

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

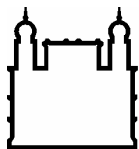
Doutorado Acadêmico em Biologia Celular e Molecular

**Caracterização e análise filogenética dos
genótipos do vírus da Hepatite B circulantes em
território brasileiro**

ANA FLÁVIA BELCHIOR DE ANDRADE

Rio de Janeiro
2008

**Caracterização e análise filogenética dos
genótipos do vírus da Hepatite B circulantes em
território brasileiro**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Doutorado Acadêmico em Biologia Celular e Molecular

Ana Flávia Belchior de Andrade

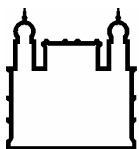
Caracterização e análise filogenética dos genótipos do vírus da Hepatite B circulantes em território brasileiro

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

RIO DE JANEIRO

2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Doutorado Acadêmico em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: Ana Flávia Belchior de Andrade

Caracterização e análise filogenética dos genótipos do vírus da Hepatite B circulantes em território brasileiro

ORIENTADORA: Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Aprovada em: 19/05/2008

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Ana Maria Gaspar Coimbra

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França

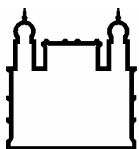
Prof. Dra. Liane de Castro

Rio de Janeiro, 19 de maio de 2008

A minha mãe Lia.
Ao meu marido Guilherme.
A minha orientadora, Cibele.

AGRADECIMENTOS

- Aos Hemocentros de Santa Catarina, Vitória, Goiânia, Alagoas e Paraíba, ao Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e a Santa Casa de Araçatuba por terem me fornecido as amostras analisadas na presente tese de doutorado.
- À Dra. Rosa Sadako Kimura da Santa Casa de Araçatuba, à Dra. Esther Maria Paiva Siqueira do Hemocentro de Goiânia, à Dra. Maria Célia Araújo Ferreira, do Hemocentro da Paraíba, ao Dr. Deoclides Lyra de Oliveira do Hemocentro de Vitória e ao Dr. Dimas Tadeu Covas do Hemocentro de Alagoas pela colaboração com o projeto, selecionando e separando as amostras de suas respectivas regiões.
- Ao Paulo França por ter me auxiliado no contato com o Hemocentro de Santa Catarina e cedido as amostras provenientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho no Rio de Janeiro.
- Ao INCA pela bolsa de doutorado.
- À minha querida orientadora, Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino, pelos anos de ensino paciência e amizade.
- Ao Dr. Héctor N. Seuánez por me receber junto à Divisão de Genética logo no início de minha pós-graduação.
- Ao Dr. Miguel Ângelo e ao Dr. Orílio Leoncini, por estarem sempre dispostos a ajudar e esclarecer minhas dúvidas.
- Ao Pablo Rodrigues e ao Albert Menezes por me ajudarem nas análises filogenéticas.
- À minha mãe que sempre me ofereceu condições para continuar estudando e buscando meu aprimoramento profissional. Por sempre estar do meu lado, me aconselhando e apoiando.
- Ao meu marido pelo companheirismo, compreensão e amor.
- Ao meu pai que apesar da distância continua presente.
- Aos meus sogros por acreditarem em mim.
- À minhas grandes amigas Kelly e Havana, por estarem sempre dispostas a ajudar.
- A todos da Divisão de Genética do Instituto Nacional do Câncer.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização e análise filogenética dos genótipos do vírus da Hepatite B circulantes em território brasileiro

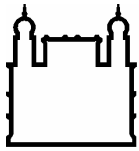
RESUMO

Tese de Doutorado

Ana Flávia Belchior de Andrade

A hepatite B é definida como inflamação do fígado causada por uma infecção pelo Vírus da Hepatite B (HBV), um vírus de DNA, da família *Hepadnaviridae*. A hepatite B é um problema de saúde pública importante, existindo em todo mundo aproximadamente 350 milhões de portadores do vírus. O HBV pode ser dividido em oito genótipos principais, designados de A a H, e definidos pela divergência nucleotídica superior a 8% entre os mesmos. Os diferentes genótipos apresentam distribuição geográfica distinta. Com o objetivo de caracterizar geneticamente as variantes virais circulantes em território brasileiro, foram realizadas análises de dados sorológicos e moleculares. A prevalência do HBV encontrada em doadores de sangue voluntários do Rio de Janeiro foi de 0,27% para HBsAg e de 3,68% para anti-HBc. De 1998 a 2005 houve queda estatisticamente significativa tanto na prevalência de HBsAg (0,36% para 0,14%) como na prevalência de anti-HBc (6,12% para 2,05%), entretanto as prevalências encontradas para os marcadores de HBV foram maiores do que a encontrada em países desenvolvidos. Este estudo também avaliou a distribuição dos diferentes genótipos do HBV no território brasileiro e sua variabilidade genética baseado na estrutura geográfica da população viral. Foram coletadas 319 amostras de doadores de sangue HBsAg positivas de diferentes regiões brasileiras e foram encontrados três genótipos de HBV: A (73%), D (23%) e F (4%). Em relação ao subtipo viral, o mais frequente foi adw2 (75,5%), seguido por ayw2 (18,01%), adw4 (3,83%), ayw1 (1,92%) e ayw3 (1,15%). Foi identificada uma grande variedade intragenotípica nas amostras de HBV, sendo observada grande variação na sequência nucleotídica da região S. A diversidade nucleotídica (π) encontrada para os genótipos A, D e F são estatisticamente diferentes ($\alpha=0.05$), sendo pequena nos estados da

região nordeste e aumentando à medida que analisamos o sul do país. Analisando a diversidade intragenotípica (h), verifica-se um equilíbrio entre os genótipos. Com base na análise de *median joining* não é possível inferir diferentes populações, entretanto existe certa tendência, de algumas populações ocuparem regiões específicas dentro da rede. A análise de AMOVA conclui que não houve uma estruturação geográfica entre as diferentes regiões estudadas sugerindo que essas populações não se encontram isoladas. Na análise de *mismatch distribution* para os genótipos A e D o teste de aderência foi aceito, indicando um evento passado de expansão populacional. A análise de máxima verossimilhança revelou a presença na população brasileira de 3 subgenótipos (FII, FIII e FIV) dos 5 já descritos para o genótipo F. A presença desses três subgenótipos do genótipo F no Brasil, corrobora a hipótese da entrada do homem na América do Sul vindo da América Central e migrando para o sul por rotas ao longo da costa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Characterization and phylogenetic analysis of Hepatitis B virus genotypes circulating in the Brazilian territory

ABSTRACT

PhD Thesis

Ana Flávia Belchior de Andrade

Hepatitis B is defined as inflammation of the liver caused by an infection by the Hepatitis B virus (HBV), a DNA virus of the *Hepadnaviridae* family. Hepatitis B is a major public health problem, with approximately 350 million carriers worldwide. HBV can be divided into eight major genotypes, called A to H, and defined by the divergence over 8% between them. The different genotypes have different geographical distribution. In order to determine the prevalence of HBV infection in voluntary blood donors we evaluated the prevalence of HBsAg and anti-HBc. In Rio de Janeiro overall prevalence estimates were 0.27% for HBsAg and 3.68% for anti-HBc. There was a significant decrease in the overall prevalence of HBsAg (from 0.36 to 0.14%) and anti-HBc (from 6.12 to 2.05%) in the period encompassed between 1998-2005. These prevalence estimates were higher than those found in other countries. This study also evaluated the distribution of the different HBV genotypes in the Brazilian territory and its genetic variability based on the geographic structure of the viral population. Three hundred nineteen samples of HBsAg positive blood donors from different regions of Brazil were collected and three HBV genotypes were found: A (73%), D (23%) and F (4%). The most frequent viral subtypes were adw2 (75.5%), followed by ayw2 (18.01%), adw4 (3.83%), ayw1 (1.92%) and ayw3 (1.15%). All three HBV genotypes showed many variants, and great variation in the nucleotide sequence of the S gene. The nucleotide diversity (π) found for the genotypes A, D and F were statistic different. The analysis of the intragenotypic diversity (h), showed a balance between the genotypes. It was not possible to infer different populations based on analysis of median joining, however there was some tendency of samples to occupy specific regions within the network. AMOVA suggested that

there was no structure between the different geographical regions studied, and that analyzed populations are not isolated. The adherence test was accepted in the *mismacth distribution* for the genotype A and D, indicating a past event of expansion in the population. Analysis of maximum likelihood revealed the presence in the Brazilian population of 3 HBV subgenotypes (FII, FIII and FIV) of 5 previously described for the genotype F corroborating the possibility of entry of the man in South America coming from Central America and migrated to the south for routes along the coast.

Figura 1. Distribuição geográfica da hepatite B crônica.

Figura 2. Micrografia mostrando partículas virais do HBV.

Figura 3. Representação esquemática do genoma do HBV.

Figura 4. Estrutura da vírus da hepatite B.

Figura 5. Esquema das fases da replicação do material genético no HBV.

Figura 6. Esquema mostrando a relação do determinante “a” da proteína S com a superfície dos vírions de HBV.

Figura 7. Prevalência de HBsAg, anti-HBc e anti-HCV entre doadores de sangue voluntários no Rio de Janeiro no período de 1998 a 2005.

Figura 8. Topologia obtida na análise de Neighbor-Joining para todos os haplótipos encontrados no genótipo A.

Figura 9. Topologia obtida na análise de Neighbor-Joining para todos os haplótipos encontrados no genótipo D.

Figura 10. Topologia obtida na análise de Neighbor-Joining para todos os haplótipos encontrados no genótipo F.

Figura 11. Gráficos mostrando a distribuição dos diferentes genótipos do HBV nos vários estados analisados.

Figura 12. *Median-joining* com os haplótipos encontrados para o genótipo A.

Figura 13. *Median-joining* com os haplótipos do genótipo D.

Figura 14. *Median-joining* com os haplótipos do genótipo F.

Figura 15. *Mismatch distribution* para o genótipo A.

Figura 16. *Mismatch distribution* para o genótipo D.

Figura 17. Topologia obtida na análise de máxima verossimilhança para as seqüências do genótipo F.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mutações na região da polimerase viral que conferem resistência ao tratamento antiviral.

Tabela 2. Tabela mostrando as substituições de aminoácidos em posições específicas que determinam os diferentes subtipos do HBV.

Tabela 3. Quantitativo de amostras coletadas no diferentes estados brasileiros.

Tabela 4. Iniciadores utilizados no estudo para determinar genótipo viral das amostras positivas para infecção por HBV.

Tabela 5. Sequências do GenBank utilizadas nas análises genéticas.

Tabela 6. Prevalência dos marcadores para a Hepatite B entre doadores de sangue no Rio de Janeiro no período de 1998 a 2005.

Tabela 7. Quantitativo de amostras sequenciadas separadas por estado de coleta.

Tabela 8. Prevalência dos diferentes subtipos virais nas diversas localidades estudadas.

Tabela 9. Distribuição dos diferentes subtipos virais nos diferentes genótipos identificados.

Tabela 10. Lista dos haplótipos compartilhados por mais de uma amostra para o genótipo A.

Tabela 11. Lista dos haplótipos compartilhados por mais de uma amostra identificados para o genótipo D.

Tabela 12. Substituições de aminoácidos encontradas nas seqüências analisadas na leitura da proteína de superfície.

Tabela 13. Substituições de aminoácidos encontradas nas seqüências da polimerase do vírus da hepatite B.

Tabela 14. Diversidade nucleotídica (π) e diversidade intragenotípica (h) para as amostras do genótipo A e genótipo D em cada localidade estudada.

Tabela 15. Análise de variância molecular (AMOVA) para as amostras do genótipo A.

Tabela 16. Análise de variância molecular (AMOVA) para as amostras do genótipo D.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
I.I. Hepatite B	2
I.II. Transmissão	3
I.III. Diagnóstico	4
I.IV. Tratamento	6
I.V. Vacinação	7
I.VI. Distribuição geográfica	8
I.VII. Estrutura Viral	10
I.VIII. Genoma	11
I.IX. Replicação do material genético	14
I.X. Mutações	15
I.XI. Variabilidade genética	18
I.XII. Métodos de genotipagem	20
I.XIII. Distribuição dos diferentes genótipos do HBV	21
I.XIV. Genótipos do HBV: O panorama Brasileiro	22
I.XV. Infecção dupla e recombinação	24
I.XVI. Associação entre os genótipos do HBV e o curso clínico da infecção e diferenças na resposta à terapia anti-viral	25
I.XVII. História Evolutiva	27
II. OBJETIVOS	30
III. MATERIAIS E MÉTODOS	32
III.I. Análise sorológica	33
III.I.I. Descrição da amostra	33
III.I.II. Análise estatística	33
III.II. Análise molecular	33
III.II.I. Descrição da amostra	33
III.II.II. Extração de DNA	34
III.II.III. Determinação do genótipo do vírus da hepatite B	35
III.II.IV. Análise Protéica	36
III. II.V. Análise Filogenética	37
III.II.VI. Análise de recombinantes	38
III. II.VI. Análise Estatística	39
IV. RESULTADOS	40
IV.I. Análise Sorológica	41
IV.II. Genotipagem	42
IV.III. Subtipos	48
IV.IV. Análise Intragenotípica	49
IV.V. Análise Protéica	51
IV.V.I. Gene S	51
IV.V.II. Polimerase	52
IV.VI. Análise Filogenética	54
IV.VII. Análise de recombinantes	64
V. DISCUSSÃO	65
V. I. Análise sorológica	66

V.II. Distribuição dos diferentes genótipos do HBV no território brasileiro	66
V.III. Os diferentes subtipos encontrados	68
V.IV. Variabilidade intragenotípica	69
V.V. Variações na região S	69
V.VI. Variações na polimerase	71
V.VII. Análise genética das cepas de HBV circulantes no Brasil	72
V.VIII. Análise de recombinantes	75
VI. CONCLUSÃO	77
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
VIII. ANEXOS	96
Anexo I	97
Anexo II	99
Anexo III	100

INTRODUÇÃO

I.I. Hepatite B

A hepatite B é definida como inflamação do fígado causada por uma infecção pelo Vírus da Hepatite B (HBV), um vírus de DNA, da família *Hepadnaviridae* (Zukerman, 1996).

A doença pode se desenvolver de duas formas: aguda ou crônica. Pessoas infectadas podem desenvolver vários sintomas, como na hepatite aguda, ou não apresentar nenhum sintoma ou sinal de doença. Em qualquer uma das situações o indivíduo pode se recuperar da infecção pelo HBV e desenvolver imunidade contra o vírus, ou desenvolver hepatite crônica que geralmente permanece sem cura durante toda a vida (WHO/V&B/01.31, 2001).

Em pessoas que desenvolvem hepatite B aguda, o período de incubação dura geralmente de 3 a 4 meses, podendo variar de 6 semanas a 6 meses. Os sintomas e sinais da doença persistem por várias semanas e incluem falta de apetite, fraqueza, náuseas, vômito, dores abdominais, icterícia, urina escurecida, erupção cutânea e dores nas articulações. Aproximadamente 1 a 2% das pessoas que desenvolvem hepatites B aguda vem a falecer de hepatite fulminante (WHO/V&B/01.31, 2001).

Na hepatite B crônica, os indivíduos infectados geralmente não apresentam sintomas por décadas após a infecção pelo HBV (WHO/V&B/01.31, 2001). Mais de 40% das pessoas infectadas cronicamente com o vírus podem desenvolver complicações relacionadas com cirrose e carcinoma hepatocelular (Purow e Jacobson, 2003).

A idade em que a pessoa entra em contato com o vírus da hepatite B é um dos principais fatores para se determinar a evolução da infecção. Entre as crianças abaixo de 5 anos que entram em contato com o HBV, aproximadamente 10% são sintomáticas. Já 80% a 90% das crianças infectadas durante o primeiro ano de vida e 30% a 50% das crianças infectadas entre 1 e 4 anos de idade, desenvolvem hepatite crônica. Por outro lado, quando o indivíduo já é um adulto ao ser infectado, 30% a 50% desenvolvem a infecção de forma sintomática e somente 2% a 5% desenvolvem hepatite B crônica. (WHO/V&B/01.31, 2001).

Em conjunto, a infecção é responsável por 1,5 milhões de mortes anuais por cirrose e carcinoma hepatocelular (Soriano, 2003). Cerca de 10% dos adultos infectados cronicamente por HBV apresentam antígenos HBs e HBe e destes, 20% desenvolvem hepatite crônica ativa, com risco elevado de desenvolver cirrose, carcinoma hepatocelular ou ambos. Em 5 a 10% destes pacientes observa-se soro conversão espontânea para anti-HBe, no entanto este número se eleva para 30-40% quando submetidos a tratamento com interferon. Dos portadores de HBV que são anti-HBe positivos, 3 a 9% desenvolvem hepatite crônica ativa e 1,5% cirrose. Em pacientes com infecção crônica por HBV, que desenvolvem hepatite B fulminante, cirrose e carcinoma hepatocelular o antígeno HBs pode não estar presente no soro (Soriano, 2003).

O estabelecimento da forma crônica da hepatite B pode estar relacionado a variações genéticas do HBV e a características genéticas do indivíduo hospedeiro (Wang, 2003). As variações genéticas do genoma viral podem ser adquiridas durante a evolução da infecção, levando a seleção de variantes (quase-espécies) que conseguem escapar da ação do sistema imune (Karasawa e cols., 1997; Lindh e cols., 1996; 1999), anticorpos estimulados pela vacinação, ou mesmo da ação de drogas antivirais (e.g., lamivudina; Torresi, 2002). Com relação a características genéticas do indivíduo infectado, diferentes alelos dos complexos de histocompatibilidade (HLA I e HLA II), ou de citocinas (como INF- γ e TNF- α) podem estar relacionados ao desenvolvimento da doença (Wang, 2003).

A hepatite B é um problema de saúde pública mundial. De acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde, anualmente há aproximadamente 5 milhões de novos casos de infecção aguda pelo HBV (Kane e cols., 1999). A imunização resultou em significativo decréscimo na incidência de novas infecções por HBV, mas o tratamento das pessoas já infectadas ainda é um problema de saúde internacional (Purow e Jacobson, 2003).

I.II. Transmissão

Atualmente são reconhecidos 4 modos de transmissão para o HBV: da mãe para o filho na hora do parto (transmissão perinatal), por contato com uma pessoa infectada (transmissão horizontal), através de contato sexual (transmissão sexual) e via parenteral por exposição a sangue ou outros fluídos corpóreos infectados (transmissão parenteral) (WHO, fact sheet 204). Existe uma variação considerável entre diferentes áreas, países ou continentes em relação à idade e o modo em que ocorre a infecção (Mahoney, 1999).

A transmissão perinatal, através de mães HBsAg e HBeAg positivas, é a principal via de transmissão atualmente no mundo e ocorre principalmente em países subdesenvolvidos onde existe alta endemicidade de HBV (Hollinger e Liang, 2001; Koziel e Siddiqui, 2006). O risco é maior para as crianças nascidas de mães com altos níveis de replicação viral, das quais 90% podem adquirir a infecção. O mecanismo preciso da transmissão perinatal é desconhecido já que o vírus não é capaz de cruzar a barreira placentária, sendo necessária uma ruptura dessa barreira, por exemplo, amniocentese. A hipótese mais aceita é que a infecção ocorra com a exposição da mucosa do recém nascido a sangue e fluidos corpóreos infectados na hora do parto (WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2).

A transmissão horizontal ocorre principalmente entre contatos familiares ou entre crianças pequenas em áreas com alta endemicidade por HBV (WHO, fact sheet 204).

Do mesmo modo que a transmissão perinatal, a transmissão sexual se dá com o contato da mucosa com sangue ou fluidos corporais infectados. A transmissão sexual é eficiente e é reconhecida como a via de propagação viral nos grupos de risco como os homossexuais, heterossexuais promíscuos, e profissionais do sexo. Atualmente o contato homossexual é o fator de risco mais frequentemente reconhecido em países desenvolvidos (Aguilera-Guirao e cols., 2006).

A transmissão parenteral inclui transfusão de sangue e de seus derivados, hemodiálise, acupuntura, uso de drogas injetáveis, tatuagens e perfuração com material infectado em profissionais da área da saúde. O HBV não consegue cruzar a pele ou a mucosa, sendo necessário que, de algum modo essas barreiras naturais sejam rompidas, mesmo que de forma mínima ou insignificante (WHO/CDS/CSR/LYO/ 2002.2).

A infecção por HBV depois da ingestão oral de material contaminado já foi documentada, mas ainda assim a eficiência de transmissão por essa via é baixa e raras vezes contribuem para a aquisição natural do HBV (Hollinger e Liang, 2001). Já em 35% dos casos, a causa de infecção não é identificada, ou não estão associadas a fatores de risco aparentes.

I.III. Diagnóstico

O diagnóstico de hepatite é estabelecido pela avaliação da função hepática que inclui dosagem de bilirrubina direta e total, aminotransferases (ALT e AST), fosfatase alcalina, protrombina, proteínas totais, albumina, globulina, contagem completa de linfócitos e estudos de coagulação (WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2).

Os sintomas da infecção pelo HBV não podem ser distinguidos dos sintomas causados pelas outras formas virais de hepatite, portanto a confirmação da etiologia depende de testes sorológicos com marcadores específicos para o HBV. Uma grande variedade de testes está disponível no mercado para o diagnóstico da infecção por HBV (Hoofnagle e Bisceglie, 1991).

Os marcadores sorológicos do HBV utilizados no diagnóstico da hepatite B são: antígeno de superfície (HBsAg) e seu anticorpo específico anti-HBs, anticorpos contra o antígeno do core (anti-HBc (IgM e IgG)), e antígeno *e* do HBV (HBeAg) e seu anticorpo (anti-HBe) (WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2).

A infecção aguda pelo HBV é caracterizada pela presença do HBsAg no soro do paciente e o aparecimento do anticorpos anti-HBc da classe IgM (Chau e cols., 1983). O HBsAg é o marcador primário para detecção de infecção aguda pelo HBV e, tipicamente,

torna-se detectável no soro de 6 a 10 semanas após a exposição ao vírus (Hatzakis e cols., 2006). Os testes de detecção do HBsAg são em sua maioria imunoenzimáticos e conseguem detectar o HBsAg em concentrações de 0,1ng/mL (Mahoney 1999). Esses testes mais sensíveis possibilitaram não só diminuição no período de janela imunológica (Biswas e cols., 2003), como também a detecção de HBVs mutantes para as proteínas de superfície (Coleman e cols., 1999; Moerman e cols., 2004; Saw e Aw, 2000; Zaaier e cols., 2001). Quando da resolução da fase aguda da infecção pelo HBV, geralmente após 4 a 6 meses de infecção, os níveis de anti-HBs aumenta enquanto os níveis de HBsAg caem (Biswas e cols., 2003). O anti-HBs é o único anticorpo que confere proteção e neutraliza o vírus. A presença desse anticorpo após a infecção aguda indica a cura e imunidade contra reinfecção. O anti-HBs também pode ser detectado em indivíduos submetidos à vacinação contra o HBV (Biswas e cols., 2003; Mahoney, 1999). Em pacientes com infecção crônica por HBV, HBsAg permanece detectável geralmente por toda a vida.

Testes imunológicos para detecção de anti-HBc envolvem anticorpos contra a proteína do core tanto de classe IgG quanto IgM, indicando exposição passada ou corrente ao vírus e replicação viral. A detecção de anti-HBc IgM é utilizado como diagnóstico para indivíduos na fase aguda da doença, já que surge logo após o HBsAg e persiste por 6 a 24 meses. Durante a evolução da infecção o anti-HBc IgM dá lugar ao anti-HBc IgG que geralmente persiste por toda a vida (Biswas e cols., 2003).

O antígeno do core (HBeAg) também pode ser detectado durante a fase aguda da infecção, sendo que durante a convalescência, o HBsAg e o HBeAg caem e o anti-HBs, anti-HBc e anti-HBe aumentam.

O diagnóstico de infecção pelo HBV, através de detecção de DNA viral, possui limitações já que existem fases da doença em que pode haver pouco material genético viral circulando (Hoofnagle e Bisceglie, 1991). A maioria dos métodos de hibridização utilizando *dot blot* é capaz de detectar DNA viral em concentrações a partir de 5pg/mL, o que corresponde a $1,5 \times 10^6$ genomas por mL, entretanto métodos baseados em amplificação de seqüências do genoma viral estão mais sujeitos a resultados falsos positivos (Mahoney, 1999). O significado clínico da constatação da presença de HBV-DNA no soro de pacientes infectados possui a mesma conotação da detecção do HBsAg, indicando a presença da infecção, embora indique uma replicação viral significativa e uma maior probabilidade do desenvolvimento de doença de fígado ativa (similar ao HBeAg) (Mahoney, 1999). O monitoramento dos níveis de DNA viral é útil para se determinar a resposta inicial da infecção pelo HBV ao tratamento e se a resposta virológica sustentada (RVS) é mantida durante a terapia. Adicionalmente, esse monitoramento permite prever a remissão da

doença, possível soroconversão HBe subsequente e a ocorrência de resistência à droga utilizada (Zoulim, 2006).

I.IV. Tratamento

A maior parte dos pacientes com hepatite B aguda produz resposta imunológica contra o HBV, não necessitando de tratamento. Hepatite B fulminante é uma forma mais severa da doença aguda, complicada pela presença de encefalopatia e falência hepática. Esses pacientes devem ser considerados para o transplante de fígado (Dusheiko, 2006).

O tratamento da hepatite B crônica tem como objetivo eliminar a infectividade do HBV a fim de prevenir a transmissão; impedir o progresso da doença no fígado; melhorar o quadro clínico e histológico; prevenir o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e a queda de marcadores de replicação (HBV-DNA e HBeAg) no soro. A normalização dos níveis de ALT também indicam o fim da infecção hepática e desaparecimento dos sintomas geralmente acompanham essas mudanças no estado clínico do paciente (WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2).

Existem hoje em dia duas classes principais de tratamento: antivirais que tem como objetivo suprimir ou destruir o vírus interferindo na replicação viral, e moduladores imunológicos que tem como objetivo auxiliar o sistema imune a desenvolver uma resposta imunológica contra o HBV.

Atualmente a hepatite B crônica é tratada com interferons (WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2). Os interferons (IFN) possuem atividade imunomodulatória, mas também possuem efeitos antiproliferativos e antivirais. Interferon- α recombinante vem sendo usado desde o início da década de oitenta na tentativa de suprimir a replicação viral e a transmissão do HBV relacionado a hepatite crônica (Karayiannis, 2003). Mas recentemente, a molécula de interferon foi associada ao polietilenoglicol (PEG), sendo desenvolvido assim o interferon peguilado. O polietilenoglicol não tem ação alguma no organismo servindo somente para modificar o interferon convencional, fazendo com o que o organismo não reconheça o IFN como um agente estranho, fazendo com que o IFN permaneça mais tempo no organismo, já que sua eliminação torna-se mais lenta.

A resposta a terapia com IFN, medida pela perda do antígeno HBeAg, é positiva em menos de 40% dos casos (Wong e cols., 1993). Esse tipo de tratamento é menos efetivo ainda em pacientes asiáticos (principalmente chineses), particularmente em pacientes com baixas taxas de ALT (Lok e cols., 1988). A terapia com IFN é associada também com vários efeitos

colaterais (febre, fadiga, mal estar, baixa contagem de glóbulos brancos, etc.) e, portanto, só é indicada para alguns pacientes.

Como a replicação do HBV ocorre via transcriptase reversa, o uso de inibidores de transcrição torna-se uma metodologia interessante para um tratamento antiviral. Os análogos de nucleosídeos são drogas sintéticas que imitam os nucleotídeos naturais. Atualmente várias drogas são utilizadas para esse fim como lamivudina (3TC), adefovir dipivoxil (ADV), e entecavir (ETV) (SBH, 2005). Embora todas elas sejam potentes inibidores de replicação viral, nenhuma delas é capaz de erradicar permanentemente a infecção pelo HBV (Hoofnagle e Lau, 1997). Pacientes com hepatite B crônica não necessitam abdicar da terapia antiviral quando há a soroconversão HBeAg para anti-HBe ou quando o DNA viral cai para níveis não detectáveis (Liaw e cols., 2005; Lok e cols., 2001). Para prevenir a recorrência é exigida uma terapia mais longa com inibidores de polimerase (Lok, 2005). Como resultado disso, verificou-se que o uso prolongado de análogos de nucleotídeos/nucleosídeos está associado ao surgimento de mutantes resistentes (Lai e Terrault, 2004; Law e cols., 2000), clinicamente caracterizados pelo aumento dos níveis de ATL e HBV-DNA no soro dos pacientes tratados (Lok, 2005; Mutimer e cols., 2004).

Em 2005, a Sociedade Brasileira de Hepatologia publicou um Consenso sobre Conduitas nas Hepatites Virais B e C. Nesse documento, o tratamento é sugerido com base nos marcadores sorológicos e carga viral apresentados pelo paciente, sendo que no momento são apresentadas cinco drogas para o tratamento da hepatite crônica B: interferon alfa, lamivudina, interferon peguilado, adefovir dipivoxil e entecavir. Qualquer uma das drogas acima poderá ser utilizada como primeira opção de tratamento, dependendo das características do caso.

I.V. Vacinação

A imunização contra o HBV é possível pela administração de imunoglobulina (imunização passiva), ou pela vacinação (imunização ativa). A imunização passiva é baseada na administração de soluções padrões de imunoglobulinas contra HBsAg (HBIG), preparadas a partir de plasma de portadores com alto níveis destes anticorpos no soro. Esse tipo de imunização é mais utilizado em complementação à vacinação a pessoas que ainda não desenvolveram resposta imune e estão em risco de obter contato direto com sangue infectado por HBV, como, por exemplo, perfuração acidental com agulhas e para bebês recém nascidos de mães HBeAg positivas (François e cols., 2001).

A primeira vacina disponível para HBV, derivada de plasma de portadores crônicos de hepatite B, surgiu em 1980. Atualmente a vacina derivada de plasma foi substituída por vacinas fabricadas utilizando-se tecnologia do DNA recombinante (Kane, 1995). Ambas vacinas são seguras e possuem uma eficácia de proteção que gira em torno de 90 a 95% (Margolis e cols., 1995). A partir de 1995 a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a recomendar que a vacina contra a hepatite B fosse incluída no calendário de vacinação infantil em países em que o HBV tivesse prevalência maior que 8%. Em 1997 a recomendação passou a valer para todos os países (WHA, 1992). Em 2001, 126 (66%) dos 191 países membros da OMS haviam incorporado a vacina contra a hepatite B em seu calendário infantil. A meta prevista para 2007 é que a vacina contra o HBV já tenha sido implantada no calendário infantil em todos os países (CDCP, 2003).

A vacina contra a hepatite B, apesar de ser segura e eficaz, apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, o fato que um pequeno, mas significativo, grupo da população não responder adequadamente à vacinação. Mais recentemente, foi desenvolvida uma geração de vacinas recombinantes que contem componentes antigênicos derivados de pre-S1, pre-S2 e S de subtipos adw e ayw (McDermott e cols., 1998), que além de aumentarem a resposta anti-HBs, também estimulam a resposta imunológica celular (Milich e cols., 1986). O Brasil, a partir de 1999, através do Instituto Butantã, começou a produzir vacina contra a hepatite B em levedura recombinante. Os testes demonstraram que tal vacina é satisfatória em termos de baixa reatogenicidade, incapacidade de gerar efeitos colaterais e taxa de soroconversão e produção de anticorpos equivalentes as observadas para outras vacinas previamente introduzidas no mercado. (Ioshimoto e cols., 1999).

I.VI. Distribuição geográfica

Mais de 2 bilhões de pessoas já tiveram algum tipo de contato com o HBV em algum momento de suas vidas, dessas aproximadamente 350 milhões desenvolveram hepatite B crônica e são portadores do vírus. A incidência da infecção por HBV e sua forma de transmissão, varia largamente dependendo da região geográfica e grupos populacionais (WHO, fact sheet 204, 2007). Em países do ocidente, a infecção crônica por HBV é relativamente rara e adquirida principalmente na fase adulta da vida, enquanto na Ásia e em grande parte da África a maior parte das infecções são passadas de mãe para filho, de contatos entre crianças de um mesmo domicílio e de agulhas e seringas não esterilizadas.

Aproximadamente 45% da população mundial vive em áreas de alta endemicidade para o HBV (>8% da população é HBsAg positiva); 43% vive em área de endemicidade intermediária (2-7% da população é HBsAg positiva); e 12% vive em áreas de baixa endemicidade (<2% da população HBsAg positiva) (Yu e cols., 2000).

A infecção crônica por HBV tem alta prevalência no sudeste asiático, China e África, onde cerca de 10% da população está infectada. Por outro lado, no oeste da Europa e América do Norte a doença afeta menos que 1% da população (Purow e Jacobson, 2003) (Fig. 2).

Os poucos estudos realizados a fim de avaliar a prevalência de HBV no Brasil mostraram grande variação. Na região amazônica a prevalência de doadores de sangue HBsAg positivos é de 3,3% e de anti-HBc positivos de 49,9% (Braga e cols. 2005). Em Recife Arraes e cols. (2003) descreveram uma prevalência de anti-HBc de 12%, enquanto em São Paulo a prevalência de anti-HBc observada foi de 16% (Almeida Neto e cols., 2001). Já os dados do estado de Santa Catarina demonstram prevalência de 0,64% para HBsAg e 5,35% para anti-HBc (Rosini e cols., 2003).

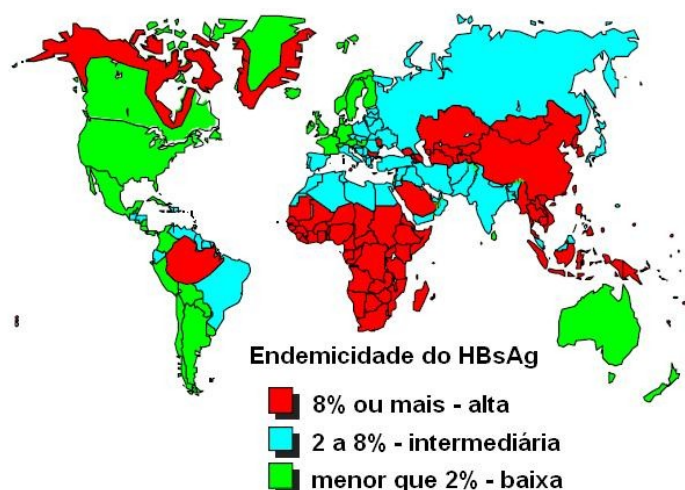


Figura 2. Distribuição geográfica da hepatite B crônica (modificado de WHO/V&B/01.31).

Em áreas de alta endemicidade o risco de infecção pelo HBV durante a vida é superior a 60% e a maior parte das infecções é adquirida na vida perinatal ou durante a infância, quando o risco de desenvolvimento de infecção crônica é elevado. Nessas áreas, hepatite B aguda é incomum, já que a maioria das crianças infectadas são assintomáticas. Entretanto, os níveis de câncer e cirrose em adultos nessa população são elevados. Em áreas de endemicidade intermediária o risco de se adquirir hepatite B é de 20% a 30% e as infecções ocorrem em todas as faixas etárias. A hepatite B aguda é comum nessas áreas devido ao fato da infecção pelo HBV ocorrer principalmente na adolescência ou fase adulta. Em áreas de baixa endemicidade, o risco de infecção pelo HBV durante a vida é abaixo de 20%. A maior

parte das infecções pelo HBV nessas regiões se dá na fase adulta e em grupos de risco bem definidos.

I.VII. Estrutura Viral

Partículas infecciosas e não infecciosas podem ser encontradas no soro de indivíduos com hepatite B. O vírion de hepatite B, também conhecido como partícula de Dane, possui 42 nm de diâmetro e compreende um core eletro denso (nucleocapsídeo) de 27 nm de diâmetro circundado por um envelope externo lipídico onde se destacam as proteínas de superfície (HBsAg) (Crowther e cols., 1994; Zuckerman, 1996). O nucleocapsídeo viral contém além de proteínas do core em arranjo icosaédrico, polimerase e o genoma do viral (Gerlich e Robinson, 1980).

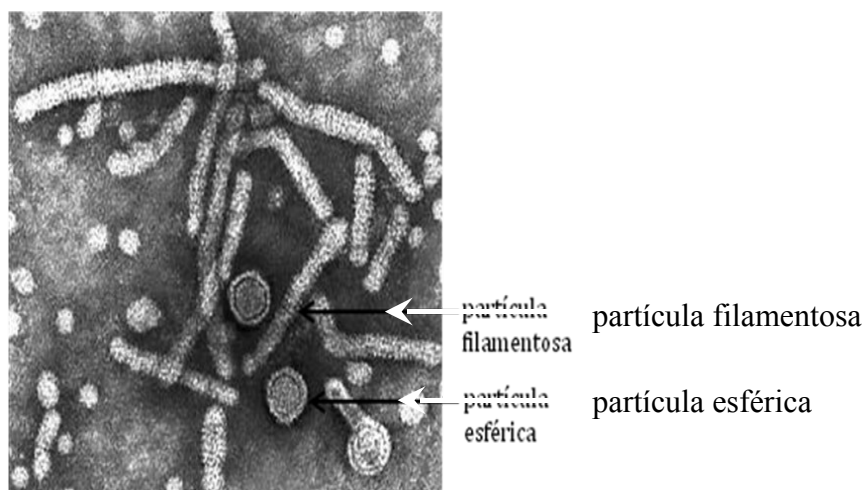


Figura 3. Micrografia mostrando partículas virais do HBV (modificado de <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html>).

O antígeno de superfície é produzido em excesso pelos hepatócitos e secretado na forma de partículas de 22 nm, inicialmente chamadas de antígeno Austrália. Duas partículas subvirais podem ser encontradas no soro de indivíduos infectados, uma filamentosa e outra esférica, ambas possuem 22nm de diâmetro e são compostas somente pela membrana lipídica e proteínas virais (Fig. 3). A ausência do core, polimerase e genoma do vírus da hepatite B reflete a natureza não infecciosa dessas partículas virais. Essas partículas contêm proteínas de superfícies pequenas em dois estados, glicosilados (gp 27) e não glicosilado (gp24) em quantidades equivalentes. Também estão presentes na superfície dessas partículas as proteínas médias (gp33 e gp 36) que contem o domínio pre-S2. A superfície viral possui composição similar, entretanto, além dessas proteínas podemos encontrar as proteínas denominadas

grandes (gp39 e gp42), que possuem tanto a região pre-S1 quanto a região pre-S2. Essas proteínas grandes não são encontradas nas pequenas partículas esféricas de 22 nm, mas podem estar presentes em formas tubulares encontradas em indivíduos com alta viremia. Acredita-se que o domínio de ligação específica para o receptor do HBV nos hepatócitos, está localizado na região pre-S1 (Zuckerman, 1996).

I.VIII. Genoma

O genoma do HBV é formado por uma molécula de DNA circular, pequena e parcialmente dupla fita. A fita maior tem aproximadamente 3,2 Kb com os extremos 5' e 3' fixos, formando um círculo quase contínuo. A fita menor tem um comprimento variável podendo ser até 50% menor que a fita maior, com o extremo 5' fixo e o extremo 3' livre e variável (Fig. 4). A estrutura circular do genoma é mantida pela região de coesão (220 nucleotídeos), situada no extremo 5' de cada fita. Próximo a esta região existem duas cópias, em repetições diretas, de um motivo de 11 nucleotídeos denominados DR1 e DR2 que estão relacionadas às funções de replicação e integração do genoma do vírus ao DNA genômico nos hepatócitos. A numeração em pares de base do genoma é baseado no sítio de clivagem de EcoR1, ou, quando este está ausente, em sítios homólogos. Na fita maior estão presentes as quatro regiões abertas de leitura (ORFs) conservadas nos diferentes genótipos de HBV. Estas quatro regiões apresentam sobreposições de ORFs e codificam para as seguintes proteínas: antígeno de superfície HBsAg (gene S-pré S), nucleocapsídeo (gene C/HBeAg), Polimerase (gene P) e proteína X (gene X). O gene P cobre mais de 70% do genoma e se sobrepõe completamente aos genes S-pré S e X e parcialmente com o gene C (Norder e cols., 1992; Soriano, 2003).

O gene S codifica a proteína do envelope do HBV (antígeno S) e é constituída de 226 aminoácidos (Yokosuka e Arai, 2006). A cadeia de leitura pre-S/S pode iniciar-se em 3 diferentes códons de iniciação, produzindo 3 proteínas: pre-S1 (envolvida no reconhecimento do HBV pelos receptores do hepatócito), pre-S2 e S pequena (codificando as glicoproteínas de superfície: grande, média e pequena (Ganem e Schneider, 2001) (Fig. 5). O genes pre-S possuem, no total, 174 códons, e o gene pre-S2 sozinho codifica 55 aminoácidos. Os aminoácidos 21 a 47 da região pre-S1 codificam o sítio de reconhecimento dos receptores para os hepatócitos., portanto a integridade do envelope viral, juntamente com a expressão dos epítomos de pre-S1 (aa21 a 47) são fatores essenciais para a ligação dos receptores do HBV aos hepatócitos (Yokosuka e Arai, 2006). Já foram relatadas deleções do códon inicial

de tradução de pre-S2, entretanto esses mutantes secretam partículas virais morfologicamente normais, eficientes e que são efetivamente infecciosas (Fernholz e cols., 1993). Alguns genomas virais isolados de pacientes com hepatite B fulminante e falência hepática apresentavam mutações no códon inicial de pre-S2 impedindo a correta síntese da proteína média do envelope viral. Esses resultados sugerem que a expressão da proteína média do envelope do HBV não é essencial para a replicação e morfogênese viral (Pollicino e cols., 1997; Santantonio e cols., 1992; Trautwein e cols., 1996). A região pre-S é a mais variável do genoma sendo que somente 49,6% dos nucleotídeos são conservados. Em contraste a parte do gene S que codifica a proteína de superfície pequena (nucleotídeos 155-832) parece ser a mais conservada do genoma viral com 81,9% dos nucleotídeos conservados (Norder e cols., 1994). Essa porção do genoma, sozinha, pode ser utilizada para genotipagem com um alto grau de confiabilidade, além de ser útil também para análises filogenéticas (Norder e cols., 1994).

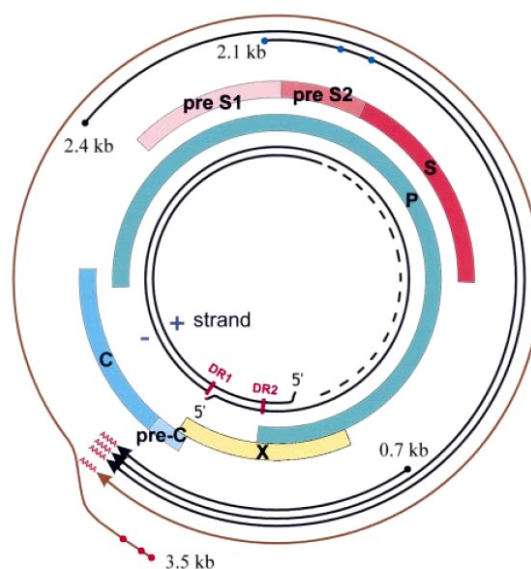


Figura 4. Representação esquemática do genoma do HBV mostrando as 4 principais regiões de transcrição (setas pretas). A seta maior em marrom corresponde ao RNA pre-genômico. As caixas coloridas representam as regiões que codificam proteínas (retirado de Kidd-Ljunggren e cols., 2002).

O gene core ou C possui 2 códon de iniciação, a região pre-core e a região core, sendo possível a tradução a partir de um ou outro. Assim, é traduzido o HBeAg (a partir do pre-core) e quando a tradução se inicia na região do core é sintetizada o HBcAg (Ganem e Schneider, 2001; Gerlich e Robinson, 1980; Lok e cols., 2001; Zuckerman, 1996). Embora sejam derivados do mesmo gene, HBcAg e HBeAg, não apresentam reação antigênica cruzada. O capsídeo icosaédrico é composto por 183 dímeros HBcAg, que protege o DNA viral da degradação por nucleases exógenas. Os resíduos 150-183 do HBcAg formam um domínio

requerido para o empacotamento do RNA (Wynne e cols., 1999). HBeAg é responsável pela diminuição da replicação *in vitro* do DNA, reduzindo a dimerização de HBcAg e portanto reduzindo o encapsulamento do RNA pre-genômico (Wynne e cols., 1999).

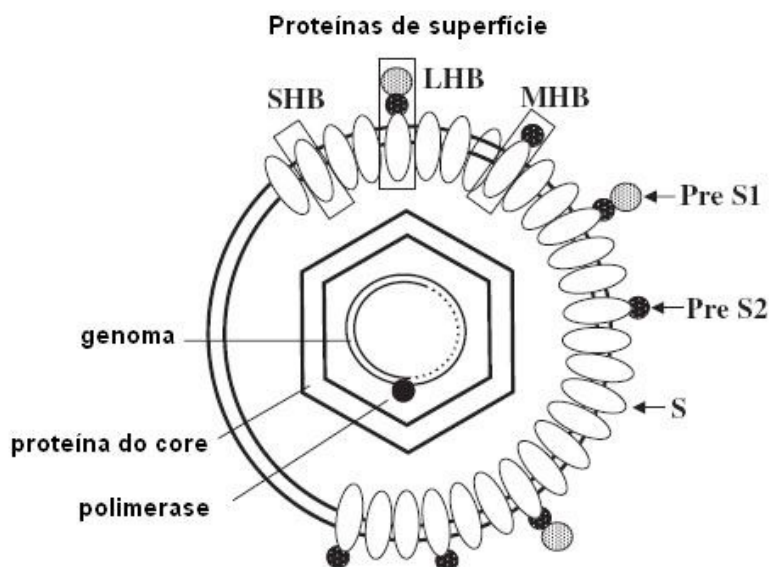


Figura 5. Estrutura do vírus da hepatite B, que consiste em uma membrana lipídica dupla envolvendo um nucleocapsídeo que contém o genoma circular parcialmente dupla fita do HBV. No envelope observa-se a proteína S grande (LHB) que contém os domínios pre-S1, pre-S2 e S, a proteína S média (MHB) que contém o domínio pre-S2 e S e a proteína S pequena (SHB), composta somente pelo domínio S. A proteína SHB é a forma mais comum dessas proteínas, a porcentagem da MHB é de 5-15% e da LHB é somente 1-2%. Modificado de Yokosuka e Arai (2006).

O gene da polimerase é o mais longo do vírus da HBV, estendendo-se por aproximadamente 80% do genoma viral e se sobrepondo a três outros genes; superfície, core e X (Sheldon e cols., 2006). A polimerase do HBV é uma proteína multifuncional que contém 4 domínios; uma região iniciadora (aa1 a aa183), uma região espaçadora (aa183 a aa348) de função desconhecida, uma região catalítica que funciona como RNA polimerase RNA/DNA dependente (aa349 a aa691) e uma região carboxi terminal (aa692 a aa845) que possui atividade ribonuclease H (Ghany e Liang, 2007). Assim, a polimerase viral funciona quer como uma transcriptase reversa (para a síntese da cadeia negativa do DNA a partir RNA genômico), quer como uma DNA polimerase endógena (Ganem e Schneider, 2001; Lok e cols., 2001; Zuckerman, 1996). O domínio catalítico (aa349 a aa691) pode ser subdividido em

7 domínios A a G. Mutações que levam a resistência aos antivirais estão tipicamente posicionadas no domínio C nas margens do sítio de ligação de dntps (Zoulim, 2004).

A função precisa da proteína HBx não é bem compreendida, mas é sabido que ela ativa várias vias metabólicas (AP-1, NF- κ B) *in vitro* e se liga a p53, sendo um potente transativador. A proteína X parece ter uma função essencial na replicação e na hepatocarcinogênese (Ganem e Schneider, 2001; Lok e cols., 2001; Zuckerman, 1996). Um importante papel da proteína X é o aumento do metabolismo intrahepático de purina e pirimidina, que é requerido para uma replicação eficiente do HBV (Shaw e Locarnini, 1995).

I.IX. Replicação do material genético

Estudos da cinética viral *in vivo* revelaram que a meia-vida plasmática do HBV é de 24 horas, com um *turnover* diário de 50% e uma produção de 10^{11} vírus diária (Nowak, 1996). O ciclo de replicação do HBV (Fig. 6) inicia-se com a ligação da partícula viral ao hepatócito, mediada pela glicoproteína de superfície pre-S1 e um receptor do hepatócito.

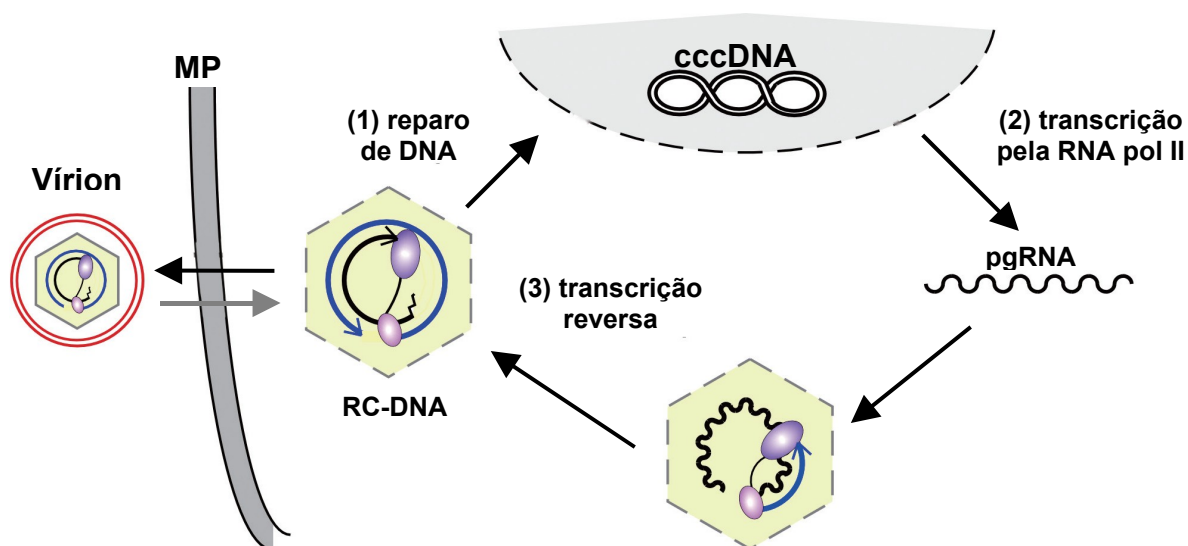


Figura 6. Esquema das fases da replicação do material genético no HBV. O vírus envelopado infecta a célula liberando o RC-DNA (DNA circular relaxado) que é transportado até o núcleo, reparado e transformado em cccDNA (1). De volta ao citoplasma, ocorre a transcrição do cccDNA pela RNA pol II (2) e o pgRNA é encapsulado. Dentro do capsídeo recém-formado ocorre a transcrição reversa (3) e a síntese do DNA +/- a partir do DNA-/- gera o novo RC-DNA. A partir daí, pode ocorrer um novo ciclo de replicação com a formação do cccDNA, ou os nucleocapsídeos contendo o RC-DNA são envelopados e liberados como novos vírions.

MP = membrana plasmática. Modificado de Beck e Nassal (2007).

Dentro do hepatócito, o genoma do HBV é libertado para dentro do núcleo, onde se completa a síntese da cadeia positiva (incompleta) do DNA. O genoma viral é, assim, convertido numa cadeia circular fechada de DNA com ligações covalentes (cccDNA) pela DNA polimerase viral (Ganem e Schneider, 2001). O cccDNA é o modelo que origina o RNA mensageiro (RNAm) para a síntese das proteínas virais e o RNA pre-genômico para a síntese do genoma viral. O RNA pre-genômico é transportado para o citoplasma, incorporado no nucleocapsídeo e convertido na cadeia negativa do DNA pela transcriptase reversa. A síntese da cadeia positiva é então iniciada e as partículas do core, contendo DNA viral, são então envolvidas por HBsAg e secretadas para fora do hepatócito ou transportadas para o núcleo, onde se completa a síntese da cadeia positiva e se forma novamente o cccDNA (Lok e cols., 2001).

I.X. Mutações

O HBV possui uma polimerase que não possui alta fidelidade, sendo que a taxa de erros durante a cópia do RNA ou DNA parece se aproximar mais das taxas estimadas para retrovírus e outros vírus de RNA (Simmonds, 2001). Essa alta taxa de mutação ocorre, provavelmente, devido ao passo de transcrição reversa que envolve a replicação do genoma do HBV, fenômeno não observado em outros vírus de DNA (Summers e Mason, 1982). Medir a frequências de trocas no genoma do HBV é extremamente complicado devido a existências de seqüências sobrepostas e a falta de sítios sinônimos na maior parte das seqüências codificantes. Suportando essa hipótese existe a observação que a maior parte das mudanças de aminoácidos, principalmente na região do pre-core e core, são deletérias e devem ocorrer como uma forma de evasão da resposta imunológica (Simmonds, 2001).

Na análise do DNA do vírus da hepatite B de isolados de plasma de portadores assintomáticos foi estimada uma taxa de mutação de aproximadamente $1,4$ a $3,2 \times 10^{-5}$ substituições/sítio/ano (Okamoto e cols., 1994). Por outro lado, utilizando DNA de HBV isolado de pacientes após falência do fígado por hepatite fulminante e transplante, a taxa de mutação encontrada foi três vezes maior (Sterneck e cols., 1997).

A atividade das enzimas da DNA polimerase e transcriptase reversa é eficiente e rápida, mas propícia à ocorrência de erros durante a replicação (Ganem e Schneider, 2001). Variações nas seqüências do HBV foram detectadas em quase todas as regiões do genoma, sendo que HBV circula na população como *quasi species*.

As primeiras mutações no HBV foram demonstradas por Carman e cols. (1989) ao conseguir detectar, em pacientes HBeAg negativos, a mutação G1896A na região pré-core e

atualmente conhecida por abolir a expressão do HBeAg. O promotor do core é responsável pela transcrição de duas fitas de mRNA de 3,5 kb; o mRNA pre-core (mensageiro do HBeAg) e o RNA pré genômico pequeno (mensageiro para proteína do core e também molde para transcrição reversa). Mutações de ocorrência natural estão agrupadas próximas ao promotor do core e são de natureza heterogênea, exceto pelas mutações A1762T e G1764A, que estão freqüentemente presentes (Tong, 2005). Mutantes do promotor do core são espécies virais dominantes não somente no estágio anti-HBe, como mais tarde, no estágio HBeAg da infecção. Muitos casos de hepatite fulminante são devidos a mutantes do promotor do core (Baumert e cols., 1996; Liang e cols., 1991).

A região S do genoma do HBV apresenta alta taxa de mutação e recombinação, levando a ocorrência de trocas de aminoácidos nas proteínas expressas (Fig. 7). Kohno e cols. (1996) ao analisar pacientes com hepatite B crônica HBsAg positivos descrevem duas mutações: G130N e G145A. Cooreman e cols. (2001) descrevem várias mutações capazes de promover o escape vacinal como: G145R, I/T126N/A, A128V, Q129H/R, G130N, M133L, K141E, P142S e D144A. Em pacientes com hepatite fulminante HBsAg negativos, Weber (2005) descreve inserção entre os aminoácidos 122 e 123. Lada e cols. (2006) analisam pacientes HBsAg e anti-HBs positivos, encontrando trocas de aminoácidos freqüentemente nas posições 145, 129, 126, 144 e 123.

Poucos estudos funcionais são voltados para análise da secreção viral de isolados naturais de HBV. A construção e teste de um número extensivo de quimeras e de construções contendo sítios de mutação dirigida revelaram que a mutação R169P no gene S é responsável pelo bloqueio da secreção, tanto de partículas virais, quanto sub-virais (Khan e cols., 2004). A mutação R169P bloqueia a secreção da partícula viral/subviral, enquanto a mutação G119E, tanto impede a secreção do vírion, como também o reconhecimento viral por métodos comerciais contendo anticorpos monoclonais (Tong, 2005). Yamamoto e cols. (1994) descreveram as mutações I/T126N e G145A, sendo que todas promovem a interrupção da expressão de determinantes HBsAg específicos. Nesse sentido foi recentemente descrito que o mutante de escape G145R também altera a secreção do vírion (Kalinina e cols., 2003). A mutação I110M também é capaz de impedir a secreção da partícula viral, entretanto a presença simultânea da mutação M133T nesses clones suprime a mutação I110M e confere eficiência à secreção da partícula viral (Tong, 2005). É interessante notar que a mutação M133T cria uma seqüência consenso para glicosilação, que pode facilitar o correto dobramento entre as pontes bissulfeto (Tong, 2005).

Em estudo publicado em 2005, Jaoudé e Sureau afirmam que mutações nos aminoácidos 119, 120, 121, 122, 123 e 124 possuem efeitos negativos sobre a infectividade

do HBV identificando o subdomínio entre os aminoácidos 119 a 128 da proteína S pequena como crítico para a infectividade viral. Além das mutações no gene do envelope viral, mutações no gene do core também possuem potencial para alterar a secreção do vírion (Bang e cols., 2005; Le Pogam e cols., 2002), entretanto mais estudos são necessários para se verificar o quão comum são as mutações que inibem a secreção da partícula viral durante a infecção crônica e o quanto a prevalência dessas mutações influencia na severidade da doença.

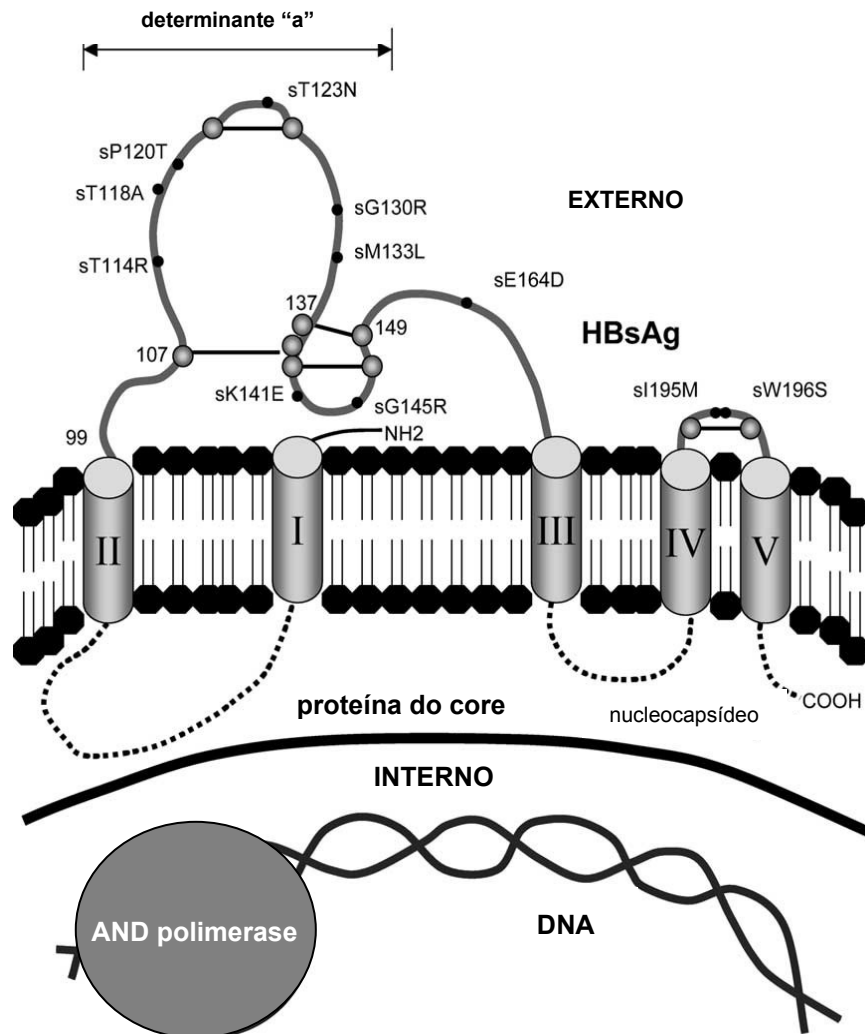


Figura 7. Esquema mostrando a relação do determinante “a” da proteína S com a superfície dos vírions de HBV. A região da proteína S, incluindo o determinante “a” que se encontra na superfície viral, é representada por uma linha sólida. Os resíduos de cisteína do determinante “a” são representados por círculos cinza e as pontes disulfeto são indicadas pelas linhas unindo esses resíduos. As alfa-hélices que atravessam a dupla camada lipídica da membrana são representadas por estruturas cilíndricas cinzas. As substituições de aminoácidos mais frequentemente encontradas na proteínas S são representadas por pontos pretos. Modificado de Torresi (2002).

Na região da polimerase viral já foram descritas várias mutações que causam resistência ao tratamento antiviral (Tab. 1). Essas mutações emergem principalmente após tratamento prolongado. Vários estudos já foram realizados na tentativa de se entender os mecanismos de resistência as drogas para o desenvolvimento de novas drogas antivirais e a fim de se desenvolver estratégias para o manejo e prevenção do desenvolvimento de mutações de resistência a drogas antivirais (Ghany e Liang, 2007). Em sua maioria as mutações que conferem resistência aos antivirais estão localizadas principalmente no domínio catalítico da polimerase. As mutações primárias ocorrem principalmente nas vizinhanças dos sítios de ligação de dntps afetando principalmente a posição ou estabilidade do substrato de ligação, molde ou iniciador. Ao contrário, as mutações secundárias tendem a ocorrer fora do sítio de ligação de nucleotídeos (Ghany e Liang, 2007, Sheldon e cols., 2006).

Tabela 1. Mutações na região da polimerase viral que conferem resistência ao tratamento antiviral (modificado de Ghany & Liang, 2007).

Droga	Domínio A	Domínio B	Domínio C	Domínio D	Domínio E
Lamivudina	rtL80V/I	rtI169T, rtV173L, rtL180M, rtA181T, rtT184S	rtM204V/I/S, rtQ215S	-	-
Telbivudina	-	-	rtM204I	-	-
Adefovir	rtV84M, rtS85A	rtA181T/V	rtV214A, rtQ215S	rtI233V, rtN236T, rtP237H	-
Tenofovir	-	rtA194T	-	-	-
Entecavir	-	rtI169T, rtS184S/A/I/L/F/G	rtS202G/I	-	rtM250V

I.XI. Variabilidade genética

- Subtipos

Em 1971, Le Bouvier fez o primeiro relato de variabilidade genética no HBV, descrevendo, na proteína de superfície viral, juntamente com o determinante a (anteriormente descrito por (Levene e Blumberg, 1969), dois outros determinantes, d e y. Em seguida, dois determinantes adicionais, w e r, foram descritos por Bancroft e cols. (1972), sugerindo que cada cepa de HBV poderia ser caracterizada como pertencente a um subtipo específico: adw, adr, ayw ou ayr. Mais tarde, em 1983, em um estudo maior, Courouce-Pauty e cols., não só confirmaram um padrão de distribuição geográfica dos vários subtipos virais, como caracterizaram subtipos adicionais, chegando a um total de nove subtipos virais de HBV (ayw1 a ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- e adr+) (Tab. 2).

Nos anos 80, tornou-se claro que os determinantes dos subtipos virais eram baseados na substituição de um único aminoácido da proteína de superfície pequena nas posições 122 (d ou r) e 160 (r ou w). Os subtipos “d” e “w” possuem ambos lisina nas duas posições, enquanto a presença de arginina em ambas posições determina os subtipos “y” e “r”. Subtipos adicionais foram mapeados nos aminoácidos 127, 144, 145, 158, 159, 177 e 178 (Norder e cols., 1992; Okamoto e cols., 1987).

Tabela 2. Tabela mostrando as substituições de aminoácidos em posições específicas que determinam os diferentes subtipos do HBV (retirado de Kay e Zoulim, 2007).

Sorotipo	Seqüência HBsAg
ayw1	122R+160K+127P+ (134F e/ou 159A)
ayw2	122R+160K+127P
ayw3	122R+160K+127T
ayw4	122R+160K+127L
Ayr	122R+160R
adw2	122K+160K+127P
adw4	122K+160K+127T
adw4q-	122K+160K+127L+178Q
adrq+	122K+160R+177L+178P
adrq-	122K+160R+177V

- Genótipos

Com a evolução, diminuição de custo e a popularização das técnicas de seqüenciamento, a subtipagem, baseada somente na seqüência da proteína S viral, foi dando lugar a genotipagem, baseada no seqüenciamento do genoma completo do HBV. Em 1988, Okamoto e cols., comparando a seqüência completa de 18 cepas de HBV, observaram o agrupamento destas em quatro grupos que se divergiam em mais de 8%, determinados de A a D, sugerindo assim que a classificação do HBV em subtipos poderia ser complementada, se não substituída. Comparando seqüências do gene S, Norder e cols. (1992), encontraram resultados similares ao de Okamoto, além de descrever outros dois grupos E e F que foram confirmados posteriormente por outros estudos (Naumann e cols., 1993; Norder e cols., 1993; 1994). Mais dois genótipos foram posteriormente descritos, G e H. O genótipo G, descrito em 2000 por Stuyver e cols., possui uma inserção de 36 nucleotídeos região do core. Já e o

genótipo H, descrito em 2002 por Arauz-Ruiz e cols., é bastante similar ao genótipo F, sendo provavelmente derivado deste.

Estudos recentes demonstram que os diferentes genótipos de HBV podem ser classificados ainda em subgrupos com origens étnicas e geográficas distintas que diferem em aproximadamente 4 % do genoma (Alestig e cols., 2001; Kramvis e cols., 2002; 2005; Sugauchi e cols., 2001; 2002). O genótipo A foi recentemente dividido em subgrupo Aa (África/Ásia) e Ae (Europa). O subgenótipo Aa difere-se de todos os outros genótipos por possuir as mutações G1809T, C1812T, G1862T e G1888A (Sugauchi e cols., 2004). Kramvis e colaboradores (2002) descreveu isolados do genótipo A, denominada A', que demonstravam uma deleção de 11 aminoácidos no final da região pre-S1 semelhante ao observado em vírus do genótipo D. O subgrupo Aa também foi observado em Malawi (Sugauchi e cols., 2003). Esses isolados eram em sua maioria pertencentes ao subtipo ayw1, entretanto não apresentavam a deleção no domínio préS1 como os isolados africanos. Sugauchi (2002) também observou que dois subgrupos pertencentes ao genótipo B podem ser diferenciados; um grupo observado principalmente na população japonesa (Bj), onde nenhuma recombinação é observada e um subgrupo asiático (Ba) que apresenta uma recombinação na região do core em HBV do genótipo C. Com a análise de seqüências virais, isoladas de aborígenes australianos, pertencentes ao genótipo C foram identificadas várias características diferentes que sugeriram a separação deste em um subgrupo separado denominado C Austrália (Alestig e cols., 2001, Sugauchi e cols., 2001). O genótipo F, sul americano, pode ser separado em dois clados, denominados FI e FII (Norder e cols., 2003). FII, primeiramente identificado no Brasil (Naumann e cols., 1993), é encontrado principalmente na América do Sul, enquanto o subgrupo FI é prevalente na América Central. Os genótipos E, G e H não apresentam nenhuma subdivisão. Acredita-se que a ausência de subgenótipos no genótipo E é devido a sua recente gênese em genótipo. Já no caso dos genótipos G e H, por terem sido descritos há menos tempo, ainda há poucos genomas totalmente seqüenciados e depositados no GenBank e nenhum trabalho foi realizado ainda no sentido de classificá-los em subgenótipos. Pelas análises de recombinação feitas até o momento, há indicações que no mínimo um novo genótipo de HBV ainda falta ser descrito (Glebe, 2007).

I.XII. Métodos de genotipagem

Vários métodos de genotipagem são conhecidos para o vírus da hepatite B (Bartholomeusz e Schaefer, 2004). Inicialmente a variabilidade do genoma era observada

através dos diferentes perfis encontrados após a digestão do material genético viral por enzimas de restrição. A separação dos diferentes genótipos do HBV utilizava a digestão com enzimas de restrição dos fragmentos previamente amplificados, sendo possível a diferenciação dos diferentes genótipos através da observação dos diferentes padrões de restrição (Lindh, 1997; Mizokami e cols., 1999). Posteriormente foram desenvolvidos vários métodos de genotipagem que incluíam a amplificação de um fragmento do genoma viral utilizando-se iniciadores específicos para cada um dos genótipos virais. Em 1993 Repp e cols. descreveram uma reação de PCR "nested" com um jogo de iniciadores multiplex capaz de detectar concomitante quatro genótipos de HBV (A, C, D e F). Outro método similar é capaz de diferenciar os genótipos A-F em duas reações de PCR distintas (Naito e cols., 2001). Kirschberg e cols. (2004) aprimoraram uma reação de PCR-multiplex, sendo possível distinguir os genótipos A-F em uma única reação. Uma vantagem da utilização de técnicas genótipo específicas é que torna mais fácil a detecção de infecção PR mais de um genótipo do HBV (Zhang e cols., 2004). Ainda estão disponíveis outros métodos de determinação dos genótipos virais utilizando sondas genótipo específicas ou a até mesmo *microarrays* (Sons e cols., 2006). Atualmente, o método padrão ouro para genotipagem é o seqüenciamento do genoma completo ou parte dele, sendo a região que codifica a proteína S a que resulta em uma análise filogenética mais semelhante da obtida quando se utiliza o genoma viral completo (Okamoto e cols., 1988; Norder e cols., 1992).

I.XIII. Distribuição dos diferentes genótipos do HBV

Os diferentes genótipos virais, designados de A a H, e definidos pela divergência na seqüência de nucleotídeos superior a 8% entre os mesmos, possuem distribuição geográfica específica (Arauz-Ruiz e cols., 2002; Norder e cols., 1992). O genótipo A é prevalente no norte e centro da Europa, mas também é comum no América do Norte e África sub-saariana. Os genótipos B e C são mais freqüentes na Ásia. O genótipo D é amplamente distribuído, sendo o genótipo predominante na região mediterrânea, e o genótipo E é encontrado principalmente no oeste da África. O genótipo F apresenta a maior divergência entre todos, e é encontrado em populações nativas das Américas (Norder e cols., 1993). O genótipo G é encontrado na França e EUA (Stuyver e cols., 2000), e o genótipo H na América Central e EUA, também em populações nativas (Arauz-Ruiz e cols., 2002).

Os diferentes subgenótipos de HBV também apresentam distribuições geográficas específicas, sendo somente o genótipo D e seus subgenótipos D1, D2 e D3, descritos como presentes por todo o mundo (Glebe, 2007).

I.XIV. Genótipos do HBV: O panorama Brasileiro

Além de existirem poucos estudos sobre os genótipos de HBV circulantes em território brasileiro, quase todos são voltados a grupos específicos de pacientes (portadores crônicos, pacientes de unidades de hemodiálise, ou portadores de HIV). Entretanto todos esses estudos demonstram como circulantes no território brasileiro os genótipos A, D e F. Outros genótipos como o B e C também já foram descritos como circulantes no Brasil, entretanto são raros e encontrados somente em descendentes de asiáticos. Há relato recente também da presença do genótipo G em nosso país.

Carrilho (2004) analisou 813 pacientes de hemodiálise de 22 unidades de diálise diferentes no estado de Santa Catarina. Nesse pacientes foram identificados os genótipos A (30.6%), D (57.1%) e F (12.2%). Análises univariadas mostraram associação entre a infecção pelo HBV e o tempo total de hemodiálise, tipo de equipamento utilizado para diálise, higiene e esterilização do equipamento, número de reutilização dos filtros de diálise, o número de pacientes por funcionário e infecção por HCV.

No estado do Paraná foi realizado um estudo em 2002, onde foram identificados circulando pela população infectada pelo HBV, os genótipos A (14%), C (1,3%), D (82,5%) e F (1,8%). Sendo que o genótipo C foi encontrado em um indivíduo do grupo étnico amarelo (Bertolini, 2002).

Pacientes infectados por HIV provenientes do Rio de Janeiro foram investigados para presença de infecção por HBV, 50% das amostras se revelaram HBsAg positivas, sendo que 70% eram do genótipo A, e 30% do genótipo D (Sucupira, 2004).

Rezende e cols. (2005), analisaram o soro de 46 pacientes com hepatite B crônica, todos provenientes da região Sudeste. Nesse estudo foram identificados 19 pacientes infectados com o genótipo A (41.3%), 26 com o genótipo D (56.5%) e somente um com o genótipo F (2.2%).

Em Goiânia foi realizado um estudo com pacientes de unidade de hemodiálise revelando que aproximadamente 12% desses indivíduos eram HBsAg positivos. A análise genotípica de 26 amostras revelou a presença de genótipo A, D e F em porcentagens de 50,0%, 46,2% e 3,8% respectivamente (Teles e cols., 1999). Posteriormente novo estudo na

mesma região geográfica e também em pacientes de diálise verificou a prevalência de 67% de HBV genótipo A, 30% de vírus do genótipo D e 3% do F (Motta, 2003).

No estado do Tocantins, um estudo também com pacientes de uma unidade de hemodiálise, analisou amostras de 100 indivíduos, dos quais quatro foram HBsAg positivos e destes três foram identificados como portadores do genótipo A do HBV (Souza e cols., 2003). Sitnik e cols. (2004) analisaram soro de 103 portadores crônicos do HBV, HBsAg positivos, provenientes de várias regiões do país, revelando a presença de cinco genótipos virais nessa população: A, B, C, D e F. O genótipo A foi o mais frequentemente encontrado (59,5%), seguido pelos genótipos D (24,3%), C (13,6%), F (9,7%) e B (2,9%). Os genótipos B e C encontrados nessa amostra foram identificados em soros de pacientes de origem asiática.

Estudo, realizado na região Norte e nordeste do País, revelou a presença dos genótipos A, D e F, sendo que na região Norte (estados do Amazonas e Acre) a prevalência do genótipo A é de 55,6%, D 22,2% e F 22,2%. Estudo filogenético mais recente, também em pacientes com hepatite B na região norte do país, demonstrou maior variabilidade genética e maior taxa de substituições em pacientes com hepatite B aguda ou crônica que em portadores assintomáticos (Oliveira e cols., 2008). Já na região Nordeste foi encontrado somente os genótipos A (85,7%) e F (14,3%) (Silva Filho, 2005).

Estudo mais abrangente foi realizado por Mello em 2007. Na região norte do país, que descreveu uma maior frequência do genótipo A no Amazonas e no Pará, enquanto no estado do Amapá o genótipo mais frequentemente encontrado foi o genótipo D. No estado de Pernambuco o genótipo mais frequente foi o A (54,2%, seguido pelo F (29,2%) e D (16,6%). Nos estados do Sudeste analisados (SP, RJ), o genótipo mais prevalente foi o genótipo A, ocorrendo o mesmo na região Sudeste (MG, MS e GO). No estado de Santa Catarina somente foi relatada a presença dos genótipos A e D, sendo o último o mais frequentemente encontrado.

Recentemente, estudo realizado com pacientes submetidos ao tratamento com lamivudina, foi observado a presença de amostras do genótipo G. Tais amostras tiveram todo o seu genoma seqüenciado e demonstraram grande divergência em relação as seqüência dos genótipos G já descritas na literatura (Bottechia e cols., 2008).

Análises filogenéticas demonstraram que ambos os subgrupos do genótipo A (Aa e Ae) circulam no Brasil, assim como dois subgrupos pertencentes ao genótipo F (Ib e II) (Gomes, 2005).

Alguns autores colocam que a América do Sul e Central são as únicas regiões onde estes três genótipos do HBV (A, D e F) co-circulam em larga escala, o que poderia contribuir para variações específicas de isolados de HBV (De Castro e cols., 2001). Estes mesmos

autores comentam que poucos genomas da América do Sul foram completamente seqüenciados. A alta diversidade do HBV, aliado aos achados de que diferentes genótipos apresentam comportamento diferente na evolução das doenças hepáticas, apontam para a necessidade de um maior conhecimento da associação deste diferentes genótipos com o desenvolvimento de diferentes doenças hepáticas. Deve-se destacar, no entanto, que não existem estudos suficientes sobre a prevalência dos diferentes genótipos virais de HBV no Brasil e na América do Sul. Tendo em vista que a população brasileira é composta por diferentes origens étnicas, seria interessante saber se a freqüência dos diferentes genótipos de HBV presentes no Brasil reflete a composição étnica obtida a partir dos dados genéticos encontrados em estudos populacionais (Alves-Silva e cols., 2000; Carvalho-Silva e cols., 2001).

I.XV. Infecção dupla e recombinação

Infecção dupla por mais de um genótipo de HBV pode ser detectada utilizando-se métodos sorológicos (Hess e cols., 1977; Tabor e cols., 1977). Superinfecções com o mesmo ou genótipos diferentes de HBV, as quais, em pacientes crônicos, parecem vir sempre acompanhadas da exacerbação da doença aguda já foram descritas (Kao e cols., 2001). Em estudos em pacientes tratados com interferon foi observada co-infecção por mais de um genótipo em 67% dos casos (Hannoun e cols., 2002). Além disso, nesse grupo de pacientes, é freqüente a mudança do genótipo A (adw) para o genótipo D (ayw) após soroconversão (Gerner e cols., 1998). O aparecimento de rearranjos e a ocorrência de várias trocas de bases na região pre-S são evidências que sugerem um processo de seleção agindo nessa região do genoma viral. Além disso, a troca de genótipos após a soroconversão HBeAg/anti-HBe revela a existência de mecanismos ainda não conhecidos durante o curso natural da infecção (Gerner e cols., 1998).

A detecção de infecção por mais de um genótipo de HBV é de fácil detecção com PCR-multiplex, ou métodos que utilizam sondas genótipo específicas (Kato e cols., 2003; Kirschberg e cols., 2004; Naito e cols., 2001; Zhang e cols., 2004). Utilizando diferentes métodos, a infecção dupla foi observada em 4,4% (Sata e cols., 2003), 10,9% (Kato e cols., 2003), 12,5% (Osiowy e cols., 2003), 17,3% (Olinger e cols., 2006), 17,5% (Chen e cols., 2004) dos pacientes infectados por HBV. Inclusive infecção tripla pelos genótipos A, B e C foram relatadas em 0,9% de pacientes usuários de drogas injetáveis (Chen e cols., 2004).

A infecção pelo genótipo G parece estar ligada necessariamente a co-infecção pelo genótipo A. Esse achado em quatro pacientes americanos (Kato e cols., 2002) foi confirmado por estudo francês que também identificou a infecção pelo genótipo G acompanhado pelo genótipo A em um paciente (Kremsdorf e cols., 1996).

Alterações no genoma do HBV já foram relatadas por vários autores. Estudos recentes identificaram *hot spots* para recombinação intergenotípica (Simmonds e Midgley, 2005; Yang e cols., 2006). Pontos de quebra e recombinação foram freqüentemente encontrados nas vizinhanças da região DR1 (nt 1640–1900), região preS1/S2 (nt 3150-100), região 3' terminal do gene do core (nt 2330-2450) e região 3' terminal do gene da proteína S (nt 650-830) (Simmonds e Midgley, 2005; Yang e cols., 2006).

A maior parte dos autores descrevem trocas em parte do promotor do gene pre-core entre diferentes genótipos (Bollyky e cols., 1996; Bowyer e cols., 2000; Morozov e cols., 2000; Sugauchi e cols., 2002). Vários recombinantes entre os genótipos A e D (Bollyky e cols., 1996; Bowyer e cols., 2000; Morozov e cols., 2000; Owiredu e cols., 2001; Sugauchi e cols., 2002); B e C (Bollyky e cols., 1996; Bowyer e cols., 2000; Morozov e cols., 2000; Sugauchi e cols., 2002) e entre os genótipos A e C (Hannoun e cols., 2002) já foram observados. Recombinações entre os genótipos B e C parecem ser responsáveis pela separação do genótipo B em dois subgenótipos com distribuições geográfica específicas: o genótipo sem recombinação é encontrado no Japão (Bj), enquanto o subgenótipo recombinante (Ba) é encontrado em toda a Ásia, exceto no Japão (Sugauchi e cols., 2002). Do mesmo modo recombinantes entre os genótipos C e D são responsáveis por diferentes subgenótipos encontrados no Tibet (Cui e cols., 2002; Wang e cols., 2005; Zeng e cols., 2005).

Co-infecção por dois genótipos diferentes de HBV em um único paciente pode resultar em troca de material genético entre as duas linhagens. Entretanto, baseado no conhecimento atual da replicação do HBV, o mecanismo de recombinação não pode ser esclarecido, já que nenhum evento recombinatório em que haja troca de material genético ao nível de transcrição pode ser proposto para o genoma de *hepadnavirus* (Schaefer, 2005; 2007). Além disso, ainda está em aberto se os eventos recombinatórios observados no genoma do HBV são consequência direta de recombinação genética entre as diferentes linhagens virais, ou se são resultados de uma rápida adaptação do HBV a certos fatores genéticos ou imunológicos característicos de diferentes populações humanas no planeta (Schaefer, 2007).

I.XVI. Associação entre os genótipos do HBV e o curso clínico da infecção e diferenças na resposta à terapia anti-viral

Embora estudos clínicos preliminares indiquem a existência de uma associação entre o genótipo do HBV, a história natural da infecção e a resposta ao tratamento anti-viral (Carman, 1997; Kao e cols., 2000 a e b; Orito e cols., 2001) análises complementares são necessárias para se chegar a uma conclusão definitiva em relação ao assunto.

Kao e cols. (2000 a, b) sugeriram que o genótipo C do HBV está associado a uma doença de fígado mais severa e a uma menor resposta a terapia com interferon (IFN), sendo que portadores de HBV genótipo C são mais frequentemente HBeAg positivos (Akuta e cols., 2003). Lindh e cols. (1999) associaram o genótipo B do HBV a uma doença de fígado mais grave. Na Índia, pacientes com HBV genótipo D foram observados com hepatite mais grave, desenvolvendo carcinoma hepatocelular mais precocemente que pacientes infectados com o genótipo A (Thakur e cols., 2002). Estudo realizado em pacientes que foram submetidos a transplante de fígado sugere que pacientes infectados com genótipo A apresentam menor risco de recorrência, enquanto pacientes portadores do genótipo D possuem um maior risco de recorrência e morte após transplante de fígado (Devarbhavi e cols., 2002). Estudo recente realizado por Livingston e cols. (2007) em pacientes com hepatite B crônica no Alasca, descreveu associação significativa entre a infecção pelo genótipo F do HBV e o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Resposta à terapia com interferon parece estar associada a genótipos específicos do HBV. Indivíduos portadores do genótipo C e D apresentam uma menor resposta a IFN se comparado a indivíduos infectados com os genótipos A e B (Hou e cols., 2001; Kao e cols., 2000 a e b;). A melhor resposta dos genótipos A e B pode estar relacionada ao mais rápido desenvolvimento de mutações no promotor base do core nos genótipos C e D (Bartholomeusz e Schaefer, 2004). A resistência a terapia antiviral com lamivudina parece ser independente do genótipo viral após um ano de terapia, mas pode estar relacionada com a presença do HBeAg (Weber, 2005).

Já que os genótipos HBV possuem distribuição geográfica específica, é correto afirmar que os genótipos virais estão relacionados às etnias das pessoas infectadas. O genótipo A é predominante em etnias brancas, enquanto os genótipos B e C são predominantes em asiáticos (Hollinger e Liang., 2001). Levando em consideração que a transmissão perinatal é o modo de transmissão mais comum no continente asiático, fica a questão; qual fator é mais importante na determinação do curso da infecção em portadores de HBV: genótipo viral, duração da infecção, ou etnia do portador (Weber, 2005).

I.XVII. História Evolutiva

Embora a primeira descrição de uma epidemia de HBV só tenha acontecido no século passado, já foi sugerido que os genótipos virais do HBV podem refletir a migração de populações humanas nos últimos 100.000 anos (Norder e cols., 1994, 1996) e há algumas especulações que certas doenças (inclusive icterícia), descritas em textos antigos, como a bíblia podem ter sido causadas por infecção pelo HBV (Hollinger e Liang, 2001). Além disso, as altas taxas de transmissão e os longos períodos de infecção alertam que o vírus não necessita de grandes populações para estabelecer infecção (Dobson e Carper, 1996) e, portanto, foi capaz de permanecer infectando pequenos agrupados humanos por vários anos.

Várias tentativas foram feitas para se reconstruir o caminho evolutivo dos *hepadnavirus* (Bollyky e Holmes, 1999; Fares e Holmes, 2002; Orito e cols., 1989). Considerando uma taxa de substituições sinônimas para o HBV de 4.57×10^{-5} por sítio por ano, foi proposto que o vírus da hepatite B de pato (DHBV) começou a se diferenciar a aproximadamente 30.000 anos atrás enquanto o vírus da hepatite B de esquilo (GSHV) e o vírus que infecta marmotas (WHB) devem ter se divergido há aproximadamente 10.000 anos atrás, todos tendo como ancestral o HBV. Os diferentes genótipos do HBV surgiram há aproximadamente 3.000 anos (Orito e cols., 1989; Simmonds, 2001). Entretanto, como não somos capazes de estimar a real taxa de mutação do HBV através dos séculos ou milênios, não é possível calcular com exatidão quanto ocorreu a separação dos genótipos do HBV ou das outras espécies da família *hepadnaviridae*. O genoma ancestral do HBV provavelmente teria 3215 nucleotídeos de comprimento, como observado nos genótipos B, C, F e H. Os outros genótipos diferem em tamanho devido a deleções e inserções ocorridas no genoma original.

Estudos sobre a distribuição geográfica dos diferentes genótipos do HBV sugerem que o HBV se originou nas Américas e se espalhou pelo Velho mundo pelos últimos 400 anos, após a era de colonizações (Bollyky e cols., 1997). Durante esse período o HBV teria se diversificado, gerando os vários genótipos conhecidos, embora cálculos baseados no relógio molecular viral estimem que um tempo muito maior (aproximadamente 2.000 a 3.000 anos) seria necessário. Embora haja a possibilidade de que os diferentes genótipos virais já existissem antes do HBV se espalhar pelo mundo, não há evidências de infecção por outro genótipo que não seja o F na população indígena das Américas da época das grandes colonizações. Corroborando essa hipótese, há o fato de que a distribuição geográfica dos diferentes genótipos do HBV não seria tão clara se eles houvessem se diferenciados antes de ter se espalhando em todo o mundo (Simmonds, 2001). Contudo, o maior problema desta

hipótese é o fato de existir em todo o Velho Mundo várias espécies de primatas infectadas por HBV. Quando a proposta de que o HBV teria surgido nas Américas surgiu, as evidências de infecção desses primatas pelo HBV era controversa, já que poderia ter ocorrido como resultado de transmissão acidental entre os humanos e os animais em cativeiro (Lanford e cols., 1998; Norder e cols., 1996; Vaudin e cols., 1988; Zuckerman e cols., 1978). Hoje em dia já são conhecidos casos de primatas selvagens infectados por HBV no Velho Mundo (Hu e cols., 2000; MacDonald e cols., 2000; Takahashi e cols., 2000).

Sendo epidemiologicamente improvável a proposta de que o contato humano foi o responsável pela transmissão do HBV para várias espécies de primatas selvagens nesses últimos 300 anos, uma teoria alternativa propôs que o HBV co-evoluiu com os humanos ao mesmo tempo em que eles migraram a partir da África há 100.000 anos (Magnius e Norder, 1995; Norder e cols., 1994). Isso implicaria em uma taxa de mutação de aproximadamente 5×10^{-7} trocas/por sítio/por ano nos últimos 100.000 anos. Entretanto, a filogenia dos genótipos do HBV em nenhum momento corresponde às relações genéticas entre as populações de humanos ou primatas. Por exemplo, a presença do genótipo F em populações nativas da América não é condizente com a presença dos genótipos B e C nas populações mongóis do nordeste asiático, que são geneticamente seus parentes mais próximos. Entretanto há pouca senão nenhuma evidência que as populações sul americanas e polinésias tiveram significativo contato para explicar a presença do genótipo F na ilhas do pacífico. Além disso, há pouca relação entre a distribuição dos genótipos do HBV com algum outro grupo populacional. Outra incongruência é a existência de genótipos de HBV espécie-específicos em chimpanzés, gibões e orangotangos e como eles estão misturados entre os genótipos humanos. Isso é altamente inesperado já que as viroses dos primatas deveriam ser mais divergentes das variantes humanas e uma das outras devido ao seu maior tempo de co-especiação com as espécies de primatas (10 ± 15 milhões de anos) (Simmonds, 2001).

A partir dessa última observação, surge a hipótese que a infecção humana pelo HBV surgiu na população várias vezes através do contato com diferentes primatas infectados com diferentes genótipos espécie-específicos. Esse cenário, de alguma forma, lembra o descrito para o surgimento da infecção pelo HIV na população humana (Feng e cols., 1992; Gao e cols., 1999). A hipótese que a infecção humana pelo HBV foi originada por contatos múltiplos entre os humanos e diferentes espécies de primatas é suportada pelo fato das áreas de alta prevalência do HBV na população humana serem regiões onde o contato entre as duas espécies é mais provável (América do Sul, África Sub-saariana e Nordeste Asiático). Além disso, a distribuição dos genótipos de HBV considerados ancestrais (F, B e C) é específica dessas três áreas, sendo que os genótipos encontrados fora dessas regiões, como na Europa e

América do Norte, são provavelmente resultado de variações mais recentes do genoma viral ao entrar em contato com grupos mais recentemente expostos. O problema encontrado na hipótese de uma origem do HBV em primatas, hoje em dia, é que humanos e primatas não compartilham nenhum genótipo de HBV, a não ser um relato sobre a infecção de um chimpanzé com uma variante do genótipo E (Takahashi e cols., 2000).

OBJETIVOS

Tendo em vistas que a co-circulação em grande escala dos genótipos A, D e F do HBV ocorre somente na América do Sul e Central e que poderia contribuir para variações específicas nesses isolados, combinado ao fato de que diferentes genótipos apresentam comportamentos diferentes na evolução das doenças hepáticas, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar os diferentes genótipos do HBV circulantes em território nacional, já que não existem estudos suficientes sobre a prevalência dos diferentes genótipos virais de HBV no Brasil e na América do Sul.

Frente ao fato da população brasileira ser composta por diferentes origens étnicas, outro objetivo do presente trabalho é identificar se a frequência dos diferentes genótipos de HBV presentes no Brasil reflete a composição étnica obtida a partir dos dados genéticos encontrados em estudos populacionais.

MATERIAIS E MÉTODOS

III.I. Análise sorológica

III.I.I. Descrição da amostra

Foi realizado levantamento, junto ao Laboratório de Sorologia do Serviço de Hemoterapia do Instituto Nacional de Câncer para os anos de 1998 a 2005, de dados relativos a marcadores sorológicos para hepatite B (HBsAg, anti-HBc) de doadores de sangue atendidos no referido Instituto.

III.I.II. Análise Estatística

O teste de qui-quadrado (X^2) foi utilizado para verificar se houveram alterações significativas na prevalência de marcadores sorológicos, em doadores de sangue voluntários, para hepatite B (HBsAg e anti-HBc).

III.II. Análise molecular

III.II.I. Descrição da amostra

Foi realizado contato com vários bancos de sangue e centros de pesquisa em todo o território nacional para obtenção de amostras de soro de indivíduos HBsAg positivos. Essas instituições, em sua maioria, foram hemocentros, nos quais existe uma soroteca na qual as amostras poderiam ser selecionadas a partir dos testes sorológicos realizados rotineiramente por essas instituições. Nesse primeiro contato, o estudo proposto era apresentado e os objetivos a serem alcançados esclarecidos. Sete instituições, representando 4 regiões brasileiras distintas, apresentaram interesse em colaborar fornecendo amostras.

O levantamento da amostras HBsAgs positivas junto as sorotecas dos respectivos centros foi realizado, sendo os soros alicotados a partir dessas amostras, já coletadas e armazenadas. Durante o levantamento realizado na soroteca do Laboratório de Sorologia do Serviço de Hematologia do Instituto Nacional de Câncer, também foi avaliada a prevalência de dois marcadores sorológicos para hepatite B (HBsAg e anti-HBc) em doadores de sangue voluntários durante os anos de 1998 a 2005.

Trezentas e nove amostras de soro HBsAg positivas de doadores de sangue foram coletadas junto as seguintes instituições (Tab. 3):

- Hemocentro de Santa Catarina, SC
- Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, RJ
- Laboratório de Sorologia, INCA, RJ

- Santa Casa de Araçatuba, SP
- Hemocentro de Vitória, ES
- Hemocentro de Goiânia, GO
- Hemocentro de Alagoas, AL
- Hemocentro da Paraíba, PB

Tabela 3. Quantitativo de amostras coletadas no diferentes estados brasileiros.

Região	Estado	Número de amostras (n)
Sul	Santa Catarina	41
	Rio de Janeiro	48
Sudeste	São Paulo	52
	Espírito Santo	52
Centro-oeste	Goiás	51
Nordeste	Paraíba	50
	Alagoas	25
Total		318

O projeto para desenvolvimento desse trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa – Centro Integrado de atenção a Saúde e ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer, sendo aprovado com os números de protocolos 08-2004 e 104/05 respectivamente (Anexo I). Pelo fato do estudo proposto ser um estudo retrospectivo, feito a partir de amostras de soro (armazenadas em sorotecas) e fornecidos de maneira anônima, não foi necessária a apresentação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), visto que, conforme na resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde, de 10 de outubro de 1996, item IV.3c, não foi possível contatar os indivíduos diagnosticados, assim como a coleta desses dados não foi necessária ao andamento do projeto.

III.II.II. Extração de DNA

As amostras coletadas no diferentes centros foram divididas em alicotas de 200µL de soro. A essa alicota foram adicionados 80µL de um tampão de lise contendo Tris 0,25M, SDS 43mM + NaCl 0,93M + EDTA 25mM + tRNA 1mg + proteinase K 10mg/mL + CaCl₂ 0,0015M. As amostras foram deixadas a 37°C por 4 h para digestão. Decorrido esse tempo a amostra foi submetida à técnica de fenol-clorofórmio (Sambrook e cols., 1989) com modificações, pois a amostra foi incubada a -20°C *overnight* e centrifugada por 20 minutos antes da precipitação por álcool.

III.II.III. Determinação do genótipo do vírus da hepatite B

Para a determinação do genótipo foram realizadas PCR “nested” para amplificação e posterior, seqüenciamento da região do envelope (S) do HBV. Para a amplificação, foram utilizados os iniciadores HBV 21, HBV 24 (Starkman e cols. 2003) (Tab. 3) em uma primeira etapa de amplificação. Para um total de 25,0 μ L de reação foi adicionado DNA (de 250,0ng a 1,0 μ g), dNTPs (0,2mM/ μ L), iniciadores (2pmol/ μ L), Taq DNA polimerase (0,02U/ μ L), MgCl (0,2mM/ μ L), tampão de amplificação 1X. Na segunda etapa de amplificação foram utilizados os iniciadores HBV 22 e HBV 23 (Starkman e cols. 2003) (Tab. 4), sendo que para um total de 50,0 μ L de reação foi adicionado 2,0 μ L de produto amplificado na primeira etapa de amplificação, dNTPs (0,2mM), iniciadores (2pmol/ μ L), Taq DNA polimerase (0,02U/ μ L), MgCl (0,2mM), tampão de amplificação 1X. A amplificação em ambas etapas ocorreu nas seguintes condições: 2 minutos a 94C°, trinta ciclos de 94C° por 30 segundos, 52 C° por 30 segundos e 72 C° por 40 segundos, segundo de 72C° por 2 minutos. Os amplicons, contendo aproximadamente 301 pares de base foram seqüenciados em um seqüenciador automático (MegaBACE 1000) utilizando os mesmos iniciadores utilizados para a segunda etapa de amplificação e submetidos a 30 ciclos de 95C° por 20 segundos, 50C° por 15 segundos, 60C° por 1 minuto. As seqüências obtidas foram editadas com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) e alinhadas manualmente. Os dados de seqüenciamento foram utilizados para identificar o genótipo viral por BLAST através do banco de dados “*Genotyping*” (Rozanov e cols., 2004) do Nacional Institute of Health, que compara a seqüência de interesse com uma série de seqüências referências aos genótipos virais de HBV. A confirmação de genotipagem foi realizada através do método de *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987) com o algoritmo de distância p e a opção de deleção par a par (*pairwise deletion*), que não requer que as diferentes linhagens tenham evoluído na mesma proporção, utilizando-se o programa MEGA 4 (Tamura e cols., 2007). Para essa análise foram utilizadas seqüências de HBV obtidas no GenBank (Tab. 5).

Tabela 4. Iniciadores utilizados no estudo para determinar genótipo viral das amostras positivas para infecção por HBV (MacDonald e cols, 2000).

Iniciadores	Seqüência	Ordem	Tamanho do produto
HBV 21	5'GACTTCTCTCARTTTTCYAGGGG3'	1a etapa	435pb
HBV 24	5'AGTAAAYTGAGCCARGAGAAACGG3'		

Tabela 5. Sequências do GenBank utilizadas nas análises genéticas.

Número do GenBank	Genótipo/ Organismo de origem	Autor da sequência
AF090839	A	Stuyver e cols.
S50225	A	Wands e cols.
AB014370	A	Takahashi e cols.
X51970	A	Koechel e cols.
AF297623	A	Owiredu e cols.
AB033554	B	Sastrosoewignjo e cols.
AF100309	B	Wen e cols.
D00329	B	Okamoto H e cols.
M12906	C	Kobayashi M e cols.
X04615	C	Okamoto H e cols.
AB014381	C	Takahashi e cols.
M32138	D	Tong e cols.
AY233291	D	Kimbi e cols.
AB104712	D	Saudy e cols.
AB205126	D	Nakajima e cols.
AB205126	D	Nakajima e cols.
X75657	E	Norder H e cols.
AB032431	E	Takahashi e cols.
X75658	F	Norder e cols.
AF223965	F	Alestig e cols.
X75663	F	Norder e cols.
AB036916	F	Nakano e cols.
X69798	F	Naumann e cols.
AY090455	F	Arauz-Ruiz e cols.
AY090458	F	Arauz-Ruiz e cols.
AY090461	F	Arauz-Ruiz e cols.
AF223963	F	Alestig e cols.
AF223964	F	Alestig e cols.
AF405706	G	Vieth S e cols.
AB064310	G	Kato H e cols.
AF160501	G	Stuyver e cols.
AY090454	H	Arauz-Ruiz P e cols.
AY090457	H	Arauz-Ruiz P e cols.
AY090460	H	Arauz-Ruiz e cols.
AJ131571	Gibão	Grethe e cols.
AB046525	<i>Pan troglodyta</i>	Takahashi e cols.
AY226578	WMHBV	Chavez e cols.

III.II.IV. Análise Protéica

Após o alinhamento das seqüências de nucleotídeo obtidas, tais seqüência foram traduzidas utilizando-se o programa MEGA 4 (Tamura e cols., 2007), tanto na posição de leitura da proteína S pequena, como na posição de leitura da polimerase viral. Essas

seqüências foram então comparadas com a seqüência consenso de cada genótipo criadas por nós (Anexo II) e as substituições de aminoácidos foram anotadas.

III.II.V. Análise Filogenética

Para avaliar as relações filogenéticas entre as diferentes seqüências de região S, as seqüências de DNA foram alinhadas e em seguida agrupadas por genótipo.

A diversidade nucleotídica π (definida como a probabilidade de se escolher ao acaso dois nucleotídeos homólogos e eles serem diferentes, Nei, 1987) e a diversidade intragenotípica h (definida como a probabilidade de se escolher ao acaso dois haplótipos distintos em uma amostra, Nei, 1987) foram estimados com o programa ARLEQUIN 2.001 (Schneider e cols., 2000) com a opção *pairwise difference* e o fator de correção gamma igual a 0,0 (zero) para o cálculo das distâncias moleculares.

O cálculo de *mismatch distribution* (Schneider e Excoffier, 1999), que computa a distribuição do número de diferenças entre pares de seqüências de DNA de um conjunto de amostras, foi utilizado para estimar um possível evento demográfico passado, como por exemplo, contração, ou expansão populacional. Intervalos de confiança ao redor do *mismatch distribution* foram calculados pelo método de percentil e baseados em 1000 réplicas de *bootstrap* e nível de significância (α) de 0,001. Para a validação do modelo de expansão repentina (*sudden expansion model*) foi realizado teste utilizando a abordagem paramétrica de *bootstrap* usando o desvio da soma de quadrados (SSD) entre as distribuições observadas e esperadas (Teste de aderência; Schneider e Excoffier, 1999). Para esta análise foi assumido o modelo de sítios infinitos (*infinite-sites model*; Kimura, 1969) onde uma nova mutação ocorre em um novo sítio que é diferente do sítio onde uma mutação ocorreu inicialmente (Schneider e Excoffier, 1999).

Análise de variância adaptada para dados moleculares (AMOVA; Excoffiere cols., 1992), calculada usando o método de distância de *pairwise difference* a partir de frequências de variantes intragenotípicas, foi utilizada para determinar a estrutura geográfica das populações e os resultados gerados foram referidos como estatística Φ (Excoffier e cols., 1992). A significância dos índices de fixação (estatística Φ) foi testada usando permutações não paramétricas (Excoffier e cols., 1992), na qual são realizadas permutações de haplótipos, indivíduos ou populações, entre populações ou grupos de populações, utilizando-se 16.000 permutações. A estatística Φ é composta por três índices; Φ_{CT} (correlação de haplótipos aleatórios dentro de grupos de populações, relativo aos pares aleatórios de haplótipos extraídos de toda a população estudada), Φ_{SC} (correlação da diversidade molecular de haplótipos aleatórios dentro das populações, relativo aos pares aleatórios de haplótipos

extraídos da região) e Φ_{ST} (correlação de haplótipos aleatórios dentro das populações, relativo aos pares aleatórios de haplótipos extraídos de uma dada população - Excoffier e cols. 1992). Para análise de variância (AMOVA) as amostras foram separadas pelos locais de coleta (São Paulo, Rio de Janeiro, Vitória, Maceió, João Pessoa, Goiânia, Joinville) e tais locais foram agrupados por região geográfica (Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul). A análise foi realizada para cada genótipo separadamente, para que a variação entre os genótipos não influenciasse as diferenças relativas aos diferentes locais de coleta.

A análise a “base de rede”, *median-joining*, foi estimada pelo programa NETWORK 4.1.1.0 (Fluxus Technology, 2005). A análise de *median-joining* (MJ), cujo algoritmo foi explicado por Bandelt e cols. (1999), é uma parcimônia sem fundamento estatístico. Esta análise, utiliza somente os sítios variáveis e infere vetores medianos que podem ser interpretados como haplótipos extintos ou não amostrados na população. A análise de MJ foi realizada para cada genótipo separadamente.

A fim de esclarecer melhor a história evolutiva das amostras do genótipo F, as amostras desse genótipo seqüenciadas nesse estudo foram analisadas utilizando o método de máxima verossimilhança (Felsenstein, 1981) com busca heurística completa, usando os algoritmos de *stepwise addition* e de *branch swapping* [opção: *tree-bisection-reconnection* (TBR)] com adição de 10 réplicas, utilizando o programa PAUP* 4.0b (Swofford, 2003). Para esta análise foram utilizadas 10 seqüências de DNA representando variantes para o genótipo F do HBV. Nessa análise foram adicionadas 12 seqüências de HBV obtidas no GenBank (Tabela 4).

III.II.VI. Análise de Recombinantes

A análise para a presença de recombinantes foi realizada com o programa Simplot (Lole e cols, 1999) pela análise de *bootscanning*, que identifica sítios informativos que suportam árvores de topologias diferentes, de acordo com Robertson e cols. (1995), Lole e cols. (1999) e Sugauchi e cols. (2002). O teste de *bootscanning* foi realizado utilizando o método de *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987) com o modelo de distância kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980), com a taxa de transição e transversão empírica e com 1000 réplicas de *bootstrap*. As seqüências foram analisadas frente à seqüências consensos formadas por grupos de seqüências de cada genótipo extraídas do Genbank (Tab. 5).

III.II.VII. Análise Estatística

O teste de qui-quadrado (X^2) foi utilizado para verificar se a ocorrência dos haplótipos nos diferentes genótipos se dava de uma maneira uniforme ou não.

Já o teste de Mann-Whitney foi utilizado para verificar se os valores encontrados tanto para a diversidade nucleotídica (π) e diversidade intragenotípica (h) nos diferentes genótipo de HBV, são estatisticamente diferentes.

RESULTADOS

IV.I. Análise Sorológica

Foram analisados dados sorológicos provenientes do Laboratório de Sorologia do Serviço de Hemoterapia do Instituto Nacional do Câncer referentes a 128.497 doadores de sangue, coletados entre os anos de 1998 e 2005. Nesse período aproximadamente 57.823, ou seja, quase 45% dos doadores eram doadores de repetição. A prevalência média de HBsAg foi de 0,27% (347/128.497) e de anti-HBc foi de 3,68% (4723/128.497) para o período de 1998 a 2005. A prevalência dos marcadores analisados ano a ano está descrita na tabela 6. Uma diminuição progressiva na prevalência média de indivíduos HBsAg e anti-HBc positivos pode ser observada para os anos de 1998 a 2005. A prevalência de HBsAg caiu significativamente de 0,36% em 1998 para 0,14% em 2005 ($p < 0,001$), ao mesmo tempo, a prevalência de anti-HBc também caiu de maneira significativa de 6,12% em 1998 para 2,05% em 2005 ($p < 0,001$) (Fig. 8). Esses dados foram publicados em 2006 na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Vol. 101(6): 673-676 (Anexo III).

Tabela 6. Prevalência dos marcadores para a Hepatite B entre doadores de sangue no Rio de Janeiro no período de 1998 a 2005.

Ano		Marcadores	
		HBsAg	anti-HBc
1998	N	48/13,363	818/13,363
	%	0,36	6,12
1999	N	54/17,103	807/17,103
	%	0,32	4,72
2000	N	72/18,214	712/18,214
	%	0,4	3,91
2001	N	56/19,256	678/19,256
	%	0,29	3,52
2002	N	38/17,374	572/17,374
	%	0,22	3,29
2003	N	41/15,821	480/15,821
	%	0,26	3,03
2004	N	24/17,059	445/17,059
	%	0,14	2,61
2005	N	14/10,307	211/10,307
	%	0,14	2,05

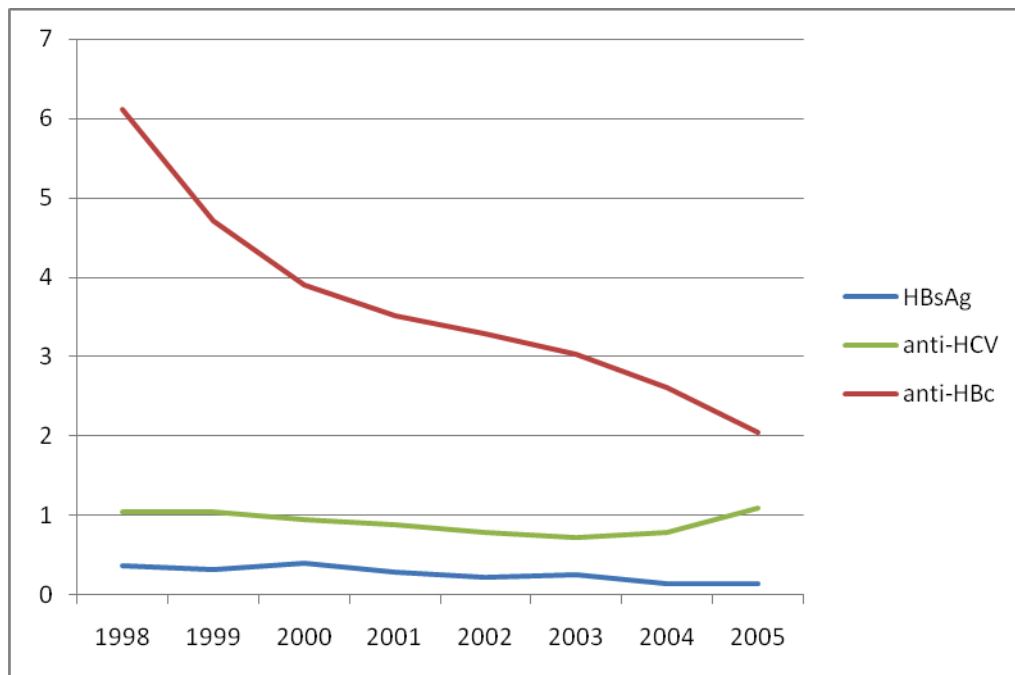


Figura 8. Prevalência de HBsAg, anti-HBc e anti-HCV entre doadores de sangue voluntários no Rio de Janeiro no período de 1998 a 2005.

IV.II. Genotipagem

Todas as 318 amostras de doadores de sangue HBsAg positivas de diferentes regiões brasileiras, depois de submetidas à extração de DNA, tiveram amplificada a região de interesse (S) por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Foi possível obter seqüências para a determinação do genótipo viral em 273 amostras (Tab. 7). O fato de não ser possível a amplificação e posterior seqüenciamento de todas as amostras pode estar relacionado à coleta em recipiente não apropriado ou estocagem imprópria com descongelamento esporádico.

A determinação do genótipo viral foi realizada primeiramente com a ferramenta *Genotyping* desenvolvida pelo *National Institute of Health* e confirmada pela análise de *Neighbor-Joining* (Figs. 9, 10 e 11).

Entre as amostras seqüenciadas foram encontrados três genótipos de HBV: A (73%), D (23%) e F (4%).

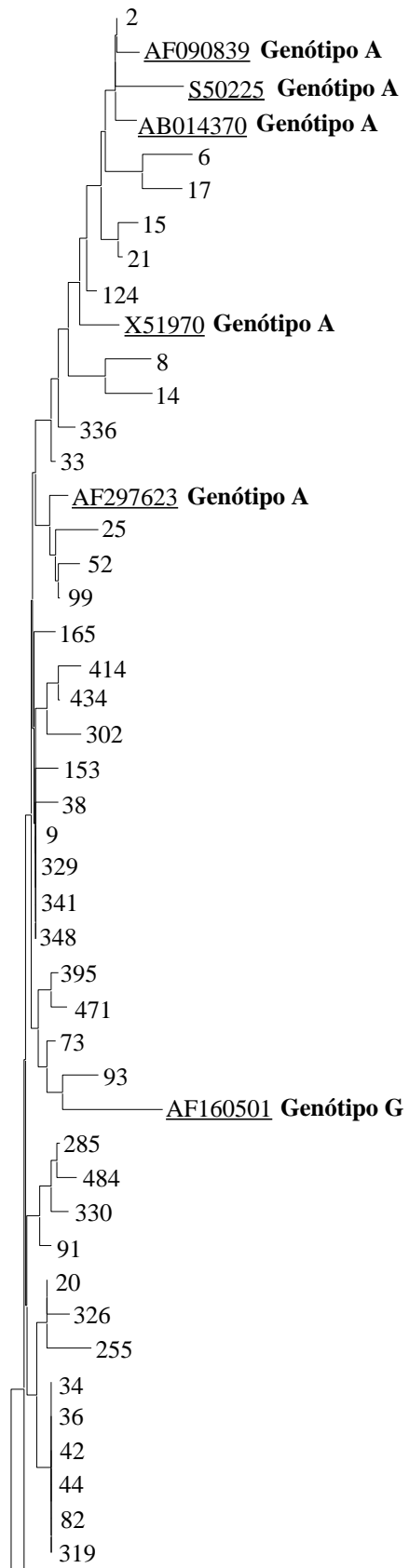
O genótipo A foi o mais identificado nas amostras de Araçatuba, Goiânia, João Pessoa, Maceió, Rio de Janeiro e Vitória, a exceção a cidade de Joinville. O genótipo D foi encontrado em amostras de Araçatuba, Goiânia, João Pessoa, Rio de Janeiro, Joinville e

Vitória, sendo a exceção neste caso, a cidade de Maceió. O genótipo F foi o menos frequentemente encontrado, somente entre as amostras de Araçatuba, João Pessoa, Joinville e Rio de Janeiro, estando ausente nas amostras coletadas em Goiânia, Maceió e Vitória.

Tabela 7. Quantitativo de amostras seqüenciadas separadas por estado de coleta.

Cidade	Número de amostras (n)
Joinville	40
Rio de Janeiro	44
Araçatuba	51
Vitória	37
Goiânia	41
João Pessoa	45
Maceió	15
Total	273

Em Araçatuba, 78% das amostras analisadas apresentavam o genótipo A, 20% o genótipo D e 2% o genótipo F. Em Goiânia, 95% das amostras analisadas apresentaram o genótipo A e 5% o genótipo D. Em João Pessoa 82% das amostras agrupou-se no genótipo A, 4% no genótipo D e 14 % no genótipo F. Na cidade de Joinville, o genótipo mais freqüente foi o D, em 67,5% das amostras coletadas, seguido pelo genótipo A, identificado em 30% das amostras, e do genótipo F presente em 2,5%. Em Maceió, só foram encontradas amostras do genótipo A. No Rio de Janeiro 76% das amostras analisadas apresentavam o genótipo A, 19% o genótipo D e 5% o genótipo F. Em Vitória 58% das amostras apresentaram o genótipo A e 42% o D, estando ausente o genótipo F (Fig. 12).



continua na próxima página

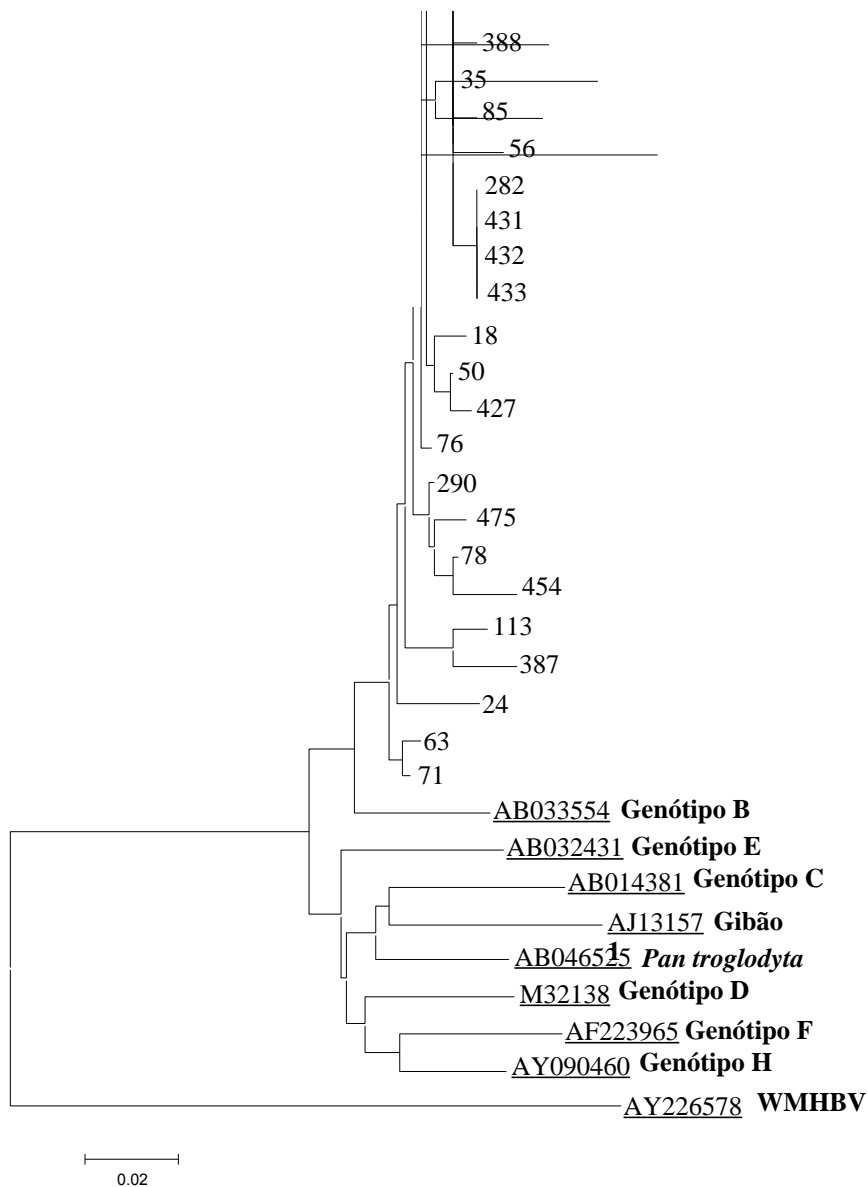
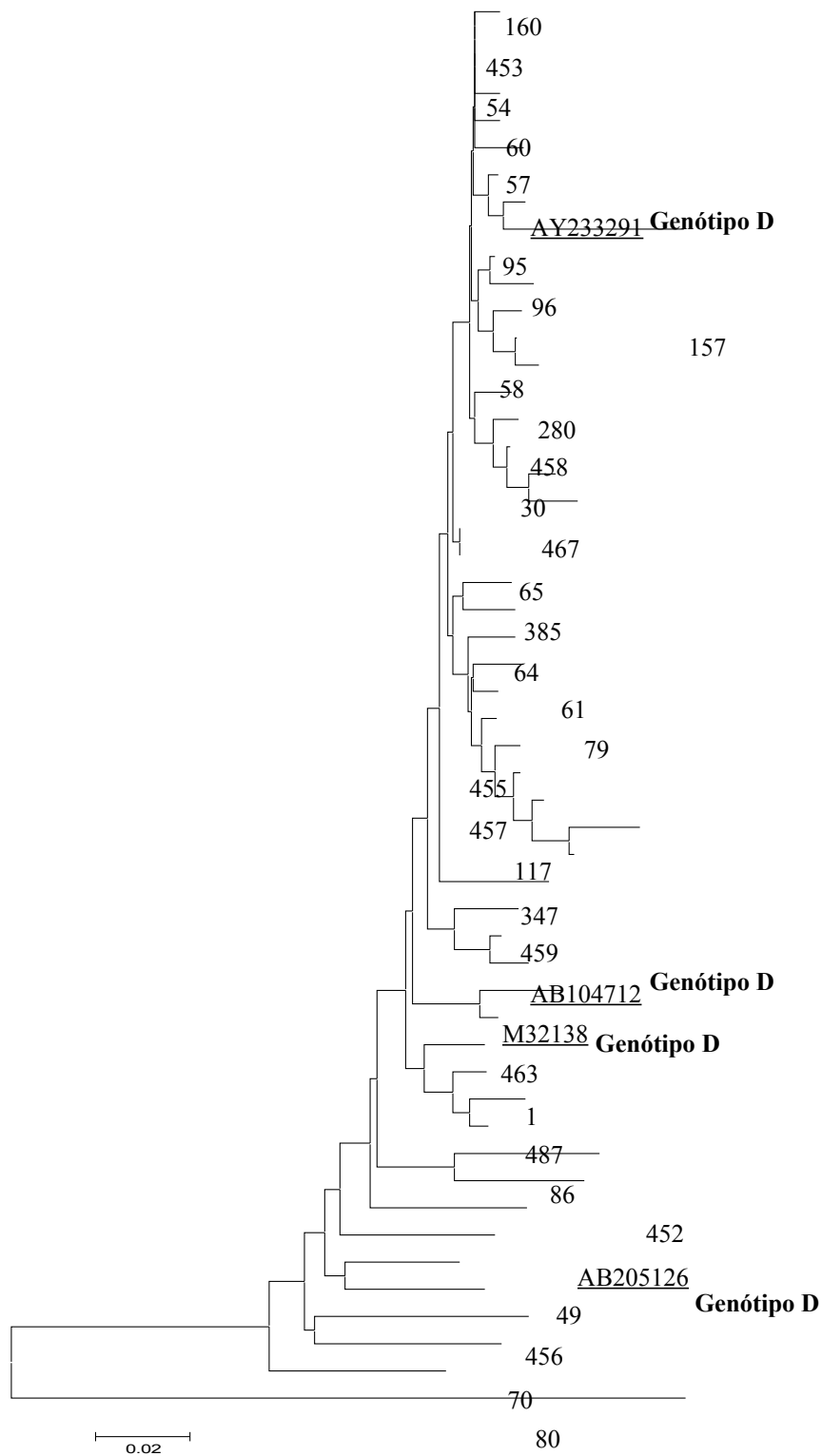


Figura 9. Topologia obtida na análise de *Neighbor-Joining* para todas as variantes intragenotípicas encontradas no genótipo A. As seqüências referências, retiradas do GenBank, encontram-se sublinhadas.



continua na próxima página

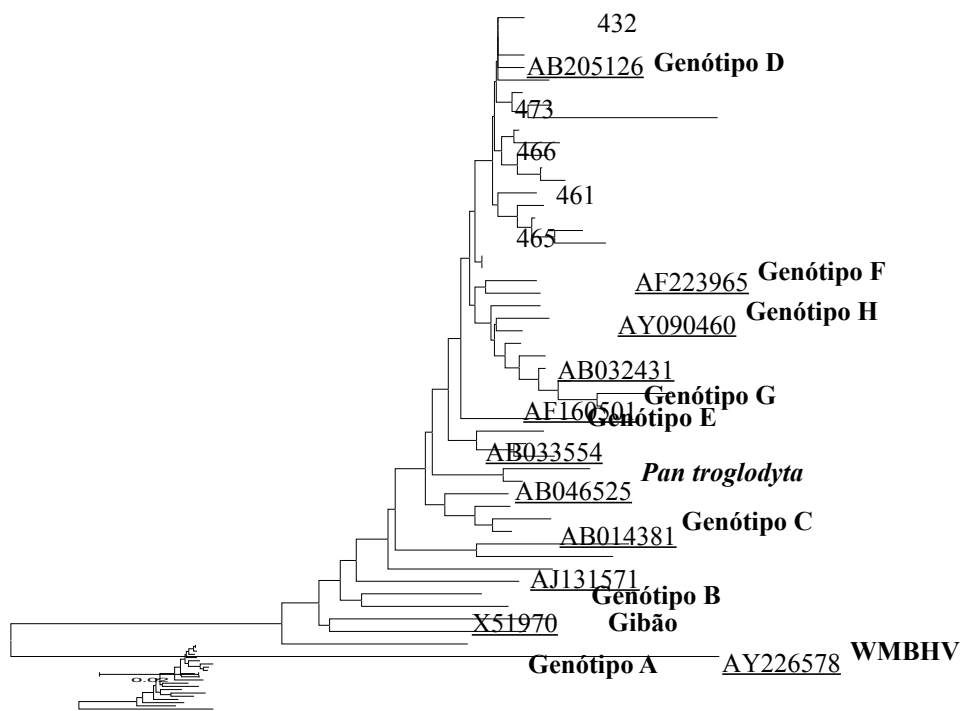


Figura 10. Topologia obtida na análise de *Neighbor-Joining* para todas as variantes intragenotípicas encontradas no genótipo D. As seqüências referências, retiradas do GenBank, encontram-se sublinhadas.

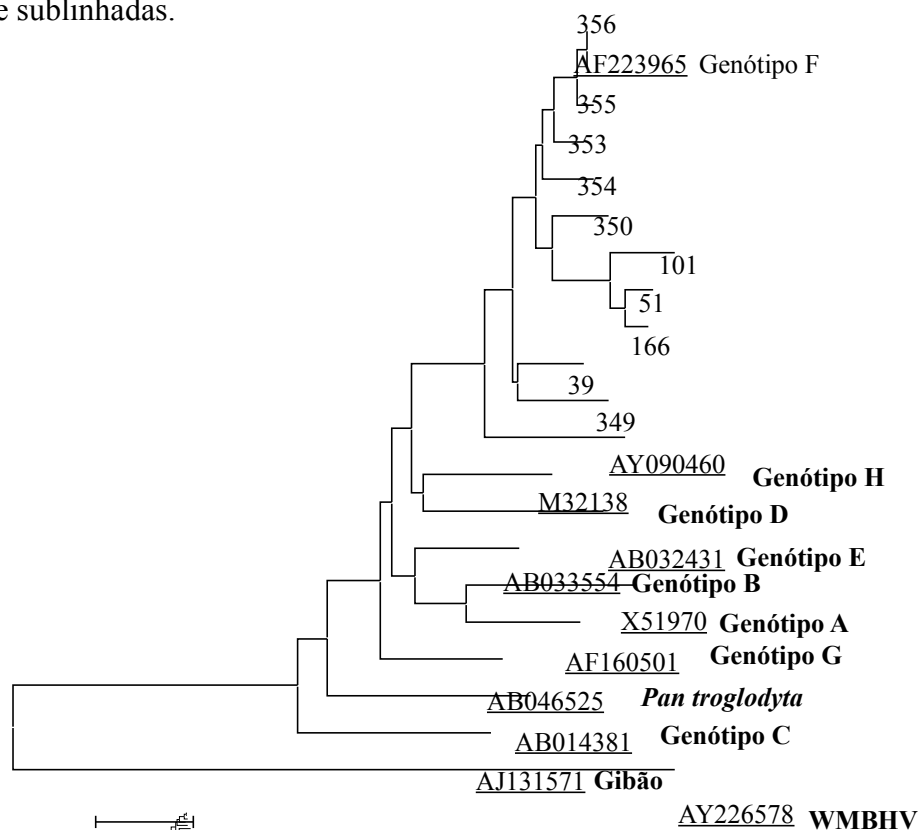


Figura 11. Topologia obtida na análise de *Neighbor-Joining* para todos os haplótipos encontrados no genótipo F. As seqüências referências, retiradas do GenBank, encontram-se sublinhadas.

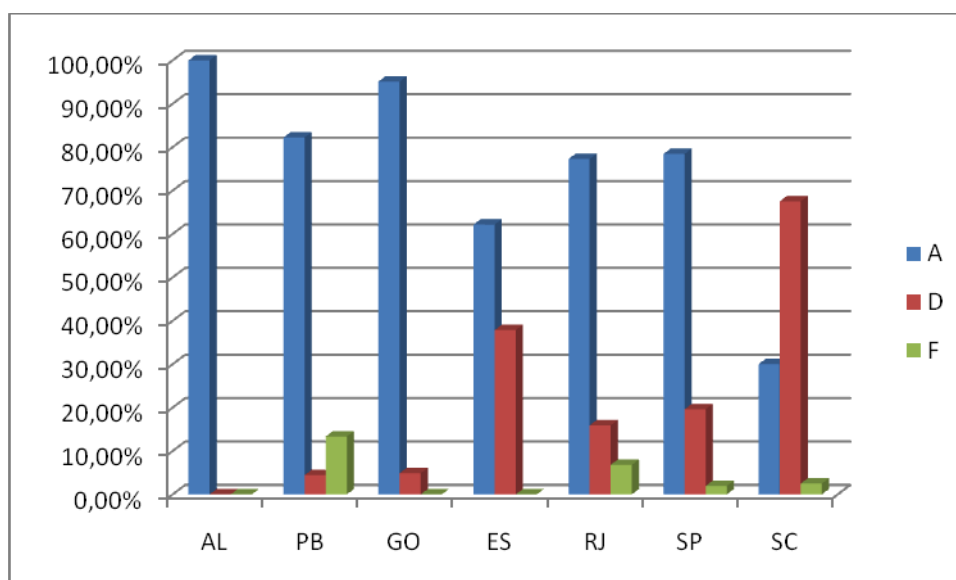


Figura 12. Gráficos mostrando a distribuição dos diferentes genótipos do HBV nas várias localidades analisadas.

IV.III. Subtipos

O subtipo viral foi determinado em 261 seqüências de acordo com os resíduos de aminoácidos presentes nas posições 122, 127, 134, 159 e 160. Em nossa amostra o subtipo mais freqüente foi adw2 (75,1%), seguido por ayw2 (18,01%), adw4 (3,83%), ayw1 (1,92%) e ayw3 (1,15%). Em todas as localidades amostradas o subtipo mais freqüente foi adw2, exceto em Joinville, onde o subtipo mais freqüente foi ayw2. No Em Vitória o subtipo ayw2, apesar de não ser o mais freqüente, também apresentou uma alta prevalência (Tab. 8).

Tabela 8. Prevalência dos diferentes subtipos virais nas diversas localidades de coleta.

Localidades Subtipo	AL	PB	GO	ES	RJ	SP	SC	Total	Porcentagem
adw2	14	38	32	20	30	38	16	196	75,10%
adw4	0	6	0	0	3	1	0	10	3,83%
ayw1	1	0	3	0	0	0	1	5	1,92%
ayw2	0	0	2	17	5	2	21	47	18,01%
ayw3	0	0	0	0	1	0	2	3	1,15%
Total	15	44	37	37	39	41	40	268	

Em amostras do genótipo A foi observado a presença de 2 subtipos diferentes adw2 e ayw1, sendo o adw2 o mais freqüente. Nas amostras pertencentes ao genótipo D foram

observados os subtipos ayw1, ayw2, ayw3 e adw2, sendo o ayw2 o mais prevalente. Nas amostras que se agruparam no genótipo F foram observados os subtipos adw2 e adw4, sendo o último o mais freqüente (Tab. 9).

Tabela 9. Distribuição dos diferentes subtipos virais nos diferentes genótipos identificados.

Subtipo	Genótipos			Total
	A	D	F	
adw2	188	6	2	196
adw4	0	0	10	10
ayw1	4	1	0	5
ayw2	0	47	0	47
ayw3	0	3	0	3

IV.IV. Análise intragenotípicas

Foram obtidas 264 seqüências relativas ao determinante “a” da região aberta de leitura da proteína S pequena compreendendo os aminoácidos 105 a 166. Nessas amostras foram encontrados 54 sítios polimórficos, nos quais ocorreram 62 substituições nucleotídicas (30 transições e 32 transversões), sendo que o número médio de diferenças entre todos os pares de variantes da amostra foi de 7,73 +/- 3,61, e a probabilidade de dois nucleotídeos homólogos escolhidos ao acaso serem diferentes foi de 0,04 +/- 0,02. Em relação ao número total de substituições, 60% ocorreram na terceira posição do códon, 25% na segunda posição e somente 15% na primeira posição. Das mutações observadas nas seqüências nucleotídicas no gene S, aproximadamente 53% eram sinônimas, ou seja, não acarretam uma mudança de aminoácidos na seqüência protéica final.

Na análise das seqüências pertencentes ao genótipo A foram observados 68 variantes (em 200 amostras analisadas), sendo 55 representados por uma única amostra. No genótipo D foram observados 37 variantes (de 62 amostras analisadas), dos quais 35 foram representados por somente uma amostra. No genótipo F foram encontrados 11 variantes, entretanto nenhum deles era compartilhado por mais de uma amostra (Tab. 10 e 11). O teste de qui-quadrado demonstrou que o maior número de variantes observado no genótipo A difere do esperado para uma distribuição uniforme ($p < 0,001$).

Tabela 10. Lista das variantes compartilhadas por mais de uma amostra identificadas na análise das seqüências de região S para o genótipo A. A localidade de coleta é representada

pela sigla do Estado. N = número de amostras encontradas para cada variante. A1 = variante 1, A2 = variante 2 e assim por diante.

Variante	N	Amostras	Localidade
A1	54	9, 19, 144, 145, 146, 147, 150, 152, 154, 155, 156, 158, 163, 167	SP
		29, 32, 41, 81, 87, 100	RJ
		67, 75, 102, 107, 123	ES
		284, 291, 293, 297, 301, 306	AL
		391, 392, 393, 394, 396, 398, 399, 402, 403, 405, 406, 408, 410, 411, 412, 413, 415, 416, 425, 426	GO
		164, 264, 474	SC
A2	36	148, 151, 161, 162	SP
		35, 37, 45, 48, 83, 90	RJ
		66, 72, 77, 105, 106, 112, 114, 120	ES
		283, 294	AL
		311, 321, 325, 328, 333, 334, 335, 339	PB
		407, 417, 422, 423, 430, 435, 451, 479	GO
A3	15	285	AL
		307, 308, 309, 310, 314, 315, 318, 322, 323, 331, 338, 343, 346, 351	PB
A4	10	20	SP
		97	RJ
		305	AL
		312, 313, 316, 317, 320, 332, 340	PB
A5	8	2, 3, 5, 7, 16, 22, 27	SP
		40	RJ
A6	5	34, 36, 42, 44, 82	RJ
A7	2	50	RJ
		468	SC
A8	2	99	RJ
		418	GO
A9	2	124	ES
		429	GO
A10	2	91	RJ
		300	AL
A11	2	53	RJ
		470	SC
A12	2	15, 23	SP
A13	2	255, 275	SC

Tabela 11. Lista das variantes compartilhadas por mais de uma amostra identificadas na análise das seqüências de região S para o genótipo D. A localidade de coleta é representada pela sigla do Estado. N = número de amostras encontradas para cada variante. D1= variante 1, D2= variante 2.

Variante	N	Amostras	Localidade
D1	20	159	SP
		54, 55	RJ
		59, 62, 69, 74	ES
		386	GO
		460, 462, 464, 469, 476, 477, 478, 480, 481, 482, 483, 486	SC
D2	5	1, 10, 11, 12, 13	SP

IV.V. Análise Protéica

IV.V.I. Gene S

Na análise das seqüências de aminoácidos gerados a partir do seqüenciamento de parte do gene S do vírus da hepatite B (aa105 a 165) foram identificados 52 peptídeos, destes, 19 foram traduzidos a partir de seqüências de DNA obtidas de HBV do genótipo A, 24 do genótipo D e 9 do genótipo F.

Na análise desses peptídeos foram observadas 27 modificações de aminoácidos em 18 sítios variáveis (Tab. 12). Em nossa amostra, o aminoácido mais variável foi o 131 no qual foi identificada substituição em 73 amostras. Este sítio também foi o mais variável nas amostras do genótipo A (substituição N131T em 12 amostras) e no genótipo D (substituição N131T em 56 amostras). No genótipo F a substituição mais freqüente foi a P127L, identificada em 10 amostras.

Tabela 12. Substituições de aminoácidos encontradas nas seqüências analisadas na leitura da proteína de superfície, discriminando o aminoácido presente na seqüência consenso (aa), sua posição, o aminoácido substituído, o número de amostras que apresentam a substituição (n) e os efeitos causados pela substituição. Em negrito estão as mudanças de aminoácidos relacionadas com a determinação do subtipo viral, em itálico estão as substituição relacionadas com variações genotípicas. ? = efeito não descrito.

aa	posição	aa substituído	n	Efeito
I	110	L	6	provável bloqueio da secreção de partículas virais
<i>T</i>	<i>114</i>	<i>S</i>	9	variação genotípica
T	118	A	1	escape vacinal
T	118	V	1	provável escape vacinal
P	120	T	2	escape vacinal
K	122	R	57	determinação de subtipos virais
P	127	T/L	13	determinação de subtipos virais
P	127	I	2	?
A	128	V	1	escape vacinal
Q	129	R	1	escape vacinal
G	130	R	1	escape vacinal
G	130	N	1	escape vacinal
<i>N</i>	<i>131</i>	<i>P/T</i>	4	variação genotípica
Y/F	134	H	1	?
Y/F	134	N	2	?
F	134	Y	68	determinação de subtipos virais
C	138	S	4	deficiência na secreção de vírions
T/C/K	140	S	3	escape vacinal
<i>S/P</i>	<i>143</i>	<i>T</i>	7	variação genotípica
S	155	T	1	?
<i>G/L/F</i>	<i>158</i>	<i>Y/A/V</i>	8	variação genotípica
A/K	159	G/V	70	determinação de subtipos virais
Y/L/K	161	F	50	variação genotípica

IV.V.I. Polimerase

Na análise das seqüências de aminoácidos gerados pela seqüência que codifica a polimerase viral do vírus da hepatite B (posição rt111 A rt171) foram identificados 71 peptídeos, sendo 41 traduzidos a partir de seqüências de DNA obtidas de HBV do genótipo A, 19 do genótipo D e 11 do genótipo F.

Analisando esses peptídeos foram observados 35 sítios variáveis, onde ocorreram 51 modificações de aminoácidos (Tab. 13). O aminoácido mais variável foi o rt154 encontrado substituído em 87 amostras. No do genótipo A, a substituição mais freqüente foi rtW154R, no genótipo D, o aminoácido mais variável foi o rt130, substituição rtP130Q, em 20 amostras, já no genótipo F a substituição mais observada foi a rtM132L em 6 amostras.

Tabela 13. Substituições de aminoácidos encontradas nas seqüências da polimerase do vírus da hepatite B analisadas, discriminando o aminoácido presente na seqüência consenso (aa), sua posição no domínio RT (posição rt), o aminoácido substituído e o número de amostras que apresentam a substituição (n).

AA	posição RT	aa substituído	n
L	115	M	1
N	118	T/D	7
S	119	P	1
I	121	L	2
H/L/Y	122	N/F/I/L	44
D	123	N	5
N	124	H	11
Q	125	K	2
H	126	Y/R	24
H	127	N	1
T	128	N	3
L	129	M	21
P	130	Q	21
N	131	D	1
M	132	L	6
S	135	Y/T	13
N	137	D	1
R	138	K	3
Q	139	H/K/N/T	21
S	140	T	3
V	142	E/A	3
M	145	L	5
Q	148	K	5
K	149	Q/E	4
F	150	Y	11
Y	151	F	4
Y/R/Q	152	F/W/K	9
W/L	154	R/F/Y	87
S	160	T	3
I	162	V/N	2
L	163	M	1
I	164	V	10
F	167	L	2
K	169	E/Q	2

IV.VI. Análise Filogenética

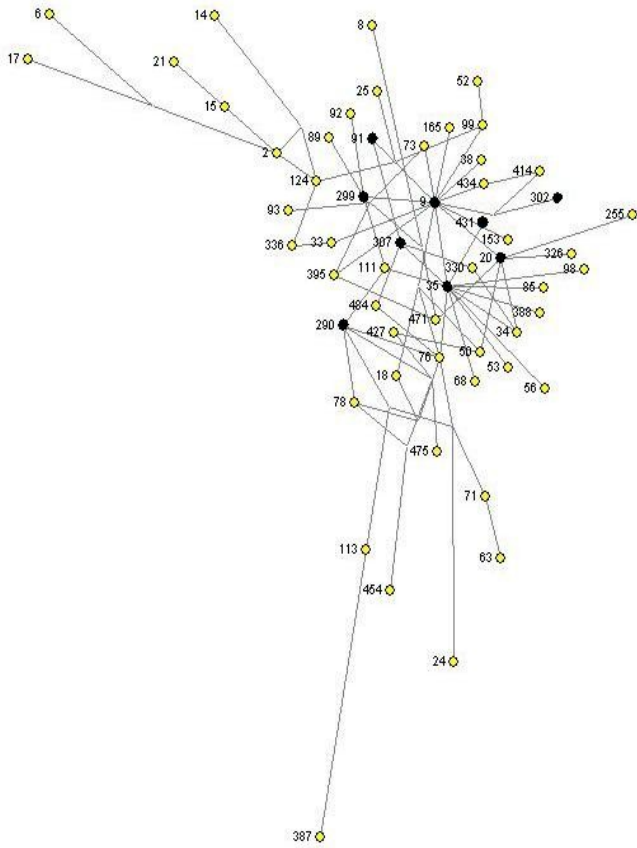
A diversidade nucleotídica (π) para as amostras do genótipo A foi de 0,013751 +/- 0,008199, para o genótipo D foi de 0,023860 +/- 0,013220 e para o genótipo F foi de 0,032323 +/- 0,019024. A diversidade nucleotídica tanto do genótipo A como do genótipo D, para cada localidade de coleta, também foi estimada (Tab. 12). O Teste de Mann-Whitney demonstrou que os valores encontrados para diversidade nucleotídica (π) nos diferentes genótipos encontrados são estatisticamente diferentes para $\alpha=0,05$. A diversidade intragenotípica (h) para o genótipo A foi de 0,8687 +/- 0,0175, para o genótipo D foi de 0,8678 +/- 0,0419 e para o genótipo F foi de 1,0000 +/- 0,0447. Da mesma forma a diversidade intragenotípica (h) para os genótipos A e D foi calculada para cada localidade separadamente (Tab. 14). Para a diversidade intragenotípica (h), ao ser aplicado o teste de Mann-Whitney, demonstrou-se que os valores encontrados para diferentes genótipos não são estatisticamente diferentes para $\alpha=0,05$.

Tabela 14. Diversidade nucleotídica (π) e diversidade intragenotípica (h) para as amostras do genótipo A e genótipo D em cada localidade de coleta.

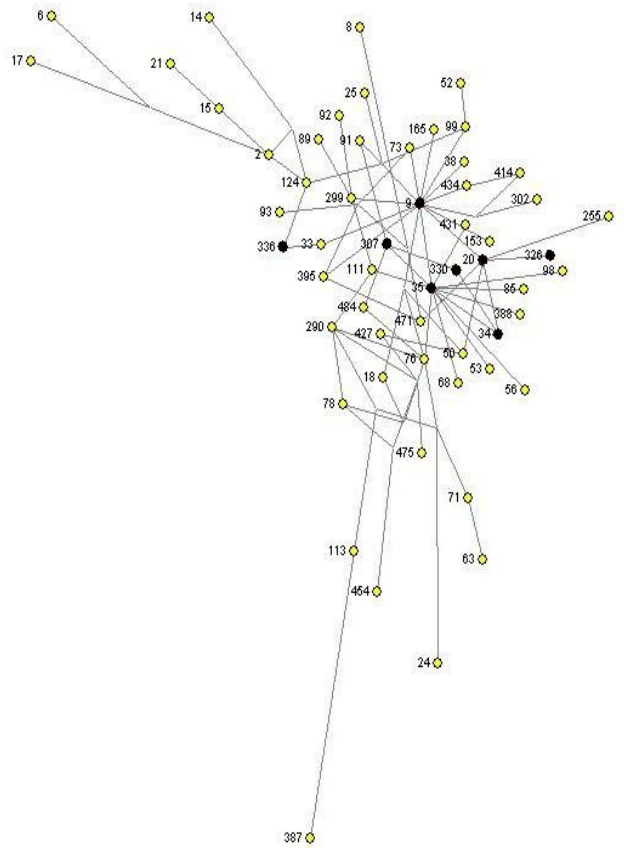
Localidade	Diversidade nucleotídica (π)	Diversidade intragenotípica (h)
Genótipo A		
Maceió	0,008760 +/- 0,006130	0,8476 +/- 0,0878
João Pessoa	0,008217 +/- 0,005602	0,7730 +/- 0,0451
Goiânia	0,007967 +/- 0,005461	0,7018 +/- 0,0685
Vitória	0,012767 +/- 0,008034	0,8498 +/- 0,0601
Rio de Janeiro	0,012075 +/- 0,007591	0,9140 +/- 0,0308
Araçatuba	0,018670 +/- 0,010804	0,8205 +/- 0,0510
Joinville	0,021272 +/- 0,013137	0,9556 +/- 0,0594
Genótipo D		
João Pessoa	0,053476 +/- 0,056086	1,0000 +/- 0,5000
Goiânia	0,010695 +/- 0,013099	1,0000 +/- 0,5000
Vitória	0,019157 +/- 0,011612	0,9341 +/- 0,0611
Rio de Janeiro	0,020053 +/- 0,012870	0,8929 +/- 0,1113
Araçatuba	0,024828 +/- 0,015504	0,6429 +/- 0,1841
Joinville	0,022137 +/- 0,012658	0,7749 +/- 0,0861

A análise de *median-joining* das amostras pertencentes ao genótipo A mostrou 12 vetores medianos e no máximo 4 mutações separando os haplótipos ou vetores medianos (Fig. 13). Os haplótipos do genótipo A mais frequentes (A1 representado pela amostra número 9, A4 representado pela amostra número 20, A2 representado pela amostra número 35 e A3 representado pela amostra número 307) foram encontrados no interior da rede sendo a variante A1 identificado como o mais ancestral. Nessa análise foi possível observar uma tendência de segregação espacial na rede, referente às amostras de uma mesma região de coleta. No genótipo D, a análise de *median-joining* mostrou 23 vetores medianos e no máximo 4 mutações separando os haplótipos ou vetores medianos (Fig. 14). Da mesma forma a variante D1 representado pela amostra número 54, a mais frequente para o genótipo D, também foi encontrada no interior da rede representando uma variante ancestral. Na análise de ambos os genótipos foi observada a formação de vários *loops*, mostrando várias possibilidades de conexão entre haplótipos. Na análise com amostras do genótipo F foi observado nove vetores medianos com no máximo 3 mutações separando os haplótipos ou vetores medianos. Na análise das amostras do genótipo F foi possível observar a formação de quatro alças, ou *loops* (Fig. 15).

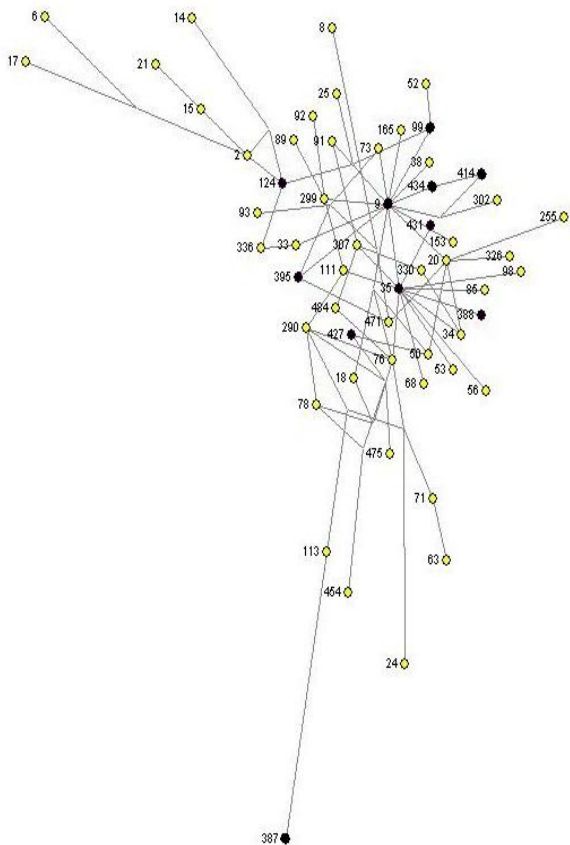
Maceió



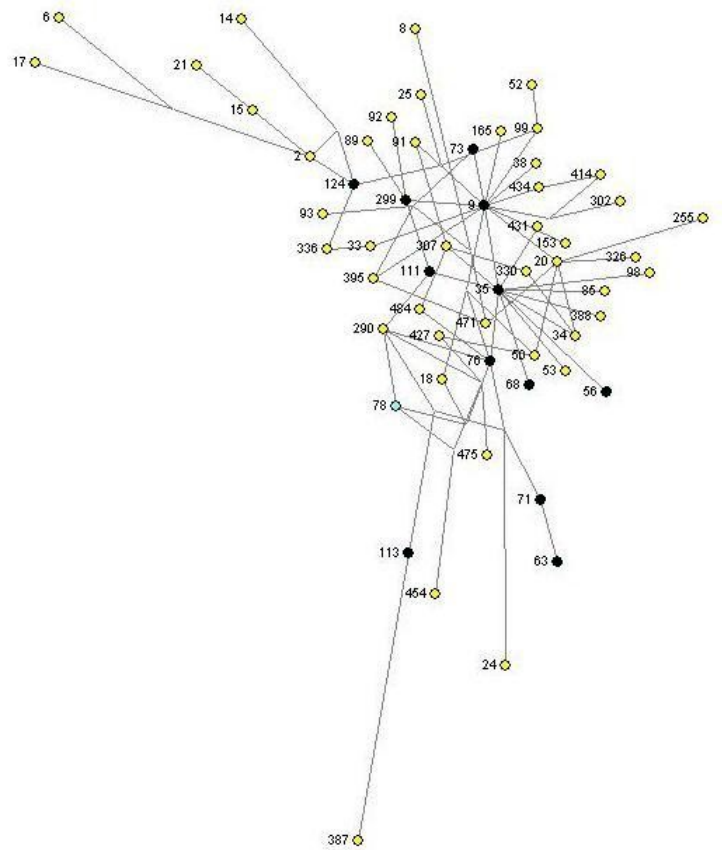
João Pessoa



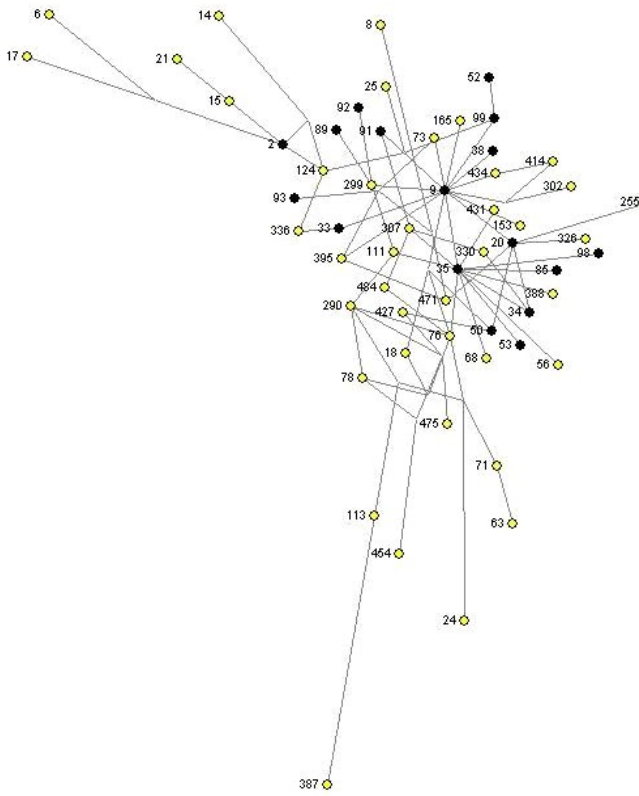
Goiânia



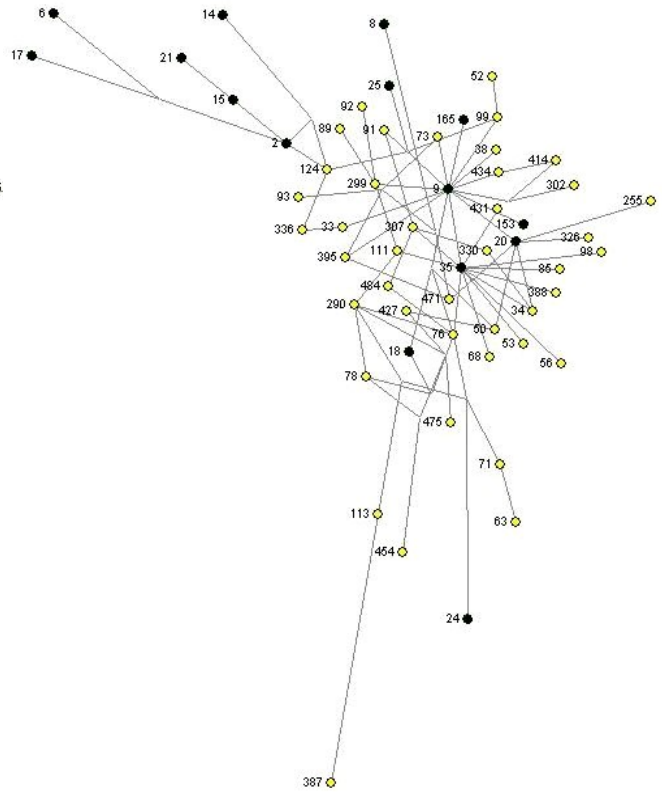
Vitória



Rio de Janeiro



São Paulo



Joinville

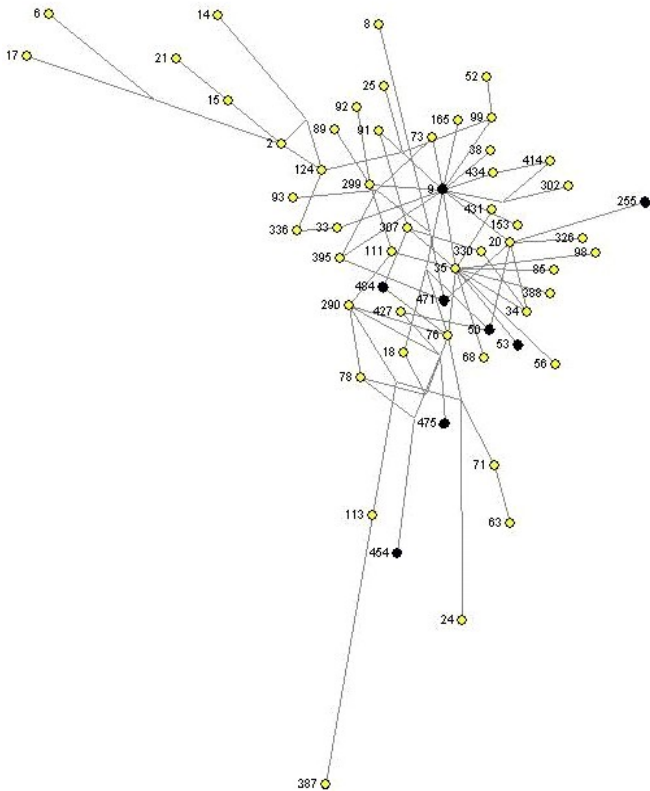
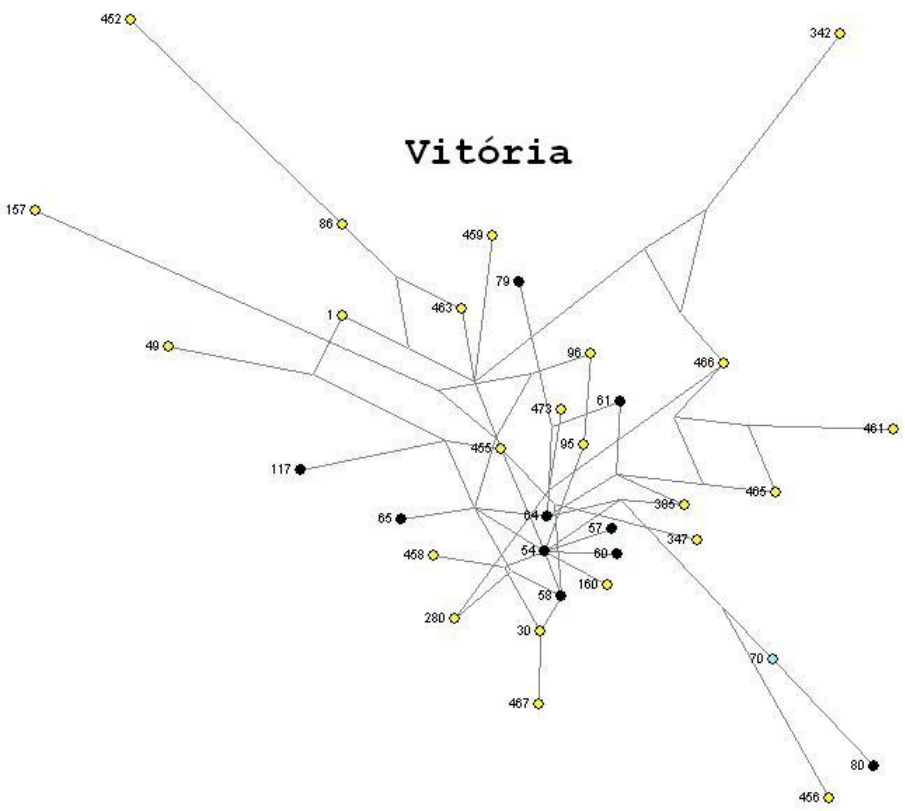
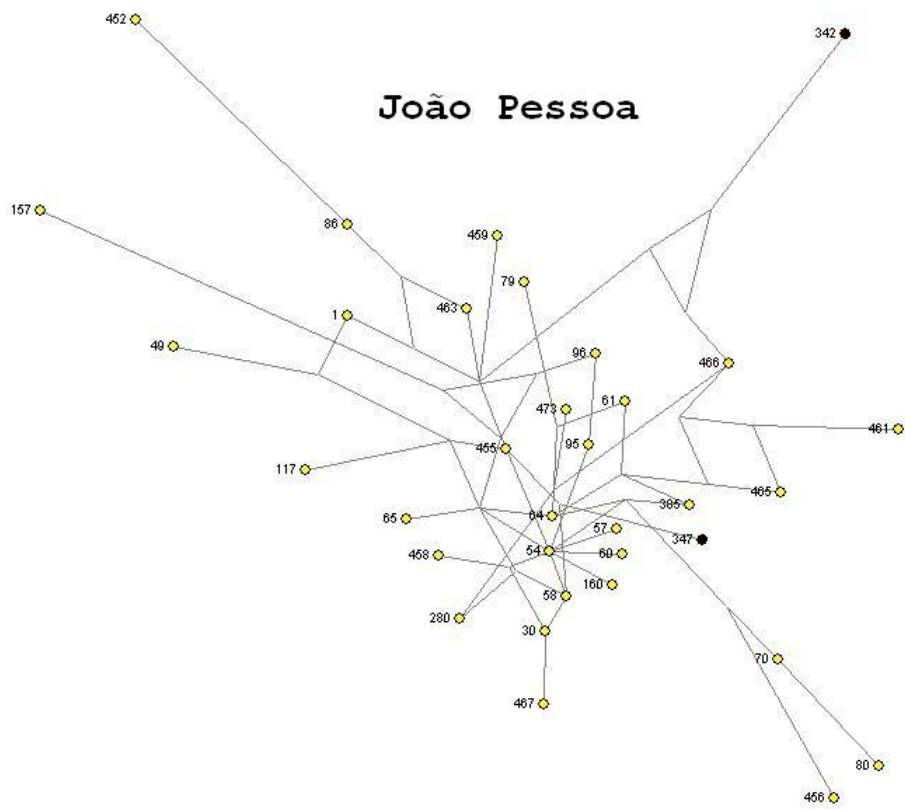
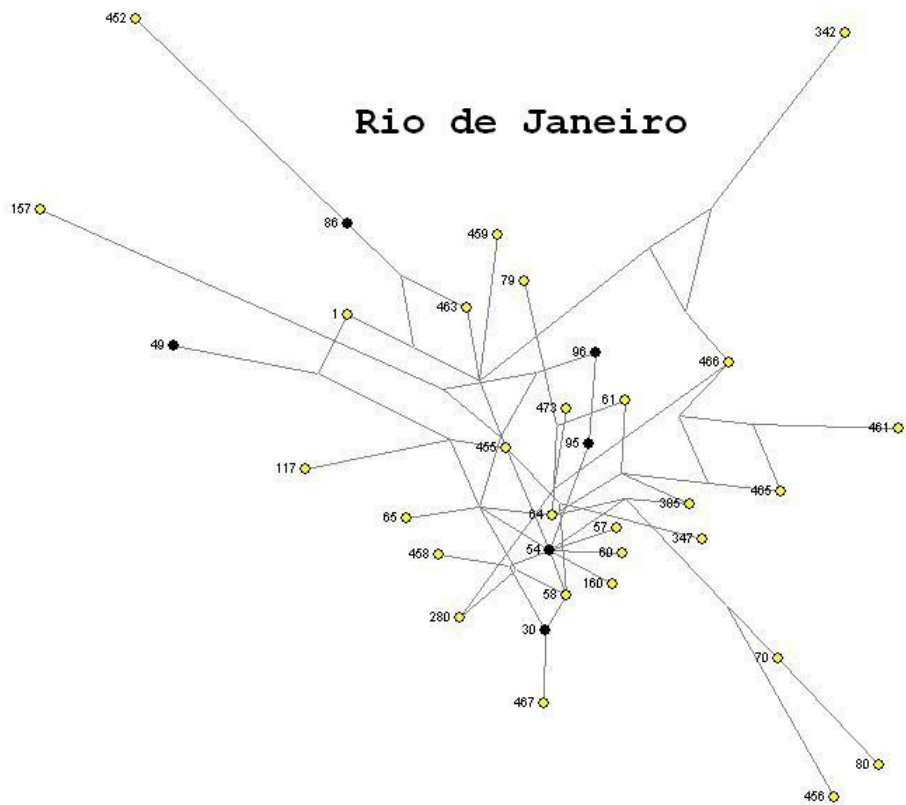
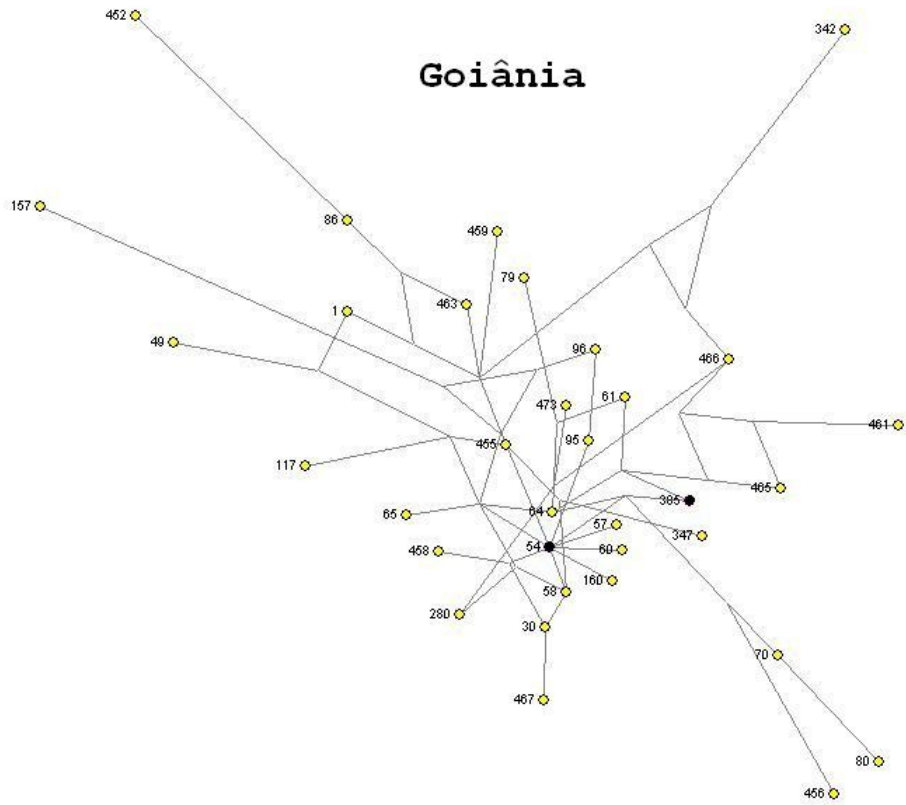


Figura 13. *Median-joining* com os haplótipos do genótipo A. Cada haplótipo é representado por um círculo, sendo que os círculos preenchidos (pontos pretos) correspondem aos haplótipos encontrado naquela localidade. Números próximos aos círculos representam as amostras. Para melhor visualização, já que alguns haplótipos são compartilhados, as árvores foram repetidas para cada localidade analisada.





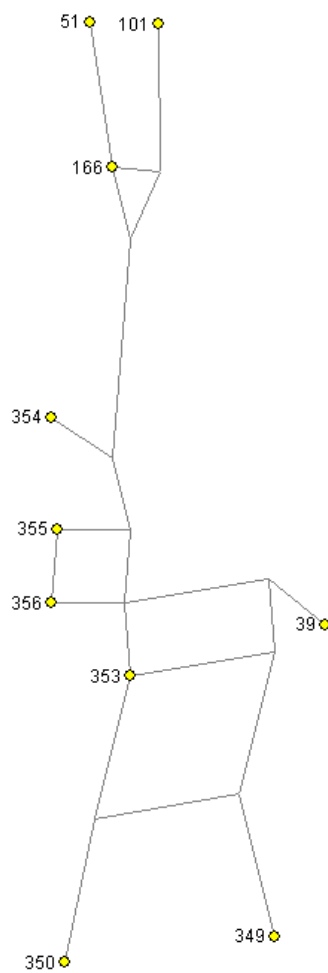


Figura 15. *Median-joining* com os haplótipos do genótipo F. Cada variante é representado por um círculo. Números próximos aos círculos representam as amostras.

Na análise hierárquica de AMOVA, o cálculo de Φ_{CT} não mostrou diferença significativa ($p=0,05$) entre regiões (Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul), tanto para as amostras do genótipo A quanto para as amostras do genótipo D (Tab. 13 e 14). O cálculo de Φ_{SC} mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre populações (João Pessoa, Maceió, Goiânia, Vitória, Rio de Janeiro, São Paulo, Joinville) de uma mesma região (Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul; Tab. 13 e 14), em ambos os genótipos. Finalmente, o Φ_{ST} mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) (Tab. 15 e 16).

Tabela 15. Análise de variância molecular (AMOVA) para as amostras do genótipo A usando o método de *pairwise difference* para o cálculo da matriz de distância.

Genótipo A				
Componente de Variância	Partição Observada		<i>p</i>	Estatística ϕ
	Variância	% total		
Entre regiões	-0,00116	-0,09	0,52600	$\phi_{CT} = -0,00088$
Entre as populações / regiões	0,18099	13,77	0,00000	$\phi_{SC} = 0,13757$
Dentro das populações	113456	86,32	0,00000	$\phi_{ST} = 0,13681$

Tabela 16. Análise de variância molecular (AMOVA) para as amostras do genótipo D usando o método de *pairwise difference* para o cálculo da matriz de distância.

Genótipo D				
Componente de Variância	Partição Observada		<i>p</i>	Estatística ϕ
	Variância	% total		
Entre regiões	-0,17766	-7,85	0,55274	$\phi_{CT} = -0,07853$
Entre as populações / regiões	0,39493	17,46	0,00819	$\phi_{SC} = 0,16186$
Dentro das populações	204501	90,40	0,00137	$\phi_{ST} = 0,09604$

A distribuição do número de diferenças nucleotídicas entre pares de haplótipos (*mismatch distribution*) mostrou uma curva unimodal para o genótipo A, enquanto que para o genótipo D foi observada uma curva multimodal. As curvas formadas com os dados simulados (assumindo o modelo de sítios infinitos) para ambos os genótipos, mostraram uma distribuição unimodal. Em ambos os genótipos as curvas traçadas com os dados observados e simulados enquadraram-se dentro dos percentis 5% e 95% (Fig. 16 e 17). O teste de aderência para o genótipo A gerou um valor $SSD = 0,00774895$ ($p > 0,1$) em concordância com o modelo hipotético de expansão repentina da população. Para o genótipo D, o modelo hipotético de expansão repentina também foi aceito pelo teste de aderência $SSD = 0,00730742$ ($p > 0,77$).

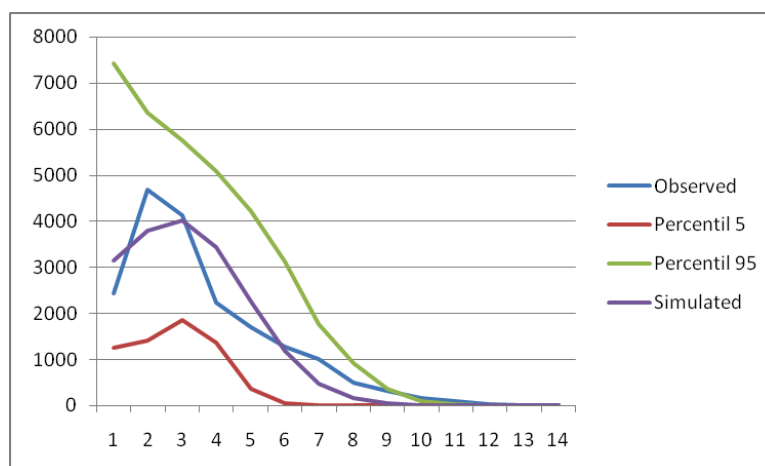


Figura 16. *Mismatch distribution* para o genótipo A com $\alpha = 0,05$. Intervalos de confiança estão representados pelas curvas de percentil 5 e 95. Observado = distribuição do número de diferenças entre pares de seqüências de DNA de HBV genótipo A; Simulado = dados simulados utilizando o modelo de sítios infinitos.

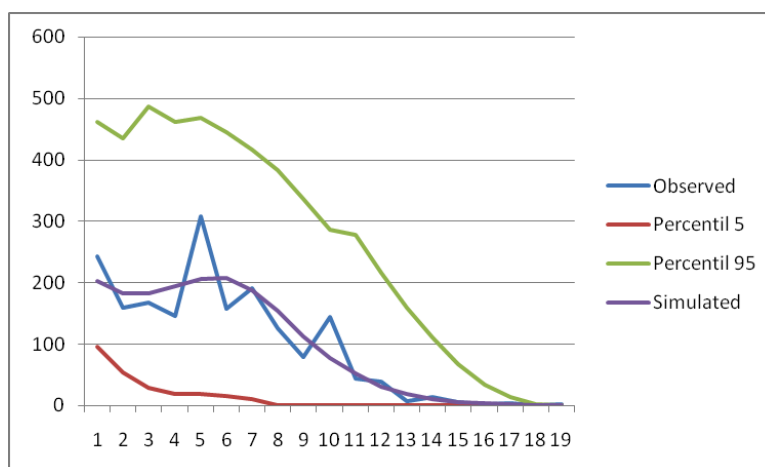


Figura 17. *Mismatch distribution* para o genótipo D com $\alpha = 0,05$. Intervalos de confiança estão representados pelas curvas de percentil 5 e 95. Observado = distribuição do número de diferenças entre pares de seqüências de DNA de HBV genótipo D; Simulado = dados simulados utilizando o modelo de sítios infinitos.

Na análise de máxima verossimilhança para as amostras do genótipo F pode-se observar que as amostras seqüenciadas no presente trabalho agrupam-se somente entre as

amostra dos subgenótipos FII, FIII e FIV, sendo que as amostras dos subgenótipos FI e FII formam um grupo monofilético, enquanto a relação entre as amostras do subgenótipo FIII não podem ser bem resolvidas (Fig. 18).

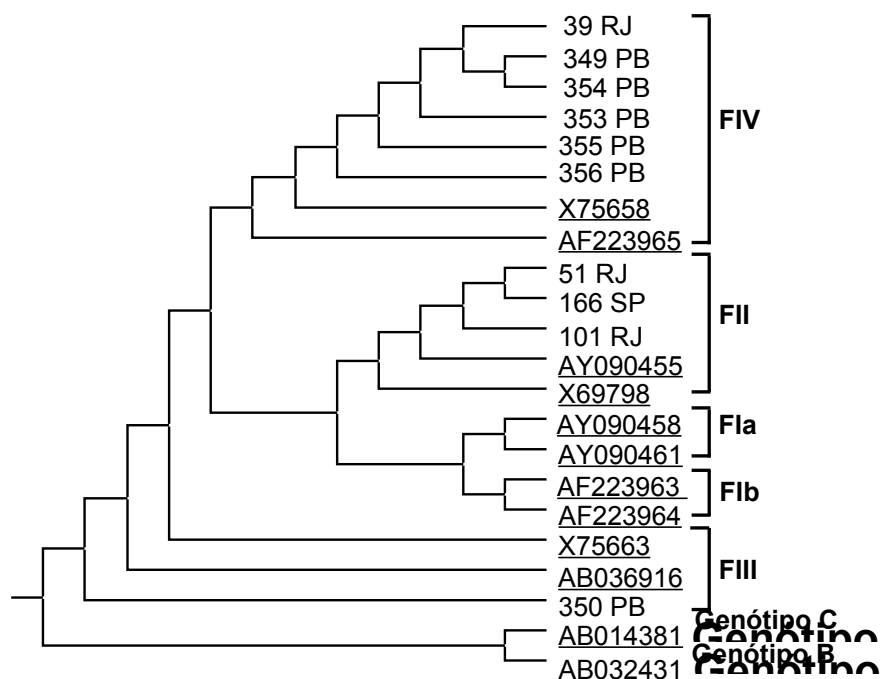


Figura 18. Topologia obtida na análise de máxima verossimilhança para as seqüências do genótipo F que codificam peptídeos diferentes. As seqüências referências, retiradas do GenBank, encontram-se sublinhadas.

IV.VII. Análise de recombinantes

Análise de seqüências recombinantes foi realizada para todos os haplótipos encontrados para cada genótipo (68 haplótipos pertencentes ao genótipo A, 37 haplótipos do genótipo D e 11 haplótipos do genótipo F). Na referida análise não foi possível caracterizar eventos de recombinação entre as seqüências encontradas no presente estudo, e as seqüências consenso dos diferentes genótipos de HBV.

DISCUSSÃO

V.I. Análise sorológica

Foi verificado que a prevalência de HBsAg e anti-HBc (marcadores para hepatite B) diminuiu significativamente em doadores de sangue do Serviço de Hematologia do Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, entre os anos de 1998 a 2005.

Nesse estudo a prevalência média de doadores de sangue HBsAg positivos (0,27%) no período de 1998 a 2005, foi menor do que a encontrada para Lábrea, no Amazonas (3,3% em 2000) (Braga e cols., 2005) e para o estado de Santa Catarina (0,7% em 1994-1995 e 0,98%, 0,84% e 0,64% em 1999-2001 respectivamente) (Treitinger e cols., 2000; Rosini e cols., 2003). Entretanto a comparação com outros países como Alemanha (0,16% em 1997-2002) (Offergeld e cols., 2005), Estados Unidos (0,07% em 2002) (Zou e cols. 2004), Itália (0,003% em 1994-1997) (Tosti e cols., 2002) e Canadá (0,012% em 2000) (Chiavetta e cols., 2003) demonstrou que a prevalência de HBsAg nessa população é maior que a encontrada em países desenvolvidos.

A prevalência média para o antígeno do core (HBc) nas amostras do Rio de Janeiro (3,68%) foi menor do que a encontrada no estado e Santa Catarina em 1999, 2000 e 2001 (8,83%, 7,09% e 5,35% respectivamente) (Rosini e cols., 2003). A prevalência de anti-HBc em nossa amostra para o ano de 1998 foi de 6,12%, índice bem abaixo do encontrado para Recife (12%) em 1997 (Arraes e cols., 2003), demonstrando que apesar da alta prevalência de anti-HBc no Brasil, a infecção por HBV não é endêmica na cidade do Rio de Janeiro. A prevalência encontrada para o anti-HBc no Rio e Janeiro em 1998 (6,12%) foi similar à encontrada na Colômbia (6,8%) e Panamá (6,7%), mas mais alta que em outros países da América Latina para o ano de 1997 como: Chile (1,5%), Costa Rica (3,8%), Equador (3,9%), El Salvador (3,8%), Honduras (3,5%), Nicarágua (3,1%), Paraguai (5,6%) e Uruguai (4,1%) (Schmunis e cols., 2001). A prevalência média de anti-HBc no Rio e Janeiro também foi maior do que a encontrada na Itália (0,03% em 1994-1997) (Tosti e cols., 2002).

A queda na prevalência desses marcadores na população estudada, deve-se principalmente a campanhas de vacinação contra o HBV e ao aumento na sensibilidade dos testes sorológicos devido ao advento da AIDS.

V.II. Distribuição dos diferentes genótipos do HBV no território brasileiro

A prevalência do genótipo A foi observada em 73% das amostras analisadas. Os poucos estudos brasileiros com amostras provenientes de mais de um estado sempre

apresentam o genótipo A como o genótipo prevalente (Mello, 2005; Rezende e cols., 2005; Silva Filho, 2005; Sitnik e cols., 2004). Em nossa amostra o genótipo A se mostrou prevalente na maioria das localidades analisadas (Maceió, João Pessoa, Goiânia, Vitória, Rio de Janeiro e São Paulo), exceto em Joinville, onde o genótipo D foi identificado na maior parte das amostras (67,5%). Outros estudos nos quais a presença dos diferentes genótipos do HBV foi avaliada em amostras da região sul, também apontaram para uma maior prevalência do genótipo D (Bertolini, 2002; Carrilho e cols., 2004; Mello, 2005). O genótipo F, apesar de ser o genótipo característico das populações americanas é o menos representado em nossa amostra (4%). A frequência do genótipo F na população está fortemente relacionada com o grau de miscigenação da população, de uma forma em geral, com os ameríndios (Devesa e Pujol, 2007). Outro fator que pode ter influenciado em nosso baixo grau de detecção de amostras pertencentes ao genótipo F deve-se ao fato de não ter sido coletada amostras de região norte do país, região essa onde o genótipo F do HBV possui maior prevalência.

A prevalência dos genótipos do HBV em diferentes regiões do país pode ser melhor entendida analisando o contexto histórico de colonização brasileira. A colonização do Brasil, iniciada na década de 30 do século XVI, teve como base econômica a produção – extrativista, agrícola ou mineral – sustentada no trabalho escravo e voltada para o comércio com Portugal (Levy, 1974). Nossas características étnicas são procedentes principalmente de 3 povos: ameríndio, africano e europeu.

Muitas sociedades indígenas que viviam no território dominado durante o processo de colonização, foram levadas à extinção, seja pela ação das armas, seja em decorrência do contágio por doenças, ou ainda, pela aplicação de políticas visando à "assimilação" dos índios à nova sociedade implantada. Os povos que habitavam a costa foram dizimados, dominados, ou refugiaram-se nas terras interioranas para evitar o contato (FUNAI). Esse comportamento acarretou pouca miscigenação entre os povos indígenas e o restante da população da época. Hoje, no Brasil, vivem cerca de 460 mil índios, distribuídos entre 225 sociedades indígenas, que perfazem cerca de 0,25% da população brasileira (FUNAI), evidenciando que mesmo que a miscigenação ocorra, ela é restrita a algumas regiões do país. Sendo assim, o genótipo F (típico da população ameríndia) apresenta baixa prevalência em todas as regiões analisadas.

A chegada de povos africanos no Brasil teve seu início na segunda metade do século 16, e desenvolveu-se no século 18 até ser proibida em 1850. Ao todo, entraram no Brasil aproximadamente 3 milhões de africanos que foram escravizados (Levy, 1974). A população africana se estabeleceu principalmente nas regiões agrárias da época, nos estados das regiões sudeste (lavoura do café) e nordeste (lavoura de cana de açúcar), onde o genótipo A do HBV, típico das populações africanas, pode ser observado mais frequentemente.

A vinda de imigrantes para o Brasil, ressalvada a presença de portugueses – colonizadores do país – delinea-se a partir da abertura dos portos as nações amigas (1808) e da independência do país (1822) (Oliveria e Abbeg, 2003). Após a proibição do tráfico negreiro, a imigração passou a fazer parte da política Imperial, pois o Sul do Brasil continuava despovoado e alvo da cobiça dos países vizinhos. O governo passou a incentivar a implantação de núcleo de colonos imigrantes provenientes de várias partes da Europa no sul do país. O governo passou a incentivar a implantação de núcleo de colonos imigrantes no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina (Herédia, 2001). A partir de então, imigrantes alemães, italianos e, em menor escala, eslavos passaram a ser atraídos para o Brasil. A imigração para o Rio Grande do Sul começou em 1824, com a chegada de imigrantes alemães, que fundaram cidades como São Leopoldo e Novo Hamburgo. A colonização no Sul do Brasil seguiu em ritmo acelerado no entrar da década de 1870, depois efetuada por imigrantes italianos. A maior parte dos colonos se dedicou à cultura de vinho e ao trabalho nas vinícolas e fundaram cidades como Caxias do Sul, Bento Gonçalves e Criciúma. A imigração para o sul do país teve seu auge na década de 1920, quando desembarcaram no Brasil 70 mil alemães que se concentraram, sobretudo, no Sul do Brasil (Herédia, 2001). Na região sul, colonizada basicamente por famílias européias existe uma maior prevalência do genótipo D do HBV, genótipo característico da população mediterrânea.

V.III. Os diferentes subtipos encontrados

Em nossa amostra foram identificadas amostras pertencentes aos subtipos adw (adw2 e adw4) e ayw (ayw 1, ayw2, e ayw3), sendo que no genótipo A foram identificadas amostras adw2 e ayw, no genótipo D amostras com subtipos adw2, ayw1, ayw2 e ayw3 e no genótipo F amostras com o subtipo adw4. Não existe relação restrita entre o genótipo e o subtipo viral, entretanto alguns subtipos são especificamente/preferivelmente identificados em amostras de genótipos específicos, sendo que no genótipo A pode ser identificados os subtipos adw2 e ayw1, no genótipo D, os subtipos ayw1, 2, 3 e no genótipo F o subtipo adw4 (Schaefer, 2005). Em nossa amostra foi possível identificar, nos genótipos D e F, o subtipo adw2, entretanto, a identificação de um subtipo viral não característico daqueles genótipos de nenhuma forma invalida a análise, já que a determinação do subtipo viral é realizada basicamente com a identificação de substituições específicas dentro do determinante “a” da proteína de superfície viral, enquanto determinação do genótipo viral é realizada com base na seqüência completa do genoma do HBV ou em parte dela.

V.IV. Variabilidade intragenotípica

Em nossa análise foi identificada uma grande variedade de intragenotípica nas amostras de HBV, sendo que a maior parte das variantes foram representados por somente uma amostra. O gene S do HBV apresentou alta variabilidade molecular, com 54 sítios variáveis, aproximadamente 28% da região analisada. Foi observado maior número de variantes no genótipo A, sendo que o teste de qui-quadrado demonstrou que as frequências de variantes observadas nos diferentes genótipos, diferem das frequências que seriam esperadas caso a distribuição fosse uniforme ($p < 0,001$).

O grande número de mutações, encontradas por todo o genoma do HBV e conseqüentemente o grande número de variantes intragenotípicas encontradas, ocorre, principalmente, por causa de características do genoma viral e seu método de replicação. A polimerase encontrada no HBV não possui alta fidelidade e, portanto, a taxa de erros durante a cópia do material genético viral é maior do que a taxa presente em outros vírus de DNA, se aproximando mais das taxas estimadas para retrovírus e outros vírus de RNA (Simmonds, 2001). Outra peculiaridade do HBV é o fato de sua replicação contar com um passo de transcrição reversa (Summers e Mason, 1982), fato este que se combinado com a presença de uma DNA polimerase que não possui alta fidelidade, pode ser responsável pela alta variabilidade encontrada nas seqüências da região S.

V.V. Variações na região S

A região traduzida do gene S analisada neste estudo é parte integrante do determinante "a", responsável pela formação dos loops externos da proteína S (Jaoude e Sureau, 2005). Substituições de aminoácidos no determinante "a" podem conduzir a alterações conformacionais que afetam a ligação de anticorpos neutralizantes com várias possíveis conseqüências, tais como a não detecção do HBsAg por kits comerciais, resistência ao tratamento anti-viral e seleção de clones mutantes. Jaoude e Sureau (2005) sugerem que esta região é um elemento importante para determinar a infecciosidade viral, já que HBV mutantes podem escapar da resposta imunológica induzida pela vacinação ou passivamente transferida, levando ao desenvolvimento de uma verdadeira infecção oculta na presença de altos títulos de anticorpos anti-HBs. As mutações mais freqüentes no gene S são as substituições G145R e D144A, mas muitas outras substituições já foram descritas no determinante "a" e fora dele, e na região pré-S (Weber, 2005).

Em nosso estudo foram observadas 62 substituições de aminoácidos no gene S. Desconsiderando as substituições de aminoácido que são subtipo determinante ou variações genótípicas corriqueiras, ocorreram 16 substituições dentro do determinante "a", e 12 fora. Dentro do determinante "a", ocorreram 9 substituições no primeiro loop (aa 127-137), e apenas 3 no segundo loop (139-147). Estes resultados coincidem com os resultados encontrados pelo Ogura e cols. (1999) mostrando que substituições de aminoácidos no determinante "a" ocorrem preferencialmente primeiro loop do referido determinante.

Seis substituições, encontradas na sequência da proteína S, estão relacionados com a determinação dos subtipos virais (K122R, P127L / T, F134Y, A159G / V), e oito, relacionadas com variações normais encontrada nos diferentes genótipos (T114S, N131P/T, S/P143T, G/L/F158Y/A/V, Y/L/K161F).

A substituição não descrita I110L foi encontrada em 6 amostras no presente estudo. Tong e cols. (2005), descreveram a substituição I110M como responsável pelo bloqueio da secreção de partículas virais pelas células hospedeiras. Khan e cols. (2004) também observaram uma diminuição da secreção de HBsAg como consequência da mesma mutação. Embora a substituição I110L seja diferente da substituição descrita, o aminoácido 110 da proteína S parece ser um sítio importante relacionado à capacidade de secreção de partículas virais e a substituição I110L provavelmente também é capaz de influenciar a capacidade secreção de partículas virais.

No presente estudo a substituição C138S foi observada em quatro amostras. Considerando que o domínio S contém 8 resíduos de cisteína (Cys) responsáveis pela formação de pontes dissulfídicas inter-e intramolecular (Mangold e Streeck, 1993), resultando em complexos multi-protéicos alto peso molecular, acreditamos que a alteração da cisteína da posição 138 afeta a formação de pontes dissulfídicas influenciando a conformação da proteína resultante. A avaliação da mutação C138A por Mangold e Streeck (1993) demonstrou déficit na secreção do vírion.

Semelhante às mutações aqui encontradas (S155T e P127I), várias alterações, incluindo S155P e P127I já foram identificados em pacientes com hepatite B crônica (Lada e cols., 2006). Embora o autor não comente os efeitos dessas variações, o fato dessas substituições terem sido descritas anteriormente sugerem que esses sítios sejam polimórficos, ou tenham uma elevada taxa de substituição.

Algumas substituições para mutantes de escape vacinal já foram descritas na literatura foram encontradas em amostras por nós estudadas (T118V, P120T, A128V, Q129R, e G130R/N). A substituição T118V também foi observada e parece que o aminoácido 118 é importante para o reconhecimento do HBsAg, já que a substituição T118A é descrita para um

mutante de escape vacinal. A substituição P120T, a mais comumente encontrada fora do determinante 'a' e que também induz escape vacinal (Oon, e cols., 1999), foi identificada em 3 amostras. O aminoácido 129, relacionado na literatura como um aminoácido com alta taxa de Mutação (substituição Q129H, Lada e cols., 2006), foi encontrado substituído em uma amostra. Nessa amostra a glutamina (Q) da posição 129 foi substituída por uma arginina (R), mutação também descritas na literatura, apesar de terem sido encontrados em menor frequência, para mutantes de escape vacinal. As mutações G130N e G130R, também foram observadas. A mutação G130N gera um potencial para o site N-glicosilação Asn-Thr-Ser, correspondente ao aminoácidos 130-132, e pode resultar em mutante de escape vacinal (Kohno e cols. 1996), especulando-se que a ligação de um motivo de carboidrato a Asn-130 afetaria expressão do determinante "a". Embora não seja claro em que extensão a glicosilação ocorre, a associação de um grupo carboidrato com a proteína de superfície pequena pode ou não afetar a expressão do determinante "a" em partículas HBsAg já que o conjunto de proteínas que reunidas para formar as partículas de HBsAg não são totalmente Glicosilada (Peterson, 1981).

Essa análise revelou a presença de mutações que alteram sítios de N-glicosilação, bloqueiam a secreção de partículas virais nos hepatócitos, alteram a conformação final de HBsAg e induz escape vacinal. A detecção de vírus que apresentam mutações nos sítios reconhecidos na literatura como escape vacinal em 1,09% dos doadores de sangue investigados é preocupante e requer uma atenção especial pelas autoridades de saúde. Mutantes de escape representam risco para a população, porque as vacinas utilizadas atualmente contra hepatite B não são eficazes na prevenção da infecção. Esses mutantes são perdidas na rotina de triagem para HBsAg em bancos de sangue e podem transmitir a infecção pelo HBV aos destinatários do sangue doado (Yamamoto e cols., 1994). Além disso, a presença de mutantes de escape vacinal em doadores de sangue população é especialmente preocupante porque testes diagnósticos para HBsAg podem não ser eficientes no reconhecimento infecção HBV, expondo a um eventual risco de contaminação de parte da população que já estão imunes debilitados como pacientes que necessita transfusão sanguínea.

V.VI. Variações na polimerase

Enquanto mutações no HBsAg possuem implicações clínicas relevantes diretamente relacionadas com vacinação, ou diagnóstico, outras mutações, que podem ser encontradas em praticamente todo o genoma viral possuem características clínicas distintas.

Mutações no gene da polimerase viral ocorrem principalmente após o tratamento prolongado com análogos de nucleosídeos acarretando tanto resistência ao tratamento anti-viral como afetando a eficiência da replicação do vírus (Chen e Chong 1999).

A resistência antiviral é detectada pelo aumento na presença de DNA viral no soro durante o tratamento. O nível de DNA viral, inicialmente, tende a ser baixo, pois mutantes resistentes as drogas antivirais possuem a replicação deficiente se comparado aos vírus selvagem, entretanto mutações de compensação podem restaurar a capacidade de replicação viral, levando a um aumento do DNA viral no soro (Lok, 2007).

A região da polimerase analisada no presente estudo faz parte do domínio catalítico, incluindo parte do domínio B. Algumas mutações nessa região já foram descritas como conferindo resistência ao tratamento antiviral (rtI169T, rtV173L), ou como afetando a capacidade de replicação viral (rtT128N, rtW153Q) (Ghany e Liang, 2007; Sheldon e cols., 2006).

Na análise da seqüência de ácidos nucléicos traduzidos na leitura da polimerase foi possível observar várias substituições de aminoácidos, entretanto somente uma das substituições (rtT128N) encontradas já foi descrita na literatura. Tal mutação foi observada por Torresi (2002) em pacientes com hepatite B severa submetidos à terapia com lamivudina e HBIg. A referida mutação não caracteriza um mutante resistente ao tratamento anti-viral, entretanto, contribui para restaurar a capacidade de replicação de mutantes resistentes a lamivudina (Torresi e cols., 2002).

A resistência a qualquer agente anti-viral é inevitável levando-se em consideração a taxa de replicação do HBV e sua polimerase sem alta fidelidade, o que possibilita uma rápida adaptação a pressões seletivas. A caracterização de mutações circulantes na população é essencial, já que é necessário o utilizar o conhecimento corrente sobre mutações e cinética viral para o desenvolvimento de novos agentes com maior potencial anti-viral e que desenvolvam menor grau de resistência. A presença da mutação rtT128N em três doadores de sangue indica que mutações típicas do HBV em indivíduos já tratados com drogas anti-virais circulam na população não tratada e nem mesmo diagnosticada como infectada pelo vírus.

V.VII. Análise genética das cepas de HBV circulantes no Brasil

A diversidade nucleotídica (π) encontrada para a totalidade das amostras pertencentes aos genótipos A, D e F são estatisticamente diferentes ($\alpha=0,05$). Para o genótipo A podemos observar que a diversidade nucleotídica é muito pequena na região nordeste e centro-oeste e

vai aumentando à medida que analisamos o sul do país. Já para o genótipo D, o sul e algumas localidades do sudeste apresentam diversidade intermediária, enquanto Goiânia e Vitória apresentam menor diversidade nucleotídica e João Pessoa a maior. Analisando-se a diversidade intragenotípica (h), verifica-se que um equilíbrio entre os genótipos, não sendo estatisticamente diferentes ($\alpha=0,05$). Esse equilíbrio se mantém mesmo analisando cada local de coleta separadamente.

Com base na análise de *median joining* não é possível inferir diferentes populações, entretanto existe certa tendência, de algumas populações de HBV do genótipo A, de ocuparem regiões específicas dentro da rede, como é possível observar, por exemplo, para as amostras provenientes de Araçatuba. Nessa análise, verificou-se também que as variantes que apresentaram maior frequência (A1 representado pela amostra número 9, A4 representado pela amostra número 20, A2 representado pela amostra número 35, A3 representado pela amostra número 307 e D1 representado pela amostra 54) foram encontradas no interior da rede. Esse fato possibilita a inferência de variantes ancestrais tanto para o genótipo A (A1, amostra 9) quanto para o genótipo D (D1 representado pela amostra 54). De acordo com Crandall e Templeton (1993), variantes ancestrais, ou seja, aqueles com maior frequência possuem maior probabilidade de produzir derivados através de mutações, passando assim a ocupar uma posição interior na rede em relação às variantes mais derivadas (aquelas de menor frequência). Ainda na análise de MJ foi possível observar vários vetores medianos e mutações separando as diferentes variantes. Os vetores medianos podem ser interpretados tanto como seqüências não amostradas, como seqüências ancestrais, já extintas (Bandelt e cols., 1999). Este fato confirma a grande variabilidade genética do HBV e evidencia a necessidade de mais estudos com amostragens maiores para um maior esclarecimento das relações filogenéticas das amostras de diferentes regiões.

Na análise de AMOVA, o Φ_{CT} demonstrou que estatisticamente não há correlação de haplótipos aleatórios dentro de cada região (Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul), em relação aos pares aleatórios de haplótipos extraídos da totalidade das amostras analisadas, enquanto que Φ_{SC} mostra que estatisticamente existe correlação da diversidade molecular de haplótipos aleatórios dentro das populações (João Pessoa, Maceió, Goiânia, Vitória, Rio de Janeiro, São Paulo, Joinville), em relação aos pares aleatórios de haplótipos extraídos de uma mesma região (Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul) e Φ_{ST} mostra que existe correlação significativa de haplótipos aleatórios dentro de cada população (João Pessoa, Maceió, Goiânia, Vitória, Rio de Janeiro, São Paulo, Joinville), em relação aos pares aleatórios de haplótipos extraídos de todas as amostras tanto para o genótipo A quanto para o genótipo D.

Entretanto esta análise conclui que não houve uma estruturação geográfica entre as diferentes regiões estudadas (Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul), uma vez que a estimativa de Φ_{CT} não foi significativa ($p > 0,05$; Tab. 14 e 15). Este resultado demonstrou que não há diferença significativa entre as amostras do vírus da hepatite B coletada em diferentes regiões brasileiras, sugerindo que essas populações não se encontram isoladas, ou seja, possuem contato e o HBV circula entre elas. Os resultados encontrados para Φ_{SC} (0,13757 para o genótipo A e 0,13757 para o genótipo D) e para Φ_{ST} (0,13681 para o genótipo A e 0,09604 para o genótipo D) sugerem que a maior variação se dá a nível populacional.

Quando analisamos o resultado da análise de MJ juntamente com os dados de diversidade nucleotídica (π) e diversidade intragenotípica (h) podemos notar que existem variações entre as diversas populações mas que essas não são específicas de cada população, ou seja não existe traço genético claro que possibilite inferir a origem de certa amostra. A AMOVA corrobora essas análises anteriores demonstrando o alto grau de variação genética se dá a nível populacional, não sendo significativa ao ser analisado todo o conjunto de populações amostradas.

Na análise de *mismacth distribution* para ambos os genótipos A e D o teste de aderência foi aceito, indicando um evento passado de expansão populacional. Essa expansão provavelmente ocorreu junto com o aumento populacional. A curva unimodal, observada para as amostras do genótipo A, sugere um maior número de migrantes portadores desse genótipo do HBV do que portadores do genótipo D (Ray e cols., 2003). Esses dados também sugerem uma expansão demográfica mais recente para as amostras do genótipo D, representada por uma distribuição multimodal (Ray e cols., 2003). Essa expansão mais recente pode ser interpretada como uma colonização mais tardia da região sul do país, onde o genótipo D é o mais freqüente. Vale ressaltar, que nessas análises populacionais ainda não é possível constatar uma retração populacional que seria de se esperar para uma população, no caso o HBV, que é combatida com vacinação em massa. Isso se deve principalmente pelo fato que somente em meados da década de 80 a vacinação contra o HBV entrou para o calendário oficial de vacinação infantil não havendo ainda tempo hábil para se detectar essas mudanças no grupo estudado.

A análise de máxima verossimilhança revelou a presença na população brasileira de 3 subgenótipos (FII, FIII e FIV) dos 5 já descritos para o genótipo F. O subgenótipo FI (a e b), é encontrado principalmente na América do Norte e Central e também no costa oeste da América do Sul voltada para o oceano pacífico, enquanto os subgenótipos FII, FIII e FIV são encontrados nas regiões norte e leste da América do Sul. Os subgenótipos FI, FII e FIV co-

circulam na Argentina (Campos e cols., 2005, Devesa e Pujol, 2007). A diferente distribuição dos subgenótipos presentes no genótipo F pode refletir os diferentes padrões de migração do homem no continente Americano (Arauz-Ruiz e cols., 1997; Kidd-Ljunggren e cols., 2002). Arauz-Ruiz e colaboradores em 2002 propuseram que o HBV entrou nas Américas vindo da Ásia junto com os primeiros navegadores através do Estreito de Bering e migrou até o sul. Os ancestrais ameríndios entraram no Novo Mundo há aproximadamente 20.000 a 15.000 anos atrás, sendo que a migração para o sul foi realizada ao longo da costa já que a era glacial tornava as rotas pelo interior inacessíveis (Campos e cols., 2005). Outra onda migratória ocorreu a cerca de 12.500 anos atrás, provavelmente por uma rota interior (Schurr, 2004). Evidências de DNA mitocondrial (mtDNA) sugerem o isolamento de certas populações ameríndias logo após a dispersão dos primeiros colonizadores (Bortolini e cols., 2003) e alguns pesquisadores sugerem que esse isolamento pode ser observado analisando o genótipo F do HBV e seus agrupamentos (Campos e cols., 2005). Nossos resultados corroboram a hipótese de Campos e colaboradores (2005) que sugerem que a distribuição do genótipo F está relacionada com a possível entrada do homem na América do Sul tanto pelo oeste, fato este representado pela presença do subgenótipo FIb nessa região do continente, quanto pelo leste, justamente pela presença dos subgenótipos FII, FIII e FIV, genótipos encontrados em nossa amostra.

V.VIII. Análise de recombinantes

No presente estudo não foi possível observar recombinação na porção do gene S do HBV analisada. Tal fato pode ser decorrente de algumas características específicas da região analisada, como variabilidade, localização, ou tamanho do fragmento amplificado.

A parte do gene S responsável por codificar a proteína S pequena e o antígeno de superfície HBsAg, região analisada no presente estudo, apesar de ser a região do genoma viral mais conservada (Norder e cols., 1994), apresentou aproximadamente 28% de nucleotídeos substituídos como verificado em nossa análise intragenotípica. Essa variabilidade pode ter influenciado na sensibilidade do método de análise de recombinantes utilizado, fazendo com que uma possível recombinação fosse interpretada como uma variabilidade intrínseca da porção do genoma analisada.

Estudo de Simmonds & Midgley (2005) demonstram que as recombinações no genoma viral não ocorrem de maneira randômica, sendo uma das regiões aparentemente favoráveis para eventos recombinatórios está localizada entre os nucleotídeos 650 a 900, ou

na fronteira dos genes como na porção final do gene S, na região de transição pré-core/core e na junção pré-S1/pré-S2, fora portanto do fragmento analisado no presente estudo, nucleotídeos 375 a 676 localizado na região mediana do gene S, que codifica o HBsAg.

Outro fator que poder ter influenciado na análise de recombinantes foi o tamanho do fragmento, que representa aproximadamente 10% do genoma viral. A possibilidade de eventos recombinatórios ter ocorrido em amostras por nós analisadas, mas em outra parte do genoma e, portanto não identificada em nossa análise, não pode ser descartada. Tal fragmento também pode não ser suficientemente amplo para a identificação de recombinação envolvendo grandes fragmentos.

CONCLUSÃO

A prevalência de marcadores para hepatite B (HBsAg e anti-HBc) apresenta diminuição significativa na população analisada, entretanto é maior do que a encontrada em países desenvolvidos.

Ocorre a prevalência de três genótipos do HBV em território brasileiro, sendo o genótipo A o mais amplamente detectado, seguido pelo genótipo D e F. Entretanto, o Sul do país possui uma composição característica em relação à frequência dos genótipos do HBV que difere do resto do país. O genótipo F apesar de ser característico da população nativa da América do Sul, mostrou se pouco representado em nossa amostra evidenciando baixo grau de miscigenação da população das áreas urbanas com a população indígena.

Existem pelo menos 5 subtipos de HBV circulantes na população brasileira, sendo que o subtipo adw2 também foi encontrado em amostras do genótipo D. Entretanto este fato não invalida nossa análise já que a determinação dos diferentes subtipos virais é feita baseado na troca de aminoácidos específicos do determinante “a” e a análise genotípica é realizada com base em seqüenciais mais extensas do genoma viral.

Estão presentes na população analisada mutações que alteram sítios de N-glicosilação e também mutações responsáveis por bloquear a secreção de partículas virais nos hepatócitos. Além disso, a detecção de vírus que possuem mutações em sítios reconhecidos na literatura como de escape vacinal em 1,09% dos doadores de sangue analisados, que são portadores assintomáticos, é preocupante pois expõe ao risco de infecção uma parcela da população que hoje é considerada como imunizada. Esses fatos são importantes porque demonstram que essas mutações circulam em pessoas ainda não tratadas (doadores de sangue), que não sabem que são portadoras e que podem disseminar o vírus.

Existe maior variação entre as amostras de HBV a nível populacional, não sendo possível inferir a origem geográfica a partir de análise da seqüência de DNA de uma amostra. Ocorre um evento recente de expansão populacional para a população de HBV estudada, não sendo possível verificar a nível populacional a eficácia da vacinação, colocada recentemente no calendário oficial de vacinação infantil.

Nas amostras do genótipo F estudadas foi possível observar a ocorrência dos subgenótipos FII, FIII e FIV corroborando a hipótese de entrada do homem na América do Sul vindo da América Central e migrando para o sul por rotas ao longo da costa.

REFERÊNCIAS

- Aguilera Guirao A, Romero Yuste S, Regueiro BJ. Epidemiology and clinical manifestations of viral hepatitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24(4):264-276.
- Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J Hepatol* 2003; 38(3): 315-321.
- Alestig E, Hannoun C, Horal P, Lindh M. Hepatitis B virus genotypes in Mongols and Australian Aborigines. *Arch Virol* 2001; 146(12): 2321–2329.
- Almeida Neto C, Strauss E, Sabino EC, Sucupira MC, Chamone DA. Significance of isolated hepatitis B core antibody in blood donors from São Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001; 43(4):203-208.
- Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Gen* 2000; 67: 444-461.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Visonfi KA, Magnus LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *J Infect Dis* 1997; 176: 851-858.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83(8): 2059-2073.
- Arraes LC, Ximenes R, Andrieu J-M, Lu W, Barreto S, Pereira LMMB, Castelo A. The biological meaning of anti-HBc positive results in blood donor: relation to HBV-DNA and to other serological markers. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; 45:137-140.
- Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* 1972; 109(4): 842–848.
- Bandelt H-J, Foster P, Röhl A. median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 1999; 16(1): 37-48.
- Bang G, Kim KH, Guarnieri M, Zoulim F, Kawai S, Li J, Wands J, Tong S. Effect of mutating the two cysteines required for HBe antigenicity on hepatitis B virus DNA replication and virion secretion. *Virol* 2005; 332(1): 216-224.
- Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004; 14(1): 3-16.
- Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest* 1996; 98(10): 2268-2276.
- Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 48-64.
- Bertolini DA. Estudo da prevalência do vírus da hepatite B e dos seus genótipos no estado do Paraná, Brasil. São Paulo; 2002. Doutorado - Universidade Federal de São Paulo.

Biswas R, Tabor E, Hsia CC, Wright DJ, Laycock ME, Fiebig EW, Peddada L, Smith R, Schreiber GB, Epstein JS, Nemo GJ, Busch MP. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 2003; 343: 788–798.

Bollyky PL, Rambaut A, Harvey PH, Holmes EC. Recombination between sequences of hepatitis B virus from different genotypes. *J Mol Evol* 1996; 42(2): 97–102.

Bollyky PL, Rambaut A, Grassly N, Carman WF, Holmes EC. Hepatitis B virus has a New World evolutionary origin. *Hepatology* 1997; 26: 765.

Bollyky PL, Holmes EC. Reconstructing the complex evolutionary history of hepatitis B virus. *J Mol Evol* 1999; 49: 130-141.

Bortolini MC, Salzano FM, Thomas MG, Stuart S, Nasanen SP, Bau CH, Hutz MH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Hill K, Hurtado AM, Castro-de-Guerra D, Torres MM, Groot H, Michalski R, Nymadawa P, Bedoya G, Bradman N, Labuda D, Ruiz-Linares A. Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 524-529.

Bottecchia M, Souto FJ, O KM, Amendola M, Brandão CE, Niel C, Gomes SA. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. *BMC Microbiol* 2008; 22;8:11.

Bowyer SM, Sim JG. Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprints of recombination in certain isolates. *J Gen Virol* 2000; 81(2): 379–392.

Braga WSM, Silva EM, Souza RAB, Tosta CE. Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B e pelo plasmódio em Lábrea, Amazonas: estimativa da ocorrência de prováveis coinfeções. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 218-223.

Campos RH, Mbayed VA, Pineiro y Leone FG. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. *J Chem Virol* 2005; 34 Suppl 2: S8 S13.

Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2(8663):588-591.

Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1997;4 Suppl 1: 11-20.

Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JR, Mello IM, Bertolini DA, Lemos MF, Moreira RC, Bassit LC, Cardoso RA, Ribeiro-dos-Santos G, Da Silva LC. Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health* 2004; 4: 13.

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ. The phylogeography of Brazilian Y chromosome lineages. *Am J Hum Gen* 2001; 678: 281-286.

CDCP. Centers for disease control and prevention. Global progress toward universal childhood hepatitis B vaccination. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; 52: 868-70.

- Chau K, Hargie MP, Decker RH, Mushahwar IK, Overby LR. Serodiagnosis of recent hepatitis B virus infection by IgM class anti- HBc. *Hepatology* 1983; 3: 142–149.
- Chen WN, Chong JO. Human hepatitis B virus mutants: significance of molecular changes. *FEBS Letters* 1999; 453:237-242.
- Chen BF, Kao JH, Liu CJ, Chen DS, Chen PJ. Genotypic dominance and novel recombinations in HBV genotype B and C coinfecting intravenous drug users. *J Med Virol* 2004; 73: 13-22.
- Chiavetta JA, Escobar M, Newman A, He Y, Driezen P, Deeks S, Hone DE, O'Brien SF, Sher G. Incidence and estimated rates of residual risk for HIV, hepatitis C, hepatitis B and human T-cell lymphotropic viruses in blood donors in Canada, 1990-2000. *CMAJ* 2003; 169: 767-773.
- Coleman PF, Jack Chen Y-C, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. *J Med Virol* 1999; 59: 19–24.
- Cooreman MP, Leroux-Roels G, Paulij WP. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci* 2001; 8(3): 237–247.
- Courouche-Pauty AM, Plancon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang* 1983; 44: 197-211.
- Crandall KA, Templeton AR. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 1993; 134: 959-969.
- Crowther RA, Kiselev NA, Böttcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 1994; 77: 943–950.
- Cui C, Shi J, Hui L, Xi H, Zhuoma, Quni, Tsedan, Hu G. The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *J Gen Virol* 2002; 83: 2773-2777.
- Da Fonseca JC, Brasil CM. Hepatitis C virus infection in the Amazon Brazilian region. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37:1-8.
- De Castro L, Niel C, Gomes SA. Low frequency of mutations in the core promoter and pre-core regions of hepatitis B virus in anti-HBe positive Brazilian carriers. *BMC Microbiol* 2001;1: 10.
- Devarbhavi HC, Cohen AJ, Patel R, Wiesner RH, Dickson RC, Ishitani MB. Preliminary results: outcome of liver transplantation for hepatitis B virus varies by hepatitis B virus genotype. *Liver Transpl* 2002; 8(6): 550-555.
- Devesa M, Pujol FH. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res* 2007; 127(2): 177-184.
- Dobson A, Carper E. Infectious diseases and human population history. *Bioscience* 1996; 46: 115–126.

Dodd RY, Notari EP 4th, Stramer SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 2002. 42: 975-979.

Dusheiko G. Candidates for therapy: HBV. *J Hepat* 2006 ; 44 Supl. 1: S84–S89.

Educação Nacional On-line: Pesquisas educacionais. Imigração no Brasil. Acessado em 7 de outubro de 2007. Disponível em <http://www.enaol.com/disciplinas/historia/imigracao.php>

Encyclopédia Brasileira. Acessado em 7 de outubro de 2007. Disponível em <http://br.geocities.com/vinicrashbr/historia/brasil/colonizacaodobrasil.htm>

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 1992; 131: 479-491.

Fares MA, Holmes EC. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol* 2002; 54: 807-814.

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 1981; 17: 368-376.

Feng G, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Greene BM, Sharp PM., Shaw G M, Hahn BH. Human infection by genetically diverse SIVsm-related HIV-2 in West Africa. *Nature* 1992; 358: 495-499.

Fernholz D, Galle PR, Stemler M, Brunetto M, Bonino F, Will H. Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* 1993; 194: 137–148.

Fluxus Technology. Free phylogenetic network analysis software [online]. German; c2005. [capturado 21 ago. 2005] Disponível em <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>

François G, Kew M, Van Damme P, Mphahlele MJ, Meheus A. Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? *Vaccine* 2001; 19: 3799–3815.

FUNAI. Fundação Nacional do Índio. Índios de Brasil. Acessado em 7 de outubro de 2007. Disponível em <http://www.funai.gov.br/indios/conteudo.htm#EUROPEU>.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. 2002. Guia de vigilância epidemiológica Vol. I. 5. ed. Brasília: 842p. Disponível em portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vig_epi_vol_1.pdf.

Ganem D, Schneider RJ. Hepadnaviridae and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001: 2703-2737.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; 397: 436-441.

- Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 1980; 21: 801-809.
- Gerner PR, Friedt M, Oettinger R, Lausch E, Wirth S. The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2- defective particles in chronically infected children. *Virology* 1998; 245: 163-172.
- Ghany M, Liang TJ. Drug Targets and Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Chronic Hepatitis B. *Gastroenterol* 2007; 132:1574–1585.
- Gilbert RJ, Beales L, Blond D, Simon MN, Lin BY, Chisari FV, Stuart DI, Rowlands DJ. Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 14783-14788.
- Glebe D. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 14-21.
- Gomes MMS. Caracterização de genomas completos do vírus da hepatite B de diferentes genótipos isolados no Brasil. São Paulo; 2005. Mestrado - Instituto Adolfo Lutz.
- Goncalves CS, Pereira FE, Gayotto LC. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey (Florianopolis, SC, 1995). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1997; 39(3): 165-170.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid Symp Ser* 1999; 41: 95-98.
- Hannoun C, Norder H, Lindh M. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *J Gen Virol* 2000; 81(9): 2267–2272.
- Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M, Group tIT. Genotype Mixtures of Hepatitis B Virus in Patients Treated with Interferon. *J Infect Dis* 2002; 186: 752-759.
- Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepat* 2006; 44 Supl 1: 71–76.
- Herédia V. A imigração européia no século passado: o programa de colonização no Rio Grande do Sul. *Rev Electr Geogr y Cienc Soc* 2001; 94 (10).
- Hess G, Arnold W, Koesters W, Biswas R, Hutteroth TH, zum Buschenfelde KH. Simultaneous presence of HBsAg and anti-HBs in the serum of different subtypes (serological and immunofluorescent studies). *Z Immunitatsforsch Immunobiol* 1977; 153: 143-151.
- Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2001; 2971-3036.
- Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin. Liver Dis.* 1991; 11: 73–83.
- Hoofnagle JH, Lau D. New therapies for chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 1997; 4 Suppl 1: 41-50.

- Hou J, Wang Z, Cheng J, Lin Y, Lau GK, Sun J, Zhou F, Waters J, Karayiannis P, Luo K. Prevalence of naturally occurring surface gene variants of hepatitis B virus in nonimmunized surface antigen-negative Chinese carriers. *Hepatology* 2001; 34(5): 1027-1034.
- Hu X, Margolis HS, Purcell RH, Ebert J, Robertson BH. Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 1661-1664.
- Jaoude GA, Sureau C. Role of the Antigenic Loop of the Hepatitis B Virus Envelope Proteins in Infectivity of Hepatitis Delta Virus. *J Virol* 2005; 10460-10466.
- Kalinina T, Iwanski A, Will H, Sterneck M. Deficiency in virion secretion and decreased stability of the hepatitis B virus immune escape mutant G145R. *Hepatology* 2003; 38: 1274-1281.
- Kane M. Global programme for control of hepatitis B infection. *Vaccine* 1995; 13 Suppl 1: 47-49.
- Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Simonsen L, Kane M. Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. *Bull World Health Organ* 1999; 77(10): 801-807.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000a; 118(3): 554-559.
- Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatology* 2000b; 33(6): 998-1002.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Acute exacerbations of chronic hepatitis B are rarely associated with superinfection of hepatitis B virus. *Hepatology* 2001; 34: 817-823.
- Karasawa T, Shirasawa T, Okawa Y, Kuramoto A, Shimada N, Aizawa Y, Zeniya M, Toda G. Association between frequency of amino acid changes in core region of hepatitis B virus (HBV) and the presence of precore mutation in Japanese HBV carriers. *J Gastroenterology* 1997; 32(5): 611-622.
- Karayiannis P. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 761-785.
- Kato H, Orito E, Gish RG, Bzowej N, Newsom M, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Hepatitis B e antigen in sera from individuals infected with hepatitis B virus of genotype G. *Hepatology* 2002; 35: 922-929.
- Kato H, Orito E, Sugauchi F, Ueda R, Koshizaka T, Yanaka S, Gish RG, Kurbanov F, Ruzibakiev R, Kramvis A, Kew MC, Ahmad N, Khan M, Usuda S, Miyakawa Y, Mizokami M. Frequent coinfection with hepatitis B virus strains of distinct genotypes detected by hybridization with type-specific probes immobilized on a solid-phase support. *J Virol Methods* 2003; 110(1): 29-35.
- Khan N, Guarnieri M, Ahn SH, Li J, Zhou Y, Bang G, Kim KH, Wands JR, Tong S. Modulation of hepatitis B virus secretion by naturally occurring mutations in the S gene. *J Virol* 2004; 78(7): 3262-3270.

- Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 2007; 127: 164–176
- Kidd-Ljunggren K, Mlyakawa Y, Klidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 83: 1267-1280.
- Kimura M. The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to the steady flux of mutations. *Genetics* 1969; 61: 893-903.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16:111-120.
- Kirschberg O, Schüttler C, Repp R, Schaefer S. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus- genotypes A-F. *J Clin Virol* 2004; 29(1): 39-43.
- Kohno H, Inoue T, Tsuda F, Okamoto H, Akahane Y. Mutations in the envelope gene of hepatitis B virus variants co-occurring with antibody to surface antigen in sera from patients with chronic hepatitis B. *J Gen Virol* 1996; 77: 1825-1831.
- Koziel MJ, Siddiqui A. Virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis delta. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R. *Enfermedades Infecciosas: Principios y Práctica*. 6.^a ed. Madrid: Elsevier; 2006: 1864-1890.
- Kramvis A, Weitzmann L, Owiredu WK, Kew MC. Analysis of the complete genome of subgroup A hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol* 2002; 83(4): 835– 839.
- Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2005; 12: 456-464.
- Kremsdorf D, Garreau F, Capel F, Petit MA, Bréchet C. In vivo selection of a hepatitis B virus mutant with abnormal viral protein expression. *J Gen Virol* 1996; 77(5): 929–939.
- Lada O, Benhamou Y, Poynard T, Thibault V. Coexistence of Hepatitis B Surface Antigen (HBs Ag) and Anti-HBs Antibodies in Chronic Hepatitis B Virus Carriers: Influence of “a” Determinant Variants. *J Virol* 2006: 2968–2975.
- Lai CJ, Terrault NA. Antiviral therapy in patients with chronic hepatitis B and cirrhosis. *Gastroenterol Clin North Am* 2004; 33: 629-654.
- Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB III, Rico-Hesse R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 5757-5761.
- Law DT, Khokhar MF, Doo E, Ghany MG, Herion D, Park Y, Kleiner DE, Schmid P, Con-dreay LD, Gauthier J, Kuhns MC, Liang TJ, Hoofnagle JH. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology* 2000; 32: 828-834.
- Le Bouvier G. L. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis* 1971; 123: 671-675.
- Le Pogam S, Shih C. Influence of a putative intermolecular interaction between core and the pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus secretion. *J Virol* 2002; 76(13): 6510-6517.

- Levene C, Blumberg BS. Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. *Nature* 1969; 221:195-196.
- Levy MSF. O papel da imigração internacional na evolução da população brasileira (1872 a 1972). *Rev Saud Publ* 1974; 8(supl.):49-90.
- Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 324(24): 1705-1709.
- Liaw YF, Leung N, Guan R, Lau GK, Merican I, McCaughan G, Gane E, Kao JH, Omata M. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update. *Liver Int* 2005; 25: 472-489.
- Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Furuta Y, Norkrans G. Hepatitis B virus carriers without pre-core mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology* 1996; 24(3): 494-501.
- Lindh M. HBV precore mutants and response to interferon. *Hepatology* 1997; 25(6): 1547-1548.
- Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999; 179(4): 775-782.
- Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE, Snowball MM, Cagle HH, Williams JL, Chulanov VP. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *J Infect Dis* 2007; 195(1):5-11.
- Lok AS, Lai CL, Wu PC, Leung EK. Long-term follow-up in a randomised controlled trial of recombinant alpha 2-interferon in Chinese patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1988; 2: 298-302.
- Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000 summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001; 120: 1828-1853.
- Lok AS. The maze of treatments for hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2743-2746.
- Lok AS-F. Navigating the maze of hepatitis B treatments. *Gastroenterology*. 2007; 132:1586-1594.
- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999; 73(1):152-60.
- MacDonald DM, Holmes EC, Lewis JC, Simmonds P. Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. *J Virol* 2000; 74: 4253-4257.
- Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34.

- Mahoney FJ. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 351–366.
- Mangold CMT, Streeck RE. Mutational analysis of cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol* 1993; 67:4588–4597.
- Margolis HS, Coleman PJ, Brown RE, Mast EE, Sheingold SH, Arevalo JA. Prevention of hepatitis B virus transmission by immunization: an economic analysis of current recommendations. *JAMA* 1995; 264: 1201–08.
- McDermott AB, Cohen SB, Zuckerman JN, Madrigal JA. Hepatitis B third-generation vaccines: improved response and conventional vaccine non-response evidence for genetic basis in humans. *J Viral Hepat* 1998; 5: 9–11.
- Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, Saraiva JC, Virgolino HA, Motta-Castro AR, Melo MM, Martins RM, Gomes SA. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 2007; 23(7):103.
- Milich DR, McLachlan A, Chisari FV, Kent SB, Thornton GB. Immune response to the pre-S(1) region of hepatitis B surface antigen (HBsAg): a pre- S(1)-specific T cell response can bypass nonresponsiveness to the pre-S(2) and S regions of the HBsAg. *J Immunol* 1986; 137: 315–22.
- Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, Robertson BH. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett* 1999; 450(1-2): 66-71.
- Moerman B, Moons V, Sommer H, Schmitt Y, Stetter M. Evaluation of sensitivity for wild type and mutant forms of hepatitis B Surface antigen by four commercial HBsAg assays. *Clin Lab* 2004; 50: 159–162.
- Motta NA. Genotipagem de vírus da Hepatite B: desenvolvimento de método de aplicação em estudos epidemiológicos e filogenéticos. Rio de Janeiro; 2003. Mestrado - Fundação Oswaldo Cruz.
- Morozov V, Pisareva M, Groudinin M. Homologous recombination between different genotypes of hepatitis B virus. *Gene* 2000; 260(1–2): 55–65.
- Mutimer D, Pawlotsky JM, Zoulim F. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2004; 9: 679-693.
- Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001; 39(1): 362–364.
- Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF, Gaspar AM, Repp R, Gerlich WH. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol* 1993; 74(Pt 8): 1627–1632.
- Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press. c1987.

- Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992; 73:3141-3145.
- Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Courouce AM, Mushahwar IK, Magnius LO. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993; 74 (7): 1341-1348.
- Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503.
- Norder H, Ebert JW, Fields HA, Mushahwar IK, Magnius LO. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* 1996; 218: 214-223.
- Norder H, Arauz-Ruiz P, Blitz L, Pujol FH, Echevarria JM, Magnius LO. The T(1858) variant predisposing to the precore stop mutation correlates with one of two major genotype F hepatitis B virus clades. *J Gen Virol* 2003; 84(8): 2083-2087.
- Nowak TH. HBV kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93: 4398.
- Offergeld R, Faensen D, Ritter S, Hamouda O. Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. *Euro Surveill* 2005; 10: 8-11.
- Ogura Y, Kurosaki M, Asahina Y, Enomoto N, Marumo F, Sato C. Prevalence and significance of naturally occurring mutations in the surface and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 1999; 180: 1444-1451.
- Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* 1987; 61(10): 3030-3034.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69: 2575-2583.
- Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 1994; 68: 8102- 8110.
- Olinger CM, Venard V, Njayou M, Oyefolu AO, Maiga I, Kemp AJ, Omilabu SA, le Faou A, Muller CP. 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* 2006; 87: 1163-1173.
- Oliveira CM, Farias IP, da Fonseca JC, Brasil LM, de Souza R, Astolfi-Filho S. Phylogeny and molecular genetic parameters of different stages of hepatitis B virus infection in patients from the Brazilian Amazon. *Arch Virol* 2008; 153(5):823-830.

Oliveira MCM, Abbeg WAJO. A Imigração: Novas Culturas, Novos Momentos. II Seminário Internacional. Educação Intercultural, Gênero e Movimentos Sociais. Identidade, diferença, mediações. 2003. Acessado em 04 de dezembro de 2007. Disponível em <http://www.rizoma.ufsc.br/busca.php?action=find>.

Oon CJ, Chen WN, Lim N, Koh S, Lim GK, Leong AL, Tan GS. Hepatitis B virus variants with lamivudine-related mutations in the DNA polymerase and the 'a' epitope of the surface antigen are sensitive to ganciclovir. *Antiviral Res* 1999; 41:113-118.

Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, Gojobori T. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 7059-7062.

Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, Okanoue T, Yotsuyanagi H, Iino S. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 2001; 33(1): 218-223.

Osiowy C, Giles E. Evaluation of the INNO-LiPA HBV genotyping assay for determination of hepatitis B virus genotype. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5473-5477.

Owiredu WK, Kramvis A, Kew MC. Molecular analysis of hepatitis B virus genomes isolated from black African patients with fulminant hepatitis B. *J Med Virol* 2001; 65(3): 485-492.

Peterson DL. Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen. *J Biol Chem* 1981; 256: 6975-6983.

Pollicino T, Zanetti AR, Cacciola I, Petit MA, Smedile A, Campo S, Sagliocca L, Pasquali M, Tanzi E, Longo G, Raimondo G. Pre-S2 defective hepatitis B virus infection in patients with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1997; 26: 495-499.

Purow DB, Jacobson IM. Slowing the progression of chronic hepatitis B. Early antiviral therapy can help minimize complications. *Postgrad Med* 2003; 114(1). Acessado em 12 de dezembro de 2007. Disponível em http://www.postgradmed.com/issues/2003/07_03/2jacobson.htm.

Ray N, Currat M, Excoffier L. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Mol Biol Evol* 2003; 20 (1): 76-86.

Rezende RE, Fonseca BA, Ramalho LN, Zucoloto S, Pinho JR, Bertolini DA, Martinelli AL. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2005; 32(1): 53-59.

Robertson DL, Hahn BH, Sharp PM. Recombination in AIDS viruses. *J Mol Evol* 1995; 40:249-259.

Rozanov M, Plikat U, Chappey C, Kochergin A, Tatusova T. A web-based genotyping resource for viral sequences. *Nucl Ac Res* 2004; 32. Web Server issue.

Rosini N, Mousse D, Spada C, Treitinger A. Seroprevalence of HBsAg, Anti-HBc and Anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. *Braz J Infect Dis* 2003; 7: 262-267.

- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4(4): 406-25.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
- Santantonio T, Jung MC, Schneider R, Fernholz D, Milella M, Monno L, Pastore G, Pape GR, Will H. Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-S2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. *Virology* 1992; 188: 948–952.
- Sata T, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56: 19-22.
- Saw SL, Aw TC. Hepatitis B surface antigen mutant detection on four immunoassay systems. AACC 2000, Presentation number 198.
- Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* 2005; 12(2): 111-124.
- Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 14-21.
- Schneider S, Excoffier L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 1999; 152: 1079-1089.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier, L. *Arlequin: A software for population genetics data analysis*. Ver 2.000. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva; Switzerland, 2000.
- Schmunis GA, Zicker F, Cruz JR, Cuchi P. Safety of blood supply for infectious diseases in latin american countries, 1994-1997. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 924-930.
- Schurr TG. The peopling of the New World perspectives from molecular anthropology. *Annu Rev Anthropol* 2004; 33: 551-583.
- Shaw T, Locarnini SA. Hepatic purine and pyrimidine metabolism: implications for antiviral chemotherapy of viral hepatitis. *Liver* 1995; 15: 169–184.
- Sheldon J, Rodès B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hep* 2006; 13:427–434.
- Silva Filho HP. *Aplicabilidade dos genes pre-S e S do vírus da hepaite B (VHB) nos estudos de diversidade genômica*. Salvador; 2005. Mestrado - Fundação Oswaldo Cruz.
- Simmonds P. Reconstructing the origins of human hepatitis viruses. *Phil. Trans R Soc London B* 2001; 356: 1013-1026.
- Simmonds P, Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. *J Virol* 2005; 79: 15467-15476.

Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bearndini AP, Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B Virus Genotypes and Precore and Core Mutants in Brazilian Patients. *J Clin Microbiol* 2004; 2455–2460.

Sociedade Brasileira de Hepatologia. Consenso sobre condutas nas hepatites virais B e C. Acessado em 05 de junho de 2008. Disponível em: http://www.sbhepatologia.org.br/pdf/uploads/76281consenso_redacao_final_b.pdf.

Song Y, Dai E, Wang J, Liu H, Zhai J, Chen C, Du Z, Guo Z, Yang R. Genotyping of hepatitis B virus (HBV) by oligonucleotides microarray. *Mol Cell Probes* 2006; 20:121–127.

Soriano MJA. 2003. Virus de la Hepatitis B: estructura genómica y marcadores clínicos. www.seimc.org/control/revi_Sero/Rvirhbs.htm.

Souza KP, Luz JA, Teles SA, Carneiro MAS, Oliveira LA, Gomes AS, Dias MA, Gomes SA, Yoshida CFT, Martins RMB. Hepatitis B and C in the Hemodialysis Unit of Tocantins, Brazil: Serological and Molecular Profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(5): 599-603.

Stannard L. Virus ultra Structure: Electron Micrograph Images. Department of Medical Microbiology, University of Cape Town. Acesso em 07 de outubro de 2007. Disponível em <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html>

Starkman SE, MacDonald DM, Lewis JC, Holmes EC, Simmonds P. Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology* 2003; 314(1): 381-393.

Sterneck M, Gunther S, Gerlach J, Naoumov NV, Santantonio T, Fischer L, Rogiers X, Greten H, Williams R, Will H. Hepatitis B virus sequence changes evolving in liver transplant recipients with fulminant hepatitis. *J Hepatol* 1997; 26: 754–764.

Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81(1): 67-74.

Sucupira MVF. Análise genômica do vírus da hepatite B (HBV) em pacientes tratados ou não com lamivudina e co-infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana tipo 1 (HIV-1). Rio de Janeiro; 2004. Mestrado - Fundação Oswaldo Cruz.

Sugauchi F, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Kato H, Suzuki S, Kimura Y, Ueda R, Butterworth LA, Cooksley WG. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: complete genome sequence and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2001; 82(4): 883–892.

Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol* 2002; 76(12): 5985–5992.

Sugauchi F, Orito E, Kato H, Suzuki S, Kawakita S, Sakamoto Y, Fukushima K, Akiba T, Yoshihara N, Ueda R, Mizokami M. Genotype, serotype, and phylogenetic characterization of

the complete genome sequence of hepatitis B virus isolates from Malawian chronic carriers of the virus. *J Med Virol* 2003; 69(1): 33–40.

Sugauchi F, Kumada H, Acharya SA, Shrestha SM, Gamutan MT, Khan M, Gish RG, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *J Gen Virol* 2004; 85: 811-820.

Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403–415.

Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates; 2003.

Tabor E, Gerety RJ, Smallwood LA, Barker LF. Coincident hepatitis B surface antigen and antibodies of different subtypes in human serum. *J Immunol* 1977; 118: 369-370.

Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, Prince A. M. Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 2000; 267: 58-64.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007. 10.1093/molbev/msm092.

Teles SA, Martins RM, Vanderborcht B, Stuyver L, Gaspar AM, Yoshida CF. Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. *Artif. Organs* 1999; 23: 1074–1078.

Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(2): 165-170.

Tong S. Mechanism of HBV genome variability and replication of HBV mutants. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S134-138.

Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol* 2002; 25: 97–106.

Torresi J, Earnest-Silveira L, Civitico G, Walters TE, Lewin SR, Fyfe J, Locarnini SA, Manns M, Trautwein C, Bock TC. Restoration of replication phenotype of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by compensatory changes in the fingers subdomain of the viral polymerase selected as a consequence of mutations in the overlapping S gene. *Virology* 2002; 299: 88–99.

Ioshimoto LM, Rissato ML, Bonilha VSJ, Miyaky C, Raw I, Granovski N. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine ButaNG in adults. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999; 41(3):191-193.

Tosti ME, Solinas S, Prati D, Salvaneschi L, Manca M, Francesconi M, Ciuffreda M, Girelli G, Mele A. An estimate of the current risk of transmitting blood-borne infections through blood transfusion in Italy. *Br J Haematol* 2002; 117: 215-219.

Trautwein C, Schrem H, Tillmann HL, Kubicka S, Walker D, Boker KH, Maschek HJ, Pichlmayr R, Manns MP. Hepatitis B virus mutations in the pre-S genome before and after liver transplantation. *Hepatology* 1996; 24: 482-488.

Treitinger A, Spada C, Ferreira LA, Neto MS, Reis M, Verdi JC, de Miranda AF, de Oliveira OV, Van der Sander Silveira M, Abdalla DS. Hepatitis B and hepatitis C prevalence among blood donors and HIV-1 infected patients in Florianopolis-Brazil. *Braz J Infect Dis* 2000; 4: 192-196.

Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, Zuckerman AJ, Harrison TJ. The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol* 1988; 69: 1383-1389.

Wallace LA, Carman WF. Surface gene variation of HBV: scientific and medical relevance. *Viral Hepatitis* 1997; 3:5-16.

Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 641-644.

Wang Z, Liu Z, Zeng G, Wen S, Qi Y, Ma S, Naoumov NV, Hou J. A new intertype recombinant between genotypes C and D of hepatitis B virus identified in China. *J Gen Virol* 2005; 86: 985-990.

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

Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A metaanalysis. *Ann Intern Med* 1993; 119: 312-323.

World Health Assembly. Resolution WHA 45.17. Immunization and vaccine quality. Geneva, 1992.

World Health Organization. Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services. WHO/V&B/01.31. 2001.

World Health Organization. Hepatitis B. Fact sheet 204. Acessado em 16 de dezembro de 2007. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/print.html>

World Health Organization. WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2: Hepatitis B. Acessado em 12 de dezembro de 2007. Disponível em <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo20022/en/>

Wynne SA, Crowther RA, Leslie AG. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* 1999; 3: 771-780.

Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol* 1994; 68(4): 2671-2676.

Yang J, Xing K, Deng R, Wang J, Wang X. Identification of Hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing. *J Gen Virol* 2006; 87: 2203-2215.

Yokosuka O, Arai M. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Med Mol Morphol* 2006; 39: 113-120.

Yu MC, Yuan JM, Govindarajan S, Ross RK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Can J Gastroenterol* 2000; 14(8): 703-709.

Zaaijer HL, Vrieling H, Koot M. Early detection of hepatitis B surface antigen and detection of HBsAg mutants: a comparison of five assays. *Vox Sang* 2001; 81: 219-221.

Zeng G, Wang Z, Wen S, Jiang J, Wang L, Cheng J, Tan D, Xiao F, Ma S, Li W, Luo K, Naoumov NV, Hou J. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China. *J Viral Hepat* 2005; 12: 609-617.

Zhang W, Hacker HJ, Mildenerger M, Su Q, Schröder CH. Detection of HBV RNA in serum of patients. *Methods Mol Med* 2004; 95: 29-40.

Zou S, Notari IV EP, Stramer SL, Wahab F, Musavi F, Dodd RY. Patterns of age- and sex-specific prevalence of major blood-borne infections in United States blood donors, 1995 to 2002: American Red Cross blood donor study. *Transfusion* 2004; 44: 1640-1647.

Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 2004; 64: 1-15

Zoulim F. Assessment of treatment efficacy in HBV infection and disease. *J Hepatol* 2006; 44: S95-S99.

Zuckerman AJ, Thornton A, Howard CR, Tsiquaye KN, Jones DM, Brambell MR. Hepatitis B outbreak among chimpanzees at the London Zoo. *Lancet* 1978; ii: 652-654.

Zuckerman AJ. Hepatitis B. In *Medical Microbiology*. 4th ed. Gavelston: Samuel Baron; 1996.

ANEXOS

Aprovação do Comitê de Ética



Comitê de Ética em Pesquisa - CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

Vitória, 18 de Abr de 2005

Ilmo(a) Sr(a) **Dr Miguel Ângelo Martins Moreira**

Nesta

Prezado(a) Senhor(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Carcinoma hepatocelular e sua associação com os subtipos virais da hepatite B"** registrado neste CEP sob o número **08-2004**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - CIAS e, após respondidas as pendências apontadas, o projeto foi considerado :

APROVADO

É parecer desse comitê que o referido projeto, adicionado às cartas de resposta às citadas pendências, atende aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

O primeiro relatório do investigador deverá ser enviado em 18 de Setembro de 2005.

Atenciosamente,

Dr. Sérgio Ragi Eis
 CRM-ES 4608 - ES
 Coordenador, CIAS - CIAS
Dr. Sérgio Ragi Eis
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do CIAS
 CRM-ES 4608



Memo. 014/06-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 10 de fevereiro de 2006

A: Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino
Pesquisadora Principal

Registro CEP nº 104/05 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do projeto: Carcinoma hepatocelular e sua associação com os genótipos virais de Hepatite B

Prezada Doutora

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após análise **aprovou** o Protocolo intitulado: Carcinoma hepatocelular e sua associação com os genótipos virais de Hepatite B em 09 de fevereiro de 2006.

2. Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

Sequencia consenso criada para as amostras do genótipo A:

**GCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCCACAACAACCAGTACGGGACCCTGC
AAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGCAACTCTATGTTTCCCTCATGTTGCT
GTACAAAACCTACGGATGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTG
GGCTTTCGCAAATACCTATGGGAGTGGGCCT**

Sequencia consenso criada para as amostras do genótipo D:

**GCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCCTCAACCACCAGCACGGGACCATGC
CGAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCT
GTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTG
GGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCT**

