

GIOVANA PAULA ANGELICE

Análise da variabilidade genética do vírus da hepatite B em portadores em diferentes estágios da infecção



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2019

Trabalho realizado no Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob a orientação da Dra. Bárbara Vieira do Lago e coorientação do Dr. Francisco Campello do Amaral Mello.

CIP - Catalogação na Publicação

A582 a Angelice, Giovana
Análise da variabilidade genética do vírus da
hepatite B em portadores em diferentes estágios da
infecção / Giovana Angelice. -- Rio de Janeiro,
2019.
69 f.

Orientadora: Barbara Lago.
Coorientador: Francisco Mello.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. Vírus da hepatite B. 2. Quadros clínicos. 3.
Variabilidade genética. I. Lago, Barbara, orient.
II. Mello, Francisco, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Giovana Paula Angelice**

DRE: 116053923

BANCA EXAMINADORA: Profa. Renata Campos Azevedo (Presidente)
 Profa. Gabriella da Silva Mendes
 Dr. Átila Duque Rossi
 Dra. Caroline Cordeiro Soares (Suplente)


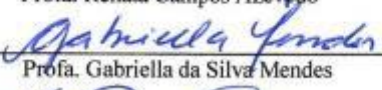
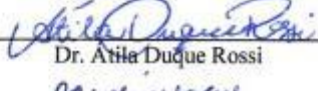
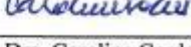
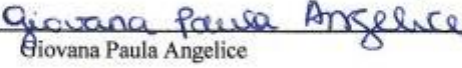


Título da Monografia: **“Análise da variabilidade genética de portadores do vírus da hepatite B em diferentes estágios da infecção”**

Local: **Sala I0-57 / Departamento de Virologia / IMPPG / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **09 de dezembro de 2019 às 13:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 09 de Dezembro de 2019.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10</u>	 _____ Profa. Renata Campos Azevedo
<u>10</u>	 _____ Profa. Gabriella da Silva Mendes
<u>10</u>	 _____ Dr. Átila Duque Rossi
<u>10</u>	 _____ Dra. Caroline Cordeiro Soares
Aluno:	 _____ Giovana Paula Angelice
Orientador:	 _____ Profa. Bárbara Vieira do Lago
Coorientador:	_____ Francisco Campello do Amaral Mello
Coordenador de TCC	 _____ Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

À minha família, Rosana, Orlando e Raphael.

... e àquela sempre presente em pensamento, minha avó, Maria Emília.

Eu nada seria se não fossem vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos que me deram o dom da vida, meus pais, Orlando e Rosana. Obrigada por toda a dedicação ao longo destes 21 anos. Sempre serei grata por terem feito o possível e o impossível para me proporcionarem uma educação de qualidade. A melhor herança que eu poderia receber é a educação. Espero poder retribuí-los através do meu empenho e dos bons resultados ao longo da carreira que escolhi seguir.

Agradeço à minha eterna criança, meu irmão Raphael. Talvez a pessoa com quem mais aprendo sobre a vida. Sou muito feliz por dividir a casa, os pais, o Tico, os colégios, os gostos e a criação com você. Obrigada por tornar os dias estressantes mais leves e prazerosos com o seu espírito divertido. Eu não poderia ter um companheiro melhor para trilhar ao meu lado.

Agradeço aos meus avós por terem proporcionado as minhas melhores lembranças da infância. À minha avó Maria Emília não tenho palavras que externem a gratidão por tanto. Dedico tudo que sou hoje e tudo que ainda me tornarei à senhora. Ao meu avô Archimedes, obrigada por me ensinar a andar de bicicleta, por me fazer companhia nos momentos de espera antes da praia de Ibicuí, pelas piadas nos fins de tarde e por fazer os melhores sucos de laranja, tão doces quanto nossas lembranças. À minha avó Irani, obrigada por todas as notas de vinte reais e por me ensinar a cuidar do jardim de Mangaratiba com tanto zelo.

Agradeço ao Fábio pelas enormes ajudas ao longo dos anos de faculdade. Desejo que essa parceria dure até depois dos nossos dias como professores pesquisadores. Seus conselhos e ensinamentos foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui. A minha conquista também é fruto do seu amor e empenho para comigo. Aonde estiver, saiba que alguém se espelha no profissional que está se tornando.

Agradeço em especial à melhor orientadora que eu poderia ter, Babi. Obrigada pela paciência, calma, compreensão e amizade ao longo da confecção desta dissertação. Agradeço também ao meu co orientador, Chico por todo o apoio e conhecimento transmitido. Obrigada por me mostrarem com tanta clareza a importância de nós, pesquisadores, para a sociedade. Sou grata pela confiança e pelas oportunidades que ambos têm me proporcionado.

Agradeço aos integrantes do LAHEP e do Ambulatório de Hepatites Virais, por me acolherem tão bem, pela boa convivência e pela aprendizagem diária. Em especial à minha equipe, composta por Vanessa, Tairine, Vinícius e Krishna, pelos experimentos e alegrias compartilhados.

Agradeço aos que tornaram os dias na universidade mais leves. Aos amigos e colegas do LARIV que acompanharam meus primeiros passos na ciência, Camila, Mariana, Daniel, Rômulo e Iranaia por ter proporcionado estes encontros. À minha dupla de CEGRIM e das diversas outras aventuras universitárias, André.

Agradeço aos amigos do Colégio Pedro II, Roberta, Nathália, Flávia, Clara, André, Victor, dentre tantos outros que estiveram ao meu lado nos momentos de alegria e tristeza, mas sempre de aprendizagem, desde a pré-adolescência. Obrigada por me aceitarem como fui ao longo das minhas diferentes fases durante esses anos. A distância nunca irá apagar as lembranças da nossa convivência diária. Quero sempre acompanhar de perto a evolução e o sucesso de cada um de vocês.

Obrigada aos que, de alguma forma, contribuíram para a minha evolução pessoal. Aos tios, primos e todos os meus familiares, das famílias Angelice, Paula e Pedrosa. Aos professores que se empenharam na minha formação desde o jardim de infância até a faculdade.

Agradeço ao CNPq e ao Ministério da Saúde, que possibilitaram a realização deste trabalho e as demais publicações do nosso grupo.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento”

– Albert Einstein.

RESUMO

Giovana Paula Angelice

Análise da variabilidade genética de portadores do vírus da hepatite B em diferentes estágios da infecção.

Orientadora: Bárbara Vieira do Lago

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus da hepatite B (HBV) é classificado em 10 genótipos (A-J), os quais possuem distribuição geográfica distinta e causam diferentes impactos na progressão clínica e na resposta ao tratamento. Estima-se que existam cerca de 257 milhões de portadores crônicos da doença em risco de desenvolvimento de cirrose e hepatocarcinoma. Para um melhor monitoramento desse agravo, é necessário investigar as diferenças na variabilidade genética do HBV circulante em pacientes com diferentes quadros clínicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a variabilidade genética e os genótipos do HBV circulantes em indivíduos agudos e crônicos atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais (AHV), FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Para isso, 90 amostras de soro de portadores agudos e crônicos do HBV atendidos entre os anos de 2014 e 2018 foram selecionadas para o estudo. As amostras de soro foram submetidas à extração de ácidos nucleicos e amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tendo como alvo a região sobreposta dos genes codificantes do envelope (S) e da polimerase viral (P). Os produtos da PCR foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger com posterior realização de análise filogenética. O DNA do HBV foi detectado em 54/90 (60%) amostras. No total, 20 amostras correspondentes a indivíduos com hepatite B crônica e 34 correspondentes a indivíduos com hepatite B aguda (12 que tiveram resolução espontânea e 22 evoluíram para a cronicidade) foram obtidas. Das 54 amostras amplificadas, 34 foram sequenciadas até o momento (62,9%), sendo 14 (41,2%) delas correspondentes a pacientes em estado crônico e 20 (58,8%) correspondentes a pacientes em estado agudo. O resultado do sequenciamento do HBV detectou a circulação dos subgenótipos A1, A2, D3, F1 e F2, prevalentes no Brasil, além dos genótipos importados C e E. De um modo geral, não houve diferenças na variabilidade genética e circulação genotípica do HBV entre agudos e crônicos, nem entre os pacientes com diferentes desfechos do quadro agudo (cura funcional ou evolução para doença crônica). Este estudo permitiu identificar a diversidade genética do HBV circulante entre 2014 e 2018 entre pacientes com diferentes quadros clínicos no Rio de Janeiro, bem como a introdução de variantes virais importadas.

Palavras-chave: vírus da hepatite B, quadros clínicos, variabilidade genética.

ABSTRACT

Giovana Paula Angelice

Analysis of genetic variability of hepatitis B virus carriers at different stages of infection.

Orientadora: Bárbara Vieira do Lago

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Hepatitis B virus (HBV) is classified into 10 genotypes (A-J), which have distinct geographic distribution, different clinical outcomes and treatment response. It is estimated that about 257 million chronic carriers are at risk of developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma. For a better monitoring of this condition, it is necessary to investigate the differences in the genetic variation of HBV circulating strains in patients with different clinical conditions. The aim of this study was to evaluate the genetic variability and circulating HBV genotypes in acute and chronic patients treated at the Viral Hepatitis Ambulatory (AHV), Fiocruz, Rio de Janeiro. For this, 90 serum samples from acute and chronic HBV carriers between 2014 and 2018 were selected for this study. Serum samples were subjected to nucleic extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification, targeting envelope (S) and viral polymerase (P) overlapped regions. PCR products were submitted to nucleotide sequencing by Sanger method and phylogenetic analysis. HBV-DNA was detected in 54/90 (60%) samples. From them, 20 chronic hepatitis B and 34 acute hepatitis B isolates (12 with spontaneous resolution and 22 that evolved to chronicity) were obtained. Of the 54 amplified samples, 34 were successfully sequenced (63%), from which 14 (41%) corresponding to chronic patients and 20 (59%) corresponding to acute patients. The HBV sequencing analysis detected the circulation of A1, A2, D3, F1 and F2 Brazilian subgenotypes, besides the imported genotypes C and E. Overall, there were no differences in the genetic variability of HBV between acute and chronic, nor among patients with different acute outcomes (viral clearance or progression to chronic disease). This study identified the genetic diversity of HBV strains circulating between 2014 and 2018 among patients with different clinical conditions in Rio de Janeiro, as well as the introduction of imported viral variants.

Key-words: hepatitis B virus, clinical conditions, genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Partículas infecciosas e não infecciosas do HBV.....	4
Figura 2 - Representação esquemática do HBV.....	5
Figura 3 - Modelo esquemático do genoma do HBV.....	6
Figura 4 – Distribuição genotípica do HBV nos estados brasileiros.....	12
Figura 5 - Distribuição global da hepatite B crônica.....	13
Figura 6 - Modelo esquemático do ciclo replicativo do HBV.....	15
Figura 7 - Progressão e possíveis desfechos da hepatite B.....	19
Figura 8 -Biomarcadores da infecção aguda pelo HBV.....	21
Figura 9 - Biomarcadores da infecção crônica pelo HBV.....	22
Figura 10 - Taxa de detecção de hepatite B, segundo ano e região.....	25
Figura 11 - Quadro mostrando a relação de primers para o HBV utilizados nas reações de PCR e sequenciamento de Sanger.....	33
Figura 12 - Representação do perfil eletroforético, em gel de agarose, dos produtos amplificados pela PCR da região sobreposta do envelope viral (S) e da polimerase em pacientes crônicos.....	35
Figura 13 - Representação do perfil eletroforético, em gel de agarose, dos produtos amplificados pela PCR da região sobreposta do envelope viral (S) e da polimerase em pacientes agudos.....	36
Figura 14 - Árvore filogenética referente à região parcial S/Pol do genoma do HBV (~900 pb).....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Subgenótipos, subtipos e distribuição geográfica do HBV. Correlação entre o tamanho do genoma e a origem geográfica entre os diferentes subtipos e subgenótipos virais	10
Tabela 2- Características dos pacientes com hepatite B selecionados para o estudo e que tiveram suas amostras amplificadas com sucesso por PCR.	344
Tabela 3- Características dos pacientes com hepatite B selecionados para o estudo e que não tiveram suas amostras amplificadas por PCR.	355
Tabela 4 - Perfil genotípico e subgenotípico dos pacientes com hepatite B que tiveram suas amostras amplificadas por PCR.....	38

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Definição de hepatite	1
1.2	Hepatites virais	1
1.3	Histórico	2
1.4	O vírus da hepatite B (HBV).....	3
1.4.1	Classificação e morfologia.....	3
1.4.2	Organização do genoma viral.....	6
1.4.3	Variabilidade do HBV	9
1.4.4	Genótipos do HBV e sua distribuição geográfica	11
1.4.5	Replicação do HBV	15
1.5	Infecção pelo HBV	17
1.5.1	Transmissão do HBV.....	17
1.5.2	Manifestações clínicas	18
1.5.3	Patogênese da hepatite B.....	19
1.5.4	Perfil sorológico e diagnóstico da hepatite B.....	20
1.6	Tratamento e controle da hepatite B	22
1.7	Epidemiologia da infecção pelo HBV	23
1.7.1	Prevalência da infecção no mundo	23
1.7.2	Prevalência da infecção no Brasil.....	24
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	Amostragem	30
4.2	Extração dos ácidos nucleicos virais	30
4.3	Detecção do DNA do HBV através da amplificação por Semi Nested-PCR.....	30
4.4	Visualização dos produtos amplificados (eletroforese em gel de agarose a 1,5%)...	31
4.5	Purificação e quantificação dos produtos de PCR.....	32
4.6	Sequenciamento nucleotídico	32
4.7	Montagem e alinhamento de sequências.....	33

4.8	Análise de sequências e genotipagem do HBV por análise filogenética	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1	Triagem de amostras sorológicas.....	34
5.2	Detecção do DNA do HBV nas amostras de pacientes com hepatite B	35
5.3	Determinação dos genótipos do HBV.....	37
6	DISCUSSÃO.....	39
7	CONCLUSÕES	44
8	PERSPECTIVAS	44
9	OUTRAS ATIVIDADES.....	45
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição de hepatite

O fígado, maior órgão interno do corpo humano, realiza aproximadamente 5 mil funções vitais. Ele é composto principalmente por hepatócitos, células responsáveis pela maioria de suas atividades. Estas células atuam na produção de bile, importante componente do processo digestivo, de hormônios, proteínas e enzimas que controlam a homeostase. Também participam da síntese de componentes sanguíneos e fatores de coagulação, na decomposição de colesterol, manutenção do açúcar no sangue e no metabolismo de medicamentos (Schinoni e Isabel, 2008).

A hepatite consiste na inflamação do tecido hepático capaz de levar a danos nas células do fígado. Apesar de os vírus das hepatites A (Aggarwal e Goel, 2015), B, C (Te e Jensen, 2010), D (Rizzetto e Ciancio, 2012) e E (Khuroo, Khuroo e Khuroo, 2016), Epstein-Barr, citomegalovírus (Leonardsson *et al.*, 2017), dentre outros, serem os principais agentes etiológicos desse processo, eles não são os únicos. Outras doenças infecciosas, como leptospirose (Hamond *et al.*, 2019), febre tifoide (Vajpayee, Gupta e Gupta, 2017), sífilis (causadas por bactérias) (Huang *et al.*, 2018) e esquistossomose (causada por um parasita) (Genaro, Brener e Coelho, 1986; Serufo e Lambertucci, 2007) também podem levar à hepatite.

Além disso, fatores não infecciosos, como distúrbios metabólicos (doença de Wilson, hemossiderose e hemocromatose), hepatite autoimune, hepatite pós-choque e o consumo prolongado de determinados fármacos (anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, sulfas, derivados imidazólicos, hormônios tireoidianos, anticoncepcionais), também estão associados a essa enfermidade (Van Damme e Vellinga, 1998; WHO, 2004a; CDC, 2009).

1.2 Hepatites virais

As hepatites virais são classificadas em dois grupos de acordo com sua principal forma de transmissão: sanguíneas e entéricas (WHO, 2004a; WHO, 2004b; CDC, 2009). As hepatites sanguíneas são causadas pelos vírus dos tipos B, C e D, podendo evoluir para um quadro crônico e até manifestações mais graves, como cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC, do inglês, *hepatocellular carcinoma*). Já as hepatites entéricas, representadas pelos tipos A e E, apresentam, na maioria das vezes, um perfil agudo autolimitado (Van Damme e Vellinga, 1998).

1.3 Histórico

A história das hepatites virais remonta a milênios. A literatura chinesa possui relatos de icterícia na sua população há mais de 5.000 anos (da Fonseca, 2010). No Tamul da Babilônia, a icterícia como manifestação cutânea já era associada a epidemias, bem como antes do início da era cristã. Em 400 a.C. ela foi descrita pelo médico e filósofo grego Hipócrates (Sherlock, 1987), porém, apenas no século XIX foi feita a associação da doença a um agente de transmissão parenteral (da Fonseca, 2010 apud Lurman, 1885).

Lurman foi responsável por documentar o primeiro caso de hepatite sérica em 1883, na Alemanha, após injetar vacina antivariólica estabilizada com soro humano em 1289 empregados de um estaleiro. Após oito meses da injeção, 191 destes funcionários, os quais foram inoculados com o mesmo lote, tornaram-se ictericos. A doença foi diagnosticada como “hepatite do soro” (Lurman, 1885 apud Gardner, 1950).

Antes da associação da doença à sua transmissão, a icterícia epidêmica transcorreu séculos. Ela foi marcante nos cenários de guerra e catástrofes humanas, sobretudo na Idade Média quando as condições sócio-higiênicas eram precárias (da Fonseca, 2010).

Na Guerra da Secessão Americana, (1861-65) em torno de 40 mil oficiais do exército foram acometidos. Durante a Segunda Guerra mundial, estima-se que cerca de 16 milhões de indivíduos tenham adquirido a enfermidade (da Fonseca, 2010). Acredita-se que grande parte destes casos tenha ocorrido devido ao desconhecimento acerca dos fatores de risco envolvidos na transmissão fecal-oral das hepatites virais epidêmicas.

Atualmente, já foram descritos diversos vírus hepatotrópicos. O vírus da hepatite B (HBV) foi o primeiro a ser identificado. Em seguida foram descritos o vírus da hepatite A (HAV) (Feinstone, Kapikian e Purceli, 1973), vírus da hepatite D (HDV) (Rizzetto *et al.*, 1977), vírus da hepatite E (HEV) (Balayan *et al.*, 1983) e vírus da hepatite C (HCV) (Choo *et al.*, 1989).

O HBV foi descoberto em 1965, por Baruch Blumberg. Ao analisar o soro de um aborígine australiano, Blumberg notou a presença de um antígeno reagente ao soro de dois pacientes hemofílicos, a que foi atribuído o nome de “antígeno Austrália” (AgAu) (Blumberg *et al.*, 1967). Mais tarde o AgAu veio a se chamar HBsAg (antígeno de superfície do HBV). Posteriormente, a partícula completa do HBV foi isolada do soro de pacientes portadores do AgAu, caracterizada por microscopia eletrônica e denominada “partícula de Dane” (Dane, Cameron e Briggs, 1970).

1.4 O vírus da hepatite B (HBV)

1.4.1 Classificação e morfologia

O HBV pertence à família *Hepadnaviridae*, a qual é subdividida nos gêneros *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus*, capazes de infectar mamíferos e aves respectivamente (Blumberg, Alter e Visnich, 1965; Dane, Cameron e Briggs, 1970; Magnius e Norder, 1995; Yang *et al.*, 2007; Patient, Hourieux e Roingeard, 2009; Wei *et al.*, 2010; Grimm, Thimme e Blum, 2011).

A família *Hepadnaviridae* é subdividida nos gêneros *Orthohepadnavirus* (contempla vírus que possuem mamíferos como hospedeiros) e *Avihepadnavirus* (contempla vírus que têm as aves como hospedeiros). Os *Orthohepadnavirus* (no qual se insere o HBV) podem infectar, além de humanos, marmotas (Summers, Smolec e Snyder, 1978), esquilos (Marion *et al.*, 1980) e primatas não humanos (Vaudin *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 2000; Robertson e Margolis, 2002). Os Hepadnavírus capazes de infectar patos (Mason *et al.*, 1982), garças (Sprengel, Kaleta e Will, 1988) e cegonhas (Pult *et al.*, 2001) são classificados como *Avihepadnavirus*.

As características estruturais do HBV foram primeiramente descritas por Blumberg e Beyer (Blumberg *et al.*, 1967; Beyer, Blumberg e Werner, 1968), através da análise do soro de um indivíduo positivo para o antígeno de superfície viral (HBsAg) pelo método de imunodifusão. Ao examinarem a amostra ao microscópio eletrônico, foram observadas partículas esféricas, de aproximadamente 22nm de diâmetro, e tubulares, de comprimento variável e 22nm de largura, as quais foram caracterizadas como envoltórios vazios e não infecciosos.

A existência de uma terceira configuração das partículas virais (“partículas de Dane”), de forma esférica e de aproximadamente 42nm de diâmetro, foi identificada em 1970 (Dane, Cameron e Briggs, 1970). Essas partículas possuem invólucro externo (correspondente ao HBsAg), um capsídeo icosaédrico compreendendo o material genético viral (Gerber *et al.*, 1974) e potencial infeccioso, diferentemente dos envoltórios encontrados anteriormente por Blumberg e Beyer (figura 1).

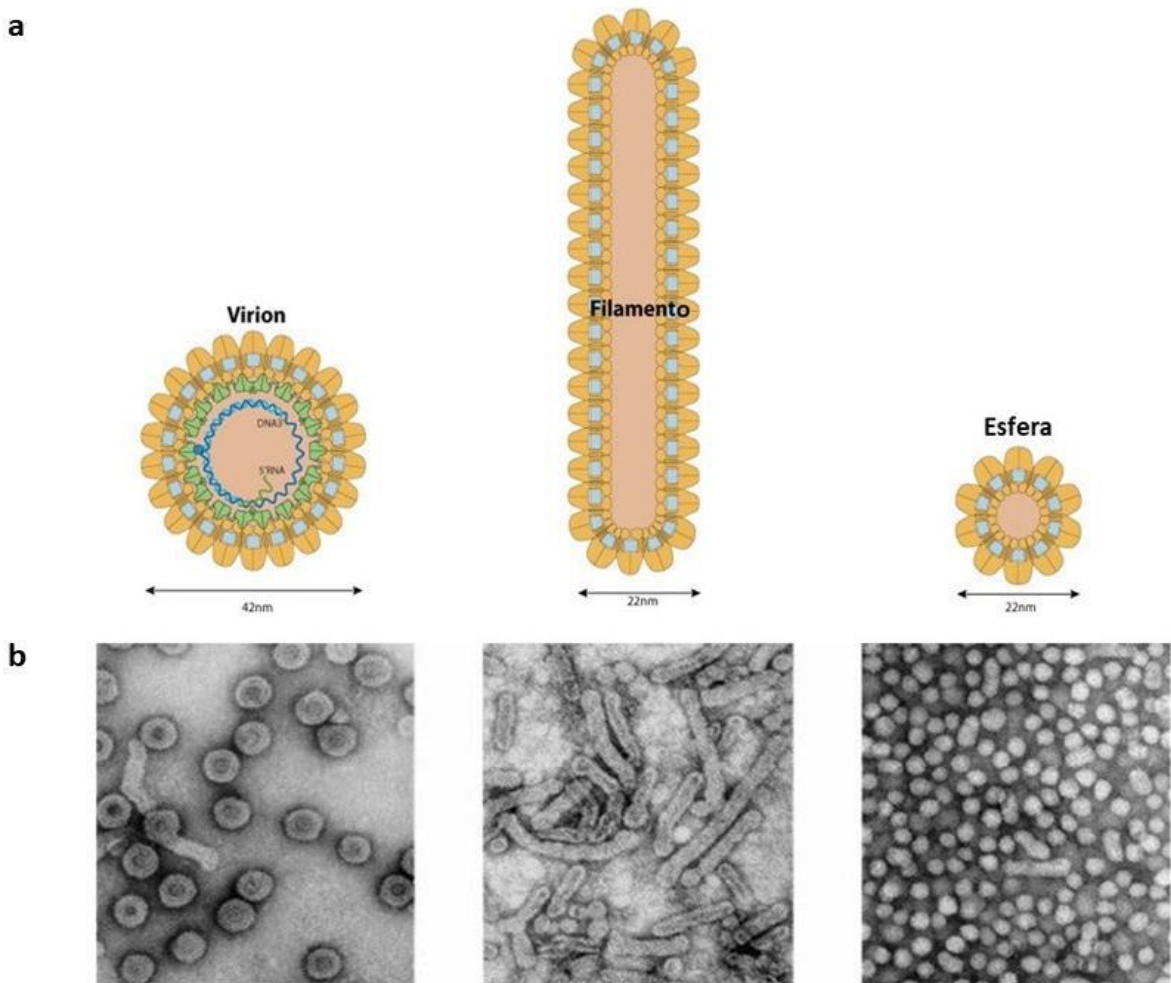


Figura 1 - Partículas infecciosas e não infecciosas do HBV. A- Representação esquemática das partículas infecciosas e não infecciosas. **B-** Imagens obtidas por microscopia eletrônica (Adaptado de Gerlich, 2013).
 Fonte: viralzone.expasy.org – HBV subviral particles.

As partículas incompletas, esféricas e filamentosas, são compostas exclusivamente pelo HBsAg e são encontradas em excesso (em torno de 10^{13} por mL) no soro de indivíduos infectados. Os vírions, por sua vez, apresentam envelope lipídico externo composto pelas glicoproteínas S (“small”), M (“middle”) e L (“large”), as quais constituem o HBsAg. Abaixo do envelope encontra-se o nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, de 42nm, formado pela proteína do core, o HBcAg. Dentro deste core estão dispostos o genoma viral e a DNA polimerase, que atua na replicação do vírus (figura 2) (Tiollais, Pourcel e Dejean, 1985).

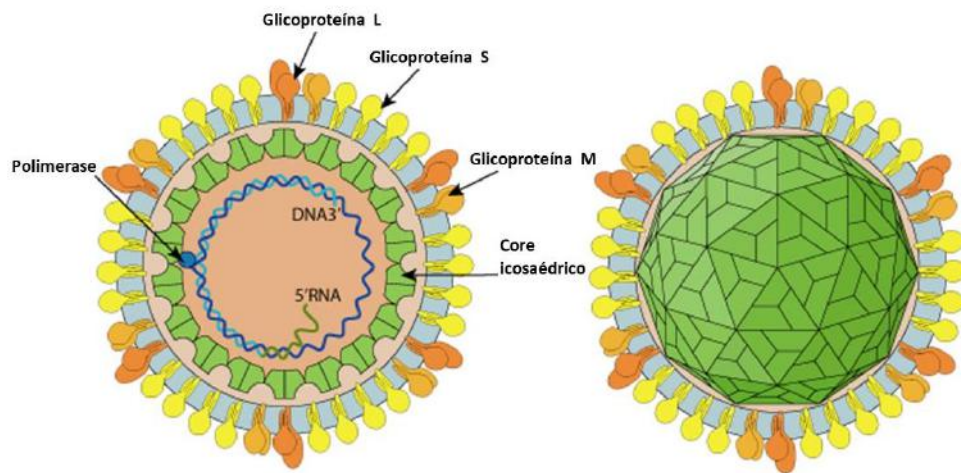


Figura 2 - Representação esquemática do HBV. Partícula viral icosaédrica, com aproximadamente 42nm de diâmetro. Nucleocapsídeo circundado por um envelope lipídico na qual são projetadas as glicoproteínas L, S e M. Fonte: viralzone.expasy.org – *Hepadnaviridae*.

1.4.2 Organização do genoma viral

O genoma do HBV é constituído por uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, *deoxyribonucleic acid*) circular, parcialmente dupla fita, com tamanho aproximado de 3.200 pares de base (pb), sendo um dos menores genomas dentre os vírus que infectam humanos (figura 3) (Ganem, 1996).

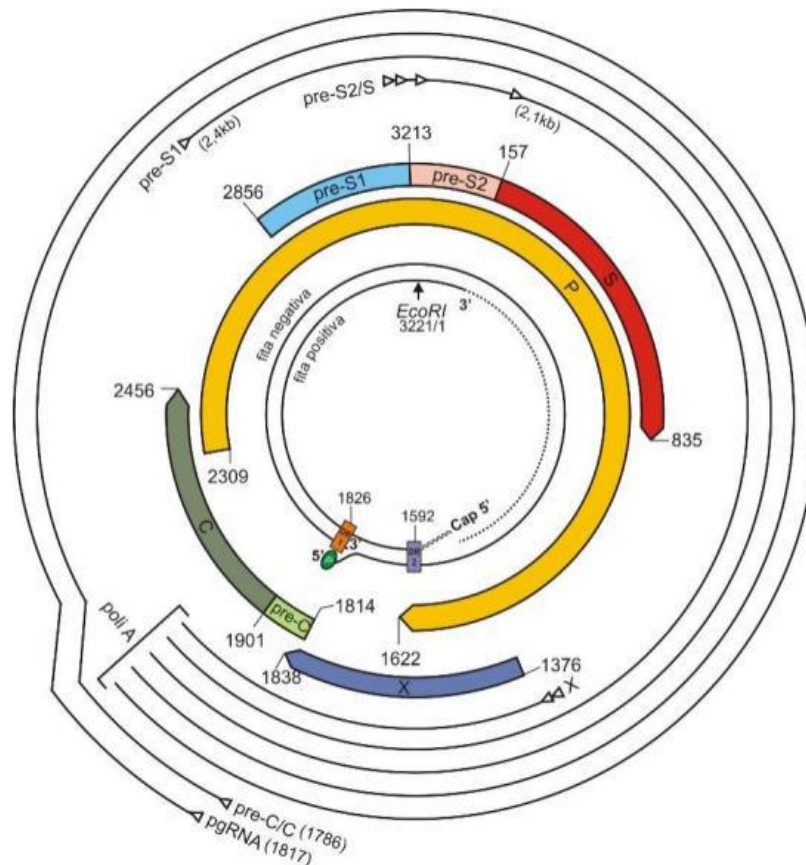


Figura 3 - Modelo esquemático do genoma do HBV (Gomes, 2003). As setas longas e coloridas simbolizam as diferentes ORFs existentes no HBV. Externamente às ORFs encontram-se os RNAs virais dispostos em semicírculos. O DNA circular parcialmente fita dupla é composto por uma fita negativa completa e uma fita positiva incompleta, é representado pelos semicírculos internos.

A fita de DNA mais extensa é complementar aos ácidos ribonucleicos (RNA, do inglês, *ribonucleic acid*) virais e tem polaridade negativa. A fita mais curta possui polaridade positiva, e sua extremidade 5' terminal é fixa, enquanto que a extremidade 3' terminal é variável. O comprimento da fita positiva pode variar de 50% a 90% do comprimento de sua fita complementar (Ganem, 1996).

Próximo à extremidade 5' dos dois segmentos do genoma, encontram-se pequenas sequências nucleotídicas importantes para o início da replicação viral. Estas sequências são

chamadas de "*direct repeats*" (DR1 e DR2) (Seeger, Ganem e Varmus, 1986; Lien *et al.*, 1987; Will *et al.*, 1987).

O HBV possui um genoma totalmente codificante, contendo quatro fases de leitura aberta (*open reading frames*, ORFs), codificadas pela fita longa de seu genoma. São elas pré-S/S, P, pré-C/C e X, as quais detêm ao menos uma região de sobreposição a outro gene, o que possibilita ao vírus codificar 50% mais proteínas do que seria esperado para o seu pequeno genoma. Quatro promotores e dois elementos potencializadores (*enhancers*), EnhI e EnhII, regulam a transcrição dos RNAs virais (Ganem e Varmus, 1987).

1.4.2.1 ORF pré-S/S

A ORF pré-S/S apresenta com três códons de iniciação na mesma fase de leitura. Ela é responsável por sintetizar as proteínas que compõem o HBsAg: L, M e S. A tradução a partir do 1º códon dá origem à proteína L *large* (400 aminoácidos (aa)) a tradução a partir do segundo códon origina a proteína M *middle* (281 aa) e do terceiro, a proteína S *small* (226 aa), a qual é codificada somente pela região S (Seeger e Mason, 2003).

As três proteínas não são distribuídas de maneira uniforme na superfície viral (Heermann *et al.*, 1984). Vírions possuem maiores quantidades de cadeias L em comparação às cadeias M e S em sua superfície, as quais contêm os sítios de ligação do HBV aos seus receptores específicos nos hepatócitos (Neurath *et al.*, 1986; Klingmüller e Schaller, 1993). Essa proporção aumentada permite que as partículas infecciosas se sobressaiam em relação às partículas incompletas na etapa de adsorção (Ganem, 1996).

1.4.2.2 ORF pré-C/C

A ORF pré-C/C é responsável pela síntese das proteínas HBcAg e HBeAg, visto que há dois códons de iniciação na mesma ORF. O HBcAg constitui o core viral, enquanto que o HBeAg é o marcador sorológico indicativo de replicação do HBV (Nassal e Rieger, 1993; Nassal e Schaller, 1996).

A proteína HBcAg sintetizada é composta por 185 aa, que quando aglutinada a outros monômeros iguais a ela, forma uma estrutura icosaédrica denominada cerne ou core viral (Nassal e Schaller, 1996).

O HBeAg é secretado no início da infecção aguda e durante etapas replicativas da infecção crônica. Sua conformação final contém 159 aa e é sintetizada a partir de um precursor composto por 214 aa. Do total de aminoácidos, 185 compõem o gene core e 29 compõem a região Pré-C. A sequência pré-core é capaz de translocar o HBeAg para o retículo

endoplasmático. É nesta organela que haverá processamento e clivagem do HBeAg em ambas as extremidades, a fim de gerar a proteína final de 159 aa (Nassal e Rieger, 1993).

1.4.2.3 ORF P

A ORF P codifica a enzima com atividade de DNA polimerase, transcriptase reversa e RNaseH. Ela é composta por 832 aa que constituem a ORF mais extensa do HBV. Sua sequência contempla cerca de 3/4 do genoma completo, e possui sobreposição com todos os demais genes (Thakur *et al.*, 2005).

Há 4 domínios na polimerase viral: o domínio amino-terminal, que atua como proteína terminal ou primase, importante para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa; região "espaçadora", cuja importância ainda não foi esclarecida; o domínio de transcriptase reversa, fundamental para a síntese de DNA a partir do RNA pré-genômico; e o domínio C-terminal, que atua como RNase H (Lai e Yuen, 2000).

O domínio transcriptase reversa possui o motivo Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD), essencial para a atividade de transcrição reversa. Há alta homologia entre todas as transcriptases reversas de diferentes vírus neste domínio, de modo que o tratamento para outros vírus pode acarretar na seleção de estirpes do HBV resistentes a fármacos que tenham ação sobre esse domínio (resistência cruzada), durante a terapia prolongada (Lai e Yuen, 2000).

1.4.2.4 ORF X

A ORF X sintetiza o antígeno HBx, proteína composta por 154 aa presente nos hepatócitos infectados (Seeger e Mason, 2003). O gene X está presente apenas no gênero *Orthohepadnavirus*, não estando presente nas linhagens infecciosas em aves, sugerindo que a ORF X não é essencial para os eventos de replicação e para a viabilidade do vírus.

Já foi atribuído o papel do HBx a mecanismos que afetam a replicação e a proliferação viral: regulação, atuação nos processos de transcrição, vias de sinalização, lise de proteínas e resposta celular a estresses (Murakami, 2001). Este antígeno também possui relação com inflamação e imunomodulação, pois quando presente em linhagens celulares de hepatoma humano induz a transcrição das citocinas TNF, IFN- α e IL-6 (Lara-pezzi *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 2017).

Outros estudos apontam a relação entre a hepatocarcinogênese e a expressão do HBx, através de: regulação da transcrição de genes específicos; integração do genoma do HBV nos

hepatócitos infectados; reparo do DNA, apoptose e interação com diferentes fatores do hospedeiro (Slagle *et al.*, 1996; Motavaf *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014).

1.4.3 Variabilidade do HBV

A taxa de mutações do HBV é considerada alta. Essas alterações costumam ocorrer no momento em que o genoma viral é convertido de DNA para RNA e vice-versa, uma vez que a transcriptase reversa empregada no processo replicativo não apresenta a função de edição de erros. As mutações são responsáveis pelo surgimento de pelo menos oito genótipos (com uma grande diversidade de subgenótipos) e nove subtipos (Kidd-Ijunggren, Miyakawa e Kidd, 2002), no entanto o HBV possui apenas um sorotipo (Pileggi *et al.*, 2017).

As 4 fases de leitura parcialmente sobrepostas presentes no genoma viral, no entanto, reduzem a chance de mutações, pois uma mutação silenciosa em alguma ORF poderia alterar o funcionamento da ORF sobreposta a ela, inviabilizando a formação do vírion (Kidd-Ijunggren, Miyakawa e Kidd, 2002).

Na década de 70 surgiram os primeiros relatos de variabilidade do HBV (Le Bouvier, 1971). Neles, dois determinantes antigênicos mutuamente exclusivos, d e y, foram identificados. Ambos os determinantes se localizam no HBsAg, e compartilham um epítipo conformacional: o determinante "a" (Levene e Blumberg, 1969).

No ano seguinte, os determinantes w e r foram descobertos (Bancroft, Mundon e Russell 1972). Dessa forma, observou-se que cada amostra do HBV poderia ser classificada como pertencente a um dos subtipos determinados. Nove subtipos foram descritos e classificados de acordo com 25 variações no antígeno de superfície viral: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adw2, adw4, ayr, adrq+ e adrq- (Couroucé-Pauty, Plançon e Soulier, 1983).

Em 1988, Okamoto e colaboradores compararam as sequências nucleotídicas completas de 18 cepas do HBV. Esse estudo deu origem à classificação dos primeiros genótipos do vírus. (Okamoto *et al.*, 1988). Desde então, foram identificados 10 genótipos (A-J) diferentes do HBV, apresentando uma distribuição geográfica característica (revisto em Kramvis, 2014).

A classificação é baseada nas sequências nucleotídicas da região genômica Pré-S/S ou do genoma viral completo (Norder *et al.*, 1992; Norder, Courouc e Magnius, 1994; Stuyver *et al.*, 2000; Arauz-Ruiz *et al.*, 2002). Alguns genótipos do HBV podem ainda possuir diferentes subgenótipos. A identidade entre as sequências do HBV divergem em torno de 8% entre genótipos, e entre seus subgenótipos, divergem 4% (Yano, Azuma e Hayashi, 2015) (tabela 1).

Tabela 1- Subgenótipos, subtipos e distribuição geográfica do HBV. Correlação entre o tamanho do genoma e a origem geográfica entre os diferentes subtipos e subgenótipos virais (adaptado de Zehender *et al.*, 2014).

Genótipo	Subgenótipo	Subtipo	Região endêmica	Genoma (pb)
A	A1 (Aa, A')	adw2, ayw1	África, Ásia, América do Sul	3221
	A2 (Ae, A-A')	adw2, ayw1	Norte da Europa, América do Norte, África do Sul	
	A3 (Ac)		Camarões, Gabão, Ruanda	
	A4		Mali, Gâmbia	
	A5		Nigéria, Ruanda, Camarões, Haiti (população africana)	
	A6		Congo, Ruanda	
	A7	ayw1, adw2, ay	Camarões, Ruanda	
B	B1 (Bj)	adw2	Japão	3215
	B2 (Ba)	adw2, adw3	Ásia, excluindo Japão	
	B3	adw2, ayw1	Indonésia, Filipinas	
	B4	ayw1, adw2	Vietnã, Camboja	
	B5		Filipinas	
	B6		Alasca, Norte do Canadá, Groenlândia	
	B7-B9		Indonésia	
C	C1 (Cs)	adrq+, ayr, adw2, ayw1	Sudeste asiático (Vietnã, Míamar, Tailândia, Sul da China)	3215
	C2 (Ce)	adrq-, adrq+	Extremo oriente (Coréia do Sul, Japão, Norte da China)	
	C3		Ilhas do pacífico (Micronésia, Melanésia, Polinésia)	
	C4		Austrália	
	C5		Filipinas, Vietnã	
	C6		Indonésia, Filipinas	
	C7		Filipinas	
	C8-C16		Indonésia	
D	D1	ayw2, adw1, ayw1	Europa, Oriente Médio, Ásia, Tunísia, Egito, Brasil, Argentina, Nova Zelândia	3182
	D2	ayw3, ayw1	Argentina, Brasil Estados Unidos, Europa, Indonésia, Marrocos, Índia	
	D3/6	ayw3, ayw2, ayw4	África do Sul, Ásia, Europa, Estados Unidos, Canadá, Brasil	
	D4	ayw2, ayw3	Austrália, Japão, Papua Nova Guiné, Oceania	
	D5		Leste da Índia, Japão	
	D7		Tunísia, Marrocos, Madagascar	
	D8		Nigéria	
	D9		Leste da Índia	
	E		ayw4, ayw2	
F	F1a	adw4, ayw4	América Central e do Sul	3215
	F1b	adw4	Argentina, Japão, Venezuela, Estados Unidos	
	F2	adw4	América do sul (Brasil, Venezuela, Nicarágua)	
	F3	adw4	Venezuela, Panamá, Colômbia, Bolívia	
	F4	adw4	Bolívia, França, Argentina	
G		adw2	Estados Unidos, Alemanha, Japão, França, México, América Central e América do Sul	3248
H		adw4	Estados Unidos, Japão, Nicarágua, América Central e América do Sul	3215
I	I1	adw2	Laos, Vietnã, Noroeste da China	3215
	I2	ayw2	Laos, Vietnã	
J		ayw	Japão	3182

1.4.4 Genótipos do HBV e sua distribuição geográfica

O Genótipo A (HBV/A) é predominante na América do Norte, Europa, Sudeste da África e Índia e possui sete subgenótipos (A1-A7). Os subgenótipos A1, A3, A4 e A5 são endêmicos principalmente na África ocidental, enquanto que A2 é endêmico na Europa (Cao, 2009). A6 inclui cepas de pacientes africanos-belgas da República do Congo e Ruanda. O subgenótipo A7 foi descoberto em Ruanda e Camarões (Kim, Revill e Ahn, 2011; Alvarado-Mora e Rebello Pinho, 2013; Yuen *et al.*, 2018).

Os genótipos B e C são predominantes na Ásia e Oceania (Yuen *et al.*, 2018). O genótipo B (HBV/B) possui nove subgenótipos (B1-B9), prevalentes na Ásia. O subgenótipo B2 é endêmico em todo o continente, exceto no Japão, onde o subgenótipo B1 é endêmico. Os subgenótipos B3 a B8 foram isolados no sul asiático (Cao, 2009).

O genótipo C (HBV/C) possui dezesseis subgenótipos (C1-C16). O subgenótipo C1 foi isolado em Taiwan, C2-C16 foram isolados na China, Austrália, Filipinas e Indonésia (Pourkarim *et al.*, 2014). O subgenótipo C2 é endêmico na Ásia, C4 é encontrado em aborígenes australianos (Cao, 2009). No Brasil, principalmente em São Paulo e no Paraná, houve uma grande migração de indivíduos da Ásia Oriental, fato que parece ser responsável pela detecção de HBV/C e HBV/B nessas regiões (Alvarado-Mora e Rebello Pinho, 2013).

O genótipo D (HBV/D) é predominante no norte da América e da África, Europa, Oriente Médio e Oceania e possui dez subgenótipos (D1-D10) descritos. O subgenótipo D1 é predominante na região mediterrânea. O subgenótipo D2 é endêmico na Rússia e na região do Báltico, e assim como D3 e D5, foi encontrado na Índia. Os subgenótipos D4 e D6 são, respectivamente, endêmicos na Oceania e na Indonésia. O subgenótipo D7 foi encontrado na Tunísia (Cao, 2009; Lin e Kao, 2011; Yuen *et al.*, 2018), e o subgenótipo D10 é circulante na Etiópia (Hundie *et al.*, 2017). Um estudo recente de Ren e colaboradores sugeriu a existência de um novo subgenótipo, encontrado no Vietnã, designado provisoriamente como subgenótipo D11, oriundo de um portador coinfetado com HBV/B e HBV/D (Ren *et al.*, 2019).

O genótipo F (HBV/F) possui 4 subgenótipos, que são prevalentes na América Latina, especialmente na população ameríndia. Os genótipos E (HBV/E), hiperendêmico na África Ocidental, e os genótipos G (HBV/G) e H (HBV/H), que estão na América Central e na América do Sul, não possuem subgenótipos (Yuen *et al.*, 2018). O genótipo I (HBV/I) possui dois subgenótipos, I1 e I2, sendo ambos encontrados no continente asiático. Recentemente, o

novo genótipo J foi isolado em um paciente japonês com carcinoma hepatocelular (Zehender *et al.*, 2014).

No Brasil, todos os genótipos prevalentes foram primeiramente descritos nos povos que deram origem à população do país. São eles: HBV/A (subgenótipos A1 e A2), HBV/D (subgenótipos D2, D3 e D4) e HBV/F (subgenótipos F1 a F4). O subgenótipo A1 é oriundo de africanos, enquanto que o subgenótipo A2 tem origem europeia, bem como os subgenótipos D2, D3 e D4. Os subgenótipos F1, F2, F3 E F4 foram identificados nos povos nativos ameríndios (Zehender *et al.*, 2014).

O HBV/A é prevalente em quase todas as regiões do país. Lampe e colaboradores (2017) demonstraram prevalência de 71,6% dos pacientes no Norte, 65,0% dos pacientes do Nordeste, 57,5% dos pacientes no Centro-Oeste e 58,9% dos pacientes no Sudeste do Brasil (figura 4).

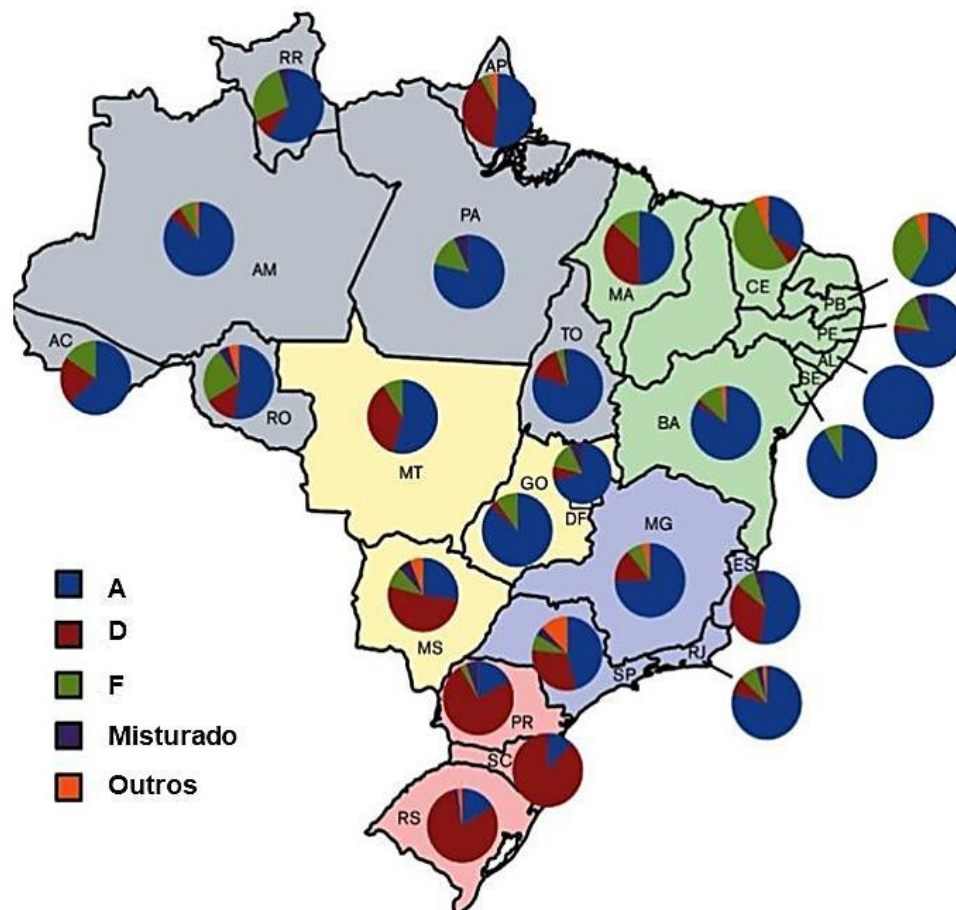


Figura 4 – Distribuição genotípica do HBV nos estados brasileiros. Gráficos demonstrando a proporção de genótipos do HBV por estados do Brasil (adaptado de Lampe *et al.*, 2017). As regiões do gráfico em roxo (misturado) representa indivíduos que apresentaram uma infecção por mais de um genótipo, não sendo possível definir qual seria o majoritário.

O HBV/D aparece com maior frequência na região Sul, onde foi encontrado em quase 80% das amostras analisadas. Ele também foi o segundo genótipo mais prevalente nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste, representando respectivamente 14,2, 27,6 e 22,6%, da amostragem total nessas regiões (Lampe *et al.*, 2017).

O HBV/F foi menos encontrado (7 a 11%) em espécimes das regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste, e somente foi detectado em um indivíduo da região Sul. Na região Nordeste, o quadro é diferente: o HBV/F foi demonstrado em uma alta frequência (23,5%), ficando atrás somente do HBV/A (Lampe *et al.*, 2017).

Cada genótipo do HBV possui uma origem específica, em populações e territórios específicos, e também apresenta particularidades na evolução para a cura, cronicidade, e na resposta a diferentes tratamentos. Essas informações, quando compiladas, são importantes ferramentas no rastreamento de padrões de transmissão, na compreensão de padrões de infecção e desenvolvimento da doença (figura 5) (Yuen *et al.*, 2018).

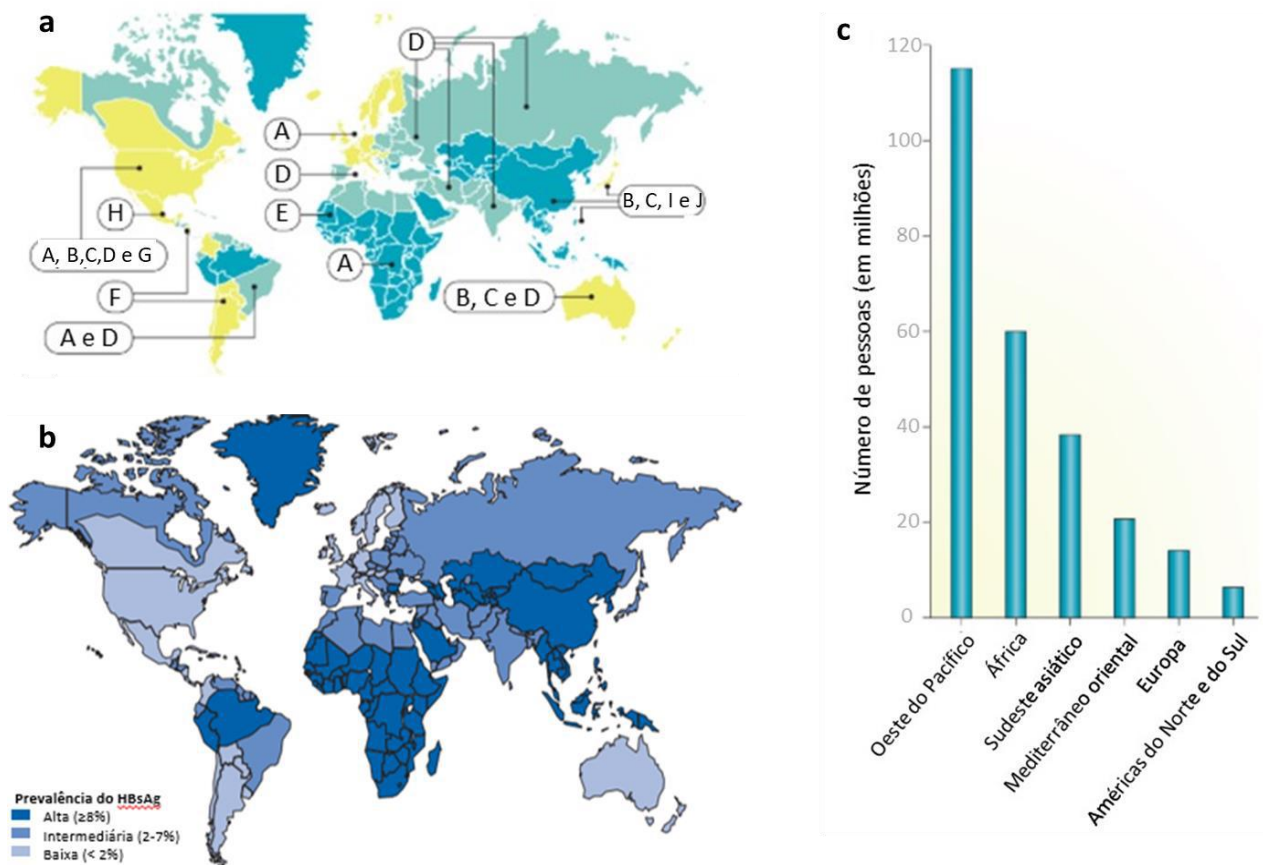


Figura 5 - Distribuição global da hepatite B crônica. A- Prevalência global dos genótipos do HBV. **B-** Distribuição global da infecção crônica pelo HBV. **C-** Número de portadores da hepatite B crônica por continente (adaptado de CDC, 2008; Yuen *et al.*, 2018).

Estudos demonstram que o padrão de distribuição dos genótipos do HBV tem mudado, principalmente pela globalização e consequente aumento do fluxo migratório. Devido a circulação de diferentes genótipos em uma mesma região, a recombinação entre os genótipos tem ocorrido com maior frequência e tende ainda a aumentar (Kidd-Ijunggren, Miyakawa e Kidd, 2002; Kurbanov *et al.*, 2005; Olinger *et al.*, 2006; Kramvis *et al.*, 2008). No entanto, ainda há uma distribuição característica, de modo que os genótipos e subgenótipos podem ser utilizados como marcadores dos fluxos migratórios das populações infectadas (Norder *et al.*, 1992; Norder *et al.*, 1993; Kidd-Ijunggren, Miyakawa e Kidd, 2002; Lago *et al.* 2019).

1.4.5 Replicação do HBV

A replicação do HBV ocorre de forma distinta aos outros vírus de DNA. Uma das etapas de seu processo consiste na produção de um intermediário de RNA, que posteriormente é convertido em DNA pela ação da transcriptase reversa (Ganem, 1996; Beck e Nassal, 2007).

O HBV possui tropismo pelas células hepáticas, as quais são o sítio primário de replicação. Nessas células estão presentes os dois receptores do vírus: o proteoglicano de sulfato de heparano (PGHS, do inglês *heparan sulfate proteoglycan*) e o taurocolato de sódio (NTCP, do inglês *taurocholate cotransporting polypeptide*) (figura 6). Durante a infecção, o HBV se liga com pouca afinidade ao PGHS, e posteriormente, com maior afinidade, ao NTCP. O NTCP é uma proteína transmembranar responsável pelo transporte de ácidos biliares no fígado de espécies susceptíveis à hepatite B (Li, 2015). Após a adsorção mediada pelos receptores PGHS e NTCP, o vírion é endocitado, migra para o citoplasma do hepatócito e perde seu envelope. Em seguida, o HBV tem seu nucleocapsídeo transportado até o núcleo celular, onde ocorre o seu desnudamento (Ganem, 1996).

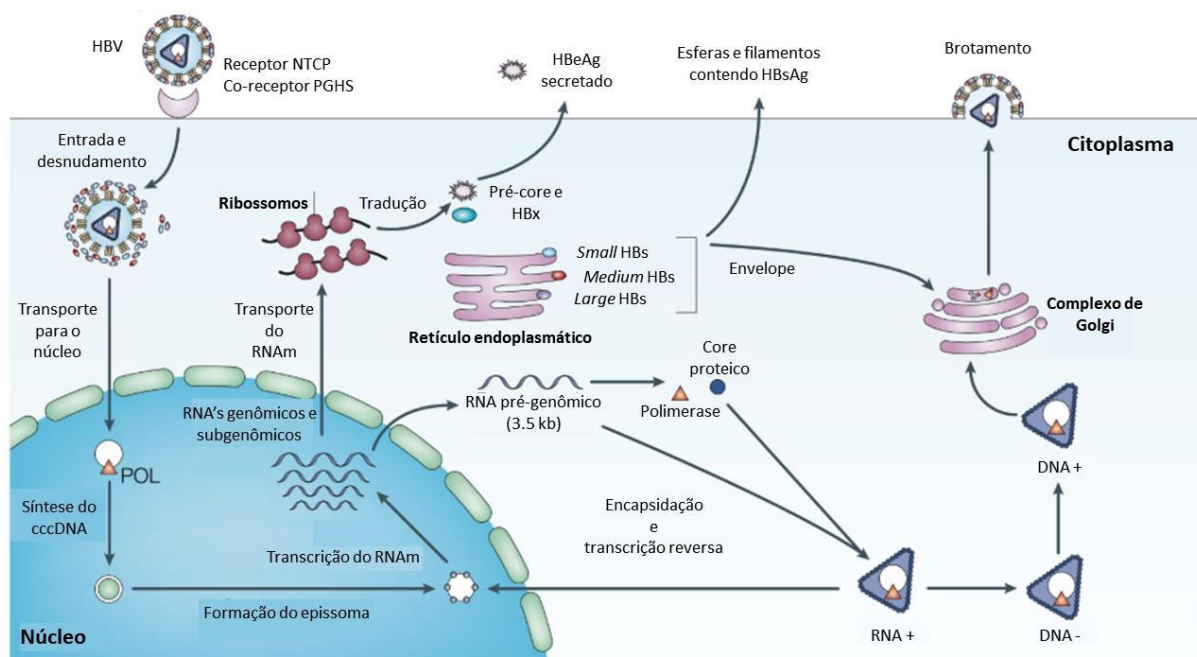


Figura 6 - Modelo esquemático do ciclo replicativo do HBV. Após a entrada do vírus no citoplasma, o capsídeo é transportado para o núcleo. O DNA circular é convertido em cccDNA, que atua como molde para a transcrição de quatro RNAs (de 0,7 kb, 2.1 kb, 2.4 kb e 3.5 kb), que são exportados para o citoplasma e usados como RNAs mensageiros. O RNA pré-genômico também funciona como modelo da replicação. A nova partícula adquire o envelope durante a passagem pelo retículo endoplasmático e / ou complexo de Golgi e em seguida é secretada (adaptado de Bhattacharya e Thio, 2010).

No núcleo, o DNA viral é convertido em dupla fita circular covalentemente fechada (cccDNA, do inglês *covalently closed circular DNA*), através da ação da DNA polimerase celular na fita positiva de DNA do HBV. Essa estrutura formada é bastante estável e se comporta como um episssomo, podendo permanecer no núcleo da célula hospedeiro até após o fim da infecção, bem como se integrar no genoma do indivíduo (Tu *et al.*, 2017).

Em seguida, a enzima RNA polimerase II do hospedeiro transcreve o cccDNA em filamentos de RNA pré-genômicos (são molde para a síntese do DNA viral, para RNAs mensageiros e para a tradução das proteínas HBcAg, HBeAg e da polimerase viral) e subgenômicos (atuam como RNAs mensageiros; migram para o citoplasma para realizar a tradução de proteínas do envelope e HBx). Os produtos da transcrição são capeados na extremidade 5' e compartilham o mesmo sinal de poliadenilação (AATAAA) na extremidade 3' (Bartlett, 2004).

O RNA pré-genômico (pgRNA), usado como molde para a síntese de RNA viral, necessita de uma estrutura em *stem-loop* na sua extremidade 5'. Essa estrutura é denominada sinal de encapsidação ϵ , e é essencial para o empacotamento do pgRNA no capsídeo em formação. Quando ocorre a ligação da DNA polimerase do HBV ao sinal de encapsidação ϵ é formado um complexo. Esse complexo, então, é envolvido pelas proteínas agrupadas do core, originando o nucleocapsídeo icosaédrico (Kidd-ljunggren, Miyakawa e Kidd, 2002).

Após a formação do capsídeo, é iniciada a transcrição reversa da fita positiva de RNA em uma sequência de DNA de polaridade negativa. Ao passo que a fita de DNA é sintetizada, a fita molde de RNA é degradada pela RNase H viral (Summers e Mason, 1982). A síntese da fita positiva de DNA é iniciada ao final da síntese da fita negativa, utilizada como molde. No entanto, a fita positiva não é completamente sintetizada. Conforme o nucleocapsídeo é transportado para o retículo endoplasmático e, em seguida para o complexo de Golgi, o genoma se circulariza e a fita positiva é estendida. É no Golgi que as proteínas dos envelope L, M e S serão incorporadas e os vírions liberados (Tuttleman, Pourcel e Summers, 1986; Bruss, 2004).

Durante a amplificação de novos genomas, o capsídeo pode ainda retornar ao núcleo, onde irá liberar o DNA viral, possibilitando novamente a sua conversão em cccDNA (Tuttleman, Pourcel e Summers, 1986; Bruss, 2004).

1.5 Infecção pelo HBV

1.5.1 Transmissão do HBV

Em indivíduos contaminados, o HBV é encontrado principalmente no sangue. Nele, a carga viral pode superar dez bilhões de vírions por mililitro em pacientes HBeAg positivos. Outros fluidos corporais como saliva, urina, secreção nasofaríngea, sêmen e fluxo menstrual podem conter partículas infecciosas (Davison *et al.*, 1987; Gonçalves, 1997).

Apesar de o HBV ser bastante resistente a diversas condições ambientais, não há relatos de sua presença nas fezes. Acredita-se que o vírion é inativado ao atravessar a mucosa intestinal ou ao entrar em contato com a microbiota do hospedeiro (Grabow *et al.*, 1975).

A transmissão do HBV é provocada principalmente pela exposição parenteral do indivíduo ao fluido contaminado. Ela pode ocorrer por contato sexual, exposição perinatal (transmissão vertical), transplante de órgãos e/ou tecidos e por via iatrogênica (WHO, 2004b).

A transmissão sexual ocorre principalmente em adultos moradores de áreas de baixa prevalência do vírus. Um estudo realizado no final dos anos 90, nos EUA (Estados Unidos da América), demonstrou que o contato sexual com um ou múltiplos parceiros portadores do vírus é responsável por cerca de 60% dos novos casos da doença (Salvatori *et al.*, 1999). Em 1999, no Japão, de todos os casos de hepatite B notificados, 43% foram transmitidos pelo contato íntimo (WHO, 2000).

Em regiões de alta endemicidade, a transmissão vertical é recorrente e ocorre em cerca de 90% de mães portadoras do HBeAg. O neonato adquire a hepatite B durante sua exposição ao sangue materno no decorrer do parto. Uma parcela menor de recém-nascidos contrai a doença no período pós-parto, pela amamentação ou até mesmo pelo contato estreito entre mãe e filho (Merican *et al.*, 2000; WHO 2018).

A infecção iatrogênica é justificada pela resistência do HBV em superfícies de utensílios perfuro-cortantes. Ela ocorre durante o uso de instrumentos médicos e odontológicos contaminados, como seringas e agulhas, objetos para colocação de *piercings* e tatuagens, alicates de unha e outros materiais que não tenham sido bem esterilizados. O compartilhamento de agulhas e seringas entre usuários de drogas também é um fator de risco (Souto, 1999; Chan e Lok, 1999; WHO 2018).

Em países desenvolvidos é comum que a transmissão horizontal ocorra através de maneiras pouco conhecidas. Especula-se a doença seja adquirida pelo contato de saliva, traços de sangue e objetos contaminados com pequenas escarificações (Kiire, 2007).

O comportamento de risco da hepatite B contempla: sexo frequente com múltiplos parceiros, uso de drogas endovenosas, frequente exposição a sangue, principalmente por parte de profissionais de saúde, e a prática sexual com fins lucrativos. A população chave da hepatite B contempla homossexuais masculinos, presidiários, companheiros de pacientes com hepatite aguda, hemofílicos, indivíduos transplantados, doentes renais em programa de hemodiálise e familiares de portadores crônicos do HBV (Carrilho e Silva, 1995).

1.5.2 Manifestações clínicas

A biossíntese do HBV é lenta e não causa efeito citolítico nos hepatócitos (Alberti *et al.*, 1983). A doença é gerada pela resposta imune do hospedeiro e por linfócitos T citotóxicos (CTL, do inglês *cytotoxic T cell*) frente a infecção, a qual pode se estabelecer: como hepatite aguda auto limitada, na qual a resposta imune do indivíduo ao primeiro contato com o vírus é balanceada; hepatite fulminante, na qual a resposta imune é exacerbada; hepatite crônica, na qual o vírus persiste no organismo do indivíduo devido ao desenvolvimento de uma resposta imune subclínica (Soares *et al.*, 2015).

Dentre os adultos infectados, 90 a 95% evoluem para a cura funcional e menos de 1% evolui para hepatite fulminante. A cura funcional é definida pela inibição da replicação viral, visto que o genoma do HBV permanece constantemente integrado ao genoma do hospedeiro, não havendo cura total para a doença (Tu *et al.*, 2017). Em contrapartida, na infecção adquirida na infância principalmente por transmissão perinatal, há mais de 90% de chance de o quadro se tornar crônico. Isso porque indivíduos que desenvolvem resposta imune subclínica a infecção tendem a cronificá-la, e crianças ainda não possuem o sistema imune bem estabelecido (figura 7) (Soares *et al.*, 2015).

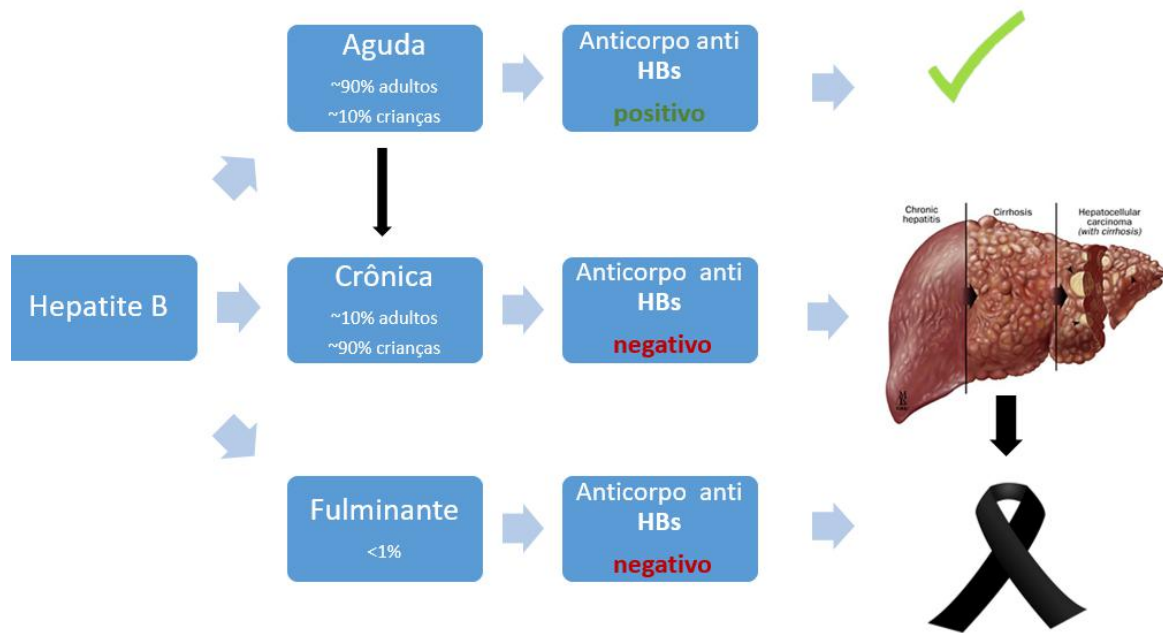


Figura 7 - Progressão e possíveis desfechos da hepatite B. Fluxograma mostrando a evolução dos quadros da hepatite B.

O período de incubação é compreendido entre os primeiros 50-180 dias após o estabelecimento da infecção. Em seguida ocorre o período prodrômico, caracterizado pelo aparecimento de sintomas inespecíficos como fraqueza, anorexia e mal-estar geral. No trato gastrointestinal pode haver dor abdominal difusa, náuseas, intolerância alimentar, distúrbios gustativos, desconforto abdominal e vômitos. Artrites, artralgias, mialgias e exantemas associados a imunocomplexos também já foram descritos (McIntyre, 1990; Yuen *et al.*, 2018).

Os sintomas do período prodrômico diminuem de intensidade no início do período icterício, que é desenvolvido por 20% dos doentes. Ele se estabelece logo após o surgimento de icterícia, colúria, acolia fecal e em alguns casos prurido cutâneo. No entanto a maioria dos quadros da hepatite B é assintomática. A convalescença dura entre 20 a 30 dias, e com ela os sinais e sintomas observados na fase anterior tendem a desaparecer (Gonçales, 1997).

1.5.3 Patogênese da hepatite B

A presença do HBV no indivíduo pode ocasionar o desenvolvimento de hepatite aguda, fulminante ou crônica, sendo a última capaz de evoluir para quadros de cirrose hepática e/ou carcinoma hepatocelular (HCC). Muitas vezes esses quadros hepáticos graves só se desenvolvem décadas após o estabelecimento da infecção (Sjogren, 1996).

O HBsAg é responsável por induzir resposta imune humoral e celular do hospedeiro durante o brotamento do HBV nos hepatócitos. O subsequente recrutamento de células T citotóxicas pode induzir apoptose nas células hepáticas e provocar quadros de cirrose (Lee, 1997; Chisari e Ferrari, 2003).

Quando os danos gerados por apoptose induzem proliferação exacerbada dos hepatócitos a fim de repará-la, podem ser formados os quadros de carcinoma. Como consequência dessa divisão intensa, há maior taxa de mutação, podendo acarretar na perda de função de proteínas de controle de tumor (Soares *et al.*, 2015).

O HCC pode estar associado a genótipos específicos do vírus infectante e a características particulares do hospedeiro. O fato de o DNA do HBV ser capaz de se integrar ao DNA celular também pode induzir alterações celulares e/ou no genoma do próprio vírus, desencadeando processos mutagênicos e carcinogênicos (Zhou *et al.*, 1988).

1.5.4 Perfil sorológico e diagnóstico da hepatite B

Pacientes portadores de hepatites apresentam quadros clínicos muito semelhantes, portanto, avaliar somente seus sintomas não permite a identificação do agente causador da doença. O diagnóstico eficiente consiste na utilização de técnicas sorológicas, moleculares e imunohistoquímicas, nas quais os marcadores sorológicos, teciduais e o genoma viral podem ser identificados (Ministério da Saúde, 2018).

O primeiro marcador sorológico a aparecer, após o período de incubação, é o HBsAg, que é o marcador de infecção presente. Junto com o HBsAg é possível detectar o antígeno indicativo de replicação e infecciosidade, HBeAg. A seguir inicia-se a fase aguda, caracterizada pela presença de DNA viral, HBsAg sérico, IgM anti-HBc e anti-HBc total (IgM + IgG) (figura 8) (Soares *et al.*, 2015).

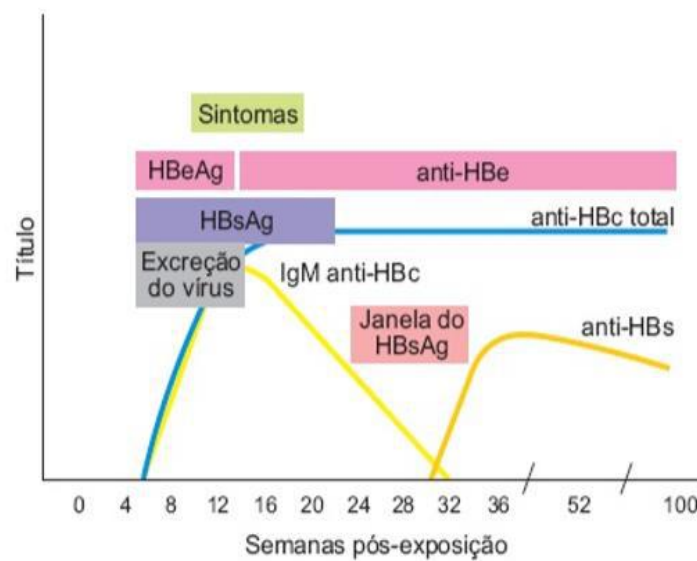


Figura 8 - Biomarcadores da infecção aguda pelo HBV (Soares *et al.*, 2015).

Durante o início da fase sintomática, os níveis de HBeAg decaem, seguido pelos níveis de HBsAg. O declínio de IgM anti-HBc, juntamente com a permanência de IgG anti-HBc e o desaparecimento do HBsAg caracterizam a convalescença, entre 2 a 16 semanas a partir da infecção. O indivíduo pode então adquirir imunidade através da soroconversão do HBsAg para anti-HBs e ter suas enzimas hepáticas normalizadas, evoluindo para a cura. No entanto, uma pequena parcela dos pacientes com doença aguda (1-2%) evolui para insuficiência hepática fulminante e até para a morte (Santos, Romanos e Wigg, 2015).

A hepatite B aguda também pode ser monitorada por meio de exames bioquímicos que avaliem as taxas de transaminases do indivíduo. Os valores de referência dessas enzimas no soro são observados juntamente com os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). No entanto, testes sorológicos ainda são a principal ferramenta para o diagnóstico das hepatites virais, pois além de detectar os antígenos e anticorpos presentes no soro do portador da infecção, também indicam a fase da doença na qual ele se encontra (Santos, Romanos e Wigg, 2015).

A hepatite B crônica é estabelecida quando o quadro agudo não termina com o desaparecimento do vírus. Ela é definida pela presença do marcador sérico HBsAg persistente por 6 ou mais meses, sem que haja soroconversão para anti-HBs. Suas manifestações clínicas e seus marcadores de replicação evoluem de forma dependente da interação vírus-hospedeiro (Sjogren, 1996). No entanto, a soroconversão dos pacientes HBeAg positivos em anti-HBe é que comumente sinaliza o fim da replicação do HBV. O anti-HBc total aparece acompanhando o HBsAg e é demonstrativo de exposição prévia ao vírus (figura 9).

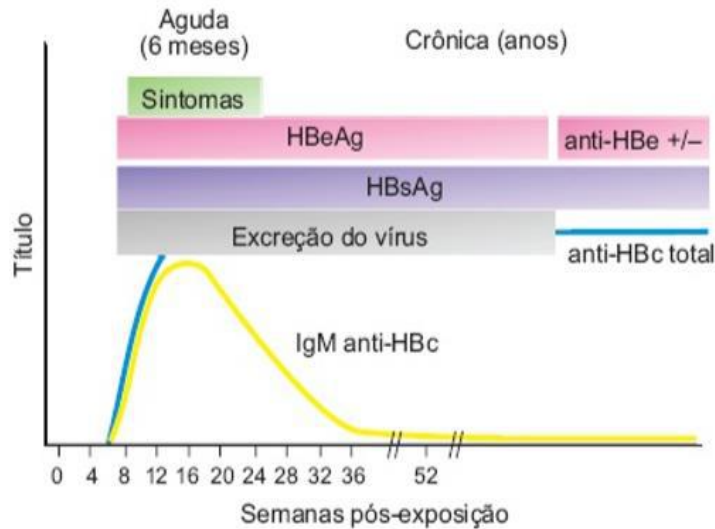


Figura 9 - Biomarcadores da infecção crônica pelo HBV (Soares *et al.*, 2015).

Portadores crônicos constituem o principal reservatório do HBV, devido a constante presença do vírus no organismo. Apesar de triagem sanguínea em bancos de sangue, esses pacientes podem representar um sério risco de transmissão do vírus em transplantes ou transfusões sanguíneas (Coursaget *et al.*, 1991; Elghouzzi *et al.*, 1995; Flichman *et al.*, 2014; Moresco *et al.*, 2014).

1.6 Tratamento e controle da hepatite B

A terapêutica da hepatite B é específica para casos crônicos e tem como objetivo: eliminar o vírus do organismo ou inibir sua replicação; evitar necroinflamação hepática e possível cirrose e/ou câncer hepático; negativar o marcador HBeAg e convertê-lo a anti HBe; eliminar ou reduzir a carga viral; normalizar os níveis de ALT; melhorar a histologia hepática (Zanetto *et al.*, 2016).

A proposta do tratamento pode ser alcançada se a replicação do HBV for persistentemente suprimida. No entanto, a infecção crônica pelo HBV não pode ser completamente erradicada devido à persistência do cccDNA no núcleo dos hepatócitos infectados e à integração do genoma viral (Zanetto *et al.*, 2016).

Há poucos anos, apenas dois fármacos eram utilizados no tratamento da hepatite B crônica: interferon- α (IFN- α) e lamivudina. O interferon-alpha (INF- α), possui atividade antiviral e imunomodulatória. Seu mecanismo de ação é baseado na inibição da replicação e síntese de proteínas virais e na indução da citólise dos hepatócitos infectados. A lamivudina (3TC) é um análogo de nucleosídeo capaz de bloquear diretamente a replicação viral (Liaw *et al.*, 1999; Ling e Harrison, 1999; Abbas, Jafri e Hamid, 2010).

Atualmente, o protocolo brasileiro recomenda a utilização do Tenofovir como primeira linha de tratamento para a hepatite B. Este fármaco possui elevada capacidade de supressão viral e alta barreira genética de resistência contra as mutações do HBV. No entanto, ele pode estar associado a toxicidade renal e desmineralização óssea, principalmente em indivíduos HIV positivos e pacientes com doença renal progressiva (Ministério da Saúde, 2017).

Assim como o Tenofovir, o Entecavir é um análogo nucleos(t)ídeo recomendado em casos de contra-indicação ao uso do Tenofovir. Ele é usado principalmente em pacientes durante tratamento de imunossupressão e quimioterapia (Ministério da Saúde, 2017).

No entanto, forma mais eficiente de evitar a infecção ainda é através da vacinação, a qual vem sendo empregada desde a década de 1980. O estabelecimento da técnica de DNA recombinante permitiu o aumento da cobertura vacinal, pois além de ter baixo custo de produção, sua produção é feita em larga escala (Ferraz, 2007).

No Brasil a vacina com a técnica de DNA recombinante foi implementada em 1992. Sua administração permitiu que a vacina deixasse de ser restrita aos grupos de risco da infecção e passasse a ser oferecida a crianças menores de 2 anos. A vacina atualmente está incluída no Programa Nacional de Imunizações (PNI) e encontra-se disponível para todas as faixas etárias pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Ela é administrada em três doses e é capaz de induzir soroproteção em 90% a 95% dos adultos vacinados, e contempla um sorotipo, que corresponde a todos os genótipos do HBV (Ferraz, 2007).

1.7 Epidemiologia da infecção pelo HBV

1.7.1 Prevalência da infecção no mundo

A vacina contra o HBV, além de ter ajudado a reduzir os casos da doença, alterou a dinâmica epidemiológica da hepatite B. Sua disseminação pelo mundo, juntamente com a mudança demográfica gerada pela migração de populações, espalhou ainda mais os genótipos do HBV pelo mundo. Apesar do advento de vacinas eficazes e de outras medidas de controle de doenças, incluindo terapia antiviral, a hepatite B continua sendo um dos principais problemas de saúde pública mundial (Yuen *et al.*, 2018).

Indivíduos que migram de países de alta endemicidade para países de baixa endemicidade, inclusive os infectados com o HBV, tendem a se estabelecer em grupos minoritários, com cuidados de saúde abaixo do ideal. Os países que acolhem esses estrangeiros passaram a ter como desafio a necessidade de ultrapassar obstáculos culturais,

sociais e logísticos relacionados à busca e encaminhamento de casos a fim de obter o controle da infecção pelo HBV e por outras doenças (Yuen *et al.*, 2018).

Em 2015 a OMS estimou que 257 milhões de pessoas (3,5% da população mundial) estão cronicamente infectadas pelo HBV. Dentre elas, a maioria nascida antes do uso disseminado da vacina. O número de crianças infectadas diminuiu desde a introdução do programa de vacinação ampliado promovido pela OMS; em 2015, apenas ~1,3% das crianças com menos de 5 anos de idade desenvolveu infecção crônica em todo o mundo. A África, no entanto, ainda apresenta alta prevalência em crianças. Além da baixa cobertura vacinal nessa região, a carga do vírus circulante é muito alta e favorece o aumento da infecciosidade em gestantes (Yuen *et al.*, 2018).

A hepatite B crônica é distribuída ao redor do mundo de forma bastante desigual. Sua prevalência é maior no Pacífico Ocidental (6,2% ou 115 milhões de indivíduos) e nas regiões africanas (6,1% ou 60 milhões de indivíduos). No Mediterrâneo Oriental os números também são altos (3,3% ou 21 milhões de indivíduos) (Yuen *et al.*, 2018).

Nas regiões do sudeste asiático (2,0% ou 39 milhões de indivíduos) e na Europa (1,6% ou 15 milhões de indivíduos) a prevalência é reduzida, e se torna ainda menor nas regiões norte e sul-americanas (0,7% ou 7 milhões de indivíduos). Estudos epidemiológicos recentes demonstraram que houve um declínio constante da hepatite B em países europeus nos últimos 30 anos: <1,5% no norte da Europa, <2% no sul da Europa, <1% na Europa Ocidental e <5% no leste da Europa (exceto para o Uzbequistão: 8%) (Yuen *et al.*, 2018).

1.7.2 Prevalência da infecção no Brasil

O Brasil está classificado como uma área de baixa endemicidade para a hepatite B, apesar de a distribuição da doença ser bastante heterogênea (Ministério da Saúde, 2011). Localidades carentes de serviços de saúde ainda apresentam altas taxas de prevalência, como algumas regiões amazônicas e do interior do Brasil (Ministério da Saúde, 2017).

Em áreas com boa assistência e acesso à saúde, os impactos da hepatite B são reduzidos. Os grupos de risco, no entanto, ainda enfrentam obstáculos independentemente da disponibilidade dos serviços de saúde. Essa população é um desafio para estratégias de prevenção, diagnóstico, assistência e vigilância, pois encontram-se constantemente expostos às doenças (Ministério da Saúde, 2017).

As taxas de detecção de hepatite B desde 2011 têm apresentado poucas variações. Contudo, houve tendência de queda a partir de 2014, alcançando 6,5 casos para cada 100 mil habitantes no país em 2017 (Ministério da Saúde, 2017).

Entre 1999 e 2017, 218.257 casos de hepatite B foram confirmados no Brasil, dentre os quais a maioria das notificações está concentrada na região Sudeste (35,2%), seguida das regiões Sul (31,6%), Norte (14,3%), Nordeste (9,7%) e Centro-Oeste (9,2%). De 2007 a 2017, as notificações das regiões Sul, Norte e Centro-Oeste foram quase sempre superiores à taxa nacional. As menores taxas foram observadas na região Nordeste, devido ao grande número de casos subnotificados da doença (figura 10) (Ministério da Saúde, 2017).

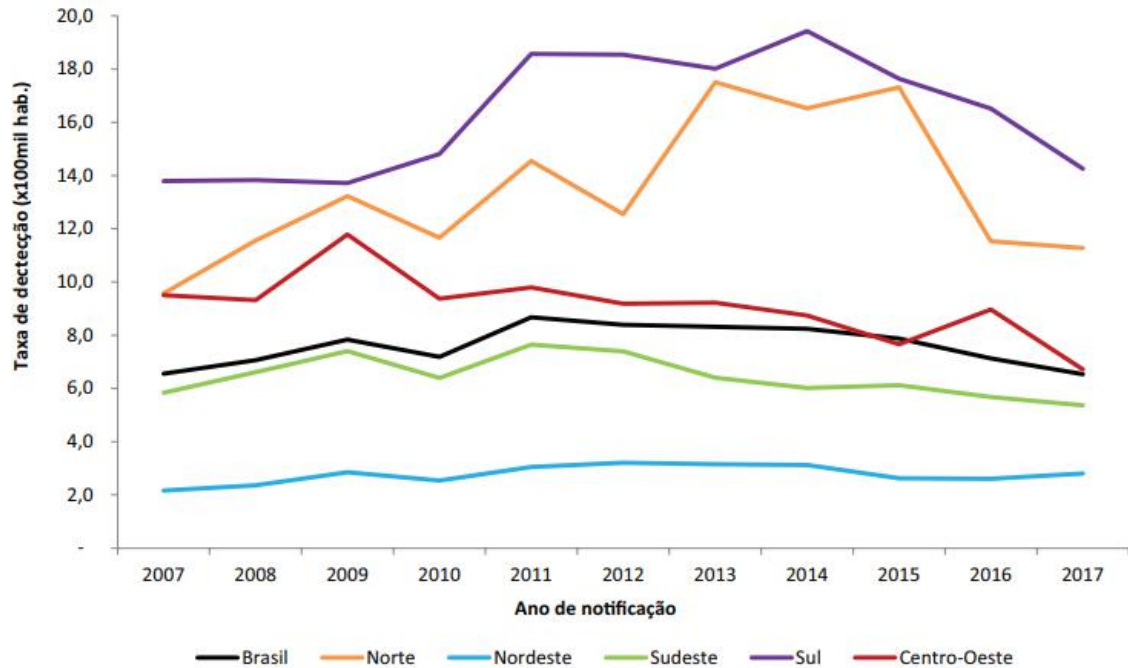


Figura 10 - Taxa de detecção de hepatite B, segundo ano e região. Gráfico demonstrando a variação da prevalência da hepatite B, nas diferentes localidades brasileiras, entre 2007 e 2017. Figura disponível em: MS/SVS/Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais.

Em 2017 foi demonstrada uma prevalência superior à nacional em 14 capitais (6,5 casos por 100 mil habitantes), sendo Rio Branco a primeira colocada (29,4 casos por 100 mil habitantes), seguida de Porto Velho (25,6 casos por 100 mil habitantes). Na região Norte, Macapá foi a única capital fora deste grupo (Ministério da Saúde, 2017).

Estudos realizados entre 1999 e 2017 apontaram que a maioria dos portadores de hepatite B são homens (118.820 ou 54,4% do total de indivíduos). Entretanto, em 2010 o número de casos notificados foi maior no sexo feminino, entre os 15-29 anos de idade, e no sexo masculino, em menores de 10 e após os 30 anos (Ministério da Saúde, 2017).

Dentre os indivíduos de todos os sexos, entre 2007 e 2017, a distribuição dos casos de hepatite B mostra que a maioria ocorre entre indivíduos de 25 a 39 anos (38,3% do total de casos). Somente em 2017 a hepatite B acometeu principalmente pessoas entre 30 e 44 anos (36,8% do total de ocorrências) (Ministério da Saúde, 2017).

Durante 10 anos foi comparada a prevalência por faixa etária, e pôde-se observar que a detecção de hepatite B entre indivíduos de 0 a 34 anos caiu. Pessoas acima de 39 anos de idade apresentaram aumento na taxa de detecção, com destaque para idosos de 60 anos ou mais: entre 2007 e 2017 a taxa passou de 4,4 casos para 7,4 casos a cada 100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2017).

As variações da prevalência podem acontecer por diversos fatores: diferenças demográficas relacionadas às características epidemiológicas da doença, sensibilidade das técnicas de diagnóstico, flutuações na viremia do paciente e novas mutações que interfiram o reconhecimento viral por testes laboratoriais (Brechot *et al.*, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da existência de uma vacina eficiente, estima-se que cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo já tenham entrado em contato com o HBV, e que existam cerca de 257 milhões de portadores crônicos, em risco de desenvolvimento de cirrose e câncer de fígado (WHO, 2017). Os medicamentos usados para o tratamento deste grupo representam um gasto anual para o Ministério da Saúde de em torno de R\$ 20 milhões, o que evidencia o impacto econômico da infecção crônica pelo HBV no Brasil.

Uma característica da infecção pelo HBV é que a probabilidade de progressão para a doença crônica é inversamente proporcional à idade em que ocorre a infecção. Devido a imaturidade do sistema imune dos mais jovens, acredita-se que crianças com até 5 anos apresentem um risco de 50- 90% de evolução para a forma crônica versus 5-10% dos adultos (WHO 2018, Hepb, 2019). Além do estado imunológico do hospedeiro, fatores virais também são capazes de influenciar na evolução da hepatite B (Chu e Lok, 2002; Miyakawa e Mizokami, 2003).

A investigação dos genótipos circulantes em pacientes agudos no Japão demonstrou uma mudança no perfil genotípico da população infectada, onde a prevalência de um genótipo importado dobrou em menos de 5 anos, estando possivelmente associada a mudanças na forma de transmissão (Tamada *et al.*, 2012).

Além disso, existem evidências de que alguns genótipos do HBV possam estar mais associados à cronificação da doença do que outros, seja através de mutações, da indução da soroconversão para anti HBe, dentre outras características ainda pouco conhecidas (Chu e Lok, 2002; Tamada *et al.*, 2012).

Tendo em vista a complexidade de fatores envolvidos na evolução para a forma crônica, estudos que investiguem os diferentes genótipos e variantes do HBV em pacientes brasileiros portadores de quadros clínicos diversos podem auxiliar na elucidação dos fatores virais associados à piora do prognóstico da infecção. Além disso, um levantamento sobre as estirpes virais circulantes em nosso país nos dias atuais, especialmente aquelas obtidas de casos agudos, de infecção recente, tem importância fundamental no contexto da epidemiologia molecular, monitorando a entrada de linhagens importadas de outros países e, assim, contribuindo com ações que visem impedir a disseminação viral.

Este projeto piloto visa investigar os genótipos causadores destas infecções e identificar a existência de possíveis variações no genoma viral que possam estar associadas à evolução da doença, tanto na resolução espontânea do quadro agudo, quanto na evolução para

um quadro crônico. Através deste estudo, pretendemos obter um direcionamento que possibilite um melhor entendimento sobre a presença ou ausência de aspectos moleculares virais envolvidos na progressão para a infecção crônica pelo HBV, bem como avaliar se existe diferença na circulação dos genótipos virais em pacientes agudos e crônicos residentes no Rio de Janeiro em um período recente, entre os anos de 2014 a 2018.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a variabilidade genética e os genótipos do HBV circulantes em indivíduos em diferentes estágios da doença no Rio de Janeiro entre os anos de 2014 e 2018.

3.2 Objetivos específicos

- a) Realizar a triagem nos prontuários, bancos de dados e soroteca do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, a fim de selecionar amostras de pacientes nos estados crônico e agudo, com diferentes desfechos clínicos (cura funcional ou evolução para doença crônica).
- b) Aplicar técnicas de biologia molecular visando detectar o DNA do HBV em pacientes com diferentes quadros clínicos e cargas virais variáveis.
- c) Determinar os genótipos do HBV circulando entre os pacientes crônicos, pacientes agudos que evoluíram para cura funcional e pacientes agudos que progrediram para cronicidade.
- d) Avaliar a sequência genômica viral buscando investigar as diferenças na variabilidade genética do HBV em pacientes com quadros clínicos diversos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

A triagem das amostras de indivíduos em diferentes estágios de infecção pelo HBV foi realizada através da plataforma GAL, na qual estão cadastrados todos os pacientes que deram entrada no Ambulatório de Hepatites Virais (AHV)/IOC/FIOCRUZ. A pesquisa buscou pacientes do Estado do Rio de Janeiro que foram atendidos no AHV durante os anos de 2014 a 2018. Preferencialmente, foram selecionadas amostras cuja carga viral foi maior que log 2 UI/mL determinada por PCR em tempo real pelo sistema “Abbott Real Time HBV assay” (Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, EUA). Não havia a informação prévia acerca dos genótipos destas amostras obtidas.

Foram selecionadas 90 alíquotas de soro de pacientes que deram entrada no AHV com infecção aguda (n=65) ou crônica (n=25) pelo HBV, cuja coleta se deu entre 2014 e 2018. Dentre as agudas, foram selecionadas: 29 correspondentes a pacientes com hepatite aguda que evoluíram para a resolução espontânea da doença, 36 que evoluíram para o quadro crônico.

Foram incluídos pacientes agudos e crônicos, positivos para os marcadores sorológicos anti-HBc e HBsAg, com idade acima de 18 anos, sem evidências sorológicas de outras hepatites virais.

Em relação às considerações éticas, o projeto possui aprovação Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ, CAAE: 71396617.6.0000.5248, sob o parecer nº. 2.308.183.

4.2 Extração dos ácidos nucléicos virais

As amostras de soro de pacientes infectados pelo HBV foram submetidas à extração de ácidos nucléicos utilizando o kit “High Pure Viral Nucleic Acid” (Roche Applied Science, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O produto da extração foi estocado em freezer -80°C até o momento de uso.

Em resumo, após a lise celular, o DNA presente em 200 microlitros de soro é retido por afinidade a uma coluna de sílica. Após etapas seriadas de lavagem e remoção de inibidores, a recuperação dos ácidos nucleicos ocorre através da eluição em tampão apropriado. O eluato obtido (DNA viral) é utilizado nas etapas posteriores do projeto.

4.3 Detecção do DNA do HBV através da amplificação por Semi Nested-PCR

A amplificação do DNA viral teve como alvo um fragmento de ~900 pares de base referente a região sobreposta dos genes codificantes do envelope viral (S) e da polimerase (P),

através de reação de *semi-nested* PCR. O conjunto de reagentes “Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen, Califórnia, EUA) foi utilizado para a amplificação por PCR que, devido a atividade de exonuclease presente na enzima utilizada, permitiu que a amplificação ocorresse com alta fidelidade de incorporação de nucleotídeos.

Para tanto, utilizou-se 20 μ L de mix de reação para cada amostra, sendo 0,2 mM de dNTPs, tampão específico para a DNA polimerase 1X, 2mM de cofator enzimático $MgSO_4$, 0,2 μ M de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) senso S1 e antisenso 4R, 0,5 U da enzima “Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity”, e q.s.p. de água destilada livre de DNase e RNase. Em seguida adicionou-se 5 μ L do DNA extraído, totalizando um volume final de 25 μ L. As amostras foram colocadas no termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), onde foram submetidas à seguinte ciclagem: aquecimento inicial a 94 °C por 2 minutos (desnaturação da dupla-fita de DNA), seguido por 30 ciclos de: 94 °C por 30 segundos (desnaturação), 55 °C por 30 segundos (hibridização aos primers) e 68 °C por 1 minuto (extensão). Finalizando a reação em uma etapa a 68 °C por 5 minutos (extensão final). Esta primeira PCR resultou na amplificação de um fragmento de ~997 pares de base do DNA viral.

Uma segunda PCR foi realizada utilizando-se 3 μ l de produto da primeira reação, além da mistura de reagentes contendo 0,5 U da enzima Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity, q.s.p de água destilada livre de DNA e RNA, 0,2 mM de dNTPs, 1x de High Fidelity PCR Buffer, 2 mM de $MgSO_4$ e 0,2 μ M de primers senso 1F e antisenso 4R para cada amostra, totalizando um volume final de 50 μ l. A reação foi incorporada ao termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, aquecendo inicialmente a 94°C por 2 minutos, iniciando 30 ciclos de: 94 °C por 15 segundos (desnaturação), 60 °C por 30 segundos (hibridização) e 68 °C por 1 minuto (extensão). Finalizando a reação em uma etapa a 68 °C por 5 minutos (extensão final). Esta segunda PCR resultou na amplificação de um fragmento de ~941 pares de base do DNA viral.

4.4 Visualização dos produtos amplificados (eletroforese em gel de agarose a 1,5%)

Para a visualização do perfil eletroforético, 5 μ L do produto amplificado foram misturados com 2 μ L de tampão contendo azul de bromofenol a 2% e aplicados em gel de agarose à 1,5% (dissolvido em tampão TBE, tris-borato-EDTA, contendo 3 μ L de brometo de etídio para cada 100 mL de TBE). Dois microlitros do peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) foi colocado em um dos poços do gel para certificação do correto tamanho dos fragmentos amplificados. Os produtos em gel foram submetidos à eletroforese (~80 volts)

durante aproximadamente 1 hora e o gel foi visualizado em câmara com luz ultravioleta UVP Transilluminator (ClinX, Shanghai, China).

4.5 Purificação e quantificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi utilizada para remover resíduos da PCR e possíveis interferentes, permitindo uma maior qualidade na reação de sequenciamento. Para tal, foram usados kits comerciais de acordo com as instruções dos fabricantes dos conjuntos de reagentes “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche Life Science) e “Promega Wizard SV gel and PCR” (Madison, Wisconsin, EUA). Ambos os kits consistem na ligação do produto amplificado em colunas de sílica, lavagens sucessivas com a sua posterior eluição, livre de interferentes.

Foram utilizadas duas metodologias: (i) purificação direto do produto de PCR ou (ii) em caso de bandas inespecíficas, o volume total de produto purificado foi aplicado em gel de agarose 1,5% (48 µL PCR 2 + 5 µL azul de bromofenol) a fim de cortar a banda de interesse.

A quantificação de DNA foi realizada através da visualização da intensidade do DNA purificado em gel de agarose, em comparação ao padrão molecular comercial “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen).

4.6 Sequenciamento nucleotídico

Após purificação e quantificação do produto amplificado, o volume adequado da amostra (100 ng de DNA amplificado) foi submetido à reação de sequenciamento pelo método de Sanger usando o kit “Big Dye Terminator Cycle Sequencing 3.1” (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) com dois pares de *primers* internos e externos a 3,2 µM (figura 11) sobrepostos para aferição do resultado. O *primer* S1 foi obtido através de um trabalho de Mello e colaboradores (2007) e os demais foram obtidos de um trabalho de Mallory, Page e Hillyard (2011). Após a reação com o “Big Dye”, a placa foi purificada e precipitada com isopropanol a 75%. Após adição de formamida Hi-Di, a placa foi analisada no equipamento “ABI 3500 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems).

<i>Prim</i>	Sequência	Técnica	Direção
S1	5'-CTTCTCGAGGACTGGGGACC-3'	PCR 1	Senso
4R	5'-GAAAGGCCTTGTAAGTTGGCG-3'	PCR1 + PCR2 + Sequenciamento	Antissenso
1F	5'-TAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGG- 3'	PCR 2 + Sequenciamento	Senso
2F	5'-CATCCTGCTGCTATGCCTCATC-3'	Sequenciamento	Senso
3R	5'-GATGGGATGGGAATACAGGTGC-3'	Sequenciamento	Antissenso

Figura 11- Quadro mostrando a relação de *primers* para o HBV utilizados nas reações de PCR e sequenciamento de Sanger (Mello et al., 2007; Mallory, Page e Hillyard, 2011).

4.7 Montagem e alinhamento de sequências

As sequências nucleotídicas obtidas a partir dos *primers* senso e antissenso de cada amostra foram editadas e a sequência consenso oriunda da análise das regiões de sobreposição dos dois *primers* foi montada no programa MEGA v.7.0 (Kumar; Stecher; Tamura, 2016) para as análises filogenéticas.

4.8 Análise de sequências e genotipagem do HBV por análise filogenética

Inicialmente, as sequências obtidas foram submetidas a análise de similaridade através da plataforma BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool” – disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para as análises moleculares, um alinhamento múltiplo da região genômica de interesse contendo as sequências obtidas no estudo juntamente com sequências representativas de todos os genótipos e subgenótipos do HBV disponíveis no GenBank foi gerado e trabalhado na ferramenta “Alignment Explorer” disponível no programa MEGA v.7.0.

A genotipagem do HBV foi realizada através da análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, implementado no programa MEGA v.7.0, utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos General Time Reversible (GTR) (definido a partir da ferramenta “Model Selection”), com *bootstrap* de 1000 pseudoreplicatas.

5 RESULTADOS

5.1 Triagem de amostras sorológicas

Amostras de pacientes portadores do HBV atendidos no AHV foram submetidas a triagem, extração e amplificação do DNA viral. As amostras triadas na soroteca do AHV foram estratificadas de acordo com os quadros clínicos dos pacientes. Todas as amostras foram provenientes de pacientes do estado do Rio de Janeiro e coletadas entre os anos de 2014 – 2018.

Das 90 amostras selecionadas para o estudo, 65 (72%) eram provenientes de pacientes que deram entrada em estado agudo e 25 (28%) em estado crônico. Destas, 34/65 (52,3%) amostras de pacientes em estado agudo e 20/25 (80%) amostras de pacientes crônicos obtiveram detecção positiva para a avaliação qualitativa do DNA do HBV. Das 34 amostras referentes à pacientes com o quadro agudo, 12 são de pacientes que evoluíram para a cura funcional e 22 são de pacientes que evoluíram para o quadro crônico. Os dados dos pacientes não amplificados e amplificados com sucesso para a região S/Pol do HBV (54/90, 60%) estão listados, respectivamente, nas tabelas 2 e 3, quanto ao ano de entrada no ambulatório, idade, sexo e carga viral identificada.

Tabela 2- Características dos pacientes com hepatite B selecionados para o estudo e que tiveram suas amostras amplificadas com sucesso por PCR.

Características	Hepatite B	
	Aguda (n=34)	Crônica (n=20)
Gênero		
Feminino	12 (35,3%)	10 (50%)
Masculino	22 (64,7%)	10 (50%)
Idade (mediana)	43 anos	38 anos
Carga viral média (log)	5,69 UI/ml	6,61 UI/ml

Tabela 3- Características dos pacientes com hepatite B selecionados para o estudo e que não tiveram suas amostras amplificadas por PCR.

Características	Hepatite B	
	Aguda (n=31)	Crônica (n=5)
Gênero		
Feminino	13 (41,9%)	4 (80%)
Masculino	18 (58%)	1 (20%)
Idade (mediana)	40 anos	47 anos
Carga viral média (log)	3.87 UI/ml	3.83 UI/ml

5.2 Detecção do DNA do HBV nas amostras de pacientes com hepatite B

Das 25 amostras correspondentes a pacientes em estado crônico, que foram submetidas à extração de ácidos nucleicos, PCR e eletroforese em gel de agarose, 20 (80%) obtiveram resultado positivo para o DNA do HBV (14 delas estão representadas na figura 12).

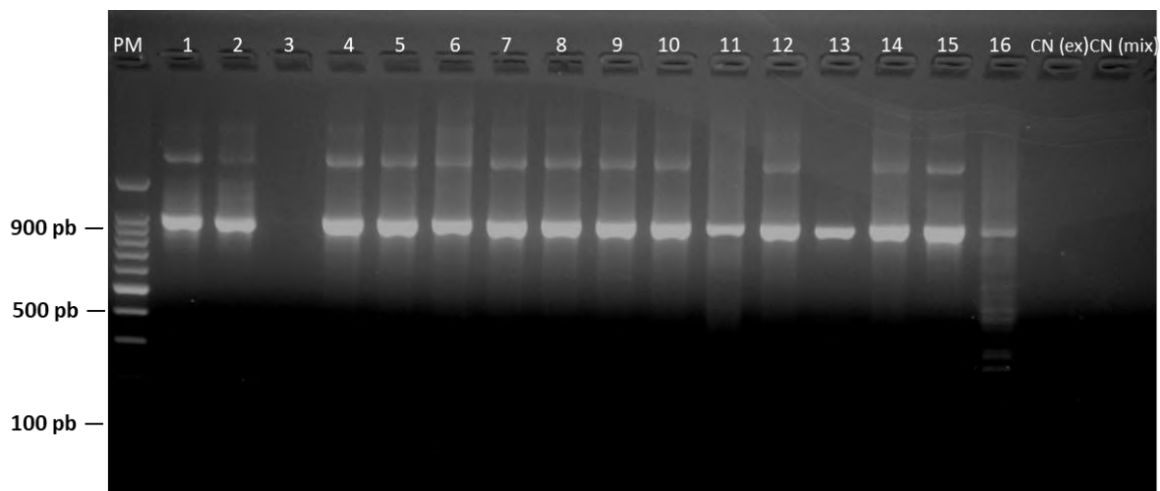


Figura 12 - Representação do perfil eletroforético, em gel de agarose, dos produtos amplificados pela PCR da região sobreposta do envelope viral (S) e da polimerase em pacientes crônicos. Sendo PM: marcador DNA 100pb; colunas 1, 2, e 4 a 15: amostras positivas; coluna 3: amostra negativa; coluna 16: controle positivo; coluna 17: controle negativo da extração (CN ex); coluna 18: controle negativo do mix da PCR (CN mix).

Das 65 amostras correspondentes à pacientes em estado agudo que foram submetidas à extração de ácidos nucleicos, PCR e eletroforese em gel de agarose, 34 (52,3%) obtiveram resultado positivo para o DNA do HBV (6 delas estão representadas na figura 13). As 36 amostras não amplificadas, dos diferentes quadros clínicos, já haviam sido quantificadas por PCR em tempo real, no qual houve detecção do DNA viral. A média das cargas virais das

amostras amplificadas com sucesso foi log 6,1 UI /ml, enquanto das amostras não amplificadas foi log 3,8 UI /ml.

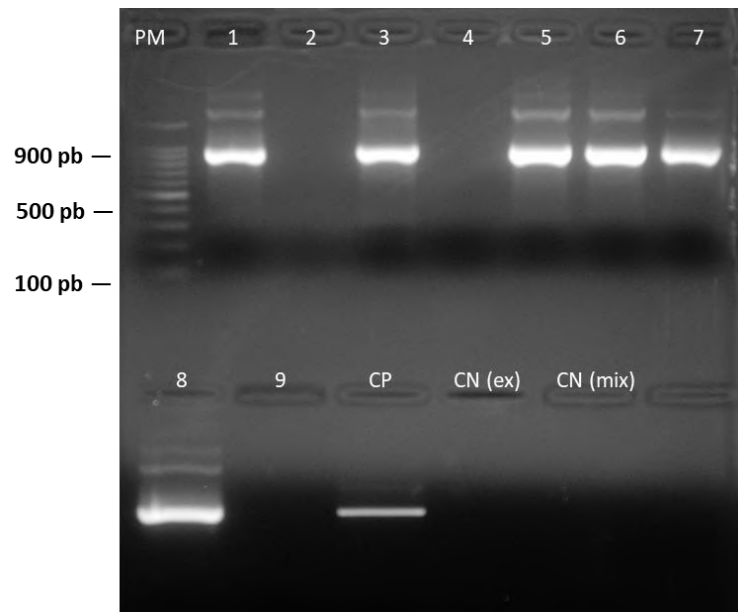


Figura 13 - Representação do perfil eletroforético, em gel de agarose, dos produtos amplificados pela PCR da região sobreposta do envelope viral (S) e da polimerase em pacientes agudos. Sendo PM: marcador DNA 100pb; colunas 1, 3 e 5 a 8: amostras positivas; colunas 2, 4 e 9: amostras negativas; coluna 10: controle positivo HBV; coluna 11 controle negativo extração (CN ex); coluna 12 controle negativo do mix da PCR (CN mix). Setas azuis indicam a altura de banda correspondente a 900 pbs.

Ao longo de toda a metodologia foi utilizada água estéril como controle negativo e duas amostras HBV positivas, todas detectadas previamente por PCR, como controle positivo.

5.3 Determinação dos genótipos do HBV

Os produtos de PCR de 34/54 (63%) amostras amplificadas com sucesso, incluindo agudos e crônicos, foram purificados, quantificados e submetidos à reação de sequenciamento nucleotídico e análise filogenética da região S/Pol do genoma do HBV (figura 14).

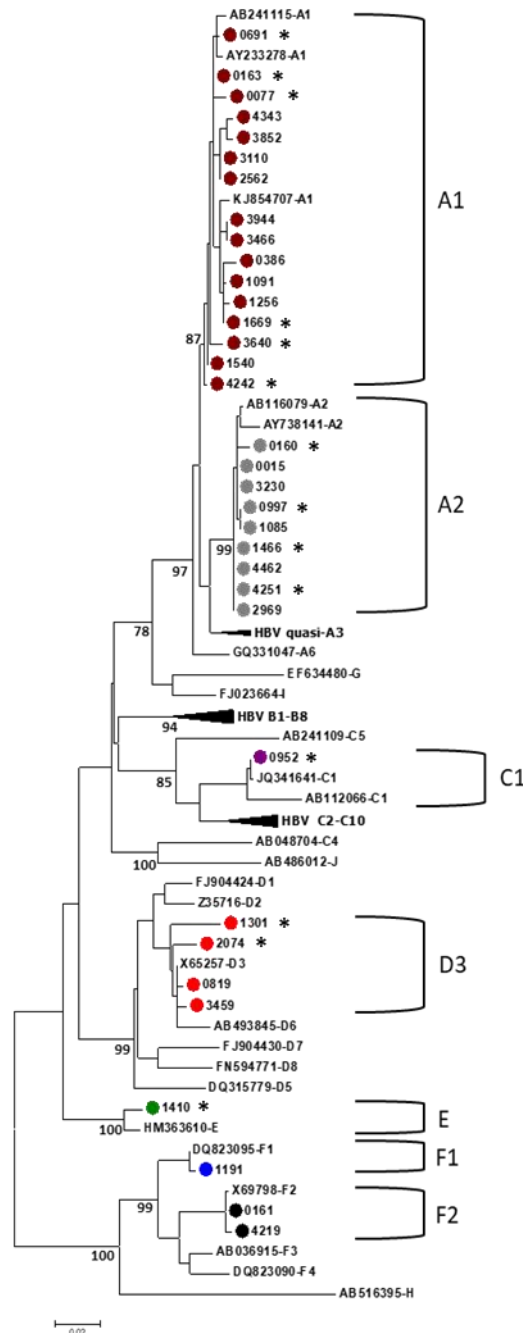


Figura 14 - Árvore filogenética referente à região parcial S/Pol do genoma do HBV (~900 pb). Construída pelo método de máxima verossimilhança com *bootstrap* de 1000 replicatas. Os círculos em marrom correspondem às amostras do subgenótipo A1; os círculos em cinza correspondem às amostras do subgenótipo A2; os círculos em roxo correspondem à amostra do subgenótipo C1; os círculos em vermelho correspondem às amostras do subgenótipo D3; o círculo em verde corresponde à amostra do genótipo E; o círculo em azul corresponde à amostra do subgenótipo F1; o círculo em preto correspondem às amostras do subgenótipo F2. As amostras contendo um asterisco (*) representam pacientes em estado crônico.

Das 34 amostras submetidas ao sequenciamento nucleotídico, 14 (41,2%) correspondem a pacientes em estado crônico e 20 (58,8%) correspondem a pacientes agudos. Destes 20 pacientes com hepatite B aguda, 12 (60%) evoluíram para a cura funcional da infecção enquanto 8 (40%) não conseguiram depurar a infecção, tornando-se portadores crônicos da doença.

Do total de pacientes em estado crônico, 10 (71,4%) estavam infectados com o HBV do genótipo A (HBV/A), sendo 6 deles pertencentes ao subgenótipo A1 e 4 ao subgenótipo A2. Um indivíduo, (1/14; 7,1%) apresentou infecção pelo genótipo C (HBV/C) (subgenótipo C2), 2 (14,3%) pelo genótipo D (HBV/D) (subgenótipo D3) e 1 (7,1%) pelo genótipo E (HBV/E).

Dentre os pacientes em estado agudo que evoluíram para hepatite B crônica, 6 (75%) estavam infectados pelo HBV/A (sendo 4 pelo subgenótipo A1 e 2 pelo subgenótipo A2), 1 (12,5%) pelo HBV/D (subgenótipo D3) e 1 (12,5%) pelo HBV/F (subgenótipo F2). Dos 12 pacientes em estado agudo que evoluiu para a cura funcional, 9 (75%) foram infectados pelo HBV/A (6 pelo subgenótipo A1 e 3 pelo subgenótipo A2), 1 (8,3%) pelo HBV/D (subgenótipo D3) e 2 pelo HBV/F (16,7%) (1 do subgenótipo F1 e 1 do subgenótipo F2) (tabela 4).

Tabela 4- Perfil genotípico e subgenotípico dos pacientes com hepatite B que tiveram suas amostras amplificadas por PCR.

Total = 34 (100%)		Crônicos (n=14; 44%)	Agudos (n=20; 56%)	
			Cronificação (n=8; 40%)	Cura funcional (n=12; 60%)
Genótipos	Subgenótipos			
A (n=25; 73,5%)	A1 (n=16; 64%)	6 (43,8%)	4 (50%)	6 (50%)
	A2 (n=9; 36%)	4 (28,5%)	2 (25%)	3 (25%)
C (n=1; 2,9%)	C1 (n=1; 100%)	1 (7,1%)	-	-
D (n=4; 11,7%)	D3 (n=4; 100%)	2 (14,2%)	1 (12,5%)	1 (8,3%)
E (n=1; 2,9%)	-	1 (7,1%)	-	-
F (n=3; 8,8%)	F1 (n=1; 33,3%)	-	-	1 (8,3%)
	F2 (n=2; 66,6%)	-	1 (12,5%)	1 (8,3%)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo se trata de um projeto piloto que teve como objetivo principal avaliar a variabilidade genética e genotípica viral em pacientes com diferentes desfechos clínicos. Para tanto, utilizou-se 90 amostras, das quais, 65 oriundas de pacientes em quadro agudo, que representam aproximadamente 10% dos pacientes agudos atendidos no AHV entre os anos de 2014-2018. A menor proporção de pacientes crônicos selecionados para o estudo deve-se ao fato de que a maioria dos estudos realizados pelo nosso grupo e relatados na literatura envolve pacientes crônicos, o que já nos fornece um conhecimento prévio da variabilidade genética e dos genótipos do HBV circulantes em portadores crônicos no Brasil. Diante disso, selecionamos apenas um pequeno número de amostras de indivíduos crônicos do mesmo período de tempo, visando corroborar os achados previamente publicados (Araujo *et al.* 2004; Mello *et al.* 2007; Lampe *et al.* 2017).

A evolução para a hepatite B crônica em pacientes infectados na idade adulta ocorre em 5-10% dos casos, dentre os quais, aproximadamente 30% desenvolvem quadros graves de cirrose ou hepatocarcinoma, resultando em aproximadamente, um milhão de óbitos anuais (WHO, 2018; Hepb, 2018). Visando evitar a influência da idade, que é sabidamente um fator altamente associado à cronificação, para o presente estudo selecionamos apenas indivíduos adultos, a fim de minimizar a influência da variável idade e, assim, obtermos uma pesquisa mais direcionada à relação entre os genótipos virais e a progressão da doença.

Em relação à detecção do DNA viral, das 90 amostras selecionadas, 54 (60%) tiveram o DNA do HBV detectado por PCR. Foi feito um levantamento acerca da carga viral de todas as 90 amostras inicialmente selecionadas para o estudo. A carga viral média das 36 amostras que não puderam ser amplificadas foi log 3,8 UI/mL, enquanto que a carga viral média das 54 amostras amplificadas com sucesso foi log 6,15 UI/mL. Estes dados sugerem que, um motivo possível pelo qual as 36 amostras remanescentes não tenham sido amplificadas com sucesso, seja devido às suas cargas virais mais baixas, quando comparadas às amostras que puderam ser amplificadas.

Com relação aos quadros clínicos, a porcentagem de amostras amplificadas correspondentes aos pacientes em estado crônico foi bastante superior ao número das amostras amplificadas correspondentes aos pacientes em estado agudo (tabelas 3 e 4). Das 34 amostras de pacientes agudos que amplificaram na PCR qualitativa, 22 são de pacientes agudos que evoluíram para o quadro crônico e 12 são de pacientes agudos que evoluíram para a cura funcional. A mediana de idade dos agudos que evoluíram para a cronificação foi de 45

anos, e a mediana de idade dos pacientes agudos que evoluíram para a cura funcional foi de 41 anos, não havendo, portanto, grandes diferenças de idade entre os grupos. A carga viral dos agudos que evoluíram para a cronificação foi de log 6,6 UI/mL, e a dos agudos que evoluíram para a cura funcional, foi de log 3,7 UI/mL. A principal variação observada entre os desfechos do grupo agudo foi em relação à carga viral das amostras. Os pacientes agudos que evoluíram para o quadro crônico apresentaram cargas virais mais altas no soro do que os pacientes agudos que evoluíram para o *clearance* viral. É possível que a baixa viremia detectada nos pacientes que evoluíram para o *clearance* seja um indicativo de que estes já estivessem desenvolvendo uma resposta imune mais adequada frente à infecção, o que resultou em cura funcional (Okamoto *et al.*, 2018).

De um modo geral, não houve diferença na distribuição genotípica entre os pacientes agudos e crônicos analisados no presente estudo. Das 34 amostras sequenciadas, 25 (73%) foram classificadas como pertencentes ao HBV/A, que é o genótipo mais prevalente no Brasil, de acordo com outros estudos disponíveis na literatura (Araujo *et al.* 2004, Mello *et al.* 2007, Lampe *et al.* 2017). Dentre os isolados de HBV/A, 16 (64%) estão classificadas no subgenótipo A1, e 9 (36%) no subgenótipo A2. As amostras restantes foram classificadas em quatro outros genótipos distintos: C (subgenótipo C1), D (subgenótipo D3), E e F (subgenótipos F1 e F2). De acordo com a literatura, HBV/A, HBV/D e HBV/F são os genótipos mais comumente encontrados no Brasil, refletindo a composição étnica da população brasileira, descendente, majoritariamente de populações africanas, européias e ameríndias (Araujo *et al.* 2004, Mello *et al.* 2007, Chacha *et al.* 2017, Lampe *et al.* 2017) e, portanto, sua circulação em portadores do HBV brasileiros já é amplamente reportada na literatura. Os genótipos C e E são prevalentes, respectivamente, na Ásia e África, e raramente encontrados no Brasil (Kramvis, 2014; Lampe *et al.* 2017), de modo que sua detecção no Brasil vem sendo associada a entrada de imigrantes de grupos étnicos específicos. É possível que a detecção de HBV/C e HBV/E seja oriunda de casos de infecção alóctone, visto que a análise dos prontuários destes pacientes sugere que ambos tenham origem ou ancestralidade estrangeira. Apesar disso, estudos anteriores já identificaram a presença do genótipo E em portadores crônicos de hepatite B em diversas regiões no Brasil e do genótipo C, principalmente em São Paulo, o estado mais populoso do país e polo de imigrantes asiáticos (Dermatini, 2000; Lampe *et al.*, 2017).

A detecção de estirpes virais importadas serve como uma ferramenta importante no monitoramento da introdução de novos isolados virais que, devido a variações patogênicas e terapêuticas, podem, futuramente, acarretar em impactos para a saúde pública (Pourkarim *et*

al. 2014; Sunbul, 2014; Kostaki *et al.*, 2018; Lago *et al.* 2019). Estudos mais aprofundados, envolvendo ferramentas robustas de filogenia e filogeografia, poderão ajudar a inferir com maior grau de segurança, os padrões de dispersão geográfica relacionados a estes isolados.

Tanto a amostra HBV/C quanto HBV/E detectadas foram obtidas de pacientes crônicos para a hepatite B. Yuen e colaboradores (2018) demonstraram que a cronificação da doença é mais prevalente no Pacífico ocidental e em regiões africanas. Além disso, vem sendo observada uma maior progressão para quadros de doença hepática grave em portadores do genótipo C (Araujo, Waizbort e Kay, 2011; Sunbul, 2014; Lin e Kao 2017). O impacto da circulação dessas estirpes importadas pode ser evidenciado no estudo de Kramvis e colaboradores (2014), no qual foi relatado que pacientes infectados com o genótipo E, de origem africana, possuem alta frequência de positividade para o HBeAg, e altas cargas virais quando comparado a pacientes infectados com o genótipo D, um genótipo mundialmente disperso e o segundo mais prevalente no Brasil. Sabe-se que um requisito essencial para a infecção aguda se tornar crônica é a expressão do HBeAg (Kramvis *et al.* 2014, Lin e Kao, 2017). Pode-se dizer, então, que é mais provável que uma estirpe africana introduzida no Brasil evolua para a cronificação do que algumas das estirpes endêmicas no Brasil, como HBV/D e F (Araujo, Waizbort e Kay, 2011).

A prevalência dos genótipos em relação ao quadro agudo que evoluiu para a cura funcional foi de 6 HBV/A (76%), sendo 4 do subgenótipo A1 e 2 do subgenótipo A2, 1 HBV/F (12%), do subgenótipo F2 e 1 HVD/3, do subgenótipo D3 (12%). A prevalência dos genótipos em relação ao quadro agudo que evoluiu para a cronicidade foi de 9 HBV/A (75%), sendo 6 do subgenótipo A1 e 3 do subgenótipo A2, 2 HBV/F 1 (17%), sendo os subgenótipos F1 e F2 e 1 HBV/D (8%), do subgenótipo D3. Foi visto em Lin e Kao (2017) que os genótipos A, B e D estão mais associados a quadros de hepatite B aguda no Japão, em Taiwan e na Índia, respectivamente. Um trabalho argentino revelou que os genótipos D e F foram os principais causadores dos quadros agudos no país (Pezzano *et al.*, 2011). Por outro lado, um estudo multicêntrico japonês mostrou que o genótipo A também foi amplamente encontrado em pacientes que tiveram HBsAg persistente no soro por mais de 6 meses após desenvolverem um quadro de hepatite B aguda (Ito *et al.*, 2014). Na Índia, Sarkar e colaboradores (2015) demonstraram que o genótipo C foi mais amplamente encontrado em indivíduos com hepatite crônica do que em indivíduos com a doença aguda. Diferentemente destes trabalhos citados, não observamos diferenças entre os genótipos para a evolução dos quadros agudo e crônico ou para a cura. Possivelmente isto se deve ao pequeno número de amostras analisados até o momento, ou ao fato de que o genótipo A, que também vem sendo

associado a cronificação do HBV (Araujo, Waizbort e Kay, 2011), ser o mais prevalente no território brasileiro. Como base de comparação para os nossos achados, em pesquisas em bases de dados científicas, não foram encontrados trabalhos publicados no Brasil, de que tenhamos conhecimento, comparando a variabilidade genética entre pacientes agudos e crônicos.

Ao contrário da hepatite crônica, onde diversos estudos têm relatado a complexidade genética do HBV, existem poucos estudos disponíveis a respeito da relação entre os genótipos do HBV e a hepatite B aguda (Lin CL, 2017).

No presente estudo, entre os pacientes que deram entrada ao AHBV com o quadro agudo, as amostras HBV/A obtidas (n=15), 6/15 (40%) evoluíram para a cura funcional e 9/15 (60%) progrediram para a cronificação. Das amostras agudas de HBV/D (2), 50% (1/2) foi de pacientes que evoluíram para a cura espontânea e 50% (1/2) evoluiu para a cronificação. Dos pacientes detectados com o genótipo F (3), 33% (1/3) evoluíram para cura, enquanto que 67% (2/3) evoluíram para a cronificação.

Diante dos resultados obtidos, não foi possível relacionar a prevalência dos genótipos encontrados aos diferentes desfechos clínicos dos pacientes analisados. Em um estudo realizado no Japão, região onde os HBV/B e C são historicamente os mais prevalentes (Kramvis, 2014), elevadas prevalências do HBV/A foram reportadas em pacientes agudos adultos atribuídos à transmissão sexual (Tamada *et al.*, 2012). Diferentemente do observado por Tamada e colaboradores (2012), onde a proporção do genótipo A nesses pacientes passou de 1,7% em 1999/2000 para 3,5% em 2005/2006, não foi observada diferença na distribuição dos genótipos entre pacientes agudos e crônicos no presente estudo. Esse fato pode ser atribuído ao nosso número amostral reduzido, ao intervalo de tempo utilizado, ou, ainda, ao fato do genótipo A já ser altamente prevalente no Brasil, podendo atuar como um fator confundidor, estando presente tanto em paciente crônicos como em infecções recentes.

Diferentemente dos achados de Tamada e colaboradores (2012) e Sarkar e colaboradores (2015), não foram encontradas diferenças genômicas notáveis entre pacientes agudos e crônicos no nosso estudo, não sendo possível sugerir associações entre padrões genéticos virais e progressão para os diferentes quadros clínicos. Entretanto, o fato de analisarmos apenas as populações majoritárias através do sequenciamento pelo método de Sanger, poderia acabar mantendo ocultas subpopulações virais que apresentem polimorfismos associados a determinados desfechos clínicos.

Das 54 amostras detectadas por PCR convencional, 34 (63%) foram sequenciadas. As 20 amostras restantes não puderam ser sequenciadas devido a uma interdição emergencial do

pavilhão onde está localizado o LAHEP, suspendendo temporariamente as atividades de pesquisa e referência dos laboratórios de virologia do IOC. Entretanto, assim que as atividades laboratoriais forem restabelecidas, as mesmas serão sequenciadas e analisadas visando a publicação científica final.

Por fim, como conclusão parcial do presente estudo, não foram observadas diferenças na variabilidade genética entre pacientes agudos e crônicos ou entre pacientes agudos que evoluíram para a cronificação e os que obtiveram a cura funcional. Como melhorias a serem implementadas na continuidade deste estudo, podemos ressaltar a necessidade de um número amostral mais robusto, a possibilidade de ampliarmos o intervalo de tempo analisado, o sequenciamento do genoma completo, bem como a utilização do sequenciamento de alta vazão, a fim de identificarmos padrões moleculares específicos em estirpes virais minoritárias. Com a adoção dessas melhorias, poderemos avaliar com mais confiabilidade a existência de características virológicas associadas aos diferentes desfechos clínicos de pacientes agudos e crônicos no Brasil.

Além disso, informações sobre mudanças na distribuição de genótipos ao longo do tempo, assim como manifestações clínicas genótipo específicas, podem trazer informações pertinentes que auxiliem o planejamento de políticas públicas visando a adoção de medidas preventivas e no aprimoramento de estratégias de terapia antiviral.

7 CONCLUSÕES

- Até o momento não foi possível observar diferenças entre os genótipos do HBV circulantes entre os quadros agudos e crônicos;
- Foi identificada a circulação de estirpes virais importadas em pacientes portadores da infecção crônica pelo HBV;
- A continuidade deste estudo permitirá identificar a diversidade genética do HBV circulante entre 2014 e 2018 em pacientes com diferentes quadros clínicos no Rio de Janeiro, bem como a introdução de variantes virais importadas.

8 PERSPECTIVAS

Nas próximas etapas, as amostras já amplificadas (20) serão sequenciadas, alinhadas e analisadas filogeneticamente. Haverá uma nova comparação entre os diferentes genótipos e quadros clínicos estudados para avaliar uma possível associação da variabilidade genética do HBV com a evolução dos quadros da hepatite B. Após o término dos resultados, o artigo científico será escrito e experimentos complementares serão realizados visando a publicação deste trabalho.

Este projeto terá continuidade no mestrado, tendo início previsto para os primeiros meses de 2020. Como objetivo desta nova etapa, serão desenvolvidos vetores lentivirais para silenciamento do HBV por RNA de interferência (RNAi) e será avaliada a eficiência do silenciamento em diferentes genótipos do HBV. Para tal, serão selecionadas amostras representativas da diversidade genotípica circulante (genótipos A, C, D, E e F), dos diversos quadros clínicos, obtidas neste estudo e em um trabalho anterior do grupo (Lampe ., 2014), e submetidas à amplificação de seus genomas completos para expressão em cultura celular. Isolados do HBV de diferentes genótipos e quadros clínicos serão transfectados em cultura de células de hepatoma, nas quais serão medidas a expressão de proteínas do vírus da hepatite B, carga viral e eficiência replicativa dentre os diferentes genótipos e quadros clínicos da doença, bem como será avaliada a sua suscetibilidade ao silenciamento gênico por RNAi.

9 OUTRAS ATIVIDADES

- **Organização de eventos;**

- XXV Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ (aulas de virologia para o Ensino Médio – professora);
- XXIV Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ (organização do evento – patrocínio);
- XXIII Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ (aulas de virologia para o Ensino Médio – monitora);
- II Simpósio de Virologia da UFRJ (organização do evento – aulas de virologia para o Ensino Médio);

- **Participação em eventos científicos;**

- XXV Congresso Brasileiro de Hepatologia;
- III Simpósio de Biotecnologia da UFRJ;
- V Simpósio avançado de Virologia Hermann Schatzmayr;
- XXII Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ;
- XXIII Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ;
- XXIV Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ;
- XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia;
- XXIX Congresso Brasileiro de Virologia;

- **Apresentação de trabalhos:**

- *“Replicação dos vírus Mayaro e Chikungunya em células musculares resulta em geração de espécies reativas de oxigênio, disfunção mitocondrial e morte celular.”* - XXIII Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ, 2017;
- *“Desenvolvimento de vetores lentivirais para inibição do vírus da hepatite B, via RNA de interferência.”* - XXIV Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ 2018;
- *“Análise do silenciamento gênico e expressão de proteínas do vírus da hepatite B, via RNA de interferência.”* - 27ª Reunião Anual de Iniciação Científica do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, 2019;
- *“Mayaro and Chikungunya virus replication in muscular cells results in reactive oxygen species generation, mitochondrial dysfunction and cell death.”* 2017. - XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2017;

- *“Análise da variabilidade genética de portadores do vírus da hepatite B em diferentes estágios da infecção.”* - XXV Congresso Brasileiro de Hepatologia, 2019; XXV Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ.

- **Prêmios**

- Melhores trabalhos - 27ª Reunião Anual de Iniciação Científica do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, 2019;

- **Treinamento de acurácia em pipetagem e biossegurança oferecido pelo LAHEP;**
- **Treinamento em técnicas do laboratório oferecido pelo LAHEP;**
- **Reuniões mensais para discussão de artigo;**

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, Z., Jafri, W. e Hamid, S. (2010). Management of Hepatitis B: Pakistan Society for the Study of Liver Diseases (PSSLD) Practice Guidelines. *J. Coll Physicians Surg Pak.* 20, 198-01.
- Aggarwal, R. e Goel, A. (2015). Hepatitis A: epidemiology in resource-poor countries. *Current opinion in infectious diseases.* 28, 488-96.
- Alberti, A., Tremolada, F., Fattovich, G., Bortolotti, F. e Realdi, G. (1983). Virus replication and liver disease in chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci* 28, 962-966.
- Alvarado-Mora, M. V. e Rebello Pinho, J. R. (2013). Distribution of HBV genotypes in Latin America *Antiviral Therapy.* 18, 459-65.
- Araujo, N. M., Mello, F. C. A., Yoshida, C. F. T., Niel, C. e Gomes, S. A. (2004). High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. *Archives of Virology.* 149, 1383-1395.
- Araujo, N. M., Waizbord e R., Kay, A. (2011). Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: How viral, host and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. *Infection, Genetics and Evolution.* 11, 1199-1207.
- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. H. e Magnius, L. O. (2002). Genotype H: A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *Journal of General Virology.* 83, 2059-73.
- Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savin Skaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Suvinov, A. P. e Poleschuk, V. F. (1983). Evidence for a virus in Non-A, Non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology.* 20, 23-31.
- Bancroft, W.H., Mundon, F.K. e Russell, P.K. (1972). Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol.* 109, 842-48.
- Bartlett, J. G. (2004). Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *Infectious Diseases in Clinical Practice.* 12, 388-389.
- Beck, J. e Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World journal of gastroenterology.* 13, 48-64.
- Beyer, M. E., Blumberg, B. S. e Werner, B. (1968). Erratum: Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature.* 218, 1057-9.
- Bhattacharya, D. e Thio, C. L. (2010). Review of Hepatitis B Therapeutics. *Clinical Infectious Diseases.* 51, 1201-1208.
- Blumberg, B. S., Alter, H. J. e Visnich, S. A. (1965). "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA.* 15, 541-6.
- Blumberg, B. S., Gerstley, B. J., Hungerford, D. A., London, W. T. e Sutnick, A. I. (1967). A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Annals of internal medicine.* 66, 924-31.
- Brechot, C., Thiers, V., Kremsdorf, D., Nalpas, B., Pol, S. e Paterlini-Bréchet, P. (2001). Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology.* 34, 194-03.
- Bruss, V. (2004). Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Research.* 106, 199-209.
- Cao, G. W. (2009). Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World Journal of Gastroenterology.* 15, 5761-5769.
- Carrilho, J. F. e Silva, L. C. (1995). Epidemiologia. In: *Hepatites Agudas e Crônicas.* da Silva, LC eds. (São Paulo, Savier), pp. 73-95.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2008). CDC Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection. *57*, 1-20.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009). Hepatitis information for the public: Viral hepatitis.
- Chachá, S. G. F., Gomes-Gouvêa, M. S., Malta, F. de M., Ferreira, S. da C., Villanova, M. G., Souza, F. F., Teixeira, A. C., Passos, A. D. C., Pinho, J. R. R. e Martinelli, A. de L. C. (2017). Distribution of HBV subgenotypes in Ribeirão Preto, Southeastern Brazil: a region with history of intense Italian immigration. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. *21*, 424–432.
- Chan, H. L.Y. e Lok, A. S. F. (1999). Hepatitis B in adults: A clinical perspective. *Hep B Clins in liver dis*. *3*, 291-08.
- Chisari, F. V. e Ferrari, C. (2003). Hepatitis B Virus Immunopathogenesis. *Annual Review of Immunology*. *13*:29-60.
- Choo Q. L., Kuo G., Weiner A. J., Overby L. R., Bradley D. W. e Houghton M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. *244*, 359-62
- Chu C. J. e Lok A. S. (2002). Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology*. *35*, 1274e6.
- Couroucé-Pauty, A. M., Plançon, A. e Soulier, J. P. (1983). Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang*. *44*, 197-11.
- Coursaget, P., LeCann, P., Leboulleux, D., Diop, M. T., Bao, O. e Coll, A. M. (1991). Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in HBsAg negative Senegalense patients suffering from cirrhosis or primary liver cancer. *FEMS Microbiol Lett*. *67*, 35-39.
- Da Fonseca, J. C. F. (2010). Histórico das hepatites virais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. *43*, 322-330.
- Dane, D. S., Cameron, C. H. e Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. *1*, 695-8.
- Davison, F., Alexander, G. J., Trowbridge, R., Fagan, E. A. e Williams, R. (1987). Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication. *Journal of Hepatology*. *4*, 37-44.
- Demartini, Z. B. F (2000). Relatos orais de famílias de imigrantes japoneses: Elementos para a história da educação brasileira. *21*, 71.
- Elghouzzi, M. H., Couroucé, A. M., Magnius, L. O., Lunel F. e Lapiere, V. (1995). Transmission of hepatitis B virus by HBV-negative blood transfusion. *Lancet*. *346*, 964.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z. e Purceli, R. H. (1973). Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*. *182*, 1026-8.
- Ferraz, M. L. G. (2007). Editorial. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*.
- Flichman, D. M., Blejer, J. L., Livellara, B. I., Re, V. E., Bartoli, S., Bustos, J. A., Ansola, C. P., Hidalgo, S., Cerda, M. E., Levin, A. E., Huenul, A, Riboldi, V., Treviño, E. M. C., Salamone, H. J., Nuñez, F. A., Fernández, R. J., Reybaud, J. F. e Campos, R. H. (2014). Prevalence and trends of markers of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human Immunodeficiency virus in Argentine blood donors. *BMC Infectious Diseases*.
- Ganem, D. e Varmus, H. E. (1987). The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem*. *56*, 651-93.
- Ganem, D (1996). Hepadnaviridae: The viruses and their replication. In: *Virology Fields*. BN Knipe DM et al. Howley eds. (Philadelphia. Lipponcott-Raven), pp. 2703-3737.

- Gardner, H. T. (1950). A note on the history of epidemic viral hepatitis in Germany. *The American Journal of Medicine*. 8, 561–564.
- Genaro, O., Brener, Z. e Coelho, P. M. (1986). *Schistosoma mansoni*: immunodepression of hepatic schistosome granuloma formation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 19, 35-37.
- Gerber, M. A. , Hadziyannis, S. , Vissoulis, C. , Schaffner, F. , Paronetto, F. e Popper, H. (1974). Electron microscopy and immunoelectronmicroscopy of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes. *The American journal of pathology*. 75, 489-502.
- Gerlich, W. H. (2013). Medical Virology of Hepatitis B: How it began and where we are now. *Virology Journal*. 10, 239.
- Gomes, S. A. (2003). Tratado de Hepatites virais. In: O vírus da Hepatite B. Editora Athenem. 119-25.
- Gonçales, F. L. (1997). Hepatite por vírus B. In: Tratado das Hepatites Virais. Focaccia R. eds. (São Paulo: Atheneu), pp. 27-49.
- Grabow, W. O. K., Prozesky, O. W., Applebaum, P. C. e Lecatsas, G. (1975). Absence of hepatitis B antigens from feces and sewage as a result of enzymatic destruction. *J Infect Dis*. 131, 658-664.
- Grethe, S., Heckel, J. O., Rietschel, W. e Hufert, F. T. (2000). Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol*. 74, 5377-81.
- Grimm, D., Thimme R. e Blum, H. E. (2011). HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatology*. 5, 644-53.
- Hamond, C., Silveira, C. S., Buroni, F., Suanes, A., Nieves, C., Salaberry, X., Aráoz, V., Costa, R. A., Rivero, R., Giannitti, F. e Zarantonelli. L. (2019). *Leptospira interrogans* serogroup Pomona serovar Kennewicki infection in two sheep flocks with acute leptospirosis in Uruguay. *Transboundary and Emerging Diseases*. 66, 1186-1194.
- Heermann, K. H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. e Gerlich, W. H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *Journal of virology*. 52, 396–402
- Hepb. Hepatitis B Foundation. (2019) Acute vs. Chronic Infection. Disponível em: <https://www.hepb.org/what-is-hepatitis-b/what-is-hepb/acute-vs-chronic/>. Acesso em 25/11/2019.
- Hu, X., Margolis, H. S., Purcell, R. H., Ebert, J., e Robertson, B. H. (2000). Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97, 1661-1664.
- Huang, J., Lin S., Wan, B. e Zhu, Y. (2018). A Systematic Literature Review of Syphilitic Hepatitis in Adults. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 6, 306–309.
- Hundie, G. B., Stalin, R. V., Gebre, M. D., Pas, S. D., Koopmans, M. P., Osterhaus, A. D., Smits, S. L. e Haagmans, B. L. (2017). A novel hepatitis B virus subgenotype D10 circulating in Ethiopia. *Journal of Viral Hepatitis*. 24, 163-173.
- Ito, K., Yotsuyanagi, H., Yatsunami, H., Karino, Y., Takikawa, Y., Saito, T., Arase, Y., Imazeki, F., Kurosaki, M., Umemura, T., Ichida, T., Toyoda, H., Yoneda, M., Mita, E., Yamamoto, K., Michitaka, K., Maeshiro, T., Tanuma, J., Tanaka, Y., Sugiyama, M., Murata, K., Masaki, N., Mizokami, M. (2014). Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology*. 59, 89-97.
- Khuroo, M. S., Khuroo, M. S. e Khuroo, N. S. (2016). Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World Journal of Gastroenterology*. 22, 7030-45.
- Kidd-ljunggren, K., Miyakawa, Y., Kidd, A. H. (2002). Genetic variability in hepatitis B viruses. *Journal of General Virology*. 83, 1267-80.

- Kiire, C. F. (2007). The epidemiology and prophylaxis of hepatitis B in sub-Saharan Africa: a view from tropical and subtropical Africa. *Gut*. 38, 5-12.
- Kim, B. K., Revill, P. A. e Ahn, S. H. (2011). HBV genotypes: Relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antiviral Therapy*. 16, 1169– 1186.
- Klingmüller, U. e Schaller, H. (1993). Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol*. 67, 7414-22.
- Kostaki, E.G.; Karamitros, T.; Stefanou, G.; Mamais, I.; Angelis, K.; Hatzakis, A.; Kramvis, A. e Paraskevis, D. (2018). Unravelling the history of hepatitis B virus genotypes A and D infection using a full-genome phylogenetic and phylogeographic approach. *eLife*. 7, e36709.
- Kramvis, A., Arakawa, K., Yu, M. C., Nogueira, R., Stram, D. O. e Kew, M. C. (2008). Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol*. 80, 27-46.
- Kramvis, A. (2014). Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology*. 57, 141-50.
- Kumar, S., Stecher, G. e Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*. 33, 1870-4.
- Kurbanov, F., Tanaka, Y., Fujiwara, K., Sugauchi, F., Mbanya, D., Zekeng, L., Ndembi, N., Ngansop, C., Kaptue, L., Miura, T., Ido, E., Hayami, M., Ichimura, H. e Mizokami, M. (2005). A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *Journal of General Virology*. 86, 2047-56.
- Lago, B.V.; do Espirito-Santo, M.P.; Costa, V.D.; Marques, V.A.; Villar, L.M.; Lewis-Ximenez, L.L.; Lampe, E. e Mello, F.C.A. (2019). Genetic Diversity of the Hepatitis B Virus Subgenotypes in Brazil. *Viruses*. 11, 860.
- Lai, C. L. e Yuen, M. F. (2000). Profound suppression of hepatitis B virus replication with lamivudine. *Journal of Medical Virology*. 61, 367-73.
- Lampe, E., Mello, F. C. A., do Espírito-Santo, M. P., Oliveira, C. M. C., Bertolini, D. A., Gonçalves, N. S. L., Moreira, R. C., Fernandes, C. A. S., Nascimento, H. C. L., Grotto, R. M. T., Pardini, M. I. M. C. e The Brazilian Hepatitis B Research Group. (2017). Nationwide overview of the distribution of hepatitis B virus genotypes in Brazil: A 1000-sample multicentre study. *Journal of General Virology*. 98, 1389-1398.
- Lara-Pezzi, E., Armesilla, A. L., Majano, P. L., Redondo, J. M., López-Cabrera, M. (1998). The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway. *EMBO Journal*. 17, 7066–7077.
- Le Bouvier, G. L. (1971). The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis*. 123, 671-75.
- Lee, W. M. (1997). Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*. 337, 1733-45.
- Leonardsson, H., Hreinsson, J. P., Löve, A., Björnsson E. S. (2017). Hepatitis due to Epstein–Barr virus and cytomegalovirus: clinical features and outcomes. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 52, 893-897.
- Levene, C. e Blumberg, B. S. (1969). Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. *Nature*. 221,195-96.
- Li, W. (2015). The Hepatitis B Virus Receptor. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 31, 125-47.
- Liaw, Y. F., Chien, R. N., Yeh, C. T., Tsai, S. L. e Chu, C. M. (1999). Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology*. 30, 567-72.
- Lien, J. M., Petcu, D. J., Aldrich, C. E. e Mason, W. S. (1987). Initiation and Termination of Duck Hepatitis B Virus DNA Synthesis during Virus Maturation. *Journal of virology*. 61, 3832–3840.

- Lin, C. L. e Kao, J. H. (2011). The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1, 123-30.
- Lin, C. L., Kao, J. H. (2017). Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 31, 249-255.
- Ling, R. e Harrison, T. J. (1999). Functional analysis of mutations conferring lamivudine resistance on hepatitis B virus. *J of Gen Virol*. 80, 601-06.
- Lurman, A. (1885). Eine icterus epidemic. *Berl Klin Wochenschr*. 22, 20–23.
- Magnius, L. O. e Norder, H. (1995). Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*. 38, 24-34.
- Mallory, M. A., Page, S. R., Hillyard, D. R. (2011). Development and validation of a hepatitis B virus DNA sequencing assay for assessment of antiviral resistance, viral genotype and surface antigen mutation status. *J Virol Methods*. 177, 31-7.
- Marion, P. L., Oshiro, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H. e Robinson, W. S. (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci*. 77, 2941-45.
- Mason, W. S., Aldrich, C., Summers, J. e Taylor, J. M. (1982). Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA. *Proc Natl Acad Sci*. 79, 3997-4001.
- McIntyre, N. (1990). Clinical presentation of acute viral hepatitis. *Br Med Bull*. 46, 535-547.
- Mello, F. C. A., Souto, F. J. D., Nabuco, L. C., Villela-Nogueira, C. A., Moraes-Coelho, H. S., Franz, H. C. F., Saraiva, J. C. P., Virgolino, H. A., Motta-Castro, A. R. C., Melo, M. M. M., Martins, R. M. B., Gomes, S. A. (2007). Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiology (Online)*. 23, 7-103.
- Merican, I., Guan, R., Amarapura, D., Alexander, M. J., Chutaputti, A., Chien, R. N., Hasnian, S. S., Leung, N., Lesmana, L., Phiet, P. H., Sjalfoellah, N., H. M., Sollano, J., Sun, H. S. e Xu, D. Z. (2000). Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 15, 1356-61.
- Ministério da Saúde. (2011). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. [s.l: s.n.].
- Ministério da Saúde. (2017). Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite B e coinfecções. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais, v. 1, p. 120.
- Ministério da Saúde. (2018). Boletim Epidemiológico Hepatites Virais. [s.l: s.n.].
- Miyakawa, Y. e Mizokami, M. (2003). Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology*. 46, 329e38.
- Moresco, M. N. DO. S., Virgolino, H. de A., de Moraes, M. P., da Motta-Passos, I., Gomes-Gouvêa, M. S., de Assis, L. M., Aguiar, K. R., Lombardi, S. C., Malheiro, A., Cavalheiro, N. de P., Levi, J. E. e Torres, K. L. (2014). Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: Implications for transfusion policy. *Vox Sanguinis*. 107, 19-25.
- Motavaf, M., Safari, S., Saffari, Jourshari, M. e Alavian, S. M. (2013). Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: The role of the virus x protein. *Acta Virologica*. 57, 389-96.
- Murakami, S. (2001). Hepatitis B virus X protein: A multifunctional viral regulator. *Journal of Gastroenterology*. 36, 651-60
- Nassal, M. e Rieger, A. (1993). An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys61 determines the structure of the secretory gene product (e antigen) of hepatitis B virus. *J. Virol*. 67, 4307-15.

- Nassal, M. e Schaller, H. (1996). Hepatitis B virus replication-an update. *J Viral Hepat.* 3, 217-26.
- Neurath, A. R., Kent, S. B. e Strick, N. e Parker, K. (1986). Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell.* 46, 429-36.
- Norder, H., Hammas, B., Löfdahl, S., Couroucé, A. M. e Magnius, L. O. (1992). Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *Journal of General Virology.* 73, 1201-8.
- Norder, H., Hammas, B., Lee, S. D., Bile, K., Couroucé, A. M., Mushahwar, I. K. e Magnius, L. O. (1993). Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *Journal of General Virology.* 74, 1341-8.
- Norder, H., Courouc, A. M. e Magnius, L. O. (1994). Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology.* 198, 489-503
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R. I., Imai, M., Miyakawa, Y. e Mayumi, M. (1988). Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 69, 2575-83.
- Okamoto, S., Yamasaki, K., Komori, A., Abiru, S., Nagaoka, S., Saeki, A., Hashimoto, S., Bekki, S., Okamoto, H. e Yatsushashi, H. (2018). Dynamics of hepatitis B virus serum markers in an acute hepatitis B patient in the incubation phase. *Clinical Journal of Gastroenterology.* 12, 218-222.
- Olinger, C. M., Venard, V., Njayou, M., Oyefolu, A. O., Maïga, I., Kemp, A. J., Omilabu, S. A., le Faou, A. e Muller, C. P. (2006). Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol.* 87, 1163– 73.
- Patient, R., Hourieux, C. e Roingeard, P. (2009). Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol.* 11, 1561-70.
- Pezzano, S. C., Torres, C., Fainboim, H. A., Bouzas, M. B., Schroder, T., Giuliano, S. F., Paz, S., Alvarez, E., Campos, R. H., Mbayed, V. A. (2011). Hepatitis B virus in Buenos Aires, Argentina: genotypes, virological characteristics and clinical outcomes. *Clin Microbiol Infect.* 17, 223-31.
- Pileggi, C., Papadopoli, R., Bianco, A., e Pavia, M. (2017). Hepatitis B vaccine and the need for a booster dose after primary vaccination. *Vaccine.* 35, 6302–6307.
- Pourkarim, M. R., Amini-Bavil-Olyae, S., Kurbanov, F., Van Ranst, M. e Tacke, F. (2014). Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: Revised classification hurdles and updated resolutions. *World Journal of Gastroenterology.* 20, 7152–7168.
- Pult, I., Netter, H. J., Bruns, M., Prassolov, A., Sirma, H. e Hohenberg, H. (2001). Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology.* 289, 114-28.
- Ren, C. C., Chen, Q.Y., Wang, X. Y., Harrison, T., Yang, Q. L., Hu, L. P., Liu, H. B., He, X., Jia, H. H. e Fang, Z. L. (2019). Novel subgenotype D11 of hepatitis B virus in NaPo County, Guangxi, bordering Vietnam. *The Journal of general virology.* 100, 828-837.
- Rizzetto, M., Canese, M. G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F. e Verme, G. (1977). Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (δ /anti- δ) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut.* 18, 997-1003
- Rizzetto, M. e Ciancio, A. (2012). Epidemiology of hepatitis D. *Seminars in Liver Disease.* 32, 211-9.
- Robertson, B. H. e Margolis, H. S. (2002). Primate hepatitis B viruses - Genetic diversity, geography and evolution. *Reviews in Medical Virology.* 12, 133-141.

- Salvatori L., Lavorino, C., Giglio, A., Alemanno, L., Di Carlo, A., Ameglio, F. e Caprilli, F. (1999). Seroprevalence of anti-human parvovirus B19 antibodies in patients attending a centre for sexually transmitted diseases. *New Microbiologica*. 22, 181-6.
- Santos, N. S. de O., Romanos, M. T. V., Wigg, M. D. (2015). Hepatites Virais. In: *Virologia Humana*. Soares, C. C., Niel, C. M. G., Mello, F. C. A., Gomes, S. A. eds. (Rio de Janeiro, Guanabara Koogan), pp. 863-929.
- Sarkar, N., Pal, A., Das, D., Saha, D., Biswas, A., Bandopadhyay, B., Chakraborti, M., Ghosh, M., Chakravarty, R. (2015). Virological characteristics of acute hepatitis B in Eastern India: Critical differences with chronic infection. 10, e0141741.
- Schinoni, I. M. (2006). Fisiologia hepática. *Gazeta Medica da Bahia*. 76, 5-9.
- Seeger, C. e Mason, W. S. (2003). Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 51-68
- Seeger, C., Ganem, D. O. N. e Varmus, H. E. (1986). Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*. 232, 477-84.
- Serufo, J. C. e Lambertucci, J. R. (2007). Esquistossomose e hepatites virais: uma revisão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 30, 313-322.
- Sherlock, S. (1987). The natural history of hepatitis B. *Postgrad med J*. 63, 7-11.
- Sjogren, M. H. (1996). Serologic diagnosis of viral hepatitis. *Medical Clinics of North America*. 80, 929-56.
- Slagle, B. L., Lee, T. H., Medina, D., Finegold, M. J. e Butel J. S. (1996). Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene. *Molecular Carcinogenesis*. 15, 261-9.
- Souto, F. J. D. (1999). Distribuicao da hepatite B no Brasil: Atualização do mapa epidemiologico e proposicoes para seu controle. *GED - Gastreterologia Endoscopia Digestiva*. 18, 143-50.
- Sprengel, R., Kaleta, E. F. e Will, H. (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol*. 62, 3832-9.
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried M., Schinazi R. F. e Rossau R. (2000). A new genotype of hepatitis B virus: Complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology*. 81, 67-74.
- Summers, J., Smolec, J. M. e Snyder, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci*. 75, 4533-7.
- Summers, J. e Mason, W. S. (1982). Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*. 29, 403-15.
- Sunbul, M. (2014). Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J. Gastroenterol*. 20, 5427-5434.
- Tamada, Y., Yatsunami, H., Masaki, N., Nakamura, M., Mita, E., Komatsu, T., Watanabe, Y., Muro, T., Shimada, M., Hijioka, T., Satoh, T., Mano, Y., Komeda, T., Takahashi, M., Kohno, H., Ota, H., Hayashi, S., Miyakawa, Y., Abiru, S. e Ishibashi, H. (2012). Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B. 61, 765-73.
- Te, H. S. e Jensen, D. M. (2010). Epidemiology of Hepatitis B and C Viruses: A Global Overview. *Clinics in Liver Disease*. 14, 1-21.
- Thakur, V., Kazim, S. N., Guptan, R. C., Hasnain, S. E., Bartholomeusz, A., Malhotra, V. e Sarin, S. K. (2005). Transmission of G145R mutant of HBV to an unrelated contact. *Journal of Medical Virology*. 76, 40-6.

- Tiollais, P., Pourcel, C. e Dejean, A. (1985). The hepatitis B virus. *Nature*. 317, 489-95. Review.
- Tu, T., Budzinska, M., Shackel, N., e Urban, S. (2017). HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses*. 9, 75-93.
- Tuttleman, J. S., Pourcel, C. e Summers, J. (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*. 47, 451-60.
- Vajpayee, S., Gupta, R.K. e Gupta, M.L. (2017). Scrub typhus causing neonatal hepatitis with acute liver failure—A case series. *Indian Journal of Gastroenterology*. 36, 239-242.
- Van Damme, P. e Vellinga, A. (1998). Epidemiology of hepatitis B and C in Europe. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*. 61, 175-82
- Vaudin, M., Wolstenholme, A. J., Tsiquaye, K. N., Zuckerman, A. J., Harrison, T. J. (1988). The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *Journal of General Virology*. 69, 1383–1389.
- Warren, K.S., Heeney, J.L., Swan, R.A., Heriyanto e Verschoor E.J. (1999). A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol*. 73, 7860-5.
- Wei Y., Neuveut C., Tiollais P. e Buendia M.A. (2010). Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol (Paris)*. 58, 267-72.
- WHO (World Health Organization). (2000). Hepatitis B. World Health Organization. 204.
- WHO (World Health Organization). (2004a). Hepatitis B vaccines. *Weekly Epidemiological Records*. 79, 255-63
- WHO (World Health Organization). (2004b). Position paper on Hepatitis B. Immunization, Vaccines and Biologicals.
- WHO (World Health Organization). (2017). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Acesso em 26/07/2017.
- WHO (World Health Organization). (2018). Hepatitis B. World Health Organization. 204.
- Will H., Reiser W., Weimer T., Pfaff E., Büscher M., Sprengel R., Cattaneo R. e Schaller H. (1987). Replication strategy of human hepatitis B virus. *Journal of virology*. 61, 904–911.
- Xiang, Y., Chen P., Xia J. R. e Zhang L. P. (2017). A large-scale analysis study on the clinical and viral characteristics of hepatitis B infection with concurrence of hepatitis B surface or E antigens and their corresponding antibodies. *Genetics and Molecular Research*. 16.
- Xu, C., Zhou W., Wang Y. e Qiao L. (2014). Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*. 45, 216-22.
- Yang, J., Xi, Q., Deng, R., Wang, J., Hou, J. e Wang, X. (2007). Identification of interspecies recombination among hepadnaviruses infecting cross-species hosts. *J Med Virol*. 79, 1741-50.
- Yano, Y., Azuma, T. e Hayashi, Y. (2015). Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World Journal of Hepatology*. 27, 583–592.
- Yuen, M., Chen, D. S., Dusheiko, G. M., Janssen, H. L. A., Lau, D. T. Y., Locarnini, S. A., Peters, M. G. e Lai, C. L. (2018). Hepatitis B virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*. 4, 1-20.
- Zanetto, A., Ferrarese, A., Bortoluzzi, I., Burra, P. e Russo, F. P. (2016). New perspectives on treatment of hepatitis B before and after liver transplantation. *Annals of Transplantation*. 14, 632-643.

Zehender, G., Ebranati, E., Gabanelli, E., Sorrentino, C., Lo Presti, A., Tanzi, E., Ciccozzi, M. e Galli, M. (2014). Enigmatic origin of hepatitis B virus: An ancient travelling companion or a recent encounter? *World Journal of Gastroenterology*. 20, 7622-34.

Zhou, Y. Z., Slagle, B. L., Donehower, L. A., van Tuinen, P., Ledbetter, D. H. e Butel, J. S. (1988). Structural analysis of a hepatitis B virus genome integrated into chromosome 17p of a human hepatocellular carcinoma. *J Virol*. 62, 4224-31.