré-core* do HBV foi detectada em amostras de seis indivíduos (26,1%) dos 23 analisados. As seis amostras infectadas pelo vírus carreando a mutação G1896A não diferiram estatisticamente das 17 infectadas pelo vírus com a sequência *pré-core wild type* (selvagem), nem quanto sexo (64,7% homens; p = 0,62; teste de Fisher), idade (mediana = 42 anos; IQR: 40,5 e 52,5; p = 0,0594; teste de Mann Whitney) e nem quanto à carga viral (mediana = 340 cp/mL; IQR: 1960 e 4974; p = 0,34; teste t).

A mutação G1896A foi mais frequente no genótipo D (n = 4), seguido dos genótipos A e F com um caso cada um. Apenas uma amostra (genótipo A) apresentou a mutação C1858T além da mutação G1896A (Tabela 6).

Devido ao número restrito e pouco volume das amostras do estudo, a testagem sorológica para HBeAg e anti-HBe só foi realizada em três das seis amostras que apresentaram a mutação G1896A. As características sorológicas e virológicas destas três amostras estão apresentadas na Tabela 7, juntamente com as demais amostras G1896A sem testagem para HBeAg e anti-HBe.

Tabela 6 – Dados demográficos, sorológicos e moleculares da população participante da análise do *pré-core*

	Genoma do *pré-core*			
	Wild Type	**G1896A**	**Total**	**Estatística**
N	17	6	23	-
HBsAg				
Positivo	17	6	23	
Negativo	0	0	0	-
Total	17	6	23	
Anti-HBc				
Positivo	15	6	21	
Negativo	2	0	2	-
Total	17	6	23	
Genótipo				
A	12	1	13	
D	1	4	5	-
F	4	1	5	
Total	17	6	23	
Mediana CV	738	289	-	NS
Sexo				
Masculino	11	5	16	
Feminino	6	1	7	NS
Total	17	6	23	
Média idade	36,8	46,0	-	NS

Legenda: Anti-HBc, anticorpo contra o core da hepatite B; CV, carga viral; HBsAg, antígeno da superfície da hepatite B; NS, não significativo
Fonte: O Autor, 2016.

Tabela 7 – Características sorológicas e virológicas das amostras G1896A

ID	HBsAg	anti-HBs	anti-HBc	HBeAg	anti-HBe	Carga Viral	Genótipo
001720	+	NR	+	NR	NR	+	A
614043	+	-	+	NR	NR	+	D
726044	+	-	+	NR	NR	+	D
113006	+	+	+	-	+	+	D
425008	+	NR	+	-	+	+	D
913002	+	-	+	+	+	+	F

Legenda: Anti-HBc, anticorpo contra o core da hepatite B; anti-HBe, anticorpo contra o antígeno “e” da hepatite B; anti-HBs, anticorpo contra o antígeno da superfície da hepatite B; HBeAg, antígeno “e” da hepatite B; HBsAg, antígeno da superfície da hepatite B; ID, identificação
Fonte: O Autor, 2016.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigados a prevalência e a tendência da infecção por HBV entre os doadores de sangue reativos tanto para HBsAg e anti-HBc durante um período de 11 anos, as características virológicas e o perfil de mutações do pré-core do vírus da hepatite B.

Os indivíduos infectados neste estudo eram principalmente homens (81%). O predomínio do sexo masculino entre os doadores soropositivos para HBV tem sido relatado em estudos de várias regiões do Brasil e do exterior (Valente, Covas et al. 2005; Lindenberg, Motta-Castro et al. 2013; Pinto, Ferreira et al. 2015; Saúde 2015). No entanto, a frequência da distribuição de HBsAg+anti-HBc encontrada neste estudo não demonstrou diferença estatística em relação ao sexo e faixa etária. Embora, o sexo feminino e a faixa etária mais jovem (18 a 29 anos) tiveram a menor frequência da distribuição de HBsAg+anti-HBc.

Enquanto a maioria dos genótipos do HBV é prevalente em uma determinada região do mundo, outros têm uma distribuição mundial (por exemplo, os genótipos A e D) (Tanaka, Hasegawa et al. 2004; Scheiblauer, El-Nageh et al. 2010; Pourkarim, Sharifi et al. 2014). Na América Latina, os genótipos mais prevalentes são A, B e D (na Argentina e no sudeste e nordeste do Brasil) e genótipo F (região amazônica) (Parana and Almeida 2005). No presente estudo, a distribuição dos genótipos A, D, E, e F foi de 73,7%, 16,2%, 2,0%, e 8,1%, respectivamente. Isto está de acordo com vários estudos que revelaram os genótipos A, D e F como os mais prevalentes no Brasil. No entanto, a distribuição dos genótipos de HBV de todas as cinco regiões geográficas brasileiras indica que os genótipos A, D, e F estão presentes em diferentes frequências: o genótipo A foi o mais prevalente nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste; o genótipo D foi o mais prevalente no sul; e todos os genótipos do HBV tiveram uma distribuição similar na região central. O genótipo F foi o terceiro mais prevalente em todas as regiões, embora com diferentes níveis de distribuição da frequência (Teles, Martins et al. 1999; Carrilho, Moraes et al. 2004; Mello, Souto et al. 2007; Bertolini, Gomes-Gouvea et al. 2012; Crispim, Fraiji et al. 2014). Um estudo realizado em amostras positivas para HBsAg em doadores de sangue na Região Sudeste do Brasil revelou uma distribuição de genótipos de HBV como sendo 64,3% do genótipo A, 19,8% do genótipo D, e 16,1% do genótipo F (Mello,

Souto et al. 2007). No presente estudo, a distribuição dos genótipos de HBV no Rio de Janeiro, uma cidade localizada no Sudeste do Brasil, está de acordo com a distribuição de genótipos relatada nesse estudo.

Além dos genótipos comumente encontrados na população brasileira (A, D e F), neste estudo foram encontrados dois casos de genótipo E. Ambos os doadores nasceram em Angola e no momento da doação residiam no Rio de Janeiro. Os dois casos podem não estar relacionados uma vez que existe um intervalo de três anos entre as doações de sangue (entre 2002 e 2005). Geograficamente, o genótipo E do HBV é predominante da África Ocidental (Tanaka, Hasegawa et al. 2004; Scheiblauer, El-Nageh et al. 2010; Valente, Lago et al. 2010). Esses casos foram certamente importados para o Brasil como sugerido por Sitnik e colaboradores (Sitnik, Sette et al. 2007). Esta informação é relevante uma vez que a migração de indivíduos de países africanos de língua portuguesa (particularmente de Angola) para o Brasil aumentou ao longo dos últimos 10 anos. Além desses dois casos encontrados no Rio de Janeiro, Sitnik e colaboradores (2007) descreveram o caso de um indivíduo angolano carreando o genótipo E, em São Paulo, Brasil (Sitnik, Sette et al. 2007). Desde então, nenhum outro caso de genótipo E foi reportado no país. No entanto, o monitoramento desses casos deve ser contínuo, a fim de reduzir o risco de propagação de genótipos alóctones em todo o país. A presença dos casos de genótipo E enfatiza a importância do monitoramento contínuo desses casos pelos serviços de vigilância e a necessidade dos serviços de saúde adotarem exames complementares para determinar o genótipo do vírus, e prontamente notificar novos genótipos circulando no país.

Um aspecto a destacar no presente estudo é a diminuição da frequência de doadores reativos para HBsAg e anti-HBc durante o período estudado. Entre as razões que poderiam explicar a diminuição dos casos de infecção pelo HBV estão: 1) aumento de campanhas públicas de sensibilização para as doenças sexualmente transmissíveis; 2) melhoria na vigilância dos casos de HBV; 3) aplicação de políticas de profilaxia pré- e pós-exposição; e 4) mudança no perfil dos doadores de sangue durante o período de estudo. No entanto, o mais importante foi o esforço nacional para implementar um programa de imunização. O Programa Nacional de Imunização teve início em meados dos anos 80 e até o final da década de 90 estava implementada a vacinação universal contra o HVB ao nascimento (Domingues, Neto et al. 2013). Além disso, a imunização é fortemente defendida e até recentemente a

sua distribuição era gratuíta para todos os indivíduos com menos de 29 anos de idade. Neste sentido, é interessante notar que, em um estudo recente realizado no campus de uma universidade no Rio de Janeiro, a prevalência de anti-HBs nos indivíduos da faixa etária superior a 49 anos foi de 22,3% e nos indivíduos da faixa etária inferior a 30 anos foi de 69,7% (Pinto, Ferreira et al. 2015). Atualmente, a distribuição gratuita da vacina contra hepatite B abrange todas as faixas etárias. Curiosamente, a tendência da diminuição de casos de infecção por HBV na mesma proporção que a do genótipo A, pode estar relacionada com a maior prevalência desse genótipo no Sudeste do Brasil, tornando assim o seu declínio mais evidente. Estes dados demonstram a importância do banco de sangue como um posto sentinela para o monitoramento de novos casos de infecção. Tal programa, combinado com outras medidas, podem ser aplicadas a qualquer cidade ou país, a fim de conter a propagação da infecção pelo HBV, que pode ser agravada pelo aumento das taxas de migração de regiões de alta prevalência. Tais medidas podem também ser utilizadas para reduzir o risco de transmissão por meio de transfusão sanguínea e pela transmissão vertical de mãe para filho.

Quanto às mutações da região do *pré-core*, o estudo revelou a presença de seis indivíduos infectados por cepas de HBV carreando a mutação G1896A, que ocorre quando a guanina (G) da posição 1896 é substituída por uma adenina (A) levando à introdução prematura de um *stop codon* no aa da posição 28. Essa mutação evita que a proteína HBeAg seja produzida, porém sem afetar a produção do HBcAg (Shi, Zhang et al. 2012; Croagh, Desmond et al. 2015). De entre as seis amostras cuja presença da mutação G1896A foi detectada, apenas três foram resgatadas da soroteca do hemocentro para testagem sorológica de HBeAg e anti-HBe. Os dados de HBeAg e anti-HBe das amostras incluídas no estudo não constavam do banco de dados pelo fato de serem provenientes de doações de sangue em um hemocentro. Estes marcadores são testados apenas para fins de diagnótico da infecção. O antígeno HBeAg é um marcador sorológico que indica replicação viral e um preditor do grau da infectividade do indivíduo. Em contrapartida, o anticorpo anti-HBe é o neutraliznte do HBeAg (Suppiah, Mohd Zain et al. 2015). Na nossa análise, a presença do anti-HBe foi constatada nas três amostras, porém a ausência do HBeAg foi evidenciada em duas delas. No curso natural da infecção crônica por HBV, a perda da expressão do HBeAg e o aparecimento do anti-HBe, geralmente é preditor de cessação de replicação viral e

soroconversão de HBeAg para anti-HBe. Contudo, a replicação viral pode ser evidenciada em amostras com esse perfil sorológico e infectadas com HBV carreando a mutação G1896A (Zhand, Karami et al. 2015). A outra amostra apresentou o anti-HBe simultaneamente com o HBeAg. Este dado afasta a possibilidade de o indivíduo ter sido infectado inicialmente por um vírus mutante. O que corrobora o preposto na literatura sugerindo que as cepas mutantes são selecionadas por pressão imunológica no decorrer da soroconversão do HBeAg (Yoo, Park et al. 2003; Zhang, Xu et al. 2009). No entanto, não podemos precisar se esse indivíduo possui concomitantemente as duas populações de vírus (selvagem e mutante). As mutações do *pré-core* têm sido associadas à evolução mais severa da hepatite B, uma vez que com a mutação inibe a produção do HBeAg levando o vírus a escapar da ação imunológica, ao mesmo tempo que estabiliza a estrutura epsilon (ε), fundamental para o início da encapsidação, tornando mais eficiente a replicação viral (Su and Yee 1992; Zhand, Karami et al. 2015).

No presente estudo, detectamos o genótipo D em quatro dos seis indivíduos infectados pelo HBV carreando G1896A. Quanto aos outros dois indivíduos, um portava o genótipo A e o outro genótipo F. Apesar do número reduzido de casos, os nossos achados tendem para o que fora anteriormente postulado sobre a maior probabilidade do genótipo D em apresentar esta mutação em relação ao genótipo A (Kidd-Ljunggren, Miyakawa et al. 2002; Croagh, Desmond et al. 2015). Segundo Sitnik e colaboradores (2004, apud Lindh et al. 1997 e Lindh et al. 1998), as mutações do *pré*-core, assim como os genótipos de HBV, possuem um padrão específico de distribuição, sendo mais frequente nas regiões geográficas onde predominam os genótipos B, C e D como a Ásia e bacia do Mediterrâneo. Na América do Norte e Europa onde o genótipo A é mais comumente encontrado(Lindh, Andersson et al. 1997; Lindh, Gonzalez et al. 1998; Sitnik, Pinho et al. 2004). Existem poucos dados referentes às mutações do *pré-core* na América do Sul. No Brasil, um estudo conduzido por De Castro e colaboradores (2001) em 29 brasileiros com anti-HBe positivo, revelou baixa frequência da mutação (24%) (De Castro, Niel et al. 2001). A baixa frequência da mutação G1896A também foi verificada por Sitnik e colaboradores (2004) em 31,7% (32/101) dospacientes, sendo que 88,0% (22/25) eram do genótipo D (Sitnik, Pinho et al. 2004).

Como limitação deste estudo, destaca-se o pouco volume das amostras que, por conseguinte, determinou o pequeno número amostral. Todavia, os resultados

obtidos neste estudo sinalizam para a necessidade de dar continuidade à pesquisa das mutações do *pré-core*, porém, com a possibilidade de ampliar a população alvo incluindo pacientes portadores de infecção crônica atendidos em outros serviços de saúde. Desta forma, aumenta a probabilidade de visualizar possíveis associações entre a ocorrência das mutações e as variáveis analisadas.

CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo revelou uma prevalência de infecção por HBV de 0,23% e que os genótipos virais A, D e F encontrados seguiram a frequência e a distribuição geográfica do HBV descritas na população brasileira, exceto para o genótipo E encontrada em dois doadores africanos. Foi constatada uma tendência decrescente de casos soropositivos para HBsAg+anti-HBc e do genótipo A do HBV, assim como seis casos de mutação G1896A do de mutação G1896A do *pré-core*. Sendo o sequenciamento uma metodologia muito segura para detectar mutações no genoma viral, torna-se de grande importância na busca por uma compreensão mais completa do HBV quanto a sua origem, evolução, detecção sorológica, virulência, distribuição geográfica, e resposta ao tratamento antiviral ou o surgimento de resistência aos medicamentos. Essas informações podem contribuir para um melhor planejamento de políticas de saúde pública e promover medidas de prevenção, tratamento e monitoramento da infecção por hepatite B.

REFERÊNCIAS

Abdo, A. A., F. M. Sanai, et al. (2012). "Epidemiology of viral hepatitis in Saudi Arabia: are we off the hook?" Saudi J Gastroenterol 18(6): 349-57.

Allen, M. I., M. Deslauriers, et al. (1998). "Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group." Hepatology 27(6): 1670-7.

Almeida, J. D., D. Rubenstein, et al. (1971). "New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis." Lancet 2(7736): 1225-7.

Bertolini, D. A., M. S. Gomes-Gouvea, et al. (2012). "Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil." Infect Genet Evol 12(6): 1295-304.

Blumberg, B. S. (1977). "Australia antigen and the biology of hepatitis B." Science 197(4298): 17-25.

Blumberg, B. S., H. J. Alter, et al. (1965). "A "New" Antigen in Leukemia Sera." JAMA 191: 541-6.

Bottecchia, M., N. Ikuta, et al. (2008). "Lamivudine resistance and other mutations in the polymerase and surface antigen genes of hepatitis B virus associated with a fatal hepatic failure case." J Gastroenterol Hepatol 23(1): 67-72.

C.D.C. (2005) "Interpretation of Hepatitis B Serologic Test Results." Division of Viral Hepatitis Volume, DOI:

Caligiuri, P., L. Sticchi, et al. (2012). "Presence of HBV S-gene mutants in immunocompromised patients." New Microbiol 35(1): 97-8.

Carman, W. F., E. A. Fagan, et al. (1991). "Association of a precore genomic variant of hepatitis B virus with fulminant hepatitis." Hepatology 14(2): 219-22.

Carrilho, F. J., L. Kikuchi, et al. (2010). "Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil." Clinics (Sao Paulo) 65(12): 1285-90.

Carrilho, F. J., C. R. Moraes, et al. (2004). "Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology." BMC Public Health 4: 13.

Contrera-Moreno, L., S. M. de Andrade, et al. (2012). "Hepatitis B virus infection in a population exposed to occupational hazards: firefighters of a metropolitan region in central Brazil." Rev Soc Bras Med Trop 45(4): 463-7.

Crispim, M. A., N. A. Fraiji, et al. (2014). "Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil." BMC Infect Dis 14: 94.

Croagh, C. M., P. V. Desmond, et al. (2015). "Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance." World J Hepatol 7(3): 289-303.

De Castro, L., C. Niel, et al. (2001). "Low frequency of mutations in the core promoter and precore regions of hepatitis B virus in anti-HBe positive Brazilian carriers." BMC Microbiol 1: 10.

Delaney, W. E. t., A. S. Ray, et al. (2006). "Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus." Antimicrob Agents Chemother 50(7): 2471-7.

Dienstag, J. L. (2008). "Hepatitis B virus infection." N Engl J Med 359(14): 1486-500.

Domingues, C. M. A. S., A. A. L. Neto, et al. (2013). Ampliação da oferta da vacina da hepatite B para a faixa etária d e30 a 49 anos em 2013. Brazil, Ministério da Saúde.

Dos Anjos, G. R., R. M. Martins, et al. (2011). "Epidemiology of hepatitis B virus infection in first-time blood donors in the southwestern region of Goias, central Brazil." Rev Bras Hematol Hemoter 33(1): 38-42.

Farshadpour, F., R. Taherkhani, et al. (2016). "Prevalence and Trends of Transfusion-Transmissible Viral Infections among Blood Donors in South of Iran: An Eleven-Year Retrospective Study." PLoS One 11(6): e0157615.

Ferrarese, A., A. Zanetto, et al. (2016). "Liver transplantation for viral hepatitis in 2015." World J Gastroenterol 22(4): 1570-81.

Fields, B. N., D. M. Knipe, et al. (1996). Fundamental Virology. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.

Fonseca, J. C. (2010). "[History of viral hepatitis]." Rev Soc Bras Med Trop 43(3): 322-30.

Gebbing, M., T. Bergmann, et al. (2015). "Gene therapeutic approaches to inhibit hepatitis B virus replication." World J Hepatol 7(2): 150-64.

Gilbert, R. J., L. Beales, et al. (2005). "Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral." Proc Natl Acad Sci U S A 102(41): 14783-8.

Girones, R. and R. H. Miller (1989). "Mutation rate of the hepadnavirus genome." Virology 170(2): 595-7.

Golsaz-Shirazi, F., H. Mohammadi, et al. (2016). "Localization of immunodominant epitopes within the "a" determinant of hepatitis B surface antigen using monoclonal antibodies." Arch Virol 161(10): 2765-72.

Gomes-Gouvea, M. S., A. C. Ferreira, et al. (2015). "HBV carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naive patients." Antivir Ther 20(4): 387-95.

Hadziyannis, S. J., N. C. Tassopoulos, et al. (2006). "Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years." Gastroenterology 131(6): 1743-51.

Hadziyannis, S. J., N. C. Tassopoulos, et al. (2003). "Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B." N Engl J Med 348(9): 800-7.

Hollinger, F. B. and G. Sood (2010). "Occult hepatitis B virus infection: a covert operation." J Viral Hepat 17(1): 1-15.

Jayalakshmi, M. K., N. Kalyanaraman, et al. (2013). Hepatitis B Virus Genetic Diversity: Disease Pathogenesis. Viral Replication. G. Rosas-Acosta, InTech.

Jeulin, H., A. Velay, et al. (2013). "Clinical impact of hepatitis B and C virus envelope glycoproteins." World J Gastroenterol 19(5): 654-64.

Kidd-Ljunggren, K., Y. Miyakawa, et al. (2002). "Genetic variability in hepatitis B viruses." J Gen Virol 83(Pt 6): 1267-80.

Kim, Y. S. (2013). "[Definition, diagnosis, and prevalence of occult hepatitis B virus infection]." Korean J Gastroenterol 62(3): 143-7.

Kokki, I., D. Smith, et al. (2016). "Hepatitis E virus is the leading cause of acute viral hepatitis in Lothian, Scotland." New Microbes New Infect 10: 6-12.

Krugman, S. and J. P. Giles (1973). "Viral hepatitis, type B (MS-2-strain). Further observations on natural history and prevention." N Engl J Med 288(15): 755-60.

Krugman, S., J. P. Giles, et al. (1971). "Viral hepatitis, type B (MS-2 strain). Studies on active immunization." JAMA 217(1): 41-5.

Lin, C. L. and J. H. Kao (2011). "The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances." J Gastroenterol Hepatol 26 Suppl 1: 123-30.

Lin, C. L. and J. H. Kao (2016). "Review article: novel therapies for hepatitis B virus cure - advances and perspectives." Aliment Pharmacol Ther 44(3): 213-22.

Lindenberg, A. S., A. R. Motta-Castro, et al. (2013). "Decrease in hepatitis B prevalence among blood donors in Central-West Brazil." J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 19(1): 7.

Lindh, M., A. S. Andersson, et al. (1997). "Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method." J Infect Dis 175(6): 1285-93.

Lindh, M., J. E. Gonzalez, et al. (1998). "Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon." J Virol Methods 72(2): 163-74.

Liu, C. J. and J. H. Kao (2008). "Genetic variability of hepatitis B virus and response to antiviral therapy." Antivir Ther 13(5): 613-24.

Locarnini, S. and F. Zoulim (2010). "Molecular genetics of HBV infection." Antivir Ther 15 Suppl 3: 3-14.

Lok, A. S., U. Akarca, et al. (1994). "Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal." Proc Natl Acad Sci U S A 91(9): 4077-81.

Magnius, L. O. and H. Norder (1995). "Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene." Intervirology 38(1-2): 24-34.

Marcellin, P., T. T. Chang, et al. (2003). "Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B." N Engl J Med 348(9): 808-16.

McDonald, S. (1918). "ACUTE YELLOW ATROPHY IN SYPHILIS: (A Preliminary Note.)." Br Med J 1(2977): 76-8.

Mello, F. C., F. J. Souto, et al. (2007). "Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates." BMC Microbiol 7: 103.

Naghavi, M., H. Wang, et al. (2015). "Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." Lancet 385(9963): 117-71.

Nascimento, M. C., P. Mayaud, et al. (2008). "Prevalence of hepatitis B and C serological markers among first-time blood donors in Brazil: a multi-center serosurvey." J Med Virol 80(1): 53-7.

Niesters, H. G., R. A. De Man, et al. (2002). "Identification of a new variant in the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase gene selected during lamivudine therapy." J Med Microbiol 51(8): 695-9.

Pallier, C., L. Castera, et al. (2006). "Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine." J Virol 80(2): 643-53.

Papatheodoridis, G. V., E. Dimou, et al. (2002). "Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance." Am J Gastroenterol 97(7): 1618-28.

Papatheodoridis, G. V. and S. J. Hadziyannis (2001). "Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B." J Viral Hepat 8(5): 311-21.

Parana, R. and D. Almeida (2005). "HBV epidemiology in Latin America." J Clin Virol 34 Suppl 1: S130-3.

Park, S. H. and B. Rehermann (2014). "Immune responses to HCV and other hepatitis viruses." Immunity 40(1): 13-24.

Perrillo, R. P. (2004). "Overview of treatment of hepatitis B: key approaches and clinical challenges." Semin Liver Dis 24 Suppl 1: 23-9.

Perrillo, R. P. (2005). "Current treatment of chronic hepatitis B: benefits and limitations." Semin Liver Dis 25 Suppl 1: 20-8.

Pinto, F. P., O. C. Ferreira, Jr., et al. (2015). "Prevalence of hepatitis B and C markers in a population of an urban university in Rio de Janeiro, Brazil: a cross-sectional study." Ann Hepatol 14(6): 815-25.

Pourkarim, M. R., Z. Sharifi, et al. (2014). "Evolutionary analysis of HBV "S" antigen genetic diversity in Iranian blood donors: a nationwide study." J Med Virol 86(1): 144-55.

Raney, A. K., A. J. Easton, et al. (1991). "Promoter-specific transactivation of hepatitis B virus transcription by a glutamine- and proline-rich domain of hepatocyte nuclear factor 1." J Virol 65(11): 5774-81.

Reuben, A. (2002). "The thin red line." Hepatology 36(3): 770-3.

Rezaee, R., M. Poorebrahim, et al. (2016). "Impacts of the G145R Mutation on the Structure and Immunogenic Activity of the Hepatitis B Surface Antigen: A Computational Analysis." Hepat Mon 16(7): e39097.

Riviere, L., A. Ducroux, et al. (2014). "The oncogenic role of hepatitis B virus." Recent Results Cancer Res 193: 59-74.

Samal, J., M. Kandpal, et al. (2012). "Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection." Clin Microbiol Rev 25(1): 142-63.

Sarpel, D., E. Baichoo, et al. (2016). "Chronic hepatitis B and C infection in the United States: a review of current guidelines, disease burden and cost effectiveness of screening." Expert Rev Anti Infect Ther 14(5): 511-21.

Saúde, M. d. (2015). Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais. Brazil, Ministério da Saúde.

Schaefer, S. (2007). "Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes." World J Gastroenterol 13(1): 14-21.

Scheiblauer, H., M. El-Nageh, et al. (2010). "Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes." Vox Sang 98(3 Pt 2): 403-14.

Schmid, R. (2001). "History of viral hepatitis: a tale of dogmas and misinterpretations." J Gastroenterol Hepatol 16(7): 718-22.

Servant-Delmas, A., M. Mercier, et al. (2010). "National survey of hepatitis B virus (HBV) polymorphism in asymptomatic HBV blood donors from 1999 to 2007 in France." Transfusion 50(12): 2607-18.

Shaw, T., A. Bartholomeusz, et al. (2006). "HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation." J Hepatol 44(3): 593-606.

Sheldon, J., N. Camino, et al. (2005). "Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir." Antivir Ther 10(6): 727-34.

Sherlock, S. (1984). "Landmark perspective: Landmarks in viral hepatitis." JAMA 252(3): 402-6.

Shi, M., Y. Zhang, et al. (2012). "Hepatitis B virus genotypes, precore mutations, and basal core promoter mutations in HBV-infected Chinese patients with persistently normal alanine aminotransferase and low serum HBV-DNA levels." Braz J Infect Dis 16(1): 52-6.

Shih, C., S. F. Chou, et al. (2016). "Control and Eradication Strategies of Hepatitis B Virus." Trends Microbiol.

Silveira, L., S. L. L., et al. (2011). "Clinical and epidemiological profile of blood donors with positive serology for viral hepatitis in southern Brazil." Rev Soc Bras Med Trop 44(3): 269-73.

Sitnik, R., J. R. R. Pinho, et al. (2004). "Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients." J Clin Microbiol 42(6): 2455-60.

Sitnik, R., H. J. Sette, et al. (2007). "Hepatitis B virus genotype E detected in Brazil in an African patient who is a frequent traveler." Braz J Med Biol Res 40(12): 1689-92.

Souza, B. F., J. F. Drexler, et al. (2014). "Theories about evolutionary origins of human hepatitis B virus in primates and humans." Braz J Infect Dis 18(5): 535-43.

Su, H. and J. K. Yee (1992). "Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers." Proc Natl Acad Sci U S A 89(7): 2708-12.

Sunbul, M. (2014). "Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance." World J Gastroenterol 20(18): 5427-34.

Sung, J. J., M. L. Wong, et al. (2005). "Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy." Gastroenterology 128(7): 1890-7.

Suppiah, J., R. Mohd Zain, et al. (2015). "G1896A Precore Mutation and Association With HBeAg Status, Genotype and Clinical Status in Patients With Chronic Hepatitis B." Hepat Mon 15(10): e31490.

Szmaragd, C., G. R. Foster, et al. (2006). "Genome-wide characterisation of hepatitis B mutations involved in clinical outcome." Heredity (Edinb) 97(6): 389-97.

Taghavi, S. A., M. Tabibi, et al. (2010). "Prevalence and clinical significance of hepatitis B Basal core promoter and precore gene mutations in southern Iranian patients." Hepat Mon 10(4): 294-7.

Tanaka, Y., I. Hasegawa, et al. (2004). "A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D." Hepatology 40(3): 747-55.

Teles, S. A., R. M. Martins, et al. (1999). "Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients." Artif Organs 23(12): 1074-8.

Tenney, D. J., S. M. Levine, et al. (2004). "Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine." Antimicrob Agents Chemother 48(9): 3498-507.

Tenney, D. J., R. E. Rose, et al. (2009). "Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy." Hepatology 49(5): 1503-14.

Valente, F., B. V. Lago, et al. (2010). "Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda, Angola." Mem Inst Oswaldo Cruz 105(8): 970-7.

Valente, V. B., D. T. Covas, et al. (2005). "[Hepatitis B and C serologic markers in blood donors of the Ribeirao Preto Blood Center]." Rev Soc Bras Med Trop 38(6): 488-92.

Velay, A., H. Jeulin, et al. (2016). "Characterization of hepatitis B virus surface antigen variability and impact on HBs antigen clearance under nucleos(t)ide analogue therapy." J Viral Hepat 23(5): 387-98.

Villet, S., A. Ollivet, et al. (2007). "Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient." J Hepatol 46(3): 531-8.

Villet, S., C. Pichoud, et al. (2008). "Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure." J Hepatol 48(5): 747-55.

Warner, N. and S. Locarnini (2008). "The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound." Hepatology 48(1): 88-98.

Weber, B. (2005). "Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact." J Clin Virol 32(2): 102-12.

Weinbaum, C. M., I. Williams, et al. (2008). "Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection." MMWR Recomm Rep 57(RR-8): 1-20.

Whalley, S. A., J. M. Murray, et al. (2001). "Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans." J Exp Med 193(7): 847-54.

WHO (2001). Hepatitis B: FactSheet. N S W Public Health Bull. Geneva, WHO. 12: 259-260.

WHO (2013). Media Centre: Hepatitis B, WHO. 204.

WHO. (2015, Updated in March 2015). "Hepatitis B." WHO Fact Sheet, 2015, from http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/.

Wieland, S. F., A. Eustaquio, et al. (2005). "Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids." Proc Natl Acad Sci U S A 102(28): 9913-7.

Ximenes, R. A., L. M. Pereira, et al. (2010). "Methodology of a nationwide cross-sectional survey of prevalence and epidemiological patterns of hepatitis A, B and C infection in Brazil." Cad Saude Publica 26(9): 1693-704.

Yeh, C. T., R. N. Chien, et al. (2000). "Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy." Hepatology 31(6): 1318-26.

Yoo, B. C., J. W. Park, et al. (2003). "Precore and core promoter mutations of hepatitis B virus and hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Korea." J Hepatol 38(1): 98-103.

Zeng, M., Y. Mao, et al. (2006). "A double-blind randomized trial of adefovir dipivoxil in Chinese subjects with HBeAg-positive chronic hepatitis B." Hepatology 44(1): 108-16.

Zhand, S., C. Karami, et al. (2015). "Correlation Between Hepatitis B G1896A Precore Mutations and HBeAg in Chronic HBV Patients." Jundishapur J Microbiol 8(2): e17126.

Zhang, J., W. J. Xu, et al. (2009). "Prevalence of the precore G1896A mutation in Chinese patients with e antigen negative hepatitis B virus infection and its relationship to pre-S1 antigen." Braz J Microbiol 40(4): 965-71.

Zhang, X., J. Hou, et al. (2013). "Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs." Front Genet 4: 202.

Zhang, Y., S. He, et al. (2013). "Dynamics of hepatitis B virus resistance substitutions correlates with virological response in lamivudine-refractory patients with entecavir rescue monotherapy." Virus Res 177(2): 156-62.

Zhang, Z. H., C. C. Wu, et al. (2016). "Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis." World J Gastroenterol 22(1): 126-44.

Zhuang, H. (2012). "[Updates of EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection]." Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 20(6): 427-9.

Zoulim, F. (2004). "Antiviral therapy of chronic hepatitis B: can we clear the virus and prevent drug resistance?" Antivir Chem Chemother 15(6): 299-305.

Zoulim, F. and S. Locarnini (2009). "Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues." Gastroenterology 137(5): 1593-608 e1-2.

APÊNDICE – Passos tomados para ajustar a frequência dos genótipos

Linha	Comentários	Dados de 2001	Fórmula
A	Número total de doadores em 2001	9842	---
B	Número de soropositivos para HBsAg+anti-HBc em 2001	25	---
C	Número de genótipos A em 2001	11	---
D	Número de genótipos DEF em 2001	1	---
E	Número de amostras não-genotipadas em 2001	1	---
F	Soma de genótipos A + DEF + não-genotipados	13	C + D + E
G	Número de amostras não-genotipadas durante o estudo + amostras não disponíveis para o estudo	12	---
H	Proporção de genótipo A em 2001	0,85	C / F
I	Proporção de genótipo DEF em 2001	0,08	D / F
J	Proporção de amostras não-genotipadas em 2001	0,08	E / F
K	Número estimado de genótipo A entre as amostras não-genotipadas/não disponíveis em 2001	10,2	H * G
L	Número estimado de genótipo DEF entre as amostras não-genotipadas/não disponíveis em 2001	0,92	I * G
M	Número estimado de amostras não-genotipadas entre as amostras não-genotipadas/não disponíveis em 2001	0,92	J * G
N	Frequência de soropositividade para HBsAg+anti-HBc em 2001	0,254	B / A
O	Frequência ajustada do genótipo A em 2001	0,215	(C + K) / A
P	Frequência ajustada do genótipo DEF em 2001	0,020	(D + L) / A
Q	Frequência ajustada de amostras não-genotipadas em 2001	0,020	(E + M) / A

Abreviatura: DEF, denominação atribuída ao grupo formado pelos genótipos D, E e F. A fórmula utilizada para ajustar a frequência de genótipos baseou-se na linha de cada categoria tendo o ano de 2001, como um exemplo.

ANEXO A – Termo de consentimento para doação de sangue do Serviço de Hemoterapia do HUCFF - UFRJ

Consentimento para Doação de Sangue

DATA: _____

NOME:_____ Identidade_____

Concordo em doar meu sangue de maneira voluntária e altruísta à rede de Hospitais Universitários da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para utilização em qualquer paciente que dele necessite.

Antes da coleta, serei submetido à triagem de doadores que consta de avaliação clinica, incluindo a dosagem da hemoglobina ou hematócrito e entrevista com profissional de saúde capacitado. Durante a entrevista, me serão feitas perguntas a fim de avaliar meus antecedentes e meu estado atual de saúde. Devo responder de forma verdadeira, já que o objetivo é sempre a minha segurança, como doador, e também permitirá uma transfusão com maior segurança ao receptor.

Como conseqüências à coleta de sangue podem ocorrer reações adversas, de intensidade variável, como alteração da pressão arterial e do pulso, tonturas leves, hematomas no local da punção ou até perda de consciência. Nesses casos serei avaliado pelo médico do Serviço de Hemoterapia e, sendo necessário, encaminhado a atendimento especializado no HUCFF. Concordo em submeter-me ao tratamento proposto no HUCFF enquanto permanecer nas suas dependências.

Estou ciente que serão realizados exames laboratoriais exigidos pelo Ministério da Saúde, de acordo com as normas técnicas vigentes, na bolsa coletada com o meu sangue. Em casos Reagentes ou Inconclusivos para infecções transmissíveis por transfusão de sangue, como hepatite B, hepatite C, HIV, sífilis, doença de Chagas ou HTLV, serei chamado por carta ou telefone para a repetição dos exames, conforme orienta a legislação brasileira. Após a avaliação dos resultados, uma conduta será sugerida pelo Serviço da Hemoterapia. Todos os resultados reativos serão comunicados às Secretarias de Saúde e as respectivas bolsas serão descartadas.

Estou ciente de que, para multiplicar o valor da doação, o sangue doado será separado em componentes do sangue e que plasma poderá ser excedente para uso clinico. Nesse caso, autorizo que essa fração do sangue seja encaminhada a produção de hemoderivados, como fatores da coagulação, albumina, imunoglobulina e outros insumos, em planta industrial gerenciada pelo governo brasileiro.

É recomendável que eu permaneça por 15 minutos no Serviço de Hemoterapia após a doação sob a observação da equipe, para a realização de lanche visando à reposição de líquidos e glicose. Para maiores informações, devo levar um folheto com orientações sobre doação de sangue.

Estou ciente que meu nome será incorporado ao arquivo local de doadores e concordo em ser convidado para novas doações de sangue, o que aceitarei de acordo com meu desejo e possibilidade à altura do convite.

Autorizo também que o excedente de amostras e de células das bolsas, quando não indicado ao uso clínico, seja aplicado em pesquisas em ciências básicas, para promoção da saúde. Estou ciente que os projetos de pesquisa serão selecionados pelo responsável técnico do Serviço de Hemoterapia, com o critério de estar comprovadamente aprovado pelas normas que regulamentam a ética em pesquisas no Brasil, através de organismo autorizado - Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Assinatura:_____

ETIQUETA COM O Nº DA DOAÇÃO	**RUBRICA TÉCNICO:**

ANEXO B – Comité de ética em Pesquisa

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PEDRO ERNESTO/ UERJ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização molecular do vírus da hepatite B (HBV) em doadores de sangue em Rio de Janeiro

Pesquisador: António Ludgero Correia Júnior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 53488616.4.0000.5259

Instituição Proponente: HLA Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.517.591

Apresentação do Projeto:

Continuação do Parecer: 1.462.823

Estudo retrospectivo em que serão utilizados soro de indivíduos doadores do banco de sangue do HUCFF da UFRJ durante o período de Janeiro de 2001 a Novembro de 2011, com idade igual ou superior a 18 anos, e que em ensaios de triagem foram identificados como sendo HBsAg e anti-HBc reagentes com densidade óptica maior ou igual a 3,0. As amostras passarão por titulação do HBsAg no Laboratório de Virologia Molecular da UFRJ e a extração dos ácidos nucleicos e as análises moleculares serão realizadas no Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da UERJ (HLA–UERJ). A identificação e as informações dos doadores não serão divulgadas.

Objetivo da Pesquisa:

Continuação do Parecer: 1.462.823

Objetivo Primário: Determinar a prevalência de HBV entre os doadores de sangue do HU de 2001 a 2011; Caracterizar a diversidade e a evolução dos genótipos de HBV durante esse período; Analisar o perfil de resistência às drogas desses indivíduos. Objetivo Secundário: Analisar a quantificação

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

de HBsAg; Avaliar a associação entre carga viral e o genótipo de HBV; Analisar a distribuição dos casos de HBV de acordo com o sexo e a faixa etária; Determinar a prevalência de cada genótipo durante esse período.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

ok.

Riscos: Nenhum risco relacionado aos participantes

Benefícios: Os benefícios serão indiretos pela contribuição para o conhecimento sobre os principais genótipos e perfil de resistência às drogas do HBV, em uma população no município do Rio de Janeiro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo retrospectivo com amostras de sangue já colhidas. Tem o objetivo de conhecer a distribuição genotípica do vírus entre os doadores infectados por HBV

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Continuação do Parecer: 1.462.823 - Justificado a nao necessidade de novo termo de consentimento pois o estudo apenas amplia a definição do resultado já obtido, marcador do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) positivo.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram atendidas as considerações do Parecer anterior. O trabalho pode ser realizado da fora como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO. Para ter acesso ao PARECER CONSUBSTANCIADO: Clicar na "LUPA" (DETALHAR) - Ir em "DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA ", clicar na opção da ramificação (pequeno triangulo no entrocamento do organograma) de pastas chamada – "Apreciação", e depois na Pasta chamada "Pareceres", o Parecer estará nesse local.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: 1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PEDRO ERNESTO/ UERJ

Continuação do Parecer: 1.517.591

Comitê de Ética solicita a V. Sª., que encaminhe relatórios parciais e anuais referentes ao andamento da pesquisa ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇOES_BASICAS_DO_PROJETO_591118.pdf	28/03/2016 17:32:43		Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP_HUPE.pdf	28/03/2016 17:31:20	António Ludgero Correia Júnior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAO_DE_CIENCIA.jpg	25/01/2016 17:09:48	António Ludgero Correia Júnior	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	04/01/2016 14:36:58	António Ludgero Correia Júnior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_HBV_GENO.pdf	29/12/2015 17:55:05	António Ludgero Correia Júnior	Aceito
Cronograma	Cronograma_Curriculo_Lattes.pdf	28/12/2015 16:53:17	António Ludgero Correia Júnior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HUCFF_doador.pdf	28/11/2015 00:01:47	António Ludgero Correia Júnior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_ausencia_TCLE.pdf	28/11/2015 00:01:34	António Ludgero Correia Júnior	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

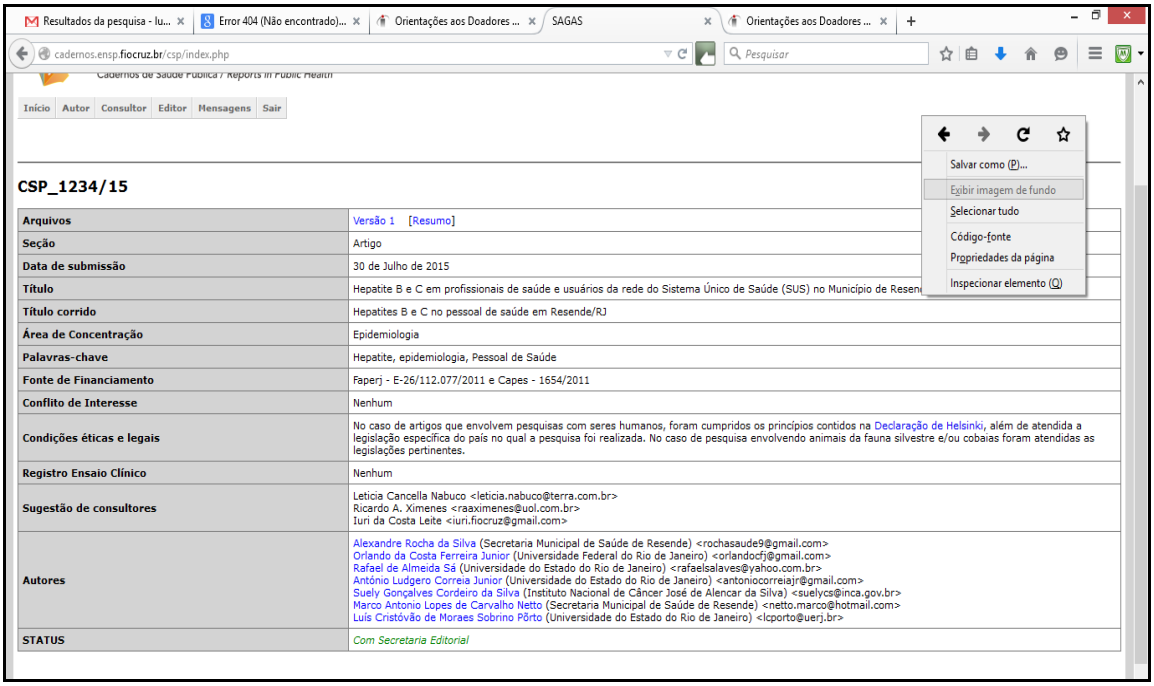
RIO DE JANEIRO, 27 de Abril de 2016

Assinado por:
DENIZAR VIANNA ARAÚJO
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

ANEXO C – Artigo I submetido para publicação na revista Cadernos de Saúde Pública



Resultados da pesquisa - lu... | Error 404 (Não encontrado)... | Orientações aos Doadores ... | SAGAS | Orientações aos Doadores ...

cadernos.ensp.fiocruz.br/csp/index.php

Cadernos de Saúde Pública / Reports in Public Health

Início | Autor | Consultor | Editor | Mensagens | Sair

Salvar como (P)...
Exibir imagem de fundo
Selecionar tudo
Código-fonte
Propriedades da página
Inspecionar elemento (Q)

CSP_1234/15

Arquivos	Versão 1 [Resumo]
Seção	Artigo
Data de submissão	30 de Julho de 2015
Título	Hepatite B e C em profissionais de saúde e usuários da rede do Sistema Único de Saúde (SUS) no Município de Resen
Título corrido	Hepatites B e C no pessoal de saúde em Resende/RJ
Área de Concentração	Epidemiologia
Palavras-chave	Hepatite, epidemiologia, Pessoal de Saúde
Fonte de Financiamento	Faperj - E-26/112.077/2011 e Capes - 1654/2011
Conflito de Interesse	Nenhum
Condições éticas e legais	No caso de artigos que envolvem pesquisas com seres humanos, foram cumpridos os princípios contidos na Declaração de Helsinki, além de atendida a legislação específica do país no qual a pesquisa foi realizada. No caso de pesquisa envolvendo animais da fauna silvestre e/ou cobaias foram atendidas as legislações pertinentes.
Registro Ensaio Clínico	Nenhum
Sugestão de consultores	Leticia Cancella Nabuco <leticia.nabuco@terra.com.br> Ricardo A. Ximenes <raaximenes@uol.com.br> Iuri da Costa Leite <iuri.fiocruz@gmail.com>
Autores	Alexandre Rocha da Silva (Secretaria Municipal de Saúde de Resende) <rochasaude9@gmail.com> Orlando da Costa Ferreira Junior (Universidade Federal do Rio de Janeiro) <orlandocfj@gmail.com> Rafael de Almeida Sá (Universidade do Estado do Rio de Janeiro) <rafaelsalaves@yahoo.com.br> Antônio Ludgero Correia Junior (Universidade do Estado do Rio de Janeiro) <antoniocorreiajr@gmail.com> Suely Gonçalves Cordeiro da Silva (Instituto Nacional de Câncer José de Alencar da Silva) <suelycs@inca.gov.br> Marco Antonio Lopes de Carvalho Netto (Secretaria Municipal de Saúde de Resende) <netto.marco@hotmail.com> Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto (Universidade do Estado do Rio de Janeiro) <lcporto@uerj.br>
STATUS	*Com Secretaria Editorial*

ANEXO D – Artigo científico II submetido para publicação na revista *Archives of Virology*

Gmail

Ludgero Correia Jr. <ludgerocorreiajr@gmail.com>

Archives of Virology - Submission Notification to co-author

1 mensagem

Archives of Virology (ARVI) <em@editorialmanager.com> 6 de setembro de 2016 16:45
Responder a: "Archives of Virology (ARVI)" <kamatchi.ulagappan@springer.com>
Para: Antonio Ludgero-Correia <ludgerocorreiajr@gmail.com>

Re: "Hepatitis B infection: Molecular characterization and temporal trends among blood donors at Rio de Janeiro, Brazil"

Full author list: Antonio Ludgero-Correia, Sc.M.; Carmen M. Nogueira, M.D., Sc.M.; Raphael Pedro M. Curvo; Liane J. Ribeiro; Luis Cristovao Porto, M.D.. Sc.D.; Deise A. Costa; Orlando C. Ferreira

Dear M Ludgero-Correia,

We have received the submission entitled: "Hepatitis B infection: Molecular characterization and temporal trends among blood donors at Rio de Janeiro, Brazil" for possible publication in Archives of Virology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Prof Luis Cristovao Porto who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Archives of Virology

ANEXO E – Artigo científico III submetido para publicação na revista *Brazilian Journal of Infectious Diseases*

07/10/2016 Gmail - Your co-authored submission

Gmail

Ludgero Correia Jr. <ludgerocorreiajr@gmail.com

Your co-authored submission

1 mensagem

Brazilian Journal of Infectious Diseases <EviseSupport@elsevier.com> 3 de outubro de 2016 14:2
Responder a: bjid@elsevier.com
Para: ludgerocorreiajr@gmail.com

Dear Mr. Lugdero-Correia,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Brazilian Journal of Infectious Diseases

Title: Exposure sources prevalence related to gender in 1,180 HCV patients in a laboratory at Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding Author: Luís Cristóvão Pôrto

Co-Authors: Angela Maria Guimarães dos Santos, Guida Silva, Patrícia Precioso, António Lugdero-Correia, Daniele Olmedo

Luís Cristóvão Pôrto submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=BJID

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: Link ORCID

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, http://www.ORCID.org, or on our ORCID help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at lcporto@uerj.br.

Thank you,
Brazilian Journal of Infectious Diseases

This message was sent automatically. Please do not reply