

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**FRANCISCO CARLOS COSTA MAGALHÃES**

**INFLUENCIA DO GENÓTIPO DO VÍRUS DA HEPATITE B NA EVOLUÇÃO  
CLÍNICA DE PACIENTES PORTADORES CRÔNICOS DA INFECÇÃO**

São Luís-MA  
2015

FRANCISCO CARLOS COSTA MAGALHÃES

**INFLUENCIA DO GENÓTIPO DO VÍRUS DA HEPATITE B NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES PORTADORES CRÔNICOS DA INFECÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adalgisa de Souza Paiva Ferreira

São Luís-MA  
2015

Magalhães, Francisco Carlos Costa.

Influência do genótipo do vírus da hepatite B na evolução clínica de pacientes portadores crônicos da infecção / Francisco Carlos Costa Magalhães. — São Luís, 2015.

74 f.

Orientador: Adalgisa de Souza Paiva Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

1. Doença hepática. 2. Hepatites virais. 3. Hepatite B – Genótipo. 4. Pacientes portadores crônicos da infecção. I. Título.

FRANCISCO CARLOS COSTA MAGALHÃES

**INFLUENCIA DO GENÓTIPO DO VÍRUS DA HEPATITE B NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES PORTADORES CRÔNICOS DA INFECÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adalgisa de Souza Paiva Ferreira

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adalgisa de Souza Paiva Ferreira  
UFMA - (Orientadora)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Conceição de Maria Pedrozo e Silva  
UFMA – (Examinadora)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria dos Remédios Freitas Carvalho Branco  
UFMA – (Examinadora)

---

Prof.<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Eduardo Martins de Sousa  
UNICEUMA – (Examinador)

São Luís-MA  
2015

*Dedico este trabalho  
A todos os pacientes portadores de hepatite B crônica.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela graça da aprovação e ingresso na pós-graduação em Ciências da Saúde e por sempre abençoar meus caminhos;

A minha esposa, Aracy da Silva Santos Magalhães, pelo amor, apoio e companheirismo constante;

Aos meus pais, Anizia e Francisco Magalhães, e irmãos, Franclyane, Fernando e Francylia Magalhães pela força, carinho e incentivo;

Aos cunhados (a), Rodrigo Gomes, Matheus Malheiros e Marília Martins pela amizade e apoio;

A Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela grande oportunidade proporcionada durante esses dois anos;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio financeiro ao trabalho;

A prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adalgisa de Souza Paiva Ferreira pela atenção, ensinamentos, disponibilidade, paciência e segurança na orientação do estudo;

A prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lena Maria Barros Fonseca que, prontamente, permitiu o uso do banco de dados da sua tese de doutorado, além de todas as outras informações necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa;

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Clínica (CEPEC) e Núcleo de Estudos do Fígado (NEF) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão pela logística, em especial a enfermeira Marinilde de Souza Teles, ao biólogo Max Diego, a senhora Lídia e o senhor Murilo;

A Camila Valente e Ludmila Martins Costa pela colaboração e disposição em todo o período do estudo;

Às professoras Conceição Pedrozo e Maria do Desterro Nascimento, pelas correções e sugestões valiosas no exame de qualificação;

Aos professores da PPGCS, em especial a prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Nascimento, prof. Dr<sup>o</sup> João Batista Garcia, prof. Dr<sup>o</sup> Vinicius Nina, prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alcione Miranda que contribuíram com o nosso processo de formação;

Aos amigos do PPGCS, em especial Nayrana Soares, Alexandro Tobias, Alberto Jorge, Carlos Eduardo, Gustavo Calado, Tereza Prazeres, Ângela Souza, José Guara, Johnny Ramos.

Aos pacientes selecionados na pesquisa pela disposição em participar e colaborar com nosso estudo.

*A fé na vitória tem que ser inabalável.*

## RESUMO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite B tem distribuição heterogênea em todo o mundo. Sua apresentação clínica depende de fatores do hospedeiro tais como a idade em que o indivíduo se infectou, estado imunológico e doenças associadas. Características virológicas também podem influenciar tais como o genótipo do vírus. Este estudo teve o objetivo de avaliar a influência do genótipo do HBV na apresentação clínica. A pesquisa foi conduzida no Centro de Pesquisa Clínica e no Núcleo de Estudos do Fígado da Universidade Federal do Maranhão, com 119 portadores crônicos do HBV com genótipos definidos. Foram identificados aqueles acompanhados por pelo menos 12 meses para definição clínica. Incluídos 101 pacientes: 67 (68%) com genótipo A1, 26 (26%) D4, 4 (3%) F2a, 3 (2%) D3 e 01 (1%) D2. Para fins de comparação foram definidos dois grupos: A (n=67) e D (n=30). No grupo HBV-D foram mais frequentes a presença do HBeAg (28% vs 10% P=0.03) e de imunotolerantes (21,5% vs 1.5% / P=0.006) quando comparados com portadores do genótipo A. Não houve diferença entre as idades nos dois grupos (39±13 vs 42±11 / P=0.26). Em conclusão, pode-se sugerir que entre os portadores do genótipo D, especialmente o subgenótipo D4, que corresponde a 90% do total, pode haver soroconversão tardia do HBeAg, favorecendo maior risco de transmissão do vírus.

**Palavras-chave:** Doença hepática; HBV, apresentação clínica; genótipo; variabilidade; transmissão

## ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) chronic infection has a heterogeneous distribution around the world. Its clinical presentation depends on factors of the carrier such as the age at which he got infected, immunological status and associated diseases. Viral characteristics like the genotype can also influence. The aim of this study was to evaluate the influence of the HBV genotype in the clinical presentation of the chronic infection. This study was performed at the Clinical Research Center and the Liver Unit of the Federal University of Maranhão, with 119 chronic carriers of HBV with defined genotypes. We identified those followed for at least 12 months for their clinical definition. It was included 101 patients: 68 (68%) with genotype A1, 26 (26%) D4, 4(3%) F2a, 2 (2%) D3 and 1 (1%) D2. For the purpose of comparison, two groups were defined: A (n=68) and D (n=29). In the HBV-D group the presence of HBeAg (28% vs 10% P=0.03) and immune tolerant (21.5% vs 1.5% P=0.006) patients were more frequent when compared to carriers of genotype A. There was no age difference between groups (39±13 vs 42±11 P=0.26). In conclusion, we can suggest that among the carriers of genotype D, especially the subgenotype D4, which corresponds to 90% of this, there might be late seroconversion of HBeAg, favoring a higher risk of virus transmission.

**Keywords:** hepatic disease; HBV, clinical presentation; genotype; variability; transmission.

## LISTA DE SIGLAS

HBV – Vírus da hepatite B

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBcAg – Antígeno do nucleocapsídeo do vírus da hepatite B

HBeAg – Antígeno “e” do vírus da hepatite B

Anti- HBc – Anticorpo contra o HBcAg

Anti-HBe –Anticorpo contra o HBeAg

Anti-HBs – Anticorpo contra o HBsAg

INF – a – Interferon alfa

HUUFMA – Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

HCV – Vírus da hepatite C

HEV – Vírus da hepatite E

HGV – Vírus da hepatite G

TLMV – Like Mini Virus TTV

HCC – Carcinoma hepatocelular

RNA – Ácido ribonucleico

pHSA – Albumina polimerizado humano

IgA- Imunoglobulina A

IL-6 – Interleucina 6

ORF – Open Reading frames

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucleico mensageiro

TNF – Fator de necrose tumoral

IFN  $\gamma$  –Interferon gama

IFN  $\alpha/\beta$  – Interferon alfa/beta

NK – Natural Killer

IL-12 – Interleucina 12

ALT –alanina aminotransferase

AST –aspartato aminotransferase

ELISA – Enzime linked immunosorbent assay

PCR – Reação em cadeia polimerase

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

HBV – DNA – Carga viral da hepatite B

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

AASLD – Associação Americana para Estudos de Doença do Fígado

EASL – Associação Europeia para Estudos do Fígado

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

BCP – Mutação core promoter

CEPEC – Centro de Pesquisa Clínica

NEF – Núcleo de Estudos do Fígado

CNS/MS – Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>20</b>
2.1 HISTÓRIA DAS HEPATITES VIRAIS	20
2.2 O VÍRUS DA HEPATITE B	23
2.3 INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B	26
2.3.1 Aspectos imunológicos	26
2.3.2 Diagnóstico, Prevalência e Transmissão do HBV	27
2.3.3 História natural da hepatite B	31
2.3.4 Tratamento da hepatite B	34
2.4 GENÓTIPOS DO HBV	37
2.4.1 Relação dos genótipos do HBV com as variáveis clínicas	39
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
3.1 GERAL	41
3.2 ESPECIFICOS	41
<b>4. MÉTODOS</b>	<b>42</b>
4.1 PACIENTES E LOCAL DO ESTUDO	42
4.2 INSTRUMENTOS	42
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	42
4.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	43
4.5 CRITÉRIOS PARA ANÁLISE DOS DADOS	44
4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	44
REFERENCIAS	45
<b>5. HBV D subgenotype D4: HBeAg seroconversion later?</b>	<b>53</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>67</b>
APENDICE	68
ANEXO 01	70
ANEXO 02	72

## 1.INTRODUÇÃO

As hepatites virais são doenças infecto-contagiosas provocadas por diferentes agentes etiológicos que possuem afinidade pelo tecido hepático. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) acomete cerca de 350 milhões de pessoas (WHO, 2011). No Brasil o número de casos novos vem aumentando desde 1999, sendo que as maiores taxas de detecção estão nas regiões Sul (14,3%) e Norte (11%), enquanto a região Nordeste apresenta a menor taxa de detecção (2,5%), sendo o Maranhão o quarto em números de casos notificados (BRASIL, 2012).

Dentre as clinicamente importantes está a HBV, um vírus de ácido-desoxirribonucleico (DNA), de dupla-fita, membro da família Hepadnaviridae, que compreende uma série de vírus hepatotrópicos que infectam outras espécies e que compartilham características estruturais e funcionais, dentro do gênero *Orthohepadnavirus*. (BECKER, 2010; BERTOLINI, 2010)

O principal antígeno do envelope do HBV é o antígeno de superfície (HBsAg), que de acordo com características estruturais e funcionais divide-se em três regiões. Estes genes codificam as três proteínas que compõem o HBsAg: a pré-S1 codifica a proteína L (large), que parece estar envolvida no reconhecimento do HBV pelos receptores do hepatócito, a pré-S2 codifica a proteína M (medium), cuja função ainda não está determinada e a S codifica a S (small). Nas partículas virais íntegras são encontrados outros antígenos relacionados ao core viral, sendo o principal constituinte do nucleocapsídeo o HBcAg. (ANDRADE, 2008)

Outro antígeno associado ao core viral encontrado em forma solúvel no soro de indivíduos infectados pelo HBV é o antígeno de replicação viral (HBeAg), derivado da proteólise de um precursor com regiões comuns ao HBcAg, produzido quando a tradução se inicia a montante da região C do genoma viral, englobando a região pré-C. Esta região codifica um peptídeo que leva à translocação da proteína produzida através do retículo endoplasmático, conduzindo-a às vias de secreção de proteínas pela célula (SITNIK, 2007).

O HBeAg não é essencial para o vírus, pois existem mutantes não produtores deste antígeno, associados com formas graves de hepatite. O HBeAg solúvel encontrado no soro parece modular a atividade de células T citotóxicas anti-HBc, através de epítomos comuns, contribuindo para o estabelecimento da persistência da infecção. Por outro lado, o aparecimento de anticorpos contra este antígeno pode sinalizar uma evolução favorável da doença (YER SH et al, 2004).

A evolução da hepatite B depende em grande parte da resposta imune do hospedeiro. Assim, a instalação e resolução da hepatite aguda B resultam da lise de hepatócitos infectados pelo HBV por linfócitos citotóxicos CD8, amplificada por células T auxiliaadoras CD4, sensibilizadas contra epítomos do HBc. (ELGOUHARI, 2008)

A lesão hepática produzida pelo HBV é extremamente variável, podendo apresentar-se como leve e transitória, ou grave e prolongada, ou mesmo fulminante. Uma resposta imune normal levaria a uma hepatite aguda de duração limitada, enquanto uma resposta deficiente seria responsável pela hepatite crônica (JUNIASTUTI, 2011)

De fato, não estão bem estabelecidos os mecanismos responsáveis por tais variações de gravidade, mas há inúmeras investigações que sugerem não ser

o HBV diretamente citopático para o hepatócito infectado. Na verdade, existem grandes evidências de que a hepatite viral é iniciada por uma resposta imune celular antígeno-específica que desencadeia uma cascata de mecanismos efetores celulares e moleculares não antígeno-específicos e que contribuem para a lesão hepática (KESSLER, 2003).

O HBV é transmitido através do sangue, fluidos do corpo que contenham sangue e outras secreções por exposição percutânea e das mucosas, por via materno-fetal e por via sexual. A infecção também se mostra altamente prevalente em familiares de portadores crônicos e em tribos indígenas da Região Amazônica. As formas clínicas de infecção crônica variam de portador assintomático sem lesão hepática, passando por graus diversificados de hepatopatia crônica, até cirrose hepática, associada ou não ao hepatocarcinoma (WASMUTH, 2009).

Nos pacientes crônicos, o HBsAg permanecerá detectável no soro por mais de seis meses. Nestes casos, o indivíduo poderá permanecer reagente para o HBeAg por vários anos ou apresentar soroconversão em um período de tempo variável. Esta soroconversão se caracteriza pelo surgimento do anticorpo anti-HBe com o conseqüente desaparecimento do antígeno HBeAg associados à negatificação do DNA do HBV no soro. Esta soroconversão se associa com parada da replicação e com significativa redução na infectividade do soro o que usualmente leva à normalização dos níveis de aminotransferases. Em decorrência destes fatos haverá progressiva remissão da doença hepática (KIRSCHBERG, 2004)

Uma pequena porcentagem de pacientes com anticorpo contra o HBeAg (anti-HBe) positivos pode continuar a apresentar doença hepática ativa com positividade para o DNA do HBV, decorrente de uma baixa replicação residual do

vírus selvagem, apesar de já ter ocorrido soroconversão para o HBeAg. Isto pode, também, ser observado nos casos do surgimento de cepas do HBV com mutações na região do pré-core. A fase de convalescença da infecção, caracterizada pela perda do HBsAg e desenvolvimento do anti-HBs, pode ocorrer em um número restrito de pacientes com infecção crônica pelo HBV (BRUIX C, 2004).

Na infecção aguda pelo HBV detecta-se o HBsAg no sangue após um período de incubação de quatro a 12 semanas, seguido pelos anticorpos contra o antígeno central (c) do HBV (anti-HBc). O HBeAg aparece concomitante ao HBsAg, desaparecendo precocemente em média de 15 dias. A maioria dos adultos elimina o vírus após a infecção aguda, mas as crianças até 5 anos de vida têm dificuldade de eliminá-lo tornando-se, a maioria, portadores crônicos da infecção (LIU, 2005).

O tratamento medicamentoso está orientado para os pacientes com hepatite crônica ativa e replicativa, objetivando a redução drástica da viremia ou seu desaparecimento, que se associa à regressão da atividade inflamatória e da infectividade. Atualmente a terapia recomendada inclui o interferon-alfa (INF-a), interferon-peguilado (PEG-INF), além dos análogos de nucleosídeos e de nucleotídeos (MA JC, 2007).

Variações nas sequências de DNA de isolados de HBV possibilitam a classificação em oito diferentes genótipos (A até H) e estudos mais recentes propuseram dois novos genótipos: I e J (TATEMATSU et al., 2009; TRAN et al. 2005; 2008; YU et al., 2010) sendo que os genótipos A, B, C, D e F admitem uma classificação em subgenótipos.

A primeira variabilidade conhecida foi a do HBsAg que possibilitou as demais classificações das variantes antigênicas do HBV em ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- e adrq+ (MORA, 2010).

As divergências de sequência ocorrem no genoma completo ou mesmo em genes específicos, de forma que variações acima de 8% no genoma total e/ou acima de 4% no gene do HBsAg caracterizam diferentes genótipos (OKAMOTO H, 1988 & KRAMVIS A, 2005).

No Brasil os genótipos A e D parecem ser os mais prevalentes (MELLO, 2007) reflexo, respectivamente, do comércio de escravos africanos e da colonização europeia, principalmente italiana (FIGUEIREDO, 2009; CAMPUS, 2005). Entretanto, há relatos de alta prevalência entre índios na região Amazônica do genótipo F (RIBEIRO, 2006).

Alterações na estrutura genética podem resultar em diferentes níveis de patogenicidade do HBV (MA *et al*, 2007). Há evidências que os genótipos e subgenótipos A1, C, B1-5, F1 e talvez o D, estejam associados com maior progressão da doença hepática (GUIRGIS, 2010).

Este fato já foi observado na Ásia, onde existem estudos demonstrando que o genótipo interfere no curso da doença, pois portadores crônicos de genótipo C apresentaram doença de fígado mais grave do que os com genótipo B (AKUTA, 2005; SCHAEFER, 2007).

Outro estudo revelou que portadores dos genótipos A e B apresentaram melhor resposta ao uso de interferon do que os demais (AKUTA e KUMADA, 2005). No trabalho de Hou (2007), o genótipo A respondeu melhor ao uso deste antiviral que o genótipo D, e apresentou maior soroconversão HBsAg/anti-HBs em relação aos genótipos B, C e D. O genótipo A apresentou maior resposta

sustentada após 6 meses de tratamento com interferon alfa, comparando com o genótipo D (49% para 26% respectivamente) e também quando realizada essa mesma comparação levando em conta a soroconversão do HBeAg, onde o genótipo A mostrou-se superior ao D (ERHARDT, 2005).

A determinação dos genótipos do HBV ainda não é uma rotina, assim como é para o vírus da hepatite C, uma vez que a relevância desse conhecimento ainda demanda novos estudos. A influência do papel dos genótipos na evolução da hepatite crônica B desperta grande interesse na atualidade, mas precisa de novos estudos científicos.

Considerando a vivência dos profissionais de saúde do Hospital Universitário da UFMA no âmbito das hepatites virais, percebeu-se ao longo dos anos diferenças na evolução clínica e no desfecho final de pacientes com HBV. Diante do que foi exposto avaliar a relação do genótipo infectante do vírus HBV com as manifestações clínicas se torna imprescindível, pois possibilitará o entendimento global acerca do comprometimento que esta doença proporciona, permitirá aos profissionais a criação de indicadores de gravidade e progressão das doenças para nortear estratégias de intervenção terapêutica.

## 2.REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRIA DAS HEPATITES VIRAIS

A história das hepatites virais remonta vários milênios. Informações contidas na literatura chinesa já faziam referência à ocorrência de icterícia entre sua população há mais de cinco mil anos. Surto de icterícia foram relatados na Babilônia há mais de 2.500 anos (FREITAS, 2002). Hipócrates, em seus pressupostos, já relacionava a icterícia com um problema infeccioso provavelmente de foco hepático. No século XVIII epidemias de icterícia foram descritas durante as guerras que assolavam a Europa e América.

No Brasil, os relatos sobre a história das hepatites são escassos antes do início do século XIX, entretanto no museu de Porto Velho - Rondônia, hoje desativado, encontrava-se uma urna funerária confeccionada pelos índios Aruak que habitaram esta região no período da descoberta do Brasil. A urna funerária de barro cozido representava um nativo pertencente à família Aruak e revela do ponto de vista médico alguns sinais e estigmas de cirrose hepática, tais como ascite, umbigo protuso pelo aumento do volume abdominal (hérnia umbilical) e ginecomastia.

Somente a partir desse momento foi introduzido pela primeira vez o termo *hepatite* por Bianchi JB, no clássico trabalho científico denominado *Historia hepatica sem Thoria et práxis omnius morborum hepatitis et bílis*, publicado em 1725.

Em maio de 1735, uma expedição de Paris a Quito registrou que um de seus integrantes relatou ter apresentado todos os sinais e sintomas de doença

febril icterica aguda, sugerindo um quadro de hepatite aguda ocasionada pelo vírus da hepatite A. (La CONDAIMINE, 2014)

Somente em 1895, a existência de uma forma de hepatite provavelmente transmitida por via parenteral (via vacinação) foi documentada cientificamente (ALTER, 2003). A doença manifestava-se por fadiga, anorexia, queixas digestivas, icterícia e por vezes, intenso prurido cutâneo (SCHIMID,1994). Provavelmente, pelo período de incubação, o agente transmissor seria o ainda não descoberto, vírus da hepatite B (HBV). Contudo, não podemos excluir também como responsável pela transmissão outro vírus descoberto recentemente, o vírus da hepatite C (HCV).

No Brasil, em princípio de 1940, um surto de icterícia pós-vacinação, com diversos óbitos, foi observado no Estado do Espírito Santo, onde mais de mil casos foram investigados. Dois lotes de vacina preparada com soro normal humano foram incriminados como fonte possível de infecção primária (FONSECA, 2010).

Em 1963, o geneticista americano Baruch Blumberg estudando anticorpos contra lipoproteínas séricas em pacientes que tinham recebido transfusão de sangue, ou seja, com objetivos completamente diferentes dos objetivos iniciais e achados finais da pesquisa, identificaram no soro pertencente a um aborígine Australiano, a presença de um antígeno (antígeno Austrália) que reagia como o soro de dois doentes hemofílicos politransfundidos (BLUMBERG,2003)

Apenas em 1971, via microscopia eletrônica, o estudo de Almeida caracterizou o pacote viral completo do HBV. Esta constituía-se de um invólucro externo e um núcleo, sendo que o invólucro externo correspondia ao

antígeno Austrália, passando posteriormente a ser designado de antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). Estudos posteriores confirmaram que a partícula representava o vírion completo do HBV, sendo constituída por um ácido nucléico (DNA) e do antígeno central do HBV (HBcAg) (ALMEIDA, 1971)

O vírus B foi o primeiro vírus humano patogênico a ser sequenciado. Em 1972, foi descrito um novo antígeno distinto do HBsAg, sendo denominado de antígeno e do vírus da hepatite B (HBeAg), como também seu anticorpo correspondente (anti-HBe). A presença sérica do HBeAg entre portadores do HBV foi identificada como um marcador de replicação viral e de alta infectividade com o HBV-DNA (HADZIYANNIS e cols, 1983).

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

Dos cinco vírus hepatotrópicos primários, o vírus da hepatite E (HEV) somente foi identificado em 1990. Sua identificação deu-se através de técnicas de clonagem molecular e transmissão experimental em macacos (REYES, 1990)

Posteriormente, diversos vírus foram descobertos e supostamente relacionados com a doença hepatite, tais como o vírus da hepatite G (HGV), vírus das hepatites GB-C, vírus Sanban, vírus Yonban, vírus TLMV, vírus SEM (YEH CH e cols, 2002). Dentre eles, o HGV foi um dos mais estudados e uma sequência de estudos experimentais e clínicos revelou que esse agente não estaria associado a doença hepática, seja aguda ou crônica (PESSOA, 1998).

Estudos recentes sugerem a participação de um novo vírus constituído de DNA na etiopatogenia da cirrose hepática e do carcinoma hepatocelular (HCC) denominado de NV-F. Este novo agente viral foi identificado no tecido hepático em 15,4% dos pacientes com carcinoma hepatocelular em Taiwan. (YEH, 2006)

## 2.2 O VÍRUS DA HEPATITE B

O HBV é um vírus DNA, envelopado, pertencente à família *Hepadnaviridae*, que infecta apenas os seres humanos. Além do HBV, esta família inclui o vírus da hepatite B da marmota, da garça, do esquilo e do pato de Pequim. As características comuns a estes vírus são: tropismo por células hepáticas, partículas virais envelopadas com nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, genoma formado por DNA fita dupla parcial e replicação através de intermediários RNA, via transcriptase reversa. (NEURATH, 1990).

O HBV pode ser encontrado no soro de pacientes infectados sob as formas de partícula completa (partícula de Dane) com 42nm de diâmetro e nucleocapsídeo de 27nm, que é indicativa de replicação viral e partículas esféricas e cilíndricas de 22nm de diâmetro, constituídas apenas pelo envelope viral. (TIOLLAIS, 1985)

O principal antígeno do envelope do HBV é o HBsAg, mas também encontramos as proteínas L (*large*) e M (*medium*), que contêm os antígenos correspondentes às regiões pré-S1 e pré-S2 do genoma viral, além de compartilharem as regiões antigênicas do HBsAg. O HBsAg é encontrado no envelope viral em sua forma não glicosilada (p25) e glicosilada (gp29), a proteína M em duas formas glicosiladas (gp33 e gp36) e a proteína L em uma forma não glicosilada (p39) e outra glicosilada (gp42). (GANEM, 2004). As proteínas L e M

estão presentes em maior proporção nas partículas virais íntegras e nas ocas cilíndricas e parecem ter um papel fundamental na infecção pelo HBV, participando no processo de captação do vírus pelas células hepáticas e do processo de morfogênese da partícula viral. (CAMPOS, 2005)

A penetração do HBV nas células hepáticas parecer ser mediada por sequências de aminoácidos encontradas nas regiões pré-S1 e pré-S2. Na região pré-S2, foi descrito um receptor para a albumina polimerizada humana (pHSA), que seria também encontrado nos hepatócitos, sendo então proposto que o pHSA funcionaria como uma ponte, proporcionando a captação do vírus pela célula. (CHANG, 2010)

Neurath e cols. encontraram sítios de ligação com os receptores dos hepatócitos na região pré-S1, aceitos por muitos como a principal via de penetração do HBV na célula, análogos ao receptor de IgA. Os receptores para asialoglicoproteína e IL-6 foram também propostos como mecanismos de captação do vírus pelos hepatócitos. (TREICHEL, 1997)

A proteína anexina V, presente no fígado humano, e a apolipoproteína H foram também identificadas como ligantes específicos do HBsAg e poderiam também funcionar como pontes para a captação do vírus pela célula. (De MEYER, 1997)

Nas partículas virais íntegras são encontrados outros antígenos relacionados ao core viral, sendo o principal constituinte do nucleocapsídeo o HBcAg, que é uma proteína de peso molecular 22kDa codificada pelo gene C, fosforilada em resíduos de serina presentes no terço carboxiterminal. Anticorpos contra esta proteína não são protetores e podem mesmo facilitar o desenvolvimento de hepatite em recém-nascidos de mães portadoras do HBV.

Em contraste, chimpanzés imunizados com HBcAg ficaram protegidos contra a infecção viral. Exceto em casos de transmissão vertical, este antígeno estimula células T auxiliares na produção de anticorpos contra proteínas e induz células T citotóxicas específicas. (BRÉCHOT, 2004)

Outro antígeno associado ao core viral encontrado em forma solúvel no soro de indivíduos infectados pelo HBV é o HBeAg. Apesar de o HBcAg pode ser transformado em HBeAg por ação enzimática, é pouco provável que este seja o mecanismo principal de sua formação *in vivo* (FUNG Sk, 2005). O HBeAg é um derivado da proteólise de um precursor com regiões comuns ao HBcAg (p25), produzido quando a tradução se inicia a montante da região C do genoma viral, englobando a região pré-C26. Esta região codifica um peptídeo sinal que leva à translocação da proteína produzida através do retículo endoplasmático, conduzindo-a às vias de secreção de proteínas pela célula. O HBeAg maduro é formado pela clivagem do peptídeo sinal e da porção carboxiterminal, possivelmente, pela ação de alguma aspartil-protease celular. (BONINO, 2003)

O genoma do HBV consiste de uma molécula de DNA de cerca de 3.200 nucleotídeos, sendo o menor genoma de DNA conhecido entre os vírus animais. Sua estrutura é peculiar: a molécula de DNA é circular, em parte fita dupla, mas com uma região de fita simples de extensão variável. A fita longa ou L(-) possui um corte (*nick*) constante na posição 1818 (tomando-se o início do sítio único para *EcoRI* como nucleotídeo zero), enquanto a fita curta ou S(+), de extensão que varia entre 50 e 100% da fita longa, possui extremidade 5' fixa por volta da posição 1620 e extremidade 3' variável. (LIANG, 2009)

Possui 4 fases de leitura aberta (ORF – open reading frames): S, C, P e X. A região S codifica proteínas de superfície do envelope do vírus (HBsAg). A

fase de codificam duas RNA transcriptases: RNAm pré-genômico e RNAm pré-core. O RNAm pré-genômico é traduzido na proteína do (HBcAg), que está presente no core de vírions em células hepáticas infectadas, contudo não é detectado no soro. Além disso, o HBcAg está integrado ao genoma viral e à DNA polimerase, sendo essencial para a função e maturação do vírion. O RNAm pré-core é traduzido na proteína pré-core, que depois de processada é secretada como o antígeno e (HBeAg), presente no soro de pacientes com replicação do HBV. (HUSSAIN, 2001)

Em algumas situações podem ocorrer mutações na região pré-core ou na região promotora e o paciente pode apresentar replicação do HBV, mesmo tendo sorologia negativa para o HBeAg. O gene P codifica a DNA polimerase, a qual também funciona como uma transcriptase reversa. O gene X codifica o HBxAg, que parece estar envolvido nos processos de carcinogênese, através de transativação de promotores celulares e virais. (CARRILHO, 2008)

O ciclo de vida do HBV é caracterizado pela síntese do DNA de fita dupla parcial, através da transcrição reversa do RNA intermediário. A replicação começa com a ligação do vírion com o hepatócito. Dentro do núcleo do hepatócito, a síntese da fita positiva de DNA do HBV é completada e o genoma viral é convertido para a forma de DNA circular. O DNA circular serve como modelo para a transcrição de diversas espécies RNAs genômicas e subgenômicas, sendo o componente estável do ciclo de replicação que é relativamente resistente à ação de antivirais e ao clareamento. (LOK, 2007)

## 2.3 INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B

### 2.3.1 Aspectos Imunológicos

Na infecção pelo HBV, as respostas iniciais (após a primeira semana da infecção) não são específicas (imunidade inata), sendo mediadas pelas células imunes que reconhecem as células infectadas e respondem com a produção de interferon tipo I e tipo II (IFN  $\gamma$ ), que interferem na síntese viral por indução de diversas proteínas. Além disso, IFN  $\alpha/\beta$  e IFN  $\gamma$  recrutam e ativam macrófagos (incluindo as células de Kupffer), que secretam diversas citocinas como TNF e IL-12, e esta última ativa células *natural killer* (NK). (GONÇALES, 2006) (BARONE, 2006)

A resposta celular contra o HBV é mediada por linfócitos T, que são responsáveis pela lesão hepática tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. A resposta imune adaptativa ao HBV é detectada muitas semanas depois da inoculação e é iniciada com um aumento da replicação viral, podendo, nesse período, serem detectados linfócitos T específicos, tanto CD4+ como CD8+ (também chamados de linfócitos citotóxicos). (LOCARNINI, 2004)

### 2.3.2 Diagnóstico, Prevalência e Transmissão do HBV.

Os quadros clínicos agudos do HBV são muito diversificados, variando desde formas subclínicas ou oligossintomáticas até formas fulminantes. A maioria dos casos cursa com predominância de fadiga, anorexia, náuseas, mal-estar geral e adinamia. Nos pacientes sintomáticos, o período de doença aguda se caracteriza pela presença de colúria, hipocolia fecal e icterícia. A alanina aminotransferase e o aspartato aminotransferase (ALT/AST) são marcadores sensíveis de lesão do parênquima hepático e que na fase mais aguda da doença, podem elevar-se dez vezes acima do limite superior da normalidade. Também

são encontradas outras alterações inespecíficas como elevação de bilirrubinas, fosfatase alcalina e discreta linfocitose – eventualmente com atipia linfocitária. (PUOTI, 2006)

A maior parte dos portadores crônicos não desenvolvera complicações hepáticas relacionadas ao HBV, contudo 15% a 40% podem evoluir para cirrose hepática e HCC, resultando em mais de 200.000 e 300.000 óbitos/ano, respectivamente. (RAIMUNDO, 2003)

O diagnóstico laboratorial do HBV é feito através da detecção dos constituintes do vírus, nas diferentes fases evolutivas da infecção, através de testes sorológicos e moleculares. Várias técnicas são empregadas no diagnóstico sorológico, contudo, as mais utilizadas atualmente são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e a quimiluminescência. Além disso, pode ser realizada a pesquisa dos antígenos HBsAg e HBcAg no tecido hepático (marcadores virais teciduais) pela imunohistoquímica (PARANÁ, 2008). A carga viral, em geral, é dosada utilizando-se técnicas de reação de polimerase em cadeia (PCR), incluindo PCR em tempo real, que se mostra muito mais sensível e confiável. A quantificação da carga viral é um componente crucial na avaliação de pacientes com infecção crônica por HBV e na avaliação da eficácia do tratamento antiviral (LOK, 2007).

Os achados sorológicos variam nas fases de evolução da doença, sendo HBsAg o marcador da existência do vírus da hepatite B. Surge durante o período de incubação, cerca de duas a sete semanas antes do início dos sintomas e persiste durante o desenvolvimento da entidade nosológica, desaparecendo com a convalescença, cerca de quatro a cinco meses após a exposição e caso o HBsAg perdure por mais de seis meses define o estado de portador crônico do

HBV. O anti-HBs é o marcador que emerge com o desaparecimento do HBsAg e se mantém detectável no soro por toda a vida do paciente, funcionando como o anticorpo protetor da hepatite B (e, igualmente, um marcador de cura). É interessante lembrar que a positividade para o anti-HBs e a negatividade de todos os outros marcadores corresponde a imunização vacinal. (WRIGHT, 2006)

O HBcAg é um antígeno intracelular, que não pode ser detectado no soro. O anti-HBc se desenvolve em todas as infecções por HBV. Durante a fase aguda da infecção, anticorpos anti-HBc da classe imunoglobulinas M (IgM), seguidos imediatamente da classe imunoglobulina G (IgG), podem ser detectados. Os anticorpos IgM anti-HBc surgem no início dos sintomas, até 30 dias após o aparecimento do HBsAg e em geral são detectáveis por cerca de seis meses, enquanto o IgG anti-HBc permanece detectável por muitos anos, em geral, por toda a vida; sua presença marca uma exposição ao HBV no presente ou no passado. O anti-HBc total é considerado um marcador de infecção pregressa do HBV. O anti-HBc IgM indica uma infecção recente, sendo o melhor marcador sorológico para uma infecção aguda, enquanto que o IgG anti-HBc representa memória imunológica. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011)

Outro marcador importante é o HBeAg que quando presente indica replicação viral ativa e infectividade, ao passo que o anti-HBe indica baixa replicação e reduzida infectividade. A ausência da soroconversão de HBeAg para anti-HBe até o 3º mês da doença aguda é sinal de cronificação, pois indica falha do sistema imunológico do hospedeiro em reprimir a replicação viral. Contudo, deve-se ressaltar que pacientes HBeAg negativo e anti-HBe positivos podem apresentar significativa replicação viral em função da mutação na região pré-core

do DNA viral. A infecção crônica estará resolvida quando o paciente apresentar: anti-HBc total positivo, HBsAg negativo, níveis normais de ALT e HBV-DNA sérico indetectável, com ou sem soroconversão para anti-HBs. (PARANÁ, 2009)

Com relação a prevalência do HBV, a OMS estima que cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo já tiveram contato com o vírus da hepatite B (HBV), e que 325 milhões se tornaram portadores crônicos. Em termos mundiais, as taxas de prevalência da hepatite B variam amplamente, de 0,1% a taxas superiores a 30%, como as verificadas em países asiáticos. No contexto geral, o Brasil é considerado um país de baixa prevalência de infecção pelo HBV, contudo os estados do Acre, Amazonas e Rondônia são considerados como regiões geográficas de alta prevalência (FERREIRA. O, 2007). Segundo o Ministério da Saúde, 96.044 casos de hepatite B foram confirmados entre os anos de 1999 e 2009. Desses, mais de 50% se concentraram em indivíduos entre 20 e 39 anos, com quadro de evolução aguda em cerca de 90% (BRASIL, 2014)

A transmissão do HBV pode ocorrer por via vertical, por via sexual, por meio de ferimentos cutâneos, por compartilhamento de seringas e agulhas entre usuários de drogas, por transfusão de sangue ou hemoderivados e em acidentes com material biológico. Também pode ocorrer transmissão do HBV por outros tipos de exposições percutâneas, incluindo tatuagens, piercings, uso compartilhado de utensílios cortantes contaminados utilizados por portadores do HBV (MELO, 2011). Apenas 30% dos indivíduos apresentam a forma icterica da doença, reconhecida clinicamente.

Aproximadamente 5% a 10% dos indivíduos adultos infectados cronificam. Caso a infecção ocorra por transmissão vertical, o risco de cronificação dos recém-nascidos de gestantes com evidências de replicação viral

(HBeAg reagente e/ou HBV DNA  $> 10^4$ ) é de cerca de 70 a 90%, e entre 10 a 40% nos casos sem evidências de replicação do vírus. Cerca de 70 a 90% das infecções ocorridas em menores de 5 anos cronicam e 20 a 25% dos casos crônicos com evidências de replicação viral evoluem para doença hepática avançada. (GANEM, 2004)

### 2.3.3 História natural da hepatite B.

A história natural da hepatite B é complexa e influenciada por diversos fatores relacionados ao hospedeiro, a fatores virais e ambientais (SHARMA, 2005). O curso natural da hepatite B crônica pode ser dividido em três fases, que estão relacionadas com a idade de acometimento da infecção. (CASTELO, 2007)

A fase imunotolerante é mais comumente vista em crianças que adquiriram o HBV em transmissão perinatal ou nos primeiros anos de vida, sendo caracterizada pela positividade do HBsAg e do HBeAg de altos níveis de carga viral (DNA-HBV), aminotransferases normais ou discretamente elevadas (ALT, AST), atividade necroinflamatória discreta com fibrose ausente ou mínima na biopsia hepática e curso assintomático (FERREIRA, 2007)

Estudos experimentais sugerem que a função primordial do HBeAg seria de induzir ao portador do HBV (HBsAg+) o estado de imunotolerância. Em indivíduos que se infectaram com o HBV durante a fase adulta, o estado pode ser mais curto ou ausente. Pacientes que apresentam esta fase são considerados de baixo risco de progressão para cirrose. (GANEM, 2004)

A fase imunoativa ou de hepatite crônica B, caracterizada pela presença no soro do HBeAg (HBV selvagem) ou do anti-HBe+ (HBV selvagem residual ou mutante pré-core) (PINHAL, 2007). A referida fase ocorre após a transmissão horizontal entre crianças ou na fase adulta.

Esta fase pode ocorrer também tardiamente entre pessoas que adquiriram a infecção pelo HBV durante a transmissão vertical (maternal), iniciando logo após a fase de imunotolerância. Elevados níveis da ALT, altos níveis de HBV-DNA e doença hepática ativa observada na biópsia caracterizam esta fase. Pacientes com hepatite crônica B HBeAg positivos podem apresentar soroconversão espontânea do HBeAg para o anti-HBe, com elevação da ALT. Após soroconversão, observa-se níveis normais da ALT e títulos do HBV-DNA menor que 1000 UI/ml. A soroconversão do HBeAg para anti-HBe ocorre em 50% das crianças e adultos após cinco anos e 70% após 10 anos. (YUEN, 2007)

Na fase não replicativa ou de portador inativo percebe-se a presença no soro de HBsAg, anti-HBe, títulos baixos ou indetectáveis de DNA-HBV, aminotransferases normais, mínima lesão histológica hepática, curso assintomático e de bom prognóstico. Muitos portadores inativos do HBV permanecem inativos por toda a vida. Estas características devem ser mantidas por no mínimo um ano de seguimento clínico-laboratorial, permitindo, deste modo, a diferenciação com a hepatite B crônica HBeAg negativa (PUNGPAPONG S, 2007). O indivíduo nesta fase pode permanecer no estado de portador inativo, soroconverter o HBsAg, com produção de Anti-HBs em aproximadamente 0,5% ou apresentar reativação espontânea da hepatite B crônica em 20 a 30% dos casos. (LAI, 2007)

O quadro de reversão é acompanhado usualmente de elevação da ALT em razão do processo de reativação necroinflamatória do fígado (CHU CM, 2007). Um número bem menor de portadores inativos do HBV desenvolve hepatite crônica B anti-HBe positivo (hepatite crônica residual pelo HBV selvagem) que se caracteriza por elevação dos níveis das aminotransferases, títulos de HBV-DNA

maior que 2.000 UI/L ( $>10^4$  cópias mL) e doença hepática ativa (histológica) (GALLEGO, 2008). Invariavelmente, estes pacientes evoluem para cirrose hepática. Todavia, o curso clínico e as seqüelas de hepatite crônica pelo HBV selvagem ou mutante variam de indivíduo para indivíduo (TOAN, 2006). Alguns autores consideram o quadro de reversão como uma fase de infecção do HBV, todavia, outros consideram a reativação do HBV como um fenômeno biológico característico dos *hepadnavirus*.

A progressão da hepatite B está relacionada com a piora do quadro do paciente e desenvolvimento da cirrose hepática e do hepatocarcinoma. A cirrose relacionada ao HBV varia conforme a idade de acometimento da infecção, se do sexo masculino, do tempo que levou para haver soroconversão do HBeAg e da magnitude da carga viral. (FATTOVICH, 2008)

A taxa de incidência anual de cirrose em portadores inativos é inferior a 0,1 por 100 pessoas-ano, enquanto nos HBeAg positivos é de 1,6 e 3,8 por 100 pessoas-ano em Asiáticos e Europeus, com incidência cumulativa de 8% e 17%, respectivamente. (HSU, 2002). Nos pacientes HBeAg negativo a taxa é de 2,8 e 9,7 por 100 pessoas-ano, com incidência cumulativa entre 13% e 38% em Asiáticos e Europeus.

O risco de desenvolver hepatocarcinoma em pacientes com infecção crônica pelo HBV é 100 vezes maior que na população em geral. O risco difere segundo as características e gravidade da hepatite crônica e a presença de cirrose hepática. A incidência anual de HCC é menor que 1% para os não cirróticos comparados com 2% a 3% dos cirróticos. (PUNGPAPONG, 2007)

#### 2.3.4 Tratamento da hepatite B

O principal objetivo do tratamento da hepatite crônica B é eliminar ou suprimir significativamente a replicação do HBV e prevenir a progressão para a cirrose e o carcinoma hepatocelular. (BRUIX, 2005)

A avaliação do paciente pré-tratamento é fundamental e busca selecionar os indivíduos que serão tratados. Além da história e exame físico cuidadosos é importante estar à disposição todas as provas de função hepática (aminotransferases, fosfatase alcalina, gama glutamil transferase, albumina sérica, provas de coagulação, bilirrubinas) e sorologias para o HBV (HBsAg, HBeAg/anti-HBe, anti-HBc (total e IgM), HCV e HIV), estes últimos para documentar possíveis co-infecções. (HOOFNAGLE, 2006)

São elegíveis para o tratamento pacientes portadores de hepatite crônica B HBeAg positivos, os portadores de hepatite crônica B HBeAg negativos (com ALT e carga viral elevados e biópsia com atividade necroinflamatória importante), as manifestações extra-hepáticas da doença (glomerulonefrite, artrite, poliarterite), os cirróticos compensados ou descompensados, formas graves de hepatite aguda e para os co-infectadas com o HIV; em pacientes transplantados de fígado, por cirrose pelo HBV é fundamental que o tratamento seja instituído no pré-transplante (para os portadores de replicação viral ativa) e mantido no pós-transplante para impedir a infecção do enxerto pelo HBV, que é universal na ausência de terapia efetiva contra esse patógeno (MARCELLIN, 2005)

Para fins de tratamento, a replicação viral é caracterizada por títulos de HBV-DNA iguais ou maiores que 20.000 UI ( $10^4$  cópias/ml) nos pacientes HBeAg<sub>+</sub> e iguais ou maiores que 2.000 UI/ml ( $10^4$  cópias/ml) nos HBeAg negativos, mutantes pré-core (KEEFFE, 2006). O incremento dos níveis do HBV-DNA está associado a maior incidência cumulativa de cirrose (ILOEJE, 2006), variando de

4,5% a 36,2%, e carcinoma hepatocelular, variando de 1,3% para 14,9% para pacientes com menos que 300 cópias/ml e com mais que 106 cópias/ml, respectivamente.

Apesar das diretrizes de algumas associações regionais de estudo do fígado: Associação Americana para o Estudo de Doença do Fígado (AASLD) (LOK; MCMAHON, 2007); Associação Europeia para Estudo do Fígado (EASL), (2009), atualmente não recomendarem a genotipagem do HBV como condição para determinar o tratamento tem sido cada vez mais reconhecido o impacto dos genótipos do HBV sobre a resposta terapêutica dos antivirais (COOKSLEY, 2010; LIN; KAO, 2011; LIU; KAO, 2008).

Atualmente, cinco principais drogas têm sido utilizadas para o tratamento da infecção pelo HBV - o interferon convencional (IFN alfa), o interferon peguilado (PEG-IFN), a lamivudina, o adefovir, o entecavir e mais recentemente a telbivudina, onde os quatro últimos são análogos de nucleosídeos/nucleotídeos utilizados por via oral, e que inibem a transcrição reversa, que ocorre durante o ciclo de replicação viral no hepatócito. Entretanto, nenhuma dessas medicações consegue erradicar de maneira eficaz o HBV dos hepatócitos, pois esse vírus ao infectar a célula hepática, desloca seu genoma (DNA) para o núcleo e desta forma se organiza em pequenos minicírculos de DNA covalentemente fechados que mantêm a infecção intracelular e servem de molde para transcrição do RNA-pré-genômico e só podem desaparecer com a morte dos hepatócitos. (KEEFE, 2006)

Alguns trabalhos sugerem que existe algum efeito, aditivo da terapia combinada de interferon alfa e lamivudina, embora outros estudos necessitem confirmar essas observações. Dados recentes mostram que a combinação de PEG-IFN e lamivudina em pacientes HBeAg (-), durante 1 ano, não mostrou

grande benefício em relação à monoterapia com PEG-IFN ou lamivudina. (MARCELLIN, 2004).

Não há estudos que definam com precisão o tempo ideal de tratamento da hepatite B crônica, especialmente com os antivirais orais, análogos nucleosídeos e nucleotídeos. Embora muitas das proposições precisem de melhor validação científica, sugere-se que a soroconversão HBeAg/anti-HBe e a indetectabilidade do HBV-DNA no soro por PCR sejam parâmetros importantes para definir a continuidade ou a suspensão do tratamento.

Com relação aos pacientes com cirrose hepática, antes do advento da terapia antiviral, estes apresentavam sobrevida de 5 anos, de cerca de 84% para os compensados e de 15-35% para os descompensados. Aqueles que desenvolviam soroconversão HBeAg → anti-HBe mostravam 97% de sobrevida aos 5 anos e os que não desenvolviam apenas 72% estavam vivos após este período, mostrando, portanto, que a replicação viral tem papel preponderante no curso evolutivo da doença. (FONTANA, 2003)

Recomenda-se hoje que cirróticos compensados devam ser tratados com antivirais orais por tempo indeterminado (Keeffe, 2006), desde que os níveis de HBV-DNA sejam iguais ou superiores a 2.000 UI. Por outro lado, pacientes com cirrose descompensada devem ser tratados independentemente dos níveis de carga viral. Sabe-se que, mesmo após a soroconversão HBeAg/anti-HBe, esses pacientes podem desenvolver carcinoma hepatocelular ou progressão da doença hepática. Sendo os antivirais orais bem tolerados, devem ser mantidos até que haja negatificação do HBVDNA por PCR e negatificação do HBsAg. Os intérferons estão contra-indicados nesses pacientes porque podem levar à descompensação da hepatopatia. A lamivudina não deve ser administrada isoladamente porque em

tratamento de longa duração, existe um alto risco de desenvolvimento de resistência, com surgimento de sinais e sintomas de descompensação clínica. (GHANY, 2005)

#### **2.4 GENÓTIPOS DO HBV.**

O genoma do HBV é compacto, contendo em torno de 3.020 a 3.320 nucleotídeos organizados em genes sobrepostos que codificam as proteínas estruturais (HBsAg e HBcAg), as proteínas não estruturais que não fazem parte da partícula infecciosa (HBeAg), as proteínas replicativas (polimerase e proteína X) e elementos reguladores. (KRAMVIS, 2005)

Os genótipos do HBV são denominados com as letras do alfabeto de A a J. Análises filogenéticas demonstraram que os genótipos do HBV podem ser divididos em subgenótipos, exceto os genótipos E e G. Nesse tipo de análise observa-se uma variabilidade de 8% entre cada genótipo conhecido e de 4% entre os subgenótipos. (SCHAEFER, 2007)

Outras metodologias de identificação molecular foram descritas posteriormente, entre as quais o polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) de DNA viral amplificado por PCR, a hibridização em membrana após a PCR e PCR com primers específicos para os diferentes genótipos. Também existem descrições do uso de ensaios sorológicos (tipo ELISA) específicos para identificação de genótipos. (KIRSCHBERG, 2004)

Os genótipos do HBV têm distribuição geográfica variada. O genótipo A é frequente no noroeste Europeu, África, Índia, Brasil e Estados Unidos; B e C no sudoeste da Ásia, Japão e Oceania; D apresenta distribuição mundial; E está restrito à África (KIDD-LJUNGGREN, 2002); F apenas na América do Sul e Central (FRANCA, 2004); G nos Estados Unidos, França, Geórgia, Grã-Bretanha,

Itália e Alemanha; H foi identificado em populações indígenas da América Central; I em comunidades do Vietnã e Laos e J em grupos de japoneses. (CAMPOS, 2005)

A variação subgenotípica também encontra diversidade de distribuição geográfica mundial. O subgenótipo A1 e se localiza preferencialmente na África, América do Sul e o subtipo A2 na Europa. Os subgenótipos B localizam-se nos países asiáticos, notadamente o B1 no Japão. Os subgenótipos C também tem maior distribuição nos países asiáticos, com descrição de C4 na Austrália. Os subgenótipos D tem distribuição mundial não seletiva. O genótipo F é encontrado na América do Sul e Central, com descrição de F3 na Bolívia e F4 na Argentina. (SCHAEFER, 2007)

No Brasil, os estudos mais recentes apontam para o predomínio do subgenótipo A1 de origem africana e do subgenótipo F2, embora coexistam F1 e F4, sugerindo maior variabilidade genética na origem desse genótipo (MELLO, 2007). Alguns genótipos podem predispor a determinadas mutações, sobretudo a mutação pré-core, entre os quais os genótipos B, C e D. (KURBANOV, 2010).

No Maranhão, mais especificamente, o subgenótipo A1 foi identificado entre comunidades afrodescendentes que vivem isoladas desde o período da escravidão (ALVARADO-MORA, 2011). O estudo de Barros (2014) identificou, além dos genótipos normalmente prevalentes no Brasil, muitos portadores crônicos do HBV com subgenótipo D4, onde sugere que este possivelmente não tenha a mesma origem dos demais subgenótipos D. Este subgenótipo também foi identificado na Oceania e Somália (ABDOU, 2010). Posteriormente, o estudo de Carmem (2015) também identificou o subgenótipo D4 em Cuba.

#### 2.4.1 Relação dos genótipos do HBV com as variáveis clínicas.

Além dos aspectos relacionados à epidemiologia, a heterogeneidade de genótipos do HBV parece estar relacionada com diferenças na evolução clínica das infecções por HBV (WAI, 2002).

A replicação do vírus da hepatite B é dependente da transcriptase reversa, favorecendo erros frequentes na transcrição e, conseqüentemente, mutações no genoma viral que poderão alterar o curso clínico da doença e o perfil sorológico. As cepas mutantes são selecionadas através da pressão seletiva ecológica desempenhada pelo sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo o escape da cepa da ação do sistema imunológico (TILLMAM, 2007). Diversas cepas mutantes pré-core/core promoter e a deleção pré-S/S foram relacionadas com doença hepática progressiva mais grave e com suas complicações, principalmente se as mutações estiverem associadas. As cepas mutantes pré-core são mais frequentes nos genótipos B, C, D e E, enquanto a mutação core promoter (BCP) ocorre em todos os genótipos, sendo, porém, mais comum no genótipo C. (WAI, 2002)

Desta forma, alguns estudos clínicos evidenciaram a relação entre o genótipo e a gravidade da doença. Na Ásia, os genótipos B e C são mais frequentes e o genótipo C estaria associado às complicações mais graves que o genótipo B (ARANKALLE, 2003)

Na Tailândia, o genótipo C foi relacionado ao desenvolvimento de HCC. Muito recentemente, a doença hepática crônica foi detectada mais frequentemente em japoneses infectados com HBV com genótipo C que D. (DUONG, 2004). Em um estudo da China, a atividade da doença foi maior nos pacientes infectados pelo HBV genótipo C do que em pessoas infectadas pelo

HBV genótipo B na fase HBeAg-positivo, mas não após a soroconversão HBeAg. (CHAN, 2005). Em um estudo em Taiwan, o genótipo C foi mais associado com a gravidade das doenças hepáticas que a variante B. (TSENG, 2007)

Um estudo realizado no Alaska/EUA demonstrou que o genótipo D foi significativamente associado ao desenvolvimento da poliarterite nodosa relacionada ao HBV em comparação aos genótipos A2, B6, C2 e F1. Um estudo mexicano evidenciou que pacientes infectados com genótipo B soroconverteram mais precocemente que pacientes infectados com genótipo C (ALVARADO-ESQUIVEL, 2006). Um trabalho publicado na Índia evidenciou que o genótipo D esteve mais associado com o desenvolvimento de doença hepática severa e HCC em pacientes jovens que pacientes com genótipo A. Em contraste, o genótipo B foi relacionado a um bom prognóstico em um estudo desenvolvido no Japão e na China e raramente foi associado ao desenvolvimento do hepatocarcinoma.

Em um estudo em Taiwan, em comparação com o genótipo C, o genótipo B foi associado com soroconversão precoce do HBeAg, a progressão mais lenta para cirrose e desenvolvimento menos frequente de HCC. (TSENG, 2007)

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a influência do genótipo do HBV nas manifestações clínicas de pacientes portadores crônicos da infecção.

#### **3.2 Específicos**

Identificar os genótipos dos pacientes portadores do HBV.

Descrever as principais diferenças na apresentação clínica entre os pacientes portadores dos diferentes genótipos encontrados.

## **4) MÉTODOS**

### **4.1 Pacientes e local do estudo;**

Foram selecionados um total de 119 pacientes avaliados no estudo GENOTIPAGEM DO VIRUS DA HEPATITE B EM SÃO LUÍS (MA) que atenderam aos critérios de inclusão deste estudo. A pesquisa foi conduzida no Centro de Pesquisa Clínica-CEPEC e no Núcleo do Fígado-NEF do Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão, localizado na Rua Almirante Tamandaré, nº 01, Centro, São Luís - MA, Brasil, no período de 2013 a 2014.

### **4.2 Instrumentos;**

1. Banco de dados do estudo GENOTIPAGEM DO VIRUS DA HEPATITE B EM SÃO LUÍS (MA), com as informações sobre a identificação dos pacientes portadores da hepatite B, sobre a genotipagem do HBV, dados clínicos e laboratoriais.
2. Ficha de acompanhamento clínico que reuniu todas as informações relevantes para o estudo colhidas no banco de dados e nos prontuários dos pacientes com os demais dados clínicos (APENDICE)

### **4.3 Critérios de Inclusão;**

- 1- Pacientes incluídos no estudo intitulado “GENOTIPAGEM DO VIRUS DA HEPATITE B EM SÃO LUIS (MA)”
- 2- Pacientes com hepatite B crônica com genótipo conhecido.
- 3- Tempo mínimo de acompanhamento de 12 semanas.

#### **4.4 Delineamento do Estudo;**

Utilizamos uma planilha contendo informações acerca da genotipagem e identificação de 119 pacientes estudados no trabalho “Genotipagem do vírus da hepatite B em São Luís-MA”. Destes, 101 atendiam aos critérios de inclusão e fizeram parte deste estudo. Os dados desses pacientes foram resgatados do banco de dados buscando-se identificar os valores de alanina aminotransferase (ALT), manifestações clínicas, histologia hepática, dados clínicos de imagem e endoscopia digestiva.

Os pacientes identificados com os mesmos genótipos foram agrupados e analisados segundo dados epidemiológicos, demográficos e apresentação clínica. Posteriormente, os resultados dos grupos foram comparados.

A classificação da hepatite B crônica foi definida de acordo com os seguintes critérios elencados. (EASL, 2012)

- a) Portador Inativo: HBsAg positivo, HBeAg negativo, anti-HBe positivo, níveis de ALT normais e valores de HBV-DNA abaixo de 2000 UI/ml.
- b) Hepatite B crônica: HBsAg positivo, HBeAg positivo, níveis elevados de ALT ou HBsAg positivo, HBeAg negativo, anti-HBe positivo e HBV DNA acima de 2000 UI/ml.
- c) Cirrose Hepática: HBsAg positivo com HBeAg positivo ou negativo independentemente da carga viral, sinais e sintomas de doença hepática avançada (ascite e/ou presença de varizes esofágicas) ou diagnóstico histológico de cirrose hepática.
- d) Imunotolerância: HBsAg positivo, HBeAg positivo com níveis de ALT normais

#### **4.5 Critérios para análise dos dados;**

Foram calculadas as diferenças entre os pacientes portadores dos diferentes genótipos identificados, quanto ao sexo, idade, procedência, apresentação clínica e laboratorial. Diferenças entre variáveis numéricas foram calculadas por teste t de Student ou Man-Witney, quando indicados e entre as categóricas pelo Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando recomendados. Foi utilizado o programa SPSS, versão 20.0. Considerou-se significativa a presença de  $p < 0,05$ .

#### **4.6 Considerações Éticas;**

O presente estudo atendeu a todos os preceitos relacionados na Resolução 466/12 do CNS/MS que trata das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Registrado sob o parecer consubstanciado nº: 487/2007 (ANEXO 1).

Utilizamos os dados coletados exclusivamente para os fins delineados no presente estudo e estes serão armazenados até que o estudo seja finalizado e publicado, após isso serão acondicionados em local adequado. O trabalho não ofereceu riscos aos pacientes nem vantagens financeiras ou mesmo no tratamento.

## REFERÊNCIAS

ABDOU CHEKARAOU M, BRICHLER S, MANSOUR W, LE GAL F, GARBA A, DÉNY P, GORDIEN E. **A novel hepatitis B virus (HBV) subgenótipo D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulation in Niger along with HBV/ E strains.** J Gen Virol, 2010

AKUTA N, KUMADA H. **Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005.

ALMEIDA JD, RUBENSTEIN D, STOTT EJ. **New antigen-antibody system in Australia-antigen positive hepatitis.** Lancet 1971

ALVARADO-ESQUIVEL C, SABLON E, CONDE-GONZALEZ CJ, JUAREZ-FIGUEROA L, RUIZ-MAYA L, AGUILAR-BENAVIDES S. **Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico:** Predominant circulation of hepatitis B virus genotype H. J Gastroenterol Oct 28, 2006

ALVARADO-MORA MV, BOTELHO L, GOMES-GOUVÊA MS, DE SOUZA VF NASCIMENTO MC. **Detection of hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhão, Brazil,** 2011.

ANDRADE A F B. Caracterização e análise filogenética dos genótipos dos vírus da hepatite B circulantes em território brasileiro. 100f. Tese (Doutorado Acadêmico em Biologia Celular e Molecular), Rio de Janeiro, 2008.

ARANKALLE VA, MURHEKAR KM, GANDHE SS, MURHEKAR MV, RAMDASI AY, PADRIDRI VS, et al. **Hepatitis B virus:** Predominance of genotype D in primitive tribes of the Andaman and Nicobar islands, India (1989-1999). J Gen Virol July 2003.

BARONE, A. A; VISO, A. T. R. **Patogenia da hepatite B e Delta.** Braz. J. infect. Dis., Salvador, v. 10, n. 1, p. 11-14, ago. 2006.

BARROS LMF, GOUVÊA MSG, KRAMVIS A, COORÊA MCJM, SANTOS A, SOUZA LAB. **High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil.** Infection, Genetics and Evolution, 2014.

BECKER C E. **Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, south of Brazil.** Arquivo of Gastroenterology, 2010.

BERTOLINI D A. **Characterization of a hepatitis B virus strain in southwestern Paraná, Brasil, presenting mutations previously associated with anti-HBs resistance.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2010.

BONINO F, BRUNETTO MR. **Chronic hepatitis B e antigen (HBeAg) negative, anti-HBe positive hepatitis B: an overview.** Journal of Hepatology, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Boletim epidemiológico**. Hepatites Virais. Brasília - DF, 2012.

\_\_\_\_\_. **Saúde amplia faixa etária para vacinação gratuita contra Hepatite B a partir de 2011**. 2010. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dsptalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=11563](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dsptalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11563)>. Acesso em: 12 mai. 2014

BRÉCHOT C. **Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms**. *Gastroenterology* 127: S56-S61, 2004.

BRUIX J, SHERMAN M. **Management of hepatocellular carcinoma**. *Hepatology* 42:1208-1236, 2005

CAMPOS RH, MBAYED VA, PINEIRO YLFG. **Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America**. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 2: S8-S13

CARMEN L. LOUREIRO, JULIO C. AGUILAR, JORGE AGUIAR, VERENA MUZIO, EDUARDO PENTÓN, DAYMIR GARCIA, GERARDO GUILLEN, AND FLOR H. PUJOL HBV **Genotypic Variability in Cuba**, *Plos One*, 2015.

CARRILHO, F. J; ONO-NITA, S. K. *Virologia do HBV*. In: ARAUJO, E. S. A. bde (Ed.). 2008, **O abc das Hepatites**: manual clínico para o manuseio e prevenção da Hepatite B. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008.

CASTELO A, PESSOA MG, BARRETO TC, et al. **Cost estimates of chronic hepatitis B virus for the Brazilian unified health system in 2005**. *Rev Assoc Med Bras*, 2007

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases**. 12. ed. Washington DC: Public Health Foundation, 2011

CHANG, K. M. *Hepatitis B Immunology for Clinicians*. **Clin. Liver. Dis.**, Philadelphia, v. 14, n.3, p. 409-424, Aug. 2010

CHOO QL, KUO G, WEINER A, WANG KS, OVERBY L, BRADLEY D, et al. **Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome**. *Science* 1989)

CHU CM, LIAW YF. **HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas**: appreciably high rates during a long-term follow-up. *Hepatology* 45: 1187-1192, 2007.

COOKSLEY, W.G. **Do we need to determine viral genotype in treating chronic hepatitis B?** Journal of Viral Hepatology, v. 17, n. 9, p. 601-610, 2010.

DUONG, T. N., HORIIKE, N., MICHITAKA, K. et al. (2004). **Comparison of genotypes C and D of the hepatitis B virus in Japan: a clinical and molecular biological study.** Journal of Medical Virology 72, 551–7

ELGOUHARI H M. TAMIMI T I A. Carey W D. **Hepatitis B vírus infection: Understanding its epidemiology, cause, and diagnosis.** Cleveland Clinic Journal of Medicine, 2008.

ERHARDT A, BLONDIN D, HAUCK K, SAGIR A, KOHNLE T, HEINTGES T, HÄUSSINGER D. **Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D.** Hepatitis. 2005.

FERREIRA, O. **Estudo de Doadores de Sangue com Sorologia Reagente para Hepatites B e C, HIV e Sífilis no Hemocentro de Ribeirão Preto.** 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado em Saúde na Comunidade) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. **Avanços no Tratamento da Hepatite pelo Vírus B.** R. Soc. Bras. Med. Trop., Brasília, v. 40, n. 4, p. 451-62, jul./ago. 2007.

FIGUEIREDO, L. (Org.). **Raízes Africanas.** Rio de Janeiro: Sabin, 2009. 112 p.

FONSECA, JCF. **Histórico das Hepatites Virais.** Revista Brasileira de Medicina Tropical, 2010

FONTANA RJ. **Management of patients with decompensated HBV cirrhosis.** Seminar Sin Liver Diseases 23:89-100, 2003.

FRANCA PH, GONZALEZ JE, MUNNE MS, et al. **Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen negative variants among HBV-infected argentine an blood donors.** J Clin Microbiol 42: 5015-5021, 2004.

FREITAS J. **Hepatites Víricas: Perspectiva histórica.** Acessado no site <http://www.aidsportugal.com/hepatitte>, em 10 de março de 2014. //Reuben A. Landmarks in hepatology: thethinredline. Hepatol 2002.

FUNG SK, LOK ASF. **Management of patients with hepatitis B virus-induced cirrhosis.** Journal of Hepatology 42: S54-S64, 2005

GALLEGO A, SHELDON J, GARCIA-SAMANIEGO J, MARGALL N, ROMERO M, HORNILLOS P, et al. **Evaluation of initial virological response to adefovir**

**and development of adefovir resistant mutations in patients with chronic hepatitis B.** J Viral Hepat 2008.

GANEM D, PRINCE AM. **Hepatitis B virus infection – Natural history and clinical consequences.** The New England Journal of Medicine 350: 1118-1129, 2004

GEORGE PAPTAEODORIDIS (COORDINATOR & EASL GOVERNING BOARD), MARIA BUTI, MARKUS CORNBERG, HARRY JANSSEN, DAVID MUTIMER, STANISLAS POL, GIOVANNI RAIMONDO. **EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection.** Journal Hepatology, 2012.

GHANY M, LUTCHMAN G, KLEINER D. **Lamivudine and adefovir versus adefovir alone for HBeAg-positive chronic hepatitis B.** Hepatology 42:591-592, 2005

GONÇALES, N. S. L.; CAVALEIRO, N. P. **Marcadores Sorológicos da Hepatite B e sua Interpretação.** Braz. J. infect. Dis. Salvador, v.10, n. 1, p. 19-22, ago. 2006.

GUIRGIS, B.S.S.; ABBAS, R.O.; AZZAZY, H. M. E. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. **International Journal of Infectious Diseases**, v.14, p. 941–953, 2010.

HADZIYANNIS SJ, LIEBERMAN HM, KARVOUNTZIS GG, SHAFRITZ DA. **Analysis of liver, nuclear HBcAg, viral replication and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg versus anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus.** Hepatol 1983

HOOFNAGLE JH. **Hepatitis B – preventable and now treatable.** The New England Journal of Medicine 345:1074-1076, 2006.

HOU, J.; LIU, Z.; GU, F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. **International Journal of Medical Sciences**, v. 2(1), p. 50-57, 2005.

HSU YS, CHIEN RN, YEH CT, ET AL. **Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B.** Hepatology, 2002.

HUSSAIN, B. K; LOK, A. S. F. Hepatitis B virology: acute and chronic Infection - wild-type HBV and HBV Variants. In: GORDON, S. C (Edit.). **Management of Chronic Viral Hepatitis.**, New York: Marcel Dekker, Inc, 2001.

ILOEJE UH, YANG HI, SU J, JEN CL, YOU SL, CHEN CJ, et al. **Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load.** Gastroenterology 2006,

JUNIASTUTI. **A nationwide molecular epidemiology study on hepatitis.** Journal of Medical Virology, 2011.

KEEFFE EB, DIETERICH DT, HAN SB, JACOBSON IM, MARTIN P, SCHIFF ER, TOBIAS H, WRIGHTT. **A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update.** Clinical Gastroenterology and Hepatology 2006;4:1-27, 2006.

KESSLER HH, STELZL E., MARTH E, STAUBER RE. **A detecção de mutações no gene da polimerase do vírus da hepatite B.** Clin Chem, 2003.

KIDD-LJUNGGRENK, MIYAKAWA Y, KIDD AH. **Genetic variability in hepatitis B viruses.** Journal of Gen Biology 83: 1267-1280, 2002.

KIRSCHBERG O, SCHUTTLER C, REPP R, SCHAEFER S. **A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus-genotypes A-F.** Journal of Clinical Virology, 2004

KRAMVIS A, KEW MC. **Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy.** Journal of Viral Hepatitis. 2005.

KURBANOV F, TANAKA Y, MIZOKAMI M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatology Research*, 2010

LAI CL, YUEN MF. **The natural history of chronic hepatitis B.** J Viral Hepat, 2007.

La CONDAIMINE MM. **Journal du voyage fait par ordreduroi, a l'Equateur, servant d'introduction historique a la Mesure destrois premiers degresdumeridien**, 1751. Acessado no site do "Center de Recherche de surla Littérature des Voyages, Paris- França (<http://www.crvl.org>) em 22 de junho de 2014.

LIANG, T. J. **Hepatitis B: The Virus and Disease.** *Hepatology.*, Baltimore, v. 49, n. 5, p. 513-521, May 2009.

LIU CJ, et al. **Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes.** Liver International. 2005.

LIN, C-L., KAO, J-H. **The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances.** Journal of Gastroenterology and Hepatology, v. 26, p. 123–130, 2011.

LIU CJ, KAO JH. **Genetic variability of hepatitis B virus and response to antiviral therapy.** Antiviral Therapy, v.13(5), p. 613-24, 2008.

LOCARNINI S. **Molecular virology of hepatitis B virus**. Seminars in Liver Disease 24 (supplement 1): 3-10, 2004.

LOK, A. S. F; MACMAHON, B. J. **Chronic Hepatitis B**. Hepatology. Baltimore, v. 45, n. 2, p. 507-539, Jan. 2007.

\_\_\_\_\_. **Chronic hepatitis B**. Hepatology, 2001.

MA JC, et al. **Relationship between HBV genotypes and anti-viral therapeutic efficacy of interferon-alpha**. Hepatobiliary Pancreat Disease International. 2007.

MARCELLIN P, LAN GKK, BONINO F, FARCI P, HADZIYANNIS S, JIN R. **For the Peginterferon Alfa-2a HbeAg-negative chronic hepatitis B study group**. The New England Journal of Medicine 351:1206-1217, 2004.

MARCELLIN P, ASSELAH T, BOYER N. **Treatment of chronic hepatitis B**. Journal of Viral Hepatitis 12:333-345, 2005.

MELLO FC, SOUTO FJ, NABUCO LC, et al. **Hepatitis B virus genotype circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates 7**: 103, 2007

MELLO, F. C. A; ISOLANI, A. P. **Hepatite B e C: Do Risco de Contaminação por Materiais de Manicure/Pedicure à Prevenção**. R. Saúde e Biol., Campo Mourão, v. 6, n. 2, p. 72-78, maio./ago. 2011

MORA, M.V.A., et al. **Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: A Bayesian inference on the genotype F**. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11(1), p. 103-108, 2010. Disponível em <[www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)> Acesso em: 02.11.2012.

NEURATH AR, THANAVALA Y. **Hepadnaviruses**. In: Regenmortel MHV, neurath AR, eds. Immunochemistry of viruses. II: The basis for serodiagnosis and vaccines, Elsevier, Amsterdam, 403-458, 1990.

OKAMOTO H, TSUDA F, SAKUGAWA H, SASTROSOEWIGNJO RI, IMAI M, MIYAKAWA Y. **Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes**. The Journal of General Virology. 1988.

PARANÁ, R. et al. **Diversidade Genômica do vírus da Hepatite B**. Gaz. Méd. Bahia, Salvador, v. 79, n. 2, p. 37-38, jul. 2009.

PARANÁ, R; SCHINONI, M. I; OLIVEIRA, A. P. **Diagnóstico e Monitorização da Hepatite B**. In: ARAUJO, E. S. A. de (Ed.). O abc das Hepatites: manual clínico

para o manuseio e prevenção da Hepatite B. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008.

PESSOA MG, TERRAULT NA, DETMER J, KOLBERG J, COLLINS M, HASSOBA HM, et al. **Quantitation of hepatitis G and C viruses in the liver: Evidence that hepatitis G is not hepatotropic.** Hepatology 1998

PINHAL MPS, UGOLINI MR, SANTOS JPM, et al. **O papel da proteína HBx no desenvolvimento do hepatocarcinoma celular.** ArqMed ABC, 2007

PUNGPAPONG S, KIM WR, POTERUCHA JJ. **Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians.** MayoClinProc, 2007.

PUOTI M, TORTI C, BRUNO R, FELICE G, CAROSI G. **Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients.** Journal of Hepatology 44: S65-S70, 2006.

RAIMUNDO G, POLLICINO T, SQUADRITO G. **Clinical virology of hepatitis B virus infection.** Journal of Hepatology 39: S26-S30, 2003.

REYES GR, PURDY MA, KIM JP, LUK KC, YOUNG LM, FRY KE, et al. **Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis.** Science 1990

RIBEIRO NR, et al. **Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection.** Liver international. 2006.

SCHAEFER S. **Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes.** World Journal of Gastroenterology, 2007.

SCHIMID R. **Viral hepatitis: Some Historical Perspectives.** In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, editors. Viral Hepatitis and Liver Disease. 1994).

SHARMA SK, SAINI N, CHWLA Y. **Hepatitis B virus: inactive carries** J Virol, 2005.

SITNIK R, SETTE JR, SANTANA RAF, MENEZES LC, GRAÇA CHN, DASTOLI GTF, SILBERT S, PINHO JRR. **Hepatitis B virus genotype E detected in Brazil in an African patient who is a frequent traveler.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2007.

TATEMATSU, K. et al. **A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J.** Journal of Virology, v. 83, n. 20, p. 10538–10547, 2009.

TIOLLAIS P, VYAS G, CHARNAY P. **Biology of hepatitis B virus.** Science 213:406-411, 1985.

TOAN, NL, SONG LH, KREMSNER PG, DUY DN, BINH VQ, DUECHTING A, KAISER H, TORRESI J, KANDOLF R, BOCK CT. **Co-infection of human parvovirus B19 in Vietnamese patients with hepatitis B virus infection.** Journal of Hepatology 45: 361-369, 2006.

TREICHEL U, MEYER ZUM BUSCHENFELDE KH, DIENES HP et al. **Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells.** Arch Virol 142:493-498, 1997.

TSENG TC, LIU CJ, CHEN PJ, LAI MY, LIN CL, KAO JH, et al. **Subgenotypes of hepatitis B virus genotype C do not correlate with disease progression of chronic hepatitis B in Taiwan.** Liver Int Sep 2007

WASMUTH, JAN-CHRISTIAN. **Hepatitis B - Epidemiology, transmission and natural history** In: MAUSS, S.; BERG, T.; ROCKSTROH, J.; SARRAZIN, C.; WEDEMEYER, H. **Hepatology: a clinical text book.** Germany: Flying Publisher, 2009. cap.2. p.25-34. Disponível em: <[www.hepatologytextbook.com](http://www.hepatologytextbook.com)>. Acesso em: 02.11. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Hepatitis B.** Fact Sheet 204 (Revised 2011). World Health Organization: [www.who.int/mediacentre](http://www.who.int/mediacentre). (Revised, 2011)

WRIGHT TL. **Introduction to chronic hepatitis B infection.** The American Journal of Gastroenterology 101: S1-S6, 2006.

YEH CH, CHEN TC, CHANG ML, HSU CW, YEH TS, LEE WC, et al. **Identification of NV-F virus in hepatocellular carcinoma.** J Med Virol 2002

YEH CT, TSAO ML, LIN YC, TSENG IC. **Identification of a novel single-stranded with human hepatitis.** J Inf Dis 2006

YU, H. et al. **Molecular and Phylogenetic Analyses Suggest an Additional BHepatitis B Virus Genotype „„I”.** PLoS ONE, v. 5, n. 2, p. 92-97, 2010.

YUEN MF. **Revisiting the natural history of chronic hepatitis B:** impact of new concepts on clinical management J Gastroenterol Hepatol, 2007.

## **Hepatitis B virus subgenotype D4: later seroconversion of HBeAg?**

Francisco Carlos Costa Magalhães<sup>1</sup>; Adalgisa de Souza Paiva Ferreira<sup>2</sup>; Lena Maria Barros Fonseca<sup>2</sup>  
1 – Federal University of Maranhão; 2 – Clinical Research Center at the University Hospital of UFMA

### **Summary**

Hepatitis B virus (HBV) is a chronic infection that has a heterogeneous distribution around the world. Its clinical presentation depends on characteristics of the carrier such as the age of infection, immunological status and associated diseases. Viral characteristics like the genotype may also influence. The aim of this study was to evaluate the influence of the HBV genotype in the clinical presentation of the chronic infection. This study was performed at the Clinical Research Center and the Liver Unit of the Federal University of Maranhão. A hundred and nineteen chronic carriers of HBV with defined genotypes participated of this study. We identified those followed during at least 12 months for their clinical definition. It was included 101 patients: 68 (68%) with subgenotype A1, 26 (26%) D4, 4(3%) F2a, 2 (2%) D3 and 1 (1%) D2. Two groups were defined for comparison: A (n=68) and D (n=29). In the HBV D group the presence of HBeAg (28% vs 10% P=0.03) and immune tolerant (21.5% vs 1.5% P=0.006) patients were more frequent when compared to carriers with genotype A. There was no gender or age difference between groups (39±13 vs 42±11 P=0.26). In conclusion, we can suggest that among the carriers with genotype D, especially the subgenotype D4, which corresponds to 90% in this study, there might be late seroconversion of HBeAg, favoring a higher risk of virus transmission.

**Keywords:** hepatic disease; HBV, clinical presentation; genotype; variability; transmission.

## 1. INTRODUCTION

The hepatitis B virus (HBV) infection is a worldwide human health problem. According to the World Health Organization (WHO), over 240 million people are chronically infected and approximately six hundred thousand die every year due to the consequences of the infection caused by this virus<sup>1</sup>. Recent data demonstrated that Brazil is a country with very low prevalence (less than 1%)<sup>2</sup>.

This infection is associated with a large spectrum of clinical presentations, depending on stage<sup>3,4</sup>. The liver injuries associated with the infection are predominately mediated by immunologic mechanisms<sup>5</sup> and thus, the course of the infection depends on many factors that might influence the immunologic response, such as age at infection with HBV, the host's genetic factors and viral genetic variability<sup>6,5,7,8</sup>.

The great variability in the sequence of nucleotides of the viral genome allows - HBV classification in genotypes and subgenotypes. Nowadays HBV is classified in 10 genotypes (A-J), with distinct global geographic distribution<sup>9,10</sup>.

Genotypes A and D are frequently observed in Europe, North America, India and Africa; genotypes B and C in the Southeast of Asia, China and Japan; genotype E is restricted to Africa; genotype F can be found in South and Central America native population; genotype G in France, USA and Mexico; genotype H in Central America<sup>11,12,13</sup>; genotype I in Vietnam and Laos and the J was recently identified in the Ryukyu Islands, in Japan<sup>15</sup>.

Most of the studies in Brazil shows a higher frequency of the genotype A, followed by the genotypes D and F<sup>16,17,18,19,20,21</sup> with little variation found in different regions of the country that may be explained by ethnic diversity of the Brazilian population, that was formed by European and African immigration<sup>9,20</sup>.

The HBV genotyping has become an important tool to clarify the progression of the hepatic disease. Many studies have suggested the influence of HBV genotypes in the natural history of infection. Recent publications summarize the association found<sup>23</sup>.

Strong evidences suggest that the subgenotypes A1, B2-5, F1 and probably genotype D are associated with a more severe progression of the hepatic disease and development of hepatocellular carcinoma<sup>24,25,26,27</sup>. Perinatal transmission has been associated with genotype C due to hepatitis B (HBeAg) replication marker seroconversion occur after fewer decades later, and thus, favoring a higher viral replication and maternal/fetal transmission.<sup>28,29</sup>

Despite the fact that there are studies defining the most frequent genotypes of HBV in Brazil<sup>17, 30, 31, 32</sup>, there is not yet information about the most frequent clinical presentations associated with each genotype. Thus, the aim of this study is to identify the most frequent clinical presentations in a sample of patients with defined genotypes of HBV.

## **2. PATIENTS AND METHODS**

Chronic carriers of HBV followed at the Clinical Research Center and Liver Unit of the Federal University of Maranhão, for at least 12 months, and who had their virus genotypes assigned, participated of this study.

Demographic, laboratorial, and clinical data were retrieved from the patients' medical files. The following data were identified: serological markers (HBsAg, anti-HBc, HBeAg and anti-HBe), viral load by real time PCR assay, levels of alanine aminotransferase (ALT), hepatic histology, presence of ascites, digestive endoscopy and liver imaging.

Chronic hepatitis B status was defined according to the following criteria:

- a) Inactive carrier: positive HBsAg, negative HBeAg, positive anti-HBe, normal ALT levels and HBV-DNA levels below 2000UI/ml.

b) Chronic Hepatitis B: positive HBsAg, positive HBeAg, high ALT levels or positive HBsAg, negative HBeAg, positive anti-HBe, and HBV-DNA levels above 2000UI/ml.

c) Cirrhosis of the liver: positive HBsAg with positive or negative HBeAg regardless of the viral load, symptoms of advanced hepatic disease (ascites and/or esophageal varices) or histological diagnosis of liver cirrhosis.

d) Immune tolerance: positive HBsAg, positive HBeAg with normal ALT levels.

The individuals were grouped according to the most frequently found genotypes and compared concerning the epidemiological and demographic data, presence of HBeAg, and clinical presentation.

Differences between variables were calculated by the Student or Mann-Witney test when indicated and also by Chi-square or Fisher Exact Test. The program SPSS, version 22.0 was utilized and the significant P value <0.05 was considered.

This study meets the regulations in Resolution 466/12 of Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde do Brasil – CNS/MS that addresses the directives and regulations of researches with human beings. This research is registered in the unified opinion number: 487/2007. (ATTATCHMENTS)

### **3. RESULTS**

The selected sample for this study was formed by 119 patients with certain genotypes of HBV (data previously reported<sup>20</sup>). Of these, 101 were monitored for at least 12 months and took part of this study. There were 50 men (49.5%). The mean age was 41 ± 11 years, ranging from 13 to 78 years of age. Demographic and clinic data are reported in **Table 1**.

The majority of the patients was infected with genotype A 68 (67%) (all subgenotype A1), 26 (26%) with subgenotype D4, 4 (4%) with subgenotype F2a, 2 (2%) subgenotype D3, and only 1 (1%) with subgenotype D2.

The monitoring time was  $47 \pm 30$  months, with the minimum of 123 months and the maximum of 136 months.

For comparison purposes, the genotypes A and D (including D2, D3, and D4) were grouped, totalizing 97 patients after the exclusion of four individuals with the genotype F. The 68 (70%) from genotype A group and 29 (30%) from genotype D were compared.

There was no statistical difference regarding age or gender. Presence of HBeAg and immune tolerance state were more frequent in genotype D group. There was no difference between groups when comparing inactive carrier, liver cirrhosis and chronic hepatitis frequencies (**Table 2**).

#### **4 DISCUSSION**

In this study, we evaluated the clinical presentations of chronic carriers of HBV according to the determined viral genotypes. As observed in other Brazilian studies<sup>17, 30, 33, 20</sup>, the presence of genotype A was most prevalent, being all of subgenotype A1.

There was a significant frequency of genotype D (subgenotype D4 in 90%). Among them, the presence of positive HBeAg individuals and immune tolerance stage of chronic carriers were more frequently found; even though they were not younger than the genotype A carriers. The majority of the studies associate the genotype D to earlier seroconversion of HBeAg when compared to genotype A<sup>28, 34</sup>. A Brazilian study which evaluated the HBeAg frequency among individuals with the genotype A and D also identified a lower frequency of HBeAg among the individuals harboring genotype D (28% vs. 60%)<sup>35</sup>. Like most of studies comparing the genotypes A and D are from regions where there must be

more European individuals, it is possible that, as in the sample here studied analyzed subgenotype D4, that is known to be a variety coming from Africa<sup>36,37,38,39,40</sup> could justify different behavior of those so far described for genotype D<sup>41</sup>.

Actually, different behaviors among HBV-D subgenotypes were suggested in recent review, but with little information about D4<sup>42</sup>. In addition, Chandra PK et al (2009), in a study conducted in India with subgenotypes D1, D2, D3 and D5, identified a significant relationship between subgenotype D1 and chronic liver disease as well as occult HBV infection most commonly found in carriers with subgenotype D3<sup>43</sup>. Similarly, Rajesh P et al (2012) found a high frequency of subgenotype D5 among patients with cirrhosis and carcinoma hepatocelular.<sup>44</sup> It is likely that subgenotype D4 infection, particularly as shown in this study, presents HBeAg seroconversion later. The statement may be explained by the fact that there was also a higher proportion of immune tolerant in this group, although they were not younger than those with genotype A ( $39\pm 13$  vs  $42\pm 11$   $P = 0.26$ ), supporting the hypothesis that individuals are remaining with high viral replication, facilitating the transmission even in the adulthood<sup>45,46,47</sup>.

In conclusion, this study showed that chronic HBV genotype D carriers, mainly subgenotype D4, a still little studied subgenotype, have a higher frequency of HBeAg, suggesting that there may be late seroconversion that is favoring a greater risk of virus transmission due to the high viral load of these individuals.

## REFERENCES

1. World Health Organization. Hepatitis B. [Internet] [updated in 2013, julho]. Found on: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Accessed on 06/01/2015
2. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 2012; 30(12): 2212 – 21.
3. Mora, M.V.A. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: A Bayesian inference on the genotype F. *Infection, Genetics and Evolution* 2010; 11(1): 103-21.
4. Elgouhari H M. Tamimi T I A. Carey W D. Hepatitis B virus infection: Understanding its epidemiology, cause, and diagnosis. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2008; 75 (12): 881 – 91.
5. Tran, T.T. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol* 2008; 82 (11): 5657 – 63.
6. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45(2): 507-32.
7. Chekaraou AM, Briclher S, Mansour W, Le Gal F, Garba A, Dény P *et al.* A novel hepatitis B virus (HBV) subgenótipo D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulation in Niger along with HBV/ E strains. *J Gen Virol* 2010; 91 (6): 1609 – 20.
8. Almeida, D. Importância clínica dos genótipos do vírus B. *Gaz. Méd. Bahia* 2009; 79(2): 39-40.
9. Gunther S, Fischer L, Pult I, Sterneck M, Will H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv. Virus Res* 1999; 52 (1):125–37

10. Juniastuti, Utsumi T, Nugrahaputra VE, Amin M, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H et al. Another novel subgenotype of hepatitis B virus genotype C from papuans of Highland origin. *Journal of Medical Virology* 2011; 83 (2): 225 – 34.
11. Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol* 2009;15 (46):5761-70.
12. Tanwar S, Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis? *CurrGastroenterol Rep* 2012;14(1):37-46
13. Thursz M, Yee L, Khakoo S. Understanding the host genetics of chronic hepatitis B and C. *Semin Liver Dis* 2011;31(2):115-27.
14. Yu, *Het al.* Molecular and Phylogenetic Analyses Suggest an Additional Hepatitis B Virus Genotype “I”. *PLoS ONE* 2010;5(2):92-7
15. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J. Virol* 2009; 83(20): 10538–47.
16. Alcaide *Ret al.* Distribution of Hepatitis B virus genotypes and viral load levels in brazilian chronically infected patients in São Paulo city. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 2009; 51(5):269-72
17. Becker CE, Mattos AA, Bogo MR, Branco F, Sitnik R, Kretzmann NA. Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, south of Brazil. *Arquive of Gastroenterology* 2010; 47 (1): 13-7.
18. Ferreira RC. Hepatitis B virus infection profile in hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors, and genotypes. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz* 2006; 101(6): 689-92

19. Mello FCA. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BioMed Central Microbiology* 2007; 7(103): 1-9
20. Barros LMF, Gouvêa MSG, Kramvis A, Coorêa MCJM, Santos A, Souza LAB. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 24(1): 68–75.
21. Alvarado-Mora MV, Botelho L, Gomes-Gouvêa MS, de Souza VF Nascimento MC. Detection of hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhão, Brazil. *Virology* 2011; 8 (1): 415-22
22. Livezey KW, Negorev D, Simon D. Hepatitis B virus-transfected Hep G2 cells demonstrate genetic alterations and de novo viral integration in cells replication HBV. *Mutat Res* 2000; 452(2): 163-80
23. Catherine MN Croagh, Paul V Desmond, and Sally J Bell. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World J Hepatol* 2015; 7(3): 289–93.
24. Guirgis, B.s.s.; Abbas, R.o.; Azzazy, H. M. E. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *International Journal of Infectious Diseases* 2010; 14(11): 941–53.
25. Kao Jh Tseng Tc, Liu Cj, Chen Pj, Lai My, Lin Cl. Subgenotypes of hepatitis B virus genotype C do not correlate with disease progression of chronic hepatitis B in Taiwan. *Liver Int* 2007; 27 (7): 983 – 91.
26. Kew Mc Kramvis A. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *Journal of Viral Hepatitis* 2005; 12 (5): 456 – 64.

27. Liu CJ, Kao JH. Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J. *Semin Liver Dis* 2013; 33 (2): 97 – 102.
28. Livingston SE, Simonetti JP, Bulkow LR, Homan CE, Snowball MM, Cagle HH, Negus SE, McMahon BJ. Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D, and F. *Gastroenterology* 2007;133(5):1452–57
29. Kurbanov F, Tanaka Y and Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol. Res* 2010; 40(1):14–16.
30. Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JR, Mello IM, Bertolini DA, Lemos MF *et al.* Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centes from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BioMed Central Public Health* 2004;4(1): 4-13
31. Maria JRF, Amanda AF, Marcella KCM, Andrei SF, Vanessa SG, Andrea MS, Ygor FFC *et al.* Prevalence of hepatitis C virus infection and genotypes in patient with chronic kidney disease undergoing hemodialysis. *Journal of Medical Virology* 2013; 85 (10): 1741 – 45.
32. Pungpapong S, Kim WR, Poterucha JJ. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. *MayoClinProc* 2007; 82(8): 967-75.
33. Mello FCA. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BioMed Central Microbiology* 2007; 7 (103): 1-9.
34. Kumar A, Kumar SI, PandeyR, Nalk S, Aggarwal R. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24(1): 19-22.

35. Tonetto PA, Gonçalves NS, Fais VC, Vignani AG, Gonçalves ES, Feltrin ABMC. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. *Infect Dis* 2009; 8(1): 140-49.
36. Catherine MN Croagh, Paul V Desmond, and Sally J Bell. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance *World J Hepatol* 2015; 7(3): 289–93
37. Rodríguez Lay LA, Corredor MB, Villalba MC, Frometa SS, Wong MS, Valdes L *et al.* Genetic Diversity of the Hepatitis B Virus Strains in Cuba: Absence of West-African Genotypes despite the Transatlantic Slave Trade. *Plos One* 2015; 10 (5)
38. Bertolini, D.A., Pinho, J.R., Saraceni, C.P., Moreira, R.C., Granato, C.F, Carrilho, F.J. Prevalence of serological markers of hepatitis B virus in pregnant women from Parana State, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res* 2006; 39(8): 1083–90
39. Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatol. Res* 2007; 37(s1): 20–26.
40. Silva, D.B.D.d. The Atlantic Slave Trade to Maranhão, 1680–1846: Volume, Routes and Organization. *Slavery & Abolit* 2008; 29 (4): 477-81.
41. Urone N, Di Marco V, Cacopardo B, Craxi A, Ferraro D. Impact of HBV genotypes A and D genetic variability on infection evolution. *Infection, Genetics and Evolution* 2015; 15(1): 178-85
42. Ozaras R, Inanc Balkan I, Yemisen M, Tabak F. Epidemiology of HBV subgenotypes D. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 2015; 39 (1): 28 – 37.

43. Chandra PK, Biswas S, Datta S, Banerjee A, Panigrahi R, Chakrabarti R *et al.* Subgenotypes of hepatitis B virus genotype D (D1, D2, D3 and D5) in India: differential pattern of mutations, liver injury and occult HBV infection, *Journal of Viral Hepatitis* 2009; 16 (10): 749 – 56.
44. Panigrahi R, Biswas A, Banerjee A, Singh SP, Panigrahi MK, Roque-Afonso AM *et al.* Subgenotype D5, BCP and MHR mutations in hepatic complications among hepatitis B virus infected patients from Orissa, India. *Infection, Genetics and Evolution* 2012; 12 (8): 1622 – 31.
45. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepatol* 1999; 6 (4): 299 – 304.
46. Ribeiro NRC, Campos GS, Angelo ALD, Braga EL, Santana N, Soares MMS *et al.* Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. *Liver international* 2006; 26 (6): 636 – 42.
47. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F<sup>1</sup>. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (23):7152-68.

TABLE 1. Description of hepatitis B chronic carriers: demographic and clinical data, Center of Liver Studies (n=101), HUUFMA. Sao Luis, MA, 2014.

<b>CHARACTERISTICS</b>		<b>N (%)</b>
<b>Age (years)(13-78)</b>	41±11	
<b>Gender</b>	Male	50 (49.5%)
	Female	51 (51.5%)
<b>HBV genotypes</b>	A1	68 (63%)
	D2	1 (1%)
	D3	2 (2%)
	D4	26 (26%)
	F2a	4 (4%)
<b>HBeAg</b>	Positive	15 (15)
	Negative	86 (85)
<b>Clinical presentation</b>	Inative carriers	48 (49%)
	Chronic Hepatitis	32 (33%)
	Immune tolerant	07 (4.6%)
	Cirrhosis	14 (14.4%)

TABLE 2 – Comparison of demographic and clinical characteristics, genotypes A1 and D, Center of Liver Studies, HUUFMA. Sao Luis, MA, 2014.

<b>CHARACTERISTICS</b>	<b>GEN A (n=68)</b>	<b>GEN D (n=29)</b>	<b>P Value</b>
<b>Gender (Male)</b>	37(54%)	10(34%)	0.07
<b>Age (years)</b>	42±11	39±13	0.26
<b>HBeAg positive</b>	7(10%)	8(28%)	0.03
<b>Inactive</b>	31 (45%)	13 (44%)	0.70
<b>Chronic hepatitis</b>	26(38%)	6 (21%)	0.09
<b>Cirrhosis of the Liver</b>	10(15%)	4(14%)	0.50
<b>Immune tolerant</b>	1(1.5%)	6(21,5%)	0.006

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a influência do genótipo do HBV nas manifestações clínicas de pacientes portadores crônicos da infecção. Para isso, identificamos, acompanhamos e comparamos dados de pacientes com diferentes genótipos a fim de buscar associações que pudessem sugerir justificativas para as diferenças na evolução clínica dos grupos genotípicos.

Evidenciamos que o genótipo D esteve mais associado à fase de imunotolerância da Hepatite B quando comparado ao genótipo A1. Como não houve diferença em relação à idade dos pacientes nos dois grupos (A1 e D), é possível que o genótipo D (subgenótipo D4) esteja realmente associado a uma resposta imune mais tardia e conseqüentemente pode estar relacionado com maior frequência de transmissão perinatal, já que mulheres em idade fértil e portadoras desse genótipo nesta situação teriam maior chance de transmissão para seus filhos durante o parto.

Outro aspecto importante no estudo foi a grande população de pacientes com subgenótipo D4 identificados e sua possível influência nos achados da pesquisa, já que se trata de um subgrupo de origem diferente dos demais do genótipo D já descritos, principalmente na Europa e Ásia.

Nossos achados podem ajudar a subsidiar novos estudos no âmbito das hepatites virais envolvendo os genótipos mais frequentes em nossa região para que outras associações sejam verificadas e estabelecidas. Assim, informações sobre a importância clínica dos genótipos do HBV poderão ser utilizadas para definição de novas estratégias de intervenção e prognóstico.

## APENDICE

### IDENTIFICAÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_  
 Nasc. \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_ Naturalidade \_\_\_\_\_  
 Estado civil \_\_\_\_\_ sexo \_\_\_\_\_ escolaridade \_\_\_\_\_

### DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Ocupação	Atual:	Trabalhou na saúde: S ( ) N ( )	
Sangue	Doador S ( ) N ( ) 1ª vez	Doações/ano:	Última aceita:
	Transfusão: S ( ) N ( )	Quando:	Motivo:
Drogas	Alcool: abstinência por toda vida ( ) abstinência há:	Consumo ativo ( ) Tempo de consumo:	
	Cerveja ( ) cachaça ( ) vinho ( ) uísque ( ) outro	Quantificação:	
	Ilícitas: N ( ) S ( ) Via: Ina: ( ) EV ( ) Quando:	Seringa própria: S ( ) N ( )	
Atividade sexual	Vida sexual: ativa ( ) inativa ( ) oligoativa ( )	Heterossexual ( ) Homo ( ) Bissexual ( )	
	Relação estável ( ) 1 parceiro ( ) mais de 1 parce. ( )	Promisc. sexual (> 3 parc. em 6 m) S ( ) N ( )	
	Preservativo: S ( ) N ( ) Extraconjugal ( ) às vezes	DST S ( ) N ( ) Qual e quando:	
Pérfuro cortantes	Cirurgia eletiva: S ( ) N ( )	Qual e quando:	
	Dentista: Extração ( ) Canal ( ) Outro ( ) Qual:	Quando: Dentista prático: S ( ) N ( )	
	Uso comum de alicates, barbeadores, navalhas, etc:	Em casa ( ) no salão/ barbearia ( ) Quando:	
	Acidentes com obj. pérfuro cortante: S ( ) N ( ) Quando:	Contato com sang. de outro: S ( ) N ( ) quando:	
	Injeções com seringa de vidro no passado: S ( ) N ( )	Acupuntura: S ( ) N ( )	
	Tatuagem: S ( ) N ( ) Quando:	Piercing: S ( ) N ( ) Quando:	
Antec. Pessoal	(Especificar condição e tempo: medicamentos, doença, icterícia, hepatite, internações, etc)		



## ANEXO - 01

	<b>Universidade Federal do Maranhão</b> <b>Hospital Universitário</b> <b>Diretoria Adjunta de Ensino, Pesquisa e Extensão</b> <b>Comitê de Ética em Pesquisa</b>
---	---

<b>PARECER CONSUBSTANCIADO</b>  <b>Tese de Doutorado em Biotecnologia</b>	<b>Nº. do Parecer: 487/2007</b> <b>Nº do Protocolo: 33104-1065/2007</b> <b>Data de Entrada no CEP: 18/07/2007</b> <b>Data da Assembléia: 17/08/2007</b>
---	--

**I - Identificação:**

Título do projeto: Genotipagem do vírus da hepatite B em São Luís-Ma.		
Identificação do Pesquisador Responsável: Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira		
Identificação da Equipe executora: Lena Maria Barros Fonseca e Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira		
Instituição onde será realizado: Núcleo de Fígado do Hospital Universitário-UFMA		
Área temática: III	Multicêntrico: NÃO	Cooperação estrangeira: NÃO

**II – Objetivos:**

O presente projeto tem como objetivo principal caracterizar os genótipos do vírus da Hepatite B de portadores crônicos atendidos no núcleo de Fígado do Hospital Universitário-UFMA.

**III- Sumário do projeto:**

O protocolo de pesquisa é um projeto de tese de doutorado, estando estruturado da seguinte forma: resumo do projeto, justificativa do projeto, objetivos, metodologia e estratégias de ação, considerações éticas, agência financiadora, resultados esperados, avaliação crítica e risco em relação ao objetivo final.

No projeto, é apresentada uma exposição conceitual de Hepatite B, como também uma justificativa para o estudo do tema.

Conforme descrito na metodologia, a população em estudo será constituída por todos os indivíduos atendidos no núcleo de Fígado do Hospital Universitário-UFMA, no período da pesquisa. Posteriormente, será calculado o tamanho da amostra, assumindo um erro amostral de 5% e prevalência de infecção crônica de 1%. Não é apresentada a análise estatística dos dados.

No item FINANCIAMENTO E EXECUÇÃO consta que todas as despesas serão subsidiadas pela UFMA, por meio do Laboratório de Estudo Genômicos e de histocompatibilidade Hospital Universitário-UFMA.

**IV- Comentários frente à resolução 196/96 CNS e complementares:**

Levando-se em consideração o que preconiza a resolução 196/96 do CNS, pode-se dizer que o projeto possui relevância científica, que visa assegurar benefícios para a melhoria das condições de saúde da população alvo (III. 3, n.o, Lei 8080/90); conta com os recursos humanos necessários, bem como há competência do pesquisador com o projeto proposto (III.3, h).

No cronograma, não é especificado o mês que a coleta de dados será iniciada. Também não foi especificada a equipe executora do projeto. Falta o currículo Lattes da co-orientadora.

No termo de consentimento Livre e Esclarecido, observa-se alguns termos técnicos, não foram especificados os benefícios diretos da participação da pesquisa e a forma de seguro que cobrirá os danos previstos, o endereço do CEP-HUUFMA. É necessário assegurar explicitamente o retorno dos benefícios para os sujeitos envolvidos, conforme preconiza a resolução 196/96-III.3.m.n, seja na forma de assistência, seja na posse dos resultados dos exames, etc, bem como, que os resultados da pesquisa serão usados unicamente para fins científicos (Res 196/96-IV.3.f).

**V – Pendências:**

As pendências foram supridas, tendo importância social e atendendo aos princípios de ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

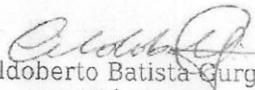
**VI – Recomendações:**

Não há recomendações a serem feitas para esse protocolo.

**VII - Parecer Consubstanciado do CEP:**

Diante do exposto, o protocolo 33104-1065/07, referente à tese de doutorado sob o título influência da Genotipagem do vírus da hepatite B em São Luis-Ma. é considerado: **APROVADO**  
Relatórios parciais (um por ano) devem ser apresentados ao CEP-HUUFMA, sendo o primeiro para 09/10/2008, ou se houver algum evento adverso, emenda ou alteração no protocolo. O relatório final deve ser entregue, acompanhado de cópia do trabalho final gravado em CD RO.

São Luís, MA, 09 de outubro de 2007.

  
Wildoberto Batista Gurgel  
Filósofo  
Coordenador do CEP-HUUFMA  
*Ethica homini habitat est*

**ANEXO – 02****INSTRUCTIONS TO AUTHORS – ANNAIS OF HEPATOLOGY****ORGANIZATION OF THE MANUSCRIPT**

Manuscripts describing original research should contain (in this order) a title page, a footnote page, an abstract, an introductory statement (without heading), a description of experimental procedures or methods, the results, a discussion and, on separate pages, a list of references, figure legends, and tables.

Authors have the option of combining the results and discussion and are encouraged to do so for short manuscripts.

All manuscripts should be double-spaced throughout, including the footnote page, list of references, figure legends, and tables. All pages must be numbered in the upper righthand corner, starting with the title page.

Original manuscripts must be no longer than 4,000 words (excluding references) and include no more than 50 references.

Manuscripts that are redundant or contain extraneous material will be returned for shortening, even if otherwise acceptable.

Concise Reviews should be no longer than 3,500 words and the reference list need not be exhaustive. It is expected that submitted Case Reports will include a detailed analysis of the case and a review of the available literature.

Only those case reports which are truly original and are likely to significantly influence medical practice are likely to be considered for publication. Others may be considered for publication in an abbreviated form as a letter to the editor. Letters to the editor which comment on articles recently published in THE ANNALS OF HEPATOLOGY are invited.

Brief case reports or new findings may also be submitted and include a single supporting illustration. Letters should be double-spaced and no longer than 500 words (including references) and include no more than 10 references and one figure.

**TITLE PAGE**

Provide a concise title of not more than 100 characters, not including spaces between words. In the case of work with experimental animals, indicate the species used. List the full names of the author(s). Indicate the institutional affiliation. In a multi-authored work involving more than a single institution, indicate individual affiliation by means of a superscript Arabic number. Any change in authorship after submission must be approved in writing by all authors. Indicate a change of address similarly. Provide a list of up to 5 key words that do not appear in the title itself.

## **FOOTNOTE PAGE**

List footnotes to the title page. Provide the contact information for the author to whom proofs should be sent (name, address, telephone number, fax number, and e-mail address). List abbreviations used with the expansions in the order of ge.

## **ABSTRACT**

Abstracts should be continuous text organized as background and rationale for the study, main results, and conclusions. The total length should not exceed 250 words. The last section of the abstract should start with "In conclusion."

## **INTRODUCTION**

Provide the minimum background information that will orient the general reader. Do not engage in a literature review.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Present the major findings of the study in graphic form if practicable. Do not illustrate minor details if their message is conveyed adequately by simple descriptive text. Mention all tables and figures. In the discussion, concisely present the implications of the new findings for the field as a whole, minimizing reiteration of the results, avoiding repetition of material in the introduction, and keeping a close focus on the specific topic of the paper.

## **ACKNOWLEDGMENT**

Acknowledge personal assistance and providers of special reagents. Note that grant and other financial support is listed on the footnote page, not here.

## **REFERENCES**

Number references in the order cited as Arabic numerals in parentheses on the line. Only literature that is published or in press (with the name of the publication known) may be numbered and listed; abstracts and letters to the editor may be cited, but they must be less than 3 years old and identified as such. Refer to only in the text, in parentheses, other material (manuscript submitted, unpublished data, personal communication, and the like) as in the following example: (Chercheur X, unpublished data). If the owner of the unpublished data or personal communication is not an author of the manuscript under review, a signed statement is required verifying the accuracy of the attributed information and agreement to its publication. Do not use Endnote or other word processing tools that may embed references in code. Type reference numbers in parentheses within the text and type out the reference list as normal text at the end of the manuscript. Use Index Medicus as the style guide for references and other journal abbreviations. List all authors up to seven, using seven and "et al." when the number is greater than seven.

## **ARTICLES IN JOURNALS**

1. Miquel JF, Covarrubias C, Villaroel L, Mingrone G, Greco AV, Puglielli L, Carvallo P, et al . Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among

Chilean Hispanics, Amerindians, and Maoris. *Gastroenterology* 1998; 115: 937-46.

## **BOOKS**

2. Watson JD. *The Double Helix*. New York: Atheneum; 1968, p. 1-6.

### **Book chapters**

3. Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in health and disease. In: Sleisinger MH, Fordtran JS (eds.). *Gastrointestinal Disease*. Volume 1. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1993, p. 127-50.

## **FILE ORGANIZATION AND FORMATTING**

Most word-processing formats are acceptable (Microsoft Word, Word Perfect); Microsoft Word is preferred. If the program used is non-standard, the material should be provide also in text format on a separate disk, marked as "a text file". Typographical formatting (column widths, type style, etc.) will be handled by the publisher. Do not use this type of formatting. Editorial formatting (use of italics, superscripts, Greek letter, etc.) may be included in the disk file. The coding scheme for such elements must be consistent throughout the file.

**Text Style.** Type text flush left (do not indent paragraphs).

Use two carriage returns at the end of a paragraph to separate it from the one that follows. Enter only one space between words and after sentences. Use 1 carriage return ("hard return") only after a heading and use 2 carriage returns at the end of a paragraph. Allow line breaks within a paragraph to be determined automatically by the word-processing program. If it is necessary to force the end of a line within a paragraph, use the program's "soft return" feature. Do not use the program's indenting or margin-setting features (These will be added during typesetting)