

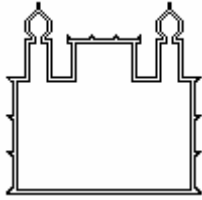
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

NATALIA MOTTA DE ARAUJO

**Estudos de Expressão do HBsAg: Hepatite B Oculta,
Genótipos do HBV e Quimeras de HBV e HCV.**

RIO DE JANEIRO

2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

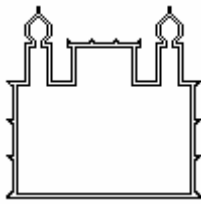
Natalia Motta de Araujo

**Estudos de Expressão do HBsAg: Hepatite B Oculta,
Genótipos do HBV e Quimeras de HBV e HCV.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Selma de Andrade Gomes

Rio de Janeiro
2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Natalia Motta de Araujo

**Estudos de Expressão do HBsAg: Hepatite B Oculta,
Genótipos do HBV e Quimeras de HBV e HCV.**

Orientadora: Dra. Selma de Andrade Gomes

EXAMINADORES:

Dra. Mariza Gonçalves Morgado (IOC-FIOCRUZ)

Dra. Cristiane Alves Villela Nogueira (UFRJ)

Dr. Alan Kay (INSERM)

Suplentes:

Dr. Christian Niel (IOC-FIOCRUZ)

Dra. Elisabeth Lampe (IOC-FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 11 de julho de 2008.

“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre a começar,
a certeza de que é preciso continuar,
e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar”.

(Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Selma de Andrade Gomes, por me ajudar a percorrer novos caminhos e ouvir com interesse e paciência todas as minhas questões, dúvidas e problemas que surgiram ao longo desses anos. Pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade e carinho, principalmente, os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Christian Niel, por incentivar constantemente o meu interesse científico, pelas valiosas sugestões e críticas oferecidas durante o meu trabalho e pela excelente ajuda na preparação dos artigos.

À amiga Monique Branco Vieira, que durante o seu estágio de iniciação científica, me forneceu uma ajuda preciosa no trabalho de bancada.

Ao meu querido amigo Chico, por essa amizade que prezo tanto e que tenho certeza que será para sempre.

Aos meus amigos de laboratório, Bárbara, Carlos Augusto, Caroline, Fátima, Leonardo e Sylvie, por todo o companheirismo no dia-a-dia do trabalho e pelos muitos momentos alegres que passamos juntos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar a minha bolsa de doutorado sanduíche de quatro meses na França.

Ao Convênio FIOCRUZ/INSERM, pelo financiamento das viagens Brasil-França e França-Brasil durante os anos de 2006 e 2007 e pelos próximos anos de 2008 e 2009.

A toda equipe da unidade 871 do INSERM em Lyon, França, principalmente ao Dr. Alan Kay e ao Prof. Christian Trepo, pelos valiosos ensinamentos e por todo o carinho e atenção dedicados a mim. “Je vous adresse mes plus sincères remerciements”.

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC-FIOCRUZ), principalmente à Dra. Anita Mendonça Silva, Dra. Jussara Árabe, Dr. José Henrique Pilotto e Dra. Beatriz Grinsztejn, pelo fornecimento dos pacientes e coleta de dados, para a realização do estudo sobre hepatite B oculta.

Um especial agradecimento a todos os pacientes do IPEC que decidiram participar deste estudo, pois sem a colaboração deles o trabalho não teria sido possível.

À coordenação e secretaria da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular IOC-FIOCRUZ pela atenção dedicada nos momentos em que precisei.

À Plataforma de Sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ por realizar o sequenciamento de todas as amostras analisadas nesta tese.

A todos os meus queridos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico e do Laboratório de Hepatites Virais, por toda a colaboração, apoio e amizade ao longo desses anos.

Aos meus pais muito queridos, pelo estímulo do início ao fim, pela ajuda constante, concreta e infatigável, ao longo de minha vida. Eu espero poder ter lhes dado uma pequena retribuição à educação que sempre se esforçaram para me proporcionar.

Ao Guilherme, por me incentivar nos momentos de desânimo, por se alegrar comigo a cada bom resultado conquistado, pela vida linda que temos juntos, pelos planos que já realizamos e os muitos outros que pretendemos ainda realizar...

RESUMO

Introdução: O vírus da hepatite B (HBV) é classificado em oito genótipos (A-H), que apresentam uma distribuição geográfica característica nas diferentes regiões do mundo. No Brasil, são encontrados principalmente os genótipos A, D e F. A infecção pelo HBV é comumente diagnosticada pela presença do antígeno de superfície viral (HBsAg) no soro de indivíduos infectados. Mutações no HBsAg podem afetar os níveis de secreção deste antígeno, bem como, alterar a sua conformação, e conseqüentemente, inibir a sua detecção pelos testes imunoenzimáticos. A detecção do DNA viral em pacientes com sorologia negativa para o HBsAg caracteriza a ocorrência de infecção oculta pelo HBV. Partículas híbridas de HBsAg, também denominadas quimeras, têm sido utilizadas com bastante eficiência na apresentação de epítomos exógenos. **Objetivos:** Realizar estudos de expressão *in vitro* do HBsAg em células eucarióticas visando (i) associar infecção oculta pelo HBV com mutações de aminoácidos no HBsAg; (ii) avaliar possíveis diferenças na detecção do HBsAg relacionadas aos diferentes genótipos do HBV; e (iii) possibilitar a construção de quimeras de HBV e do vírus da hepatite C (HCV) para produção de proteínas híbridas imunizantes. **Metodologia:** A clonagem das regiões genômicas do envelope do HBV foi realizada utilizando-se os vetores de expressão em células eucarióticas pcDNA3 e/ou pCI. Para a inserção do segmento de HCV no HBsAg, foi utilizado um sítio de restrição natural localizado na região do epítomo neutralizante do HBsAg. Ensaio de transfecção transitória foram realizados em células CHO e/ou HuH7. O meio de cultura e os extratos celulares foram analisados quanto à detecção de HBsAg por ensaios imunoenzimáticos. Ensaio de imunofluorescência, utilizando um anticorpo monoclonal anti-HBs, foram realizados para detectar a localização intracelular do HBsAg. **Resultados:** 1) A infecção oculta pelo HBV foi detectada em 6/43 (14%) pacientes infectados pelo HIV. A ocorrência de hepatite B oculta não teve relação com a elevação dos níveis de transaminases, porém foi significativamente associada à presença de infecção pelo HCV. Todos os pacientes, exceto um, apresentaram baixa carga viral para o HBV. O sequenciamento da região S revelou mutações em dois pacientes que podem ser responsáveis pela falta de detecção do HBsAg pelos testes comerciais. 2) O genótipo A apresentou os maiores níveis de detecção de HBsAg em comparação aos genótipos D (redução de 37%) e F (redução de 30%). Entretanto, a presença de duas únicas substituições (T143M, em um clone do genótipo A, e T125M, em um clone do genótipo D) alterou consideravelmente os níveis de detecção do HBsAg. 3) Uma mutação identificada na porção carboxi-terminal da proteína S do HBsAg no resíduo 215 (L215Q), em um isolado de HBV do genótipo F, foi responsável pela inibição da secreção deste antígeno. Através de microscopia de imunofluorescência, foi observada uma localização intracelular do HBsAg mutante indicativa de retenção no retículo endoplasmático. 4) A inserção de um segmento do HCV dentro do epítomo neutralizante do HBsAg através de um sítio natural de restrição, não alterou os padrões de secreção e a antigenicidade do HBsAg quimérico. **Conclusões:** A detecção de mutações no HBsAg e a baixa viremia do HBV confirmam que mecanismos multifatoriais estão envolvidos na infecção oculta pelo HBV. Mutações únicas no HBsAg podem ter mais influência nos padrões de detecção e secreção do HBsAg do que o conjunto total de variações características de cada genótipo. A utilização do sítio de restrição natural identificado neste estudo para a inserção de epítomos do HCV não alterou as propriedades antigênicas do HBsAg.

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis B virus (HBV) is classified into eight genotypes (A-H) that have a distinct distribution in different geographical regions. In Brazil, genotypes A, D and F are the most prevalent. HBV infection is commonly diagnosed by the presence of the surface antigen (HBsAg) in serum. Amino acid mutations may affect HBsAg secretion levels, as well as, alter HBsAg conformation, and thus, inhibit its detection by immunoassays. The detection of HBV DNA in HBsAg negative patients characterizes the occurrence of occult HBV infection. HBsAg hybrid particles, also known as chimeras, have been successfully used as vectors for presentation of other epitopes. **Objectives:** To conduct HBsAg expression assays in eukaryotic cells aiming to (i) associate occult HBV infection with amino acid mutations in HBsAg; (ii) analyze possible differences in the levels of HBsAg detection related to HBV genotypes; and (iii) construct hybrid particles of HBsAg and hepatitis C virus (HCV) epitopes to produce chimeric immunogenic proteins. **Methods:** Cloning procedures of the coding regions for the HBV envelop proteins were done by using pcDNA3 and/or pCI eukaryotic expression vectors. A natural restriction site located at the HBsAg neutralizing epitope was used for insertion of the HCV segment into the HBsAg. Transient transfection assays were carried out in CHO and/or HuH7 cells. Medium and extracts of transfected cells were analyzed for the presence of HBsAg by immunoassays. The intracellular localization of HBsAg was observed by immunofluorescence using a monoclonal anti-HBs antibody. **Results:** 1) Occult HBV infection was detected in 6/43 (14%) HIV-infected patients. It was not associated with alanine aminotransferase elevation but significantly correlated with the presence of HCV infection. All except one patient, showed low HBV loads. S gene sequencing revealed mutations in two patients that may inhibit HBsAg detection by commercial assays. 2) HBV genotype A displayed the highest levels of HBsAg detection in comparison with genotypes D (reduction of 37%) and F (reduction of 30%). However, the presence of two single mutations (T143M, in a genotype A clone, and T125M, in a genotype D clone) changed considerably HBsAg detection levels. 3) A unique amino acid mutation in the carboxi-terminal region of the HBsAg at residue 215 (L215Q), from a genotype F isolate, that inhibits secretion of HBsAg, was identified. By immunofluorescence microscopy, an intracellular localization of the HBsAg mutant, indicating retention in the endoplasmic reticulum, was observed. 4) The insertion of the HCV segment into the HBsAg neutralizing epitope by a natural restriction site did not alter patterns of secretion and antigenicity of the chimeric HBsAg. **Conclusions:** The detection of HBsAg mutants and low HBV loads confirm that multifactorial mechanisms are involved in occult HBV infection. Single mutations in HBsAg may have more influence on the patterns of HBsAg detection and secretion than the set of variations characteristic of each genotype. The natural restriction site identified in this study for insertion of HCV epitopes did not change HBsAg antigenic characteristics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Histórico	1
1.2	Epidemiologia da Infecção pelo Vírus da Hepatite B	2
1.3	Classificação	4
1.4	Transmissão do HBV	5
1.5	Quadro Clínico	6
1.6	Patogênese	7
1.7	Diagnóstico Laboratorial da Hepatite B	8
1.8	Prevenção da Hepatite B	9
1.9	Tratamento	10
1.10	Características Biológicas do Vírus da Hepatite B	12
1.11	Organização Genômica	14
1.11.1	A Fase de Leitura Aberta Pre-S/S	15
1.11.2	A Fase de Leitura Aberta da Polimerase (P)	16
1.11.3	A Fase de Leitura Aberta Pre-C/C	17
1.11.4	A Fase de Leitura Aberta X	18
1.12	Replicação Viral	19
1.13	Variabilidade do HBV	21
1.13.1	Subtipos do HBV	21
1.13.2	Genótipos do HBV	22
1.14	A Proteína S do HBsAg	25
1.14.1	Estrutura da Proteína S do HBsAg	25
1.14.2	Variabilidade Genética da Proteína S do HBsAg	27
1.14.3	Hepatite B Oculta	28
1.14.4	HBsAg como Apresentador de Epítomos Exógenos - Enfoque HCV	29
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	RESULTADOS	36
5	DISCUSSÃO	106
6	CONCLUSÕES	115
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
	ANEXOS	138

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Histórico

Relatos da ocorrência de icterícia epidêmica são encontrados desde o período anterior à Era Cristã, e foram descritos inicialmente por Hipócrates (400 AC). Entretanto, somente no final do século XIX, após a vacinação contra a varíola (vacina preparada com linfa humana) de 1.289 trabalhadores do estaleiro de Bremen, Alemanha, dos quais 15% se tornaram ictericos, tornou-se evidente a associação desta enfermidade a um agente de transmissão parenteral (Lurman, 1885).

Durante a primeira metade do século XX, surtos de hepatite de “período de incubação longo” (50 a 180 dias) foram observados em muitos países e foram associados às transfusões de sangue, ao uso de medicação injetável com seringas e agulhas não esterilizadas e à administração de vacina, como por exemplo, o surto de hepatite/icterícia ocorrido entre os militares que foram vacinados contra a febre amarela durante a Segunda Guerra Mundial (Krugman, 1989).

A década de 1940 foi o período no qual se distinguiu a presença de mais de um agente viral para as epidemias de icterícia. Em 1947, MacCallum designou os termos “vírus da hepatite A” (HAV) e “vírus da hepatite B” (HBV), referindo-se aos supostos agentes etiológicos das hepatites de período de incubação curto ou infecciosa (18 a 37 dias) e de período de incubação longo ou soro-homóloga (50 a 180 dias), respectivamente. Esta terminologia foi adotada pelo comitê das hepatites virais da Organização Mundial de Saúde, permanecendo até os dias atuais (Hollinger, 1991).

Em 1965, Blumberg e colaboradores publicaram o que viria a ser uma das mais importantes revelações sobre as hepatites virais. Com o objetivo de estudar características polimórficas hereditárias, Blumberg e sua equipe examinaram milhares de amostras de soro de diferentes áreas geográficas do mundo. Durante o curso da investigação, a equipe descobriu que uma amostra de soro de um aborígene da Austrália continha um antígeno que reagia especificamente com um anticorpo presente no soro de um paciente hemofílico dos Estados Unidos. Estudos subseqüentes revelaram que este “antígeno Austrália” era relativamente raro na população da América do Norte e Oeste Europeu, porém prevalente em algumas regiões Africanas e Asiáticas e entre pacientes com leucemia, síndrome de Down e

hepatite aguda (Blumberg et al., 1967; Bayer et al., 1968). Em 1968, a correlação do antígeno Austrália (agora designado antígeno de superfície do vírus da hepatite B ou HBsAg) com a infecção pelo HBV, pôde ser estabelecida (Okochi & Murakami, 1968; Prince, 1968). Posteriormente, a purificação do HBV foi realizada a partir do soro de portadores do antígeno Austrália e a partícula completa ou vírion foi detectada por microscopia eletrônica (Dane et al., 1970).

Atualmente é conhecida uma série de vírus hepatotrópicos humanos, sendo o HBV o primeiro deles a ter sido identificado (1970), seguido pelo vírus da hepatite A (HAV) (Feinstone et al., 1973), vírus da hepatite D (HDV) (Rizzeto et al., 1977), vírus da hepatite E (HEV) (Balayan et al., 1983) e vírus da hepatite C (HCV) (Choo et al., 1989). Outros novos agentes foram identificados em indivíduos com hepatite pós-transfusional não A-E, porém uma relação causal entre infecção por estes vírus e hepatopatias ainda não pôde ser confirmada. Dentre eles, destacam-se o vírus da hepatite G (HGV) (Simons et al., 1995), Torque Teno vírus (TTV) (Nishizawa et al., 1997), Torque Teno Mini vírus (TTMV) (Takahashi et al., 2000) e Torque Teno Midi vírus (TTMDV) (Ninomiya et al., 2007).

1.2 – Epidemiologia da Infecção pelo Vírus da Hepatite B

A OMS calcula que mais de 350 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo HBV no mundo. Os portadores crônicos de hepatite B apresentam um maior risco de falecer por complicações relacionadas à hepatite crônica, como cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), com relato de 500 mil a 1,2 milhões de óbitos por ano. Estes portadores crônicos servem como fonte de infecção para outros indivíduos (Zuckerman, 1999).

A infecção pelo HBV exhibe alta prevalência para o HBsAg (8 a 15%) no Sudeste asiático, China, Filipinas, África, bacia amazônica e Oriente Médio. Uma prevalência intermediária (2-7%) é observada no Leste Europeu, Ásia Central, Japão, Israel e ex-União Soviética, enquanto, uma baixa prevalência (<2%), é encontrada na América do Norte, Europa Ocidental, Austrália e Sul da América Latina (Margolis et al., 1991) (Figura 1).

O Brasil é considerado uma área de prevalência intermediária para a infecção pelo HBV, porém observam-se taxas variáveis de ocorrência da infecção em diferentes regiões do país, inclusive em nível de sub-regiões, uma vez que

localidades vizinhas podem apresentar graus distintos de endemicidade (Souto, 1999) (Figura 2). A região Sul, que sempre apresentou os menores índices de hepatite B do país, teve caracterizada sub-regiões, mais precisamente as regiões de Francisco Beltrão (PR), Cascavel (PR) e Chapecó (SC), com prevalência moderada a elevada do HBsAg. A mesma situação é observada na região Sudeste, onde a prevalência é baixa, porém há a presença de sub-áreas com altos índices de infecção pelo HBV, localizadas nos estados do Espírito Santo e Minas Gerais (Souto, 1999). Ao contrário, na região Norte, que é a principal área de alta prevalência do HBV no Brasil e que tem recebido maior atenção dos estudiosos e das autoridades sanitárias, verificou-se uma sub-região (em Barcellos) no Norte do Estado do Amazonas, cuja prevalência para o HBsAg é baixa (1,6%) (Arboleda et al., 1995). Na região Nordeste, os poucos estudos de soroprevalência da hepatite B que foram realizados, apontam índices baixos na cidade de Salvador e nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte (Lyra et al., 1986; Souto, 1999). Para a região Centro-Oeste, os números conhecidos sugerem que a região pode ser dividida em duas grandes áreas quanto ao padrão epidemiológico da hepatite B: a primeira mais ao Sul, englobando o Mato Grosso do Sul, Goiás e Sul do Mato Grosso, com prevalência baixa a moderada, e a região Norte do Mato Grosso, correspondendo à Amazônia, com comportamento semelhante ao da região Norte (Souto, 1999).

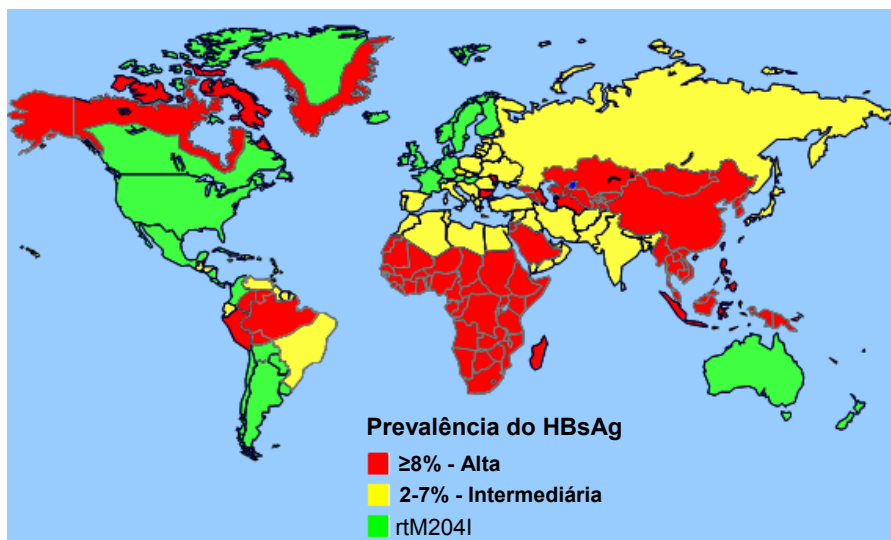


Figura 1: Distribuição Mundial do HBV.

Disponível em http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide_9.htm
[acesso em 10 abril 2008] (Figura adaptada para o português).

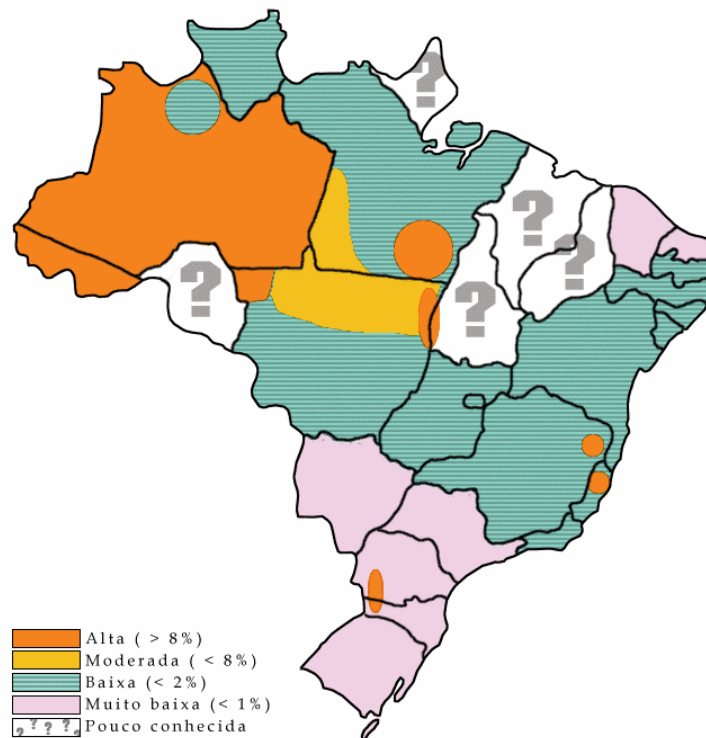


Figura 2: Distribuição do HBV no Brasil (Fonte: Adaptada de Souto, 1999).

1.3 – Classificação

O HBV é o protótipo de um grupo de vírus DNA hepatotrópicos, classificados na família *Hepadnaviridae*, os quais compartilham características comuns, tais como, tamanho, ultraestrutura do vírion, organização da molécula de DNA e um mecanismo exclusivo de replicação por transcrição reversa. Esta família é dividida em dois gêneros, *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus*, representando os vírus cujos hospedeiros são mamíferos e aves, respectivamente. Os representantes do primeiro gênero são encontrados em humanos (HBV), marmotas (WHV) (Summers et al., 1978), esquilos (GSHV) (Marion et al., 1980) e primatas não humanos (HBV) (Vaudin et al., 1988; Hu et al., 2000; Robertson, 2001). Em 1998, Lanford e colaboradores isolaram de um primata do Novo Mundo (*Lagothrix lagotricha*), um novo representante deste gênero, denominado de “WMHBV – Woolly Monkey Hepatitis B Virus”. Os vírus pertencentes ao gênero *Avihepadnavirus* infectam patos (DHBV) (Mason et al., 1980; Zhou, 1980), garças (HHBV) (Sprenkel et al., 1988) e cegonhas (STHBV) (Pult et al., 2001).

1.4 – Transmissão do HBV

O HBV é principalmente encontrado no sangue de indivíduos infectados. A carga viral pode ser maior que dez bilhões de vírions por mililitro de sangue em portadores com sorologia positiva para o HBeAg (antígeno indicador de replicação do HBV). Além disso, o HBV pode ser detectado em outros fluidos corporais, como na urina, saliva, fluido nasofaríngeo, sêmen e fluido menstrual (Alter et al., 1977; Davison et al., 1987). O HBV não foi ainda detectado em fezes, provavelmente devido à inativação e degradação do vírion na mucosa intestinal ou pela flora bacteriana (Grabow et al., 1975).

A transmissão do HBV ocorre pela exposição perinatal, através da relação sexual, pela exposição a sangue ou derivados, pelo transplante de órgãos ou tecidos, através de seringas compartilhadas por usuários de drogas endovenosas, por lesões de pele, por picadas de agulhas ou através de outras exposições de origens desconhecidas (Gonçales, 1997). Nas áreas de alta incidência de infecção pelo HBV, a disseminação ocorre principalmente na infância, seja ao nascer (perinatal), ou nos primeiros anos de vida por transmissão horizontal entre familiares (Margolis et al., 1991). Na exposição perinatal, a transmissão mãe-filho pode se fazer durante o parto pela exposição do recém-nascido ao sangue ou líquido amniótico (onde está presente o HBV), durante a passagem pelo canal vaginal, ou pela amamentação (Gonçales, 1997). O próprio contato familiar continuado de crianças com mães reativas para os antígenos HBsAg/HBeAg nos anos seguintes ao nascimento, levará a um risco considerável de aquisição do HBV, se as crianças não forem vacinadas (Beasley & Hwang, 1987). Em áreas de baixa prevalência, a infecção ocorre principalmente em indivíduos adultos, sendo a via de transmissão dependente de padrões ambientais e comportamentais, tais como, o compartilhamento de seringas ou agulhas na utilização de drogas injetáveis (Alter, 1993; Oliveira et al., 1999), relações sexuais com múltiplos parceiros (homossexuais ou heterossexuais) (Piot et al., 1990), profissionais de saúde através de acidentes com materiais perfurocortantes contaminados com sangue (Beltrami et al., 2000) e pacientes politransfundidos e/ou submetidos à cirurgia ou a outros procedimentos invasivos (Teles et al., 1998).

1.5 – Quadro Clínico

Acredita-se que o HBV não exerça um efeito citopático direto sobre os hepatócitos (Alberti et al., 1983). A hepatite B pode, no entanto, variar desde uma doença aguda auto-limitada, até uma forma grave como a hepatite fulminante. Pode, ainda, apresentar um curso crônico com evolução para a cirrose hepática e hepatocarcinoma. Cerca de 90-95% dos pacientes adultos infectados evoluem para a cura, e menos de 1% dos indivíduos desenvolvem uma hepatite fulminante. Entretanto, crianças infectadas através de transmissão perinatal, apresentam mais de 90% de chance de se tornarem portadores crônicos.

O período de incubação da hepatite B é de 50 a 180 dias, com média de 75 dias. Decorrido este tempo, inicia-se o chamado período prodrômico (pré-ictérico), que dura vários dias e se caracteriza pelo aparecimento de fraqueza, anorexia e mal-estar geral. Nesta fase, os doentes podem referir dores abdominais difusas, náuseas, intolerância a vários alimentos, distúrbios gustativos, desconforto abdominal e vômitos. A ocorrência de artrites, artralguas e mialgias é descrita nos casos de hepatite B, bem como a observação de exantemas cutâneos rubeoliformes ou lembrando urticárias (McIntyre, 1990). O exame físico pode revelar hepatomegalia dolorosa. O aparecimento de icterícia, com colúria e hipocolia fecal (período ictérico), ocorre em somente 20% dos doentes, sendo a hepatite B uma doença assintomática no restante dos casos. Quando aparece a icterícia, os sintomas gerais, como febre e mialgias, diminuem de intensidade. Neste momento se elevarão os níveis séricos das bilirrubinas, principalmente da fração direta. As transaminases estarão muito elevadas no soro, expressando a ocorrência de lesões hepatocíticas. Este quadro ictérico costuma durar cerca de 20 dias ou mais, e pode, às vezes, provocar pruridos cutâneos. Os demais sinais observados nas icterícias hepatocelulares, como hipocolia ou acolia fecal e colúria, tornam-se bastante evidentes no período ictérico da hepatite B. Com a evolução da doença, a hepatomegalia dolorosa e a esplenomegalia, se presentes, vão diminuir paulatinamente, bem como todos os sintomas dispépticos e aqueles relacionados com a icterícia. Este período de convalescença dura, em média, 20 a 30 dias (Gonçales, 1997).

1.6 – Patogênese

Como o HBV não é diretamente citopático, existem evidências consideráveis de que a hepatite B se inicia por uma resposta imune-celular dirigida contra antígenos virais específicos que levarão ao dano hepático. Acredita-se que a participação dos dois componentes da resposta imune (celular e humoral) seja necessária para que ocorra a eliminação do vírus, além da inativação viral intracelular produzida por citocinas liberadas pelas células linfomononucleares, tais como interferon-gama e o fator de necrose tumoral (TNF) (Rapicetta et al., 2002). Durante a fase aguda da hepatite viral, os hepatócitos expressam na sua superfície um complexo formado por peptídeos do core (HBcAg) do HBV e proteínas de classe I do HLA. O linfócito T citotóxico reconhece este complexo de peptídeos do core/MHC classe I e ao atacar este hepatócito infectado produz a lise hepatocítica. Sem dúvida a resposta das células T às proteínas do HBV, que se expressam associadas a antígenos HLA de classe I na superfície dos hepatócitos infectados, representa o maior determinante da lise destas células. Quando este mecanismo é totalmente eficiente, leva à recuperação da infecção (Rapicetta et al., 2002). Esta lise imunológica dos hepatócitos infectados é, portanto, a base histopatológica da enfermidade aguda produzida pelo HBV. O indivíduo poderá desenvolver hepatite B crônica porque não ocorre expressão da classe I do HLA, ou porque o linfócito T citotóxico não é apropriadamente estimulado ou, ainda por algum outro mecanismo desconhecido (Thomas, 1991).

A integração do DNA do HBV no genoma do hospedeiro pode acarretar no desenvolvimento de hepatocarcinoma celular. Esta alteração cromossômica, freqüentemente envolvendo o cromossomo 17, leva a transformações celulares, que produzem, após alguns anos, o carcinoma de células primárias do fígado (Hino et al., 1986; Zhou et al., 1988). Através de técnicas de biologia molecular, pôde-se inserir o gene que produz o antígeno X (HBxAg) do HBV em ratos, e os animais produziram este antígeno e desenvolveram carcinoma hepatocelular, mesmo na ausência de lesão hepatocítica (Kim et al., 1991). Estes fatos apontam para a participação do HBV no desenvolvimento de neoplasias hepáticas.

1.7 – Diagnóstico Laboratorial da Hepatite B

Do ponto de vista clínico, as hepatites virais apresentam um quadro bastante similar. O diagnóstico etiológico consiste em identificar o agente causador da infecção e pode ser realizado através de técnicas sorológicas, imunohistoquímicas ou moleculares, onde pesquisam-se os marcadores sorológicos, teciduais e o ácido nucléico viral, respectivamente (Brasil, Ministério da Saúde, 1995).

O HBV inicia a replicação no hepatócito na semana que antecede as suas manifestações clínicas. Nesta fase, o HBsAg pode ser determinado sem que o indivíduo tenha ainda sintomas ou evidências de necrose hepatocelular (Hoofnagle & Di Bisceglie, 1991). Ao iniciar a sintomatologia e a elevação de aminotransferases, aparecem o anticorpo anti-HBc da classe IgM, com o marcador anti-HBc total. O anti-HBc IgM, juntamente com o HBsAg, constituem a chave do diagnóstico da infecção aguda, uma vez que a fração IgG deste anticorpo serve apenas como evidência de memória imunológica. Apesar de ser um anticorpo de longa duração, o anti-HBc, não confere imunidade ao indivíduo, pois não possui capacidade neutralizante (Sjogren, 1994). Na fase inicial da doença os marcadores de replicação (HBeAg e o HBV-DNA) são encontrados em títulos altos. À medida que a infecção se instala, a resposta imunológica do hospedeiro modula a infecção, diminuindo progressivamente a replicação viral. Os indivíduos que apresentam resposta imunológica satisfatória conseguem debelar a replicação viral, geralmente até o 3º mês da doença, fazendo com que o HBeAg desapareça dando lugar ao anticorpo anti-HBe, que está associado a uma baixa replicação do HBV. A ausência da soroconversão HBeAg/anti-HBe até o 3º mês da doença aguda é sinal de mau prognóstico, pois indica falha do sistema imunológico e tendência para cronificação do processo. Cessando a replicação viral, ocorrerá o desaparecimento progressivo do HBsAg e, algumas semanas após, surgirá o anti-HBs, anticorpo neutralizante e indicativo de cura da infecção. Os indivíduos que se tornam crônicos, permanecem como portadores do vírus por tempo variado. A hepatite crônica é determinada pela persistência do HBsAg no soro por mais de seis meses após o início da infecção. Nestes pacientes, os marcadores de replicação viral e as manifestações clínicas serão dependentes da interação “vírus x hospedeiro” (Sjogren, 1994). A Figura 3 apresenta as curvas dos marcadores sorológicos nas infecções aguda e crônica, respectivamente.

Provas bioquímicas de função hepática, tais como a dosagem das transaminases (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase – AST) e bilirrubina são também realizadas para fins de diagnóstico, pois seus níveis aumentam no soro durante os episódios de lesão ou necrose hepatocelular em decorrência da infecção viral (Sjogren, 1994).

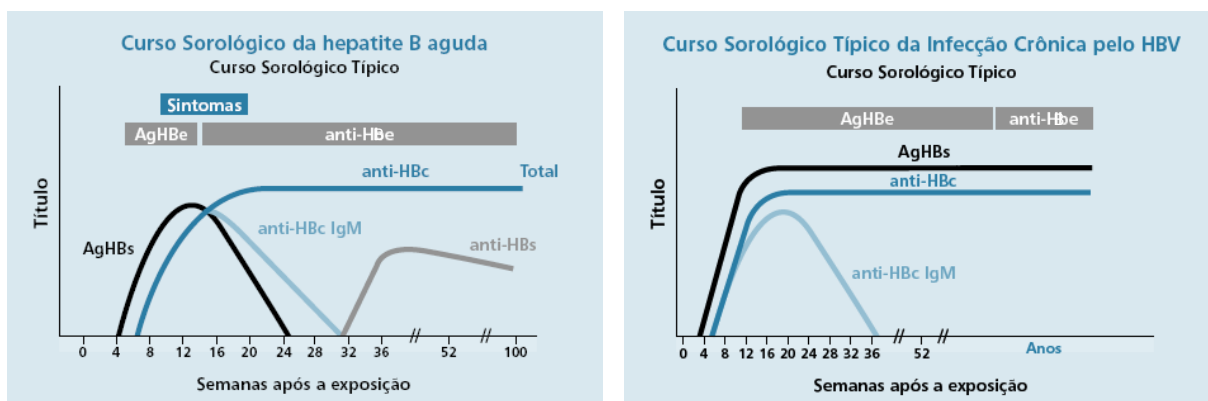


Figura 3: Curvas Sorológicas nas Infecções Aguda e Crônica.

Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide_3.htm> e <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide_4.htm> [acesso em 16 Jan. 2008] (Figuras adaptadas para o português).

1.8 – Prevenção da Hepatite B

A primeira vacina contra o HBV foi licenciada em 1981 e era derivada de plasma humano de portadores crônicos do HBV (Heptavax-B, Merck & Co). Entretanto, o risco de transmissão de outros agentes infecciosos presentes no plasma, impulsionou o desenvolvimento de vacinas recombinantes compostas de HBsAg produzido por engenharia genética (Engerix-B, SmithKline e Recombivax, Merck & Co). Para a produção destas vacinas, utiliza-se a tecnologia do DNA recombinante para expressão do HBsAg em leveduras (Assad & Francis, 2000). A vacina apresenta uma boa imunogenicidade contra o HBV, cerca de 90% dos indivíduos imunocompetentes, quando vacinados, desenvolvem uma adequada resposta de anticorpos. Além disso, a vacina tem um potencial para reduzir as taxas de incidência e mortalidade do hepatocarcinoma celular (Blumberg, 1997). O esquema atualmente recomendado com as vacinas recombinantes disponíveis é de 3 doses por via intramuscular, no músculo deltóide, com intervalos de 1 mês (entre

1ª e 2ª dose) e de 5 meses (entre 2ª e 3ª dose) - esquema 0,1,6 meses (Assad & Francis, 2000). No nosso país, a vacina está disponível nas unidades básicas de saúde e em algumas maternidades. A recomendação do Ministério da Saúde (Programa Nacional de Imunizações – PNI) é de vacinar todos os recém-nascidos, de preferência nas primeiras doze horas de vida ou na ocasião da vacina BCG-ID. Em todo o país, a vacina está disponível para os grupos de risco (indivíduos que se expõem ao contato direto com sangue humano, seus derivados ou secreções humanas) desde a década de 90 e, mais recentemente, foi estendida a indivíduos com idade inferior ou igual a 19 anos (FUNASA, 2001). A eficácia protetora da vacina é diretamente relacionada ao nível de anticorpos anti-HBs produzidos, sendo considerado necessário para proteção, título igual ou maior que 10 mUI/ml (CDC, 1991).

A imunoproliferação através do uso de gamaglobulina hiperimune específica (HBIG) é utilizada para conferir proteção passiva imediata a indivíduos que tenham sido expostos recentemente ao HBV, como por exemplo, após uma punção acidental, contato sexual com portador ou, durante o parto de neonatos em mães HBsAg positivas (Perrillo et al., 1984).

1.9 – Tratamento

O tratamento da hepatite B crônica visa suprimir a replicação viral e reduzir a lesão hepática, prevenindo a evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular. São considerados objetivos do tratamento: 1) soroconversão de HBeAg para anti-HBe; 2) desaparecimento do DNA do vírus do soro; 3) normalização do nível de ALT; e 4) melhora da histologia hepática.

Dois condutas terapêuticas têm sido utilizadas no tratamento da infecção pelo HBV: moduladores do sistema imune e agentes antivirais na forma de análogos de nucleos(t)ídeos. Na primeira categoria, encontra-se o interferon alfa (IFN- α), que foi a primeira droga licenciada pelo FDA ("Food and Drug Administration") para utilização na terapêutica da hepatite B. O IFN apresenta-se na forma convencional ou peguillada (peginterferon). O processo de peguilação, que consiste em ligar covalentemente uma molécula de interferon a uma molécula de polietilenoglicol (PEG), permite que o medicamento atue por mais tempo no organismo. Dessa forma, a administração do IFN peguillado é feita uma única vez por semana,

enquanto que o IFN convencional é administrado três vezes por semana. A dose recomendada de IFN em adultos é de 5 milhões de unidades (MU) por dia ou de 10 MU três vezes por semana, por via subcutânea, durante um período de 16 semanas. Em crianças, recomenda-se 6 MU/m², 3 vezes por semana durante 16 semanas. Aproximadamente 20% dos pacientes HBeAg positivos tratados com IFN fazem a soroconversão para anti-HBe (Karayiannis, 2004). O tratamento com IFN apresenta como vantagens uma curta duração do tratamento, ausência de resistência antiviral e excelente duração e qualidade de resposta. Como desvantagens, têm-se principalmente os efeitos colaterais, tais como, sintomas gripais e reações hematológicas, neuropsiquiátricas, dermatológicas, endocrinológicas, pneumológicas, oftalmológicas e cardio-vasculares (Fattovich et al., 1996).

A segunda categoria de agentes antivirais para o tratamento da hepatite B crônica são os análogos de nucleos(t)ídeos. Um total de quatro agentes são atualmente licenciados: lamivudina (3TC), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), e telbivudina (LdT). Além desses, o tenofovir disoproxil fumarato (TDF), que faz parte da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART) usada no tratamento da infecção pelo HIV, tem também atividade contra o HBV. Estes agentes são bem tolerados pelo organismo, entretanto a ocorrência de cepas mutantes de resistência tem sido o principal fator limitante para a eficácia destas drogas. A Figura 4 mostra um esquema das mutações localizadas na polimerase do HBV que levam à resistência das cepas mutantes aos análogos de nucleos(t)ídeos.

A lamivudina (2'-3'-dideoxi-3'-thiacitidina) foi o primeiro análogo de nucleosídeo licenciado em 1998 pelo FDA para uso no tratamento da hepatite B crônica. A lamivudina também tem atividade contra o HIV e é um dos componentes da HAART. A absorção da lamivudina após administração via oral é rápida, com poucos efeitos colaterais e a droga é amplamente distribuída no organismo (Johnson et al., 1999). A dose diária recomendada é de 100 mg por um período mínimo de 1 ano. Dados de ensaios clínicos têm mostrado uma taxa de soroconversão de HBeAg para anti-HBe de 17% em 1 ano de tratamento a 27, 36 e 47% em 2, 3 e 4 anos, respectivamente (Liaw et al., 2000; Karayiannis, 2004). A atividade antiviral dos análogos de nucleosídeos incluindo a lamivudina encontra explicação pela competição que esta droga faz aos outros nucleosídeos naturais para ligar-se ao sítio ativo da polimerase viral. A lamivudina incorpora-se no DNA do vírus inibindo a sua síntese, e conseqüentemente, a replicação viral. A principal desvantagem do tratamento com lamivudina é o surgimento de cepas mutantes resistentes à droga. A

resistência à lamivudina ocorre em até 32% dos pacientes HBeAg positivos após 1 ano de tratamento, podendo chegar a até 70% após 5 anos (Karayiannis, 2004). A mutação primária de resistência à lamivudina ocorre no códon 204 gerando uma substituição de uma metionina para uma valina ou isoleucina (rtM204V/I) no motivo Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD) que é essencial para a atividade de transcrição reversa da polimerase viral (Mutimer, 2001). Cepas contendo esta mutação apresentam uma capacidade de replicação reduzida (Melegari et al., 1998). Mutações compensatórias, tais como rtV173L e rtL180M, parcialmente restauram a capacidade replicativa do mutante resistente à lamivudina (Delaney et al., 2003). Na terapia de resgate em pacientes com resistência viral a lamivudina, a co-administração com adefovir dipivoxil ou tenofovir tem sido indicada (Lok et al., 2007).

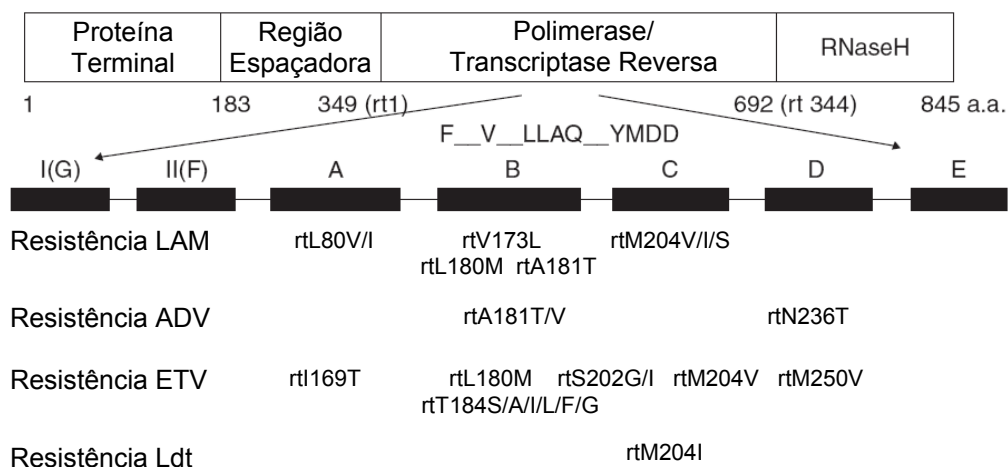


Figura 4: Fase de Leitura da Polimerase do HBV Mostrando os Domínios Conservados e a Localização das Mutações de Resistência aos Análogos de Nucleos(t)ídeos. LAM, lamivudina; ADV, adefovir dipivoxil; ETV, entecavir; LdT, telbivudina (Fonte: Lok et al., 2007 - Figura adaptada para o português).

1.10 – Características Biológicas do Vírus da Hepatite B

O HBV apresenta um mecanismo único entre os vírus que infectam o homem, o qual permite a produção de diferentes tipos de partículas virais. Em preparações para a microscopia eletrônica de soro de indivíduos infectados, três formas de partículas são observadas: partículas completas infecciosas, partículas incompletas não infecciosas esféricas e partículas incompletas não infecciosas filamentosas

(Figura 5-A). A concentração da partícula viral completa, também chamada partícula de Dane, em soro de pessoas infectadas, pode ultrapassar a 10^9 partículas/ml, e possui uma densidade de flutuação de $1,22 \text{ g/cm}^3$ em gradiente de equilíbrio de cloreto de céso. As partículas incompletas são compostas exclusivamente de HBsAg e são encontradas em excesso (em torno de 10^{13} por ml) no soro de indivíduos infectados. Ambas as partículas subvirais (esféricas e filamentosas), apresentam um diâmetro de 22 nm, sendo as filamentosas de comprimento variável. Estas partículas apresentam uma densidade de aproximadamente $1,18 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de céso. As partículas virais infecciosas são esféricas com diâmetro de aproximadamente 42 nm. Estes vírions apresentam um envelope lipídico externo, composto pelas proteínas S (“small”), M (“middle”) e L (“large”), o qual constitui o antígeno de superfície do HBV (HBsAg). O nucleocapsídeo possui simetria icosaédrica e é constituído pela proteína do core (HBcAg) e pelo genoma viral (Tiollais et al., 1985) (Figura 5-B).

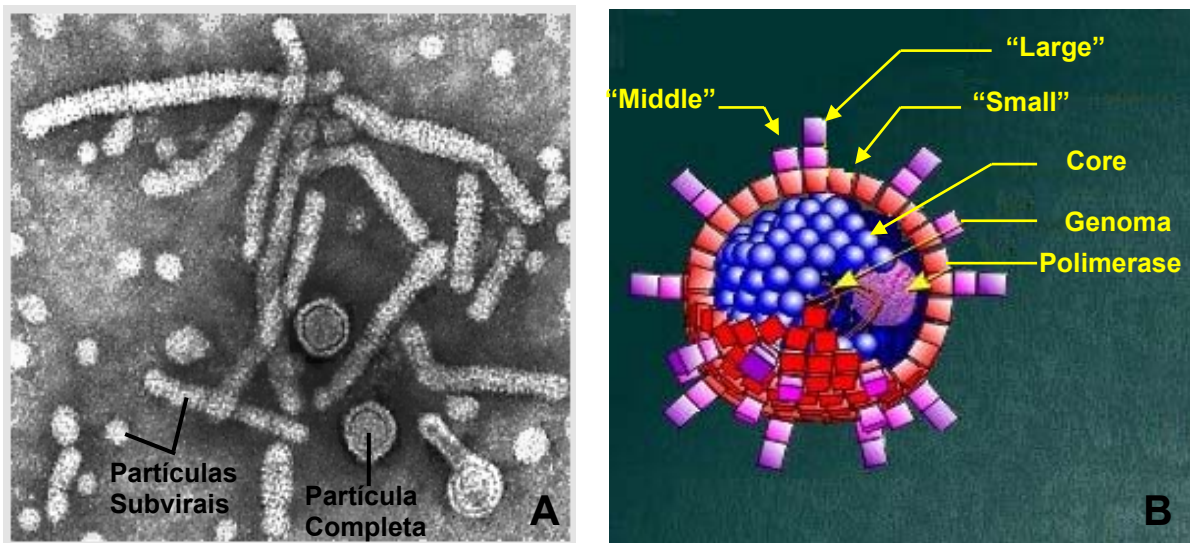


Figura 5: A – Micrografia eletrônica mostrando as partículas completas e subvirais do HBV. Disponível em <<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html>> [acesso em 10 abril 2008].

B – Estrutura do vírion. Disponível em <<http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/hbvparts.htm>> [acesso em 11 nov. 2002] (Figura adaptada para o português).

O HBV não se replica em linhagens celulares, sendo necessária a utilização de células primárias humanas. Porém, a indisponibilidade de tais culturas dificulta o cultivo do HBV (Galle et al., 1994). Algumas linhagens humanas de hepatomas, tais como, HepG2, HuH6 e HuH7, são permissivas a replicação do HBV somente quando

transfectadas com o genoma viral clonado (Tsurimoto et al., 1987; Sells et al., 1988). Recentemente, foi desenvolvida uma linhagem celular de hepatoma humano, denominada HepaRG, que é suscetível à infecção pelo HBV (Gripon et al., 2002). Entretanto, o cultivo desta linhagem celular é ainda bastante laborioso.

A utilização de modelos animais em infecções experimentais é restrita, uma vez que o HBV infecta, além do homem, apenas primatas não humanos. A imunogenicidade e antigenicidade são mantidas em pH 2,4 por 6 horas ou a 98°C por 1 minuto ou 60°C por 10 horas. A infecciosidade do HBV, após estocagem a 30 - 32°C por seis meses ou a -20°C por quinze anos, também é conservada. Entretanto, a exposição do HBsAg ao hipoclorito de sódio na concentração de 0,25% por 3 minutos destrói a antigenicidade do vírus e provavelmente a infecciosidade. Outros agentes como álcool isopropílico, álcool etílico ou combinações desses, inativam o HBV. Além disso, a exposição direta à ebulição por 2 minutos e autoclavação em 121°C por 20 minutos, pode inativar os vírions em amostras de soro (Bond et al., 1983; Hollinger, 1996).

1.11 – Organização Genômica

O genoma do HBV é um dos menores entre os vírus que infectam o homem, abrangendo aproximadamente 3.200 pares de bases (pb). É composto por uma molécula de DNA circular parcialmente fita dupla. A fita maior é complementar aos RNAs virais e por convenção possui polaridade negativa (fita negativa). Nesta fita existe uma proteína covalentemente ligada à sua extremidade 5' (Gerlich & Robinson, 1980). Na fita de polaridade positiva, a posição da extremidade 5' terminal é fixa, enquanto que a posição da extremidade 3' terminal é variável. Desta forma, o comprimento da fita positiva é variável, correspondendo entre 50 a 90% do comprimento da fita complementar (Figura 6). Próxima às extremidades 5' de ambas as fitas, há duas pequenas seqüências de 11 nucleotídeos, que são diretamente repetidas e chamadas de "direct repeats" (DR1 e DR2). Estas seqüências são importantes para a inicialização da replicação do HBV (Seeger et al., 1986, Lien et al., 1987, Will et al., 1987).

O genoma do HBV é totalmente codificante e apresenta quatro fases de leitura aberta designadas de pre-S/S, pre-C/C, P e X (Figura 6). Através de um engenhoso sistema que sobrepõe as fases de leitura aberta, todos os genes do vírus

estão intimamente ligados e o HBV pode produzir aproximadamente 50% mais proteínas do que o esperado para o tamanho do seu genoma (Ganem & Varmus, 1987). A região genômica pre-S/S codifica as proteínas de superfície viral que compõem o HBsAg; pre-C/C é responsável pela síntese do HBeAg e do antígeno e (HBeAg); o gene P codifica a polimerase viral; a região X sintetiza uma proteína regulatória, chamada de proteína X (HBxAg). A numeração dos pares de bases do genoma do HBV mais comumente utilizada, se inicia a partir de um sítio único para a enzima de restrição *EcoRI*, localizado na região pre-S2 ou em sítios homólogos, caso o sítio *EcoRI* esteja ausente.

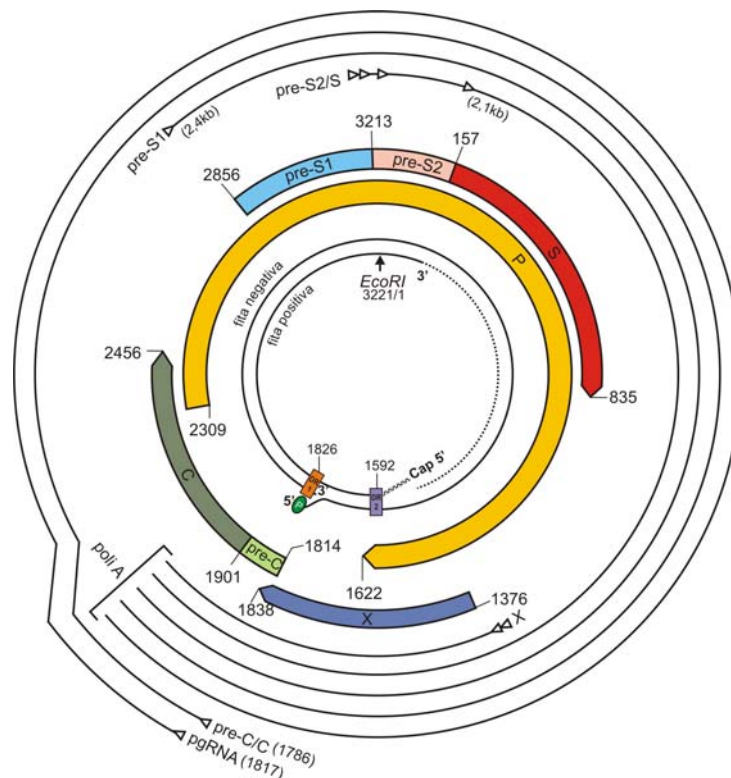


Figura 6: Modelo Esquemático do Genoma do HBV. O esquema mostra as quatro fases de leitura aberta pre-S/S, pre-C/C, P e X, e as respectivas coordenadas do início e final de cada região; os pontilhados indicam a região do genoma que possui fita simples (Fonte: Gomes, 2003).

1.11.1 – A Fase de Leitura Aberta Pre-S/S

O gene pre-S/S, inclui as regiões pre-S1, pre-S2 e S, com três códon de iniciação na mesma fase de leitura. A proteína de maior tamanho, L “large” (400 aa), é codificada a partir do códon de iniciação localizado no começo da região pre-S1, e

a síntese desta proteína se estende pelas regiões pre-S1, pre-S2 e S. A proteína de tamanho intermediário, M “middle” (281 aa), é codificada pelas regiões pre-S2 e S, enquanto que a proteína de menor tamanho, S “small” (226 aa) é sintetizada a partir do terceiro códon de iniciação localizado no início da região S. Todas estas proteínas possuem o mesmo códon de terminação localizado no final da região S. Estas proteínas são encontradas nas formas glicosiladas e não glicosiladas, sendo que a proteína M pode se apresentar diglicosilada (Seeger & Mason, 2000).

Os três tipos de proteínas não são distribuídos uniformemente entre as diferentes formas de partículas virais (Heermann et al., 1984). Partículas subvirais de 22 nm são compostas predominantemente por proteínas S, apresentando quantidades variáveis de proteína M e poucas cadeias L. Entretanto, as partículas completas (vírions) são enriquecidas de proteínas L. Uma vez que sabe-se que as proteínas L contém os sítios de ligação do HBV aos receptores específicos nos hepatócitos (Neurath et al., 1986; Klingmuller & Schaller 1993), este enriquecimento de proteínas L poderia prevenir as partículas subvirais, que são mais numerosas, de competir com os vírions pelos receptores presentes na superfície celular (Ganem, 1996).

A proteína M também atua como elemento de ligação para a adsorção do HBV. Esta proteína possui uma região de ligação com a albumina sérica humana e esta ligação permite que o HBV penetre via receptores celulares de albumina no citoplasma do hepatócito (Thung & Gerber, 1984; Dash et al., 1991).

A proteína S, que é a principal proteína que forma o HBsAg, é capaz de induzir resposta imunológica protetora (anti-HBs) contra o HBV, e é o antígeno utilizado na formulação de vacinas (Grob, 1998). Mutações em epítomos específicos, ocorrendo dentro do gene S, podem interferir na proteção vacinal, na análise de resultados sorológicos, bem como prejudicar a terapia baseada na utilização de anticorpos específicos para suprimir a infecção em indivíduos transplantados (Blum, 1993; Wallace & Carman, 1994).

1.11.2 – A Fase de Leitura Aberta da Polimerase (P)

O gene P cobre aproximadamente 3/4 do genoma e codifica uma enzima de 832 aminoácidos, com atividade de DNA polimerase, transcriptase reversa e RNase H. A fase de leitura aberta do gene P está decalada de dois nucleotídeos em relação a fase de leitura pre-S/S. Existem quatro domínios na polimerase viral: o domínio

amino-terminal, que atua como proteína terminal ou primase, necessário para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa; uma região chamada de “espaçadora”, que parece não ter nenhuma função em particular; o domínio de transcriptase reversa; e o domínio C-terminal que exibe atividade de RNase H. Existe homologia entre a polimerase viral e outras transcriptases reversas, em particular estas enzimas compartilham o motivo Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD) que é essencial para a atividade de transcrição reversa (Toh et al., 1983). Pacientes submetidos à terapia com drogas antivirais, como a lamivudina, podem apresentar mutações no motivo YMDD que causam resistência à droga (François et al., 2001).

1.11.3 – A Fase de Leitura Aberta Pre-C/C

A região pre-C/C possui dois códons de iniciação na mesma fase de leitura aberta. O HBeAg é traduzido a partir do único códon de iniciação da região pre-C. Inicialmente, é produzido um polipeptídeo precursor de 214 aminoácidos compreendendo os 29 aminoácidos da região pre-C e os demais aminoácidos do gene C. O produto é então translocado para o retículo endoplasmático rugoso onde é clivado nas duas extremidades, resultando na formação do HBeAg com 159 aminoácidos. O HBeAg é então secretado na circulação sanguínea, usualmente ligado a proteínas do soro, sendo um indicador de replicação viral (Garcia et al., 1988; Nassal & Rieger, 1993). A correlação entre a expressão do HBeAg e o estabelecimento da infecção crônica em crianças de mães portadoras do HBV, demonstra que este antígeno tem uma provável função de induzir tolerância imunológica, uma vez que é capaz de atravessar a placenta e atingir a circulação sanguínea do feto (Milichi et al., 1990).

O HBcAg corresponde a um polipeptídeo de 185 aminoácidos. O nucleocapsídeo viral é formado por 180 monômeros desta proteína que espontaneamente se ligam para formar uma partícula icosaédrica (Nassal & Schaller, 1996). O HBcAg é ainda capaz de induzir a produção de anticorpos (anti-HBc) independentemente de células T, tanto na infecção natural pelo HBV quanto em animais imunizados (Milich & Mclachlam, 1986).

Diversas mutações na região pre-C/C têm sido descritas por vários autores (Carman et al., 1989; Fiordalisi et al., 1990; Maruyama et al., 2000; de Castro et al., 2001). Uma das mutações mais freqüentes é a troca de uma guanina, no nucleotídeo 1896, por uma adenina, alterando o códon 28 da proteína HBeAg,

inicialmente UGG, em um códon de terminação (UAG) para a tradução protéica. Com a presença do códon de terminação, a expressão do HBeAg é interrompida. A ocorrência desta mutação depende da presença de uma uracila no nucleotídeo 1858, o qual vai parear com o nucleotídeo 1896 na estrutura ϵ do sinal de encapsidação do RNA pré-genômico. Os genótipos B, C, D e E apresentam uma uracila nesta posição, explicando assim, a alta prevalência de mutantes A1896 na Ásia e no Mediterrâneo onde os três primeiros genótipos são encontrados. A infecção pelo HBV mutante na região do pre-core, incapaz de secretar HBeAg, tem sido associada com hepatite fulminante (Sato et al., 1995), hepatite crônica severa (Brunetto et al., 1989) e também tem sido descrita em pacientes assintomáticos (Okamoto et al., 1990).

1.11.4 – A Fase de Leitura Aberta X

O gene X é a menor região genômica do HBV e é responsável pela síntese da proteína HBxAg de 154 aminoácidos. Este gene está presente somente nos vírus do gênero *Orthohepadnavirus*. A função exata desta proteína na infecção pelo HBV ainda não foi completamente definida. Porém, sabe-se que o HBxAg estimula a replicação e a expressão de genes virais, o que pode ser importante para o estabelecimento e manutenção do estado de portador crônico (Feitelson & Duan, 1997).

Apesar da determinação dos sítios de integração do genoma do HBV no genoma do hospedeiro pareça ser aleatória, existem regiões de preferência dentro do genoma viral. Durante a replicação do HBV, a origem de replicação para cada fita de DNA consiste em uma seqüência de 11 pares de bases repetidas e invertidas (“direct repeats”) (Dejean et al., 1984). Uma vez que estas seqüências estão sobrepostas ao gene X, este gene se torna a seqüência mais freqüentemente integrada ao genoma do hepatócito. A maioria dos tumores primários apresentam produtos de RNA do gene X, e apenas poucos apresentam RNAs de outras regiões genômicas do HBV. (Diamantis et al., 1992; Paterlini et al., 1995). Muitos desses fragmentos integrados codificam HBxAg que atua como trans-ativador de promotor tanto *in vitro* (Wollersheim et al., 1988) como *in vivo* (Balsano et al., 1994). Além disso, a proteína X pode interferir na atividade da p53, uma proteína supressora de tumor e ativadora da apoptose celular. Estas propriedades parecem contribuir para o

desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular em portadores crônicos do HBV (Feitelson et al., 1993; Truant et al., 1995).

1.12 – Replicação Viral

O sítio primário de replicação do HBV é a célula hepática, embora não se tenha ainda informações detalhadas sobre os mecanismos de adsorção e penetração do HBV nesta célula. Muitos estudos têm sido realizados sobre os componentes do envelope viral e o seu envolvimento nas interações com a célula hospedeira. Para o HBV, há muitas evidências que indicam que as proteínas L, M e S participam da ligação a receptores celulares. Anticorpos contra epítomos codificados pela região pre-S1, bloqueiam a adsorção de partículas do HBV a frações de membrana plasmática de hepatócitos humanos e a células HepG2 (Neurath et al., 1986; Pontisso et al., 1989).

A Figura 7 apresenta as principais etapas do ciclo replicativo do HBV. Após adsorção, o nucleocapsídeo viral penetra no hepatócito e libera o DNA do HBV no núcleo da célula hospedeira. Primeiramente, o DNA viral é convertido na forma circular dupla fita covalentemente ligada (cccDNA). Para isto, a fita positiva é completada pela DNA polimerase celular. A RNA polimerase II celular transcreve o genoma do HBV a partir da forma cccDNA em RNAs genômicos e subgenômicos. Todos os produtos de transcrição são capeados na extremidade 5' e compartilham o mesmo sinal de poliadenilação (AATAAA) na extremidade 3'.

Ao longo de todo o genoma viral, existem quatro promotores (pre-S1, pre-S2, pre-C/C e X) e dois elementos “enhancer” (EnhI e EnhII). O promotor pre-C/C controla a transcrição de diferentes RNAs de tamanho em torno de 3,5 kb, que possuem heterogeneidade na extremidade 5'. Entre estes RNAs, o chamado de RNA pré-genômico (pgRNA) é o molde para a síntese do DNA genômico, através de um complexo sistema de transcrição reversa. O pgRNA serve também de molde para a síntese da proteína do core e da polimerase viral. Os RNAs de 3,5 kb com extremidade 5' localizada acima do códon de iniciação da região pre-C, moldam a síntese do HBeAg.

No caso das proteínas de envelope que compõem o HBsAg, são conhecidos dois promotores, promotor pre-S1 e promotor pre-S2/S. O promotor pre-S1 controla a transcrição de um único RNA subgenômico de 2,4 kb, que perfaz toda a região

pre-S/S e é o único RNA mensageiro para a proteína “large”. O promotor pre-S2/S controla uma família de RNAs subgenômicos de 2,1 kb possuindo microheterogeneidade da extremidade 5’, de modo que um destes transcritos se inicia imediatamente antes do AUG da região pre-S2 e os demais após este códon de iniciação. Desta forma, um dos transcritos de 2,1 kb origina a proteína “middle”, enquanto os demais RNAs mensageiros de 2,1 kb originam a proteína “small”.

O promotor X controla a transcrição de um RNA subgenômico de 0,9 kb que é traduzido na proteína HBxAg.

Após a tradução dos RNAs no citoplasma, o pgRNA é encapsidado juntamente com a polimerase viral. Acredita-se que o empacotamento do pgRNA dependa da interação entre a polimerase, proteínas do core e o sinal de encapsidação (ϵ), localizado na extremidade 5’ do pgRNA (Bartenschlager & Schaller, 1992). No interior do nucleocapsídeo ocorre a transcrição reversa do pgRNA em DNA. Inicialmente é sintetizada a fita de DNA de polaridade negativa. Paralelamente, a atividade de RNase H da polimerase viral degrada o molde de RNA. Com o término da polimerização da fita negativa, inicia-se a síntese da fita de polaridade positiva, a qual não é formada completamente. Uma vez que a síntese da fita positiva começa, o nucleocapsídeo adquire o envelope lipoprotéico viral. Este processo ocorre no retículo endoplasmático rugoso, seguindo depois no complexo de Golgi, onde finalmente os vírions são secretados (Figura 7) (Ganem, 1996).

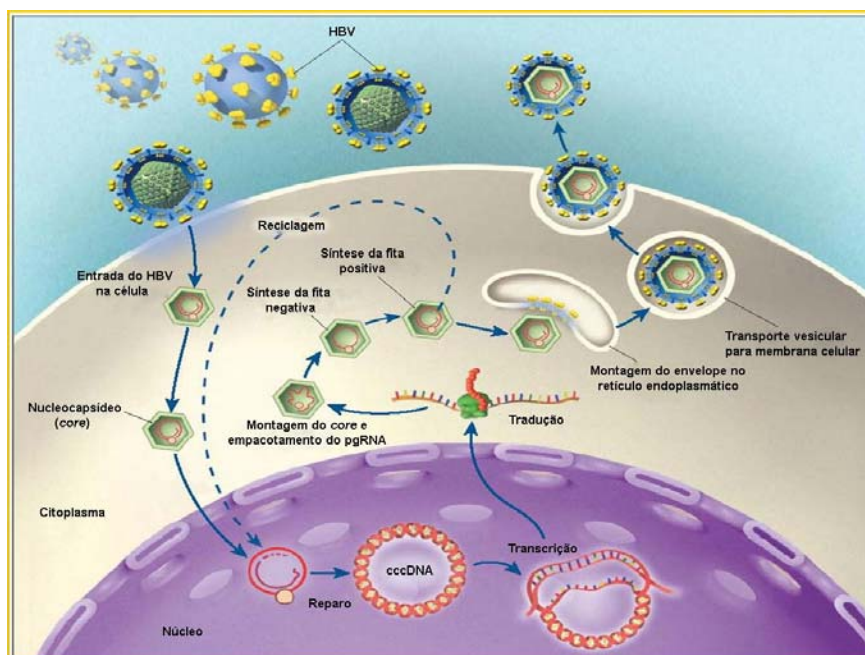


Figura 7: Modelo esquemático do ciclo replicativo do HBV (Fonte: Ganem & Prince, 2004

- Figura adaptada para o português).

1.13 – Variabilidade do HBV

1.13.1 – Subtipos do HBV

Os primeiros relatos de variabilidade do HBV vieram de Le Bouvier (1971), que descreveu dois determinantes antigênicos mutuamente exclusivos, *d* e *y*. Estes determinantes residem na proteína de superfície do vírus, juntamente com o principal determinante antigênico *a*, localizado entre os aminoácidos 124 a 147 da região S (Levene & Blumberg, 1969). Dois determinantes adicionais, *w* e *r*, foram descritos por Bancroft e colaboradores (1972), que observaram que cada cepa de HBV poderia ser caracterizada como pertencendo a um dos subtipos *adw*, *adr*, *ayw* ou *ayr*. Em um amplo estudo, subtipos adicionais foram caracterizados por Couroucé-Pauty e colaboradores (1983). Os dez subtipos descritos foram *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw3*, *adw4*, *adrq-* e *adrq+* (Tabela 1). Através de técnicas moleculares, foi possível demonstrar que substituições de aminoácidos (lisina por arginina) nas posições 122 e 160 da proteína S estão associadas às variações alélicas “d/y” e “w/r”, respectivamente, enquanto que no resíduo 127, estão relacionadas as subespecificidades do subdeterminante *w*, sendo prolina (*w1/w2*), treonina (*w3*) ou leucina (*w4*) (Okamoto et al., 1987a; Norder et al., 1992a). Os demais determinantes têm sido mapeados em aminoácidos localizados nas posições 134, 159, 177 e 178 (Okamoto et al., 1989; Norder et al., 1992a) (Tabela 1). A subtipagem de cepas do HBV pode ser utilizada para estudos epidemiológicos e, em alguns casos, para verificar a possibilidade de infecção nosocomial.

Tabela 1: Subtipos do HBV e seus correspondes aminoácidos no HBsAg (Fonte:

Adaptado de Kay & Zoulim, 2007).

Subtipo	Aminoácidos HBsAg
<i>ayw1</i>	122R+160K+127P+(134F e/ou 159A)
<i>ayw2</i>	122R+160K+127P
<i>ayw3</i>	122R+160K+127T
<i>ayw4</i>	122R+160K+127L
<i>Ayr</i>	122R+160R
<i>adw2</i>	122K+160K+127P
<i>adw3</i>	122K+160K+127T
<i>adw4q-</i>	122K+160K+127L+178Q
<i>adrq+</i>	122K+160R+177V+178P
<i>adrq-</i>	122K+160R+177 ^a

1.13.2 – Genótipos do HBV

Em 1988, Okamoto e colaboradores sugeriram que os subtipos tradicionais poderiam ser complementados ou substituídos por uma classificação de cepas do HBV em subgrupos genéticos. Um total de 18 seqüências completas de HBV, incluindo três genomas de origem asiática do subtipo *adw* clonadas neste estudo, bem como quinze seqüências oriundas de diferentes países (seis *adw*, quatro *adr*, quatro *ayw*, e um *ayr*) foram analisadas. Através da comparação da seqüência nucleotídica, observou-se que estas seqüências se agrupavam em quatro grupos, denominados de A a D, com mais de 8% de divergência intergenotípica. Esta porcentagem de divergência na seqüência nucleotídica passou a ser utilizada para distinguir os genótipos. Comparações de seqüências do gene S foram feitas por Norder e colaboradores (1992b) e mais outros dois genótipos (E e F) foram descritos. Em um amplo estudo, eles compararam seqüências da região S de 122 cepas e confirmaram a existência destes dois novos genótipos (Norder et al., 1993). Neste mesmo ano, Naumann e colaboradores (1993), descreveram uma cepa do Brasil bastante divergente das demais cepas, com relação à seqüência genômica (15%). Esta cepa expressava o subtipo *adw4*, e pertencia ao genótipo F. Ela tem sido freqüentemente utilizada como um grupo externo em estudos filogenéticos do HBV, uma vez que o genótipo F é o mais divergente entre os já relatados em humanos. Um novo genótipo, designado G, foi descrito em 2000 em um estudo com doadores de sangue na França e nos Estados Unidos (Stuyver et al., 2000). Mais recentemente, um estudo evidenciou um novo subgrupo de isolados muito relacionado filogeneticamente ao genótipo F que foi denominado como genótipo H (Arauz-Ruiz et al., 2002).

Não há uma correlação direta entre os genótipos e subtipos, pois alguns subtipos podem ser encontrados em mais de um genótipo diferente. É o caso do subtipo *adw2*, que é encontrado nos genótipos A, B, C e G, e o subtipo *ayw1*, que é encontrado nos genótipos A e B. O subtipo *adw4*, que, até recentemente, era exclusivo do genótipo F, foi observado, através da análise de aminoácidos da região S, em cepas pertencentes ao genótipo H.

Os genótipos do HBV apresentam diferentes tamanhos de genoma. As cepas dos genótipos B, C, F e H possuem um genoma de 3.215 pb. Os isolados do genótipo D possuem um genoma de 3.182 pb devido a uma deleção de 33 nucleotídeos na região pre-S1. Os genótipos E e G, cujos genomas correspondem a

3.212 pb e 3.248 pb, respectivamente, possuem uma deleção de três nucleotídeos no gene da polimerase. Além disso, o genótipo G apresenta uma inserção de 36 nucleotídeos na porção N-terminal do gene do core, fazendo com que este seja o maior genoma dentre os isolados de HBV (Stuyver et al., 2000). O genótipo A varia dos demais genótipos por uma inserção de seis nucleotídeos na porção N-terminal do gene da polimerase (inserção que afeta também o gene do core sobreposto).

Devido a uma grande diversidade intra-genotípica, alguns genótipos foram mais recentemente divididos em subgenótipos. Foi o caso dos genótipos A (subgenótipos A1, A2 e A3) (Bowyer et al., 1997; Kramvis et al., 2002, Kurbanov et al., 2005), B (B1, B2, B3 e B4) (Sugauchi et al., 2004a), C (C1, C2 e C3) (Huy et al., 2004), D (D1, D2, D3 e D4) (Norder et al., 2004) e F (F1a, F1b, F2, F3, F4) (Devesa et al., 2004).

Os genótipos do HBV apresentam uma distribuição geográfica característica nas diferentes regiões do mundo (Figura 8). Os genótipos A e D são bastante difundidos no mundo, embora o genótipo D seja relativamente raro no Norte da Europa e EUA. Pouco se sabe sobre a distribuição do genótipo G, tendo sido este já encontrado na Europa, EUA e no Japão. Os genótipos B e C são encontrados essencialmente na Ásia. O genótipo E é encontrado na África subsaariana e em casos raros, na França e Grã-Bretanha, devido provavelmente à imigração. O genótipo F é encontrado principalmente nas Américas do Sul e Central, sendo originário das populações ameríndias. O genótipo H é encontrado na América Central e no Sul dos EUA. Os subgenótipos do HBV também apresentam uma distribuição global diferenciada. O subgenótipo A1 (ou Aa) é encontrado principalmente na África e Ásia enquanto que o subgenótipo A2 (ou Ae) se encontra distribuído pela Europa e América do Norte (Sugauchi et al., 2004b). Já o subgenótipo B1 (Bj) é encontrado somente no Japão e B2 (Ba) está distribuído no restante da Ásia (Sugauchi et al., 2004a). A Tabela 2 apresenta a correlação entre os genótipos, subgenótipos, subtipos e as regiões geográficas onde estes grupos são encontrados.

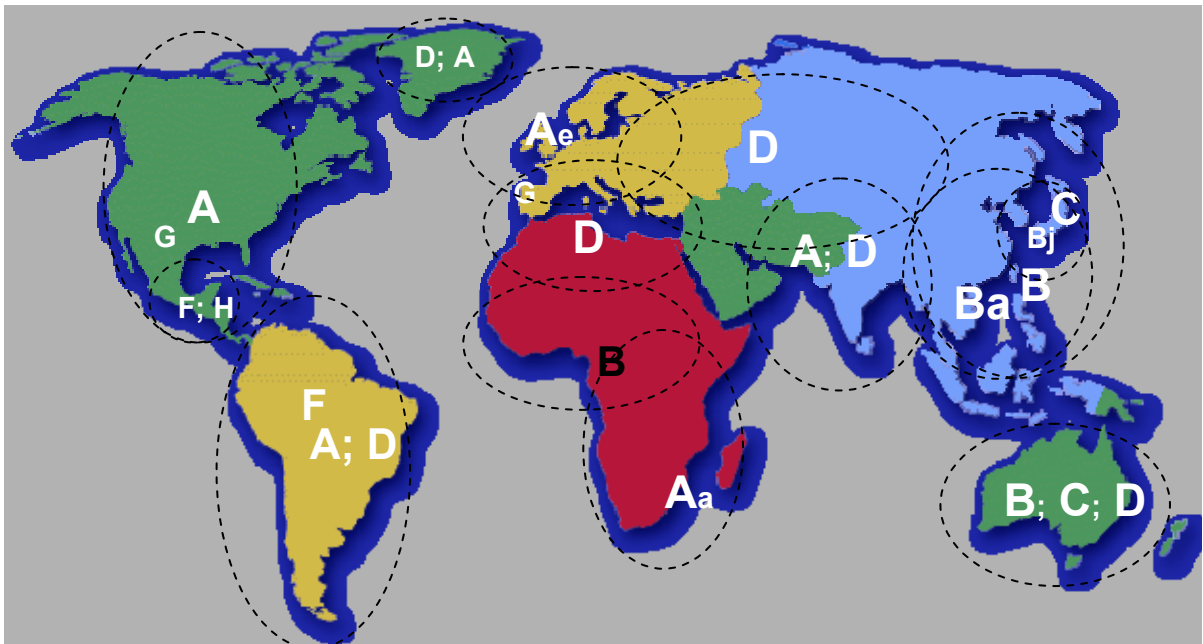


Figura 8: Distribuição Global dos Genótipos e Subgenótipos do HBV. Disponível em <http://web.ucsf.edu/sfbc/elective/2005/fall/Virology_Bass.ppt> [acesso em 21 junho 2008].

Tabela 2: Características dos Genótipos do HBV (Fonte: Adaptado de Kay & Zoulim, 2007).

Genótipo	Subgenótipo	Subtipo	Distribuição Geográfica	Genoma (pb)
A	A1 (Aa)	<i>adw2, ayw1</i>	África, Ásia, Brasil	3221
	A2 (Ae)	<i>adw2, ayw1</i>	Norte da Europa e EUA	
B	B1 (Bj)	<i>Adw2</i>	Japão	3215
	B2 (Ba)	<i>adw2, adw3</i>	Ásia	
	B3	<i>adw2, ayw1</i>	Indonésia, China	
	B4	<i>ayw1, adw2</i>	Vietnam, Cambodia	
C	C1	<i>adrq+, ayr, adw2, ayw1</i>	Leste Asiático	3215
	C2	<i>adrq+, ayr</i>	Leste Asiático	
	C3	<i>adrq-, adrq+</i>	Ilhas do Pacífico	
D	D1	<i>ayw2, adw1, ayw1</i>	Europa, Egito, Índia, Ásia	3182
	D2	<i>ayw3, ayw1</i>	Europe, Japão	
	D3	<i>ayw3, ayw2, ayw4</i>	Europa, Ásia, África do Sul, EUA	
	D4	<i>ayw2, ayw3</i>	Austrália, Japão, Nova Guiné	
E		<i>ayw4, ayw2</i>	África subsaariana, Reino Unido, França	3212
F	Fla	<i>adw4, ayw4</i>	América Central	3215
	F1b	<i>Adw4</i>	Argentina, Japão, Venezuela, EUA	
	F1I	<i>Adw4</i>	Brasil, Venezuela, Nicarágua	
	F1II	<i>Adw4</i>	Venezuela, Panamá, Colômbia	
	F1V	<i>Adw4</i>	Argentina, Bolívia, França	
G		<i>Adw2</i>	EUA, Alemanha, Japão, França	3248
H		<i>Adw4</i>	EUA, Japão, Nicarágua	3215

No Brasil, um país com dimensões continentais e com uma população altamente miscigenada, os genótipos mais prevalentes são A, D e F (Moraes et al., 1996; Teles et al., 1999; de Castro et al., 2001; Araujo et al., 2004). Recentemente, Mello e colaboradores analisaram amostras de soro HBsAg positivas de 303 doadores de sangue das cinco regiões geográficas do Brasil (Mello et al., 2007).

Este estudo mostrou uma maior prevalência no país do genótipo A (48,5%), com um predomínio do subgenótipo de origem africana A1 (138/153; 90.2%), corroborando os resultados obtidos em um estudo anterior (Araujo et al., 2004) (Figura 9).

A presença destes três genótipos é um reflexo da formação da população brasileira. O subgenótipo de origem africana A1, foi provavelmente introduzido no Brasil através do tráfico de escravos africanos, ocorrido entre os séculos XVI e XIX. A alta prevalência do genótipo D no Sul do Brasil, bem como a presença do subgenótipo de origem européia A2, podem ser relacionados ao fluxo de imigrantes europeus, provenientes principalmente da Itália e Alemanha, ocorrido no início do século XX. Por fim, o genótipo F, característico das populações ameríndias, seria originário da população nativa do Brasil [Mello et al., 2007].

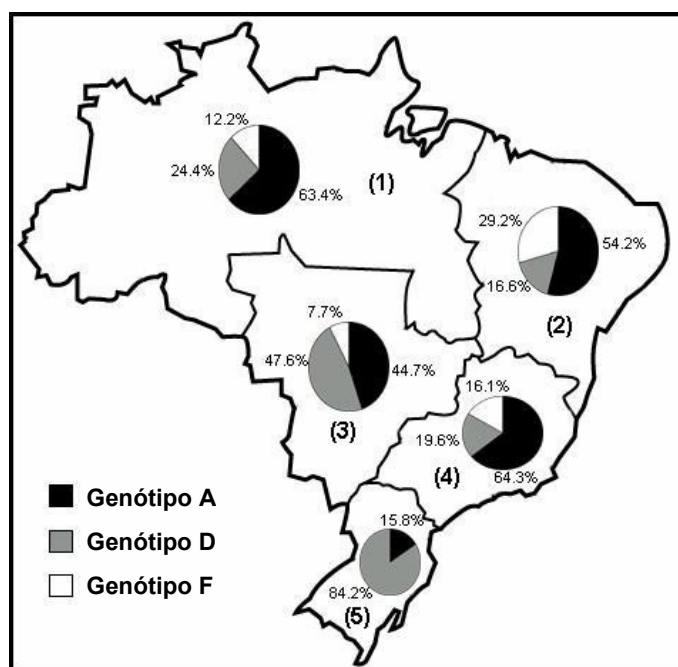


Figura 9: Distribuição dos Genótipos do HBV nas Cinco Regiões do Brasil (Fonte: Mello et al., 2007- Figura adaptada para o português).

1.14 – A Proteína S do HBsAg

1.14.1 – Estrutura da Proteína S do HBsAg

A proteína S é uma glicoproteína de 226 aminoácidos e é o principal componente do HBsAg. Ela se encontra ancorada à membrana do retículo

endoplasmático, provavelmente através de quatro segmentos transmembrânicos (Figura 10). O primeiro segmento (TM1), localizado na porção amino-terminal da proteína (resíduos 4 a 24), é seguido por (i) um “loop” citosólico (resíduos 24 a 80) englobando um epítipo para células T (Chisari & Ferrari, 1995), (ii) o segmento TM2 (resíduos 81 a 100), e (iii) um “loop” antigênico (resíduos 101 a 164), voltado para o lúmen do retículo endoplasmático, que contém o principal epítipo para células B, denominado determinante *a* (resíduos 124 à 147) (Gavilanes et al., 1982). A topologia da porção carboxi-terminal da proteína S (resíduos 165 a 226) não é ainda precisamente conhecida. Acredita-se que este domínio possua dois segmentos transmembrânicos (TM3 e TM4) localizados nas posições 173 a 193 e 202 a 222, respectivamente, sendo separados por um segundo “loop” citosólico (resíduos 194 a 201) (Persson & Argos, 1994).

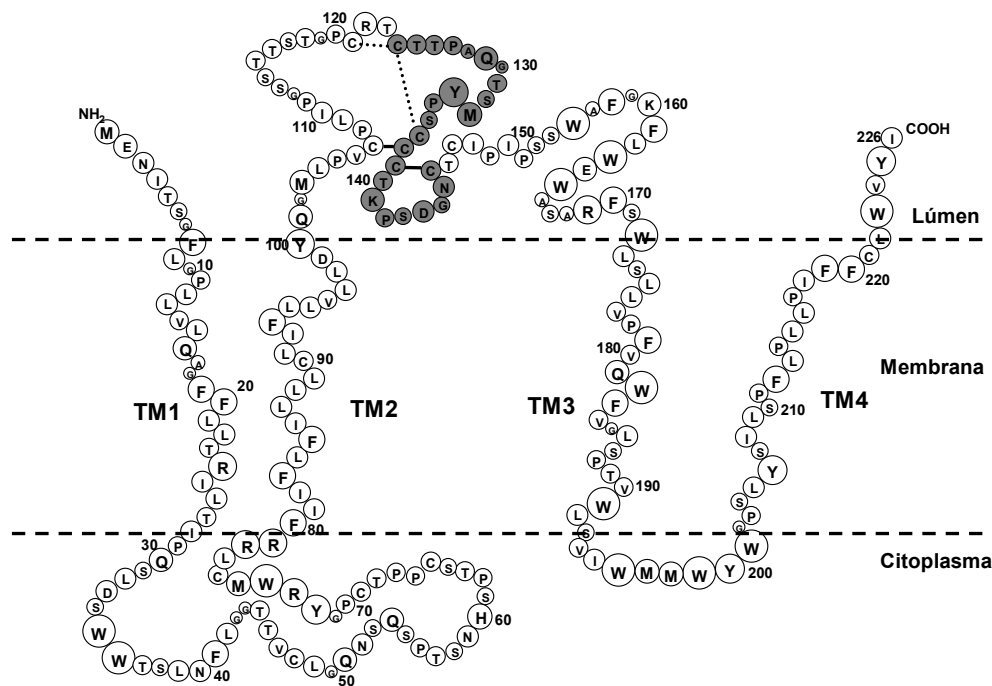


Figura 10: Esquema da estrutura do HBsAg. Os aminoácidos marcados em cinza correspondem ao determinante antigênico *a*. (Fonte: Jeantet et al., 2002 - Figura adaptada para o português).

1.14.2 – Variabilidade Genética da Proteína S do HBsAg

O primeiro estudo com o objetivo de estimar a taxa de mutação do HBV foi realizado por Okamoto e colaboradores (1987b). Através da comparação de diferentes clones isolados do soro de uma mulher de 54 anos, infectada pela via de transmissão vertical, a taxa de mutação do HBV foi estimada entre 1,4 e $3,2 \times 10^{-5}$ substituições por sítio/ano. Esta taxa de mutação é mais alta do que em vírus de DNA e mais próxima a certos vírus de RNA.

A taxa de substituições *in vivo* depende de vários fatores, relativos ao HBV (genoma compacto e replicação por transcrição reversa), ao seu hospedeiro (resposta imune) e a fatores externos (tratamentos antivirais) (Kidd-Ljunggren et al., 2002). O genoma compacto do HBV, onde as quatro fases de leitura estão parcialmente sobrepostas, restringe o número de mutações que ocorrem naturalmente durante a replicação viral. A ocorrência de uma mutação em uma determinada fase de leitura, por exemplo, na pre-S/S, pode gerar uma mutação na fase de leitura sobreposta, no caso o gene da polimerase, que poderá afetar a viabilidade da replicação viral (Chen & Oon, 1999). Por um outro lado, a estratégia de replicação através de transcrição reversa, utilizando-se uma RNA polimerase que não possui atividade de reparação de erro (“proof reading”), como as DNA polimerases, contribui para um aumento nas taxas de mutação do genoma do HBV.

As vacinas contra o HBV disponíveis são compostas exclusivamente de HBsAg recombinante. O HBsAg possui uma região antigênica denominada determinante *a* (resíduos 124 a 147), que tem a capacidade de induzir resposta imunológica protetora contra o HBV, e contra a qual os anticorpos neutralizantes são direcionados. Além disso, o determinante *a* é o principal alvo dos testes de detecção para o HBsAg.

Algumas variações específicas de aminoácidos dentro ou próximas desta região do HBsAg estão associadas aos genótipos do HBV. A influência dos diferentes genótipos na sensibilidade de ensaios sorológicos de detecção do HBsAg tem sido pouco investigada, sobretudo com respeito ao genótipo F, o qual é encontrado somente nas Américas do Sul e Central. Entretanto, dados mostrando uma influência dos diferentes genótipos na sensibilidade dos ensaios de detecção do HBsAg, têm sido relatados (Weber, 2005).

Mutações não relacionadas aos genótipos na região do determinante *a* podem resultar em alterações na antigenicidade do HBsAg, dificultando o

reconhecimento de tais mutantes pelos anticorpos neutralizantes (anti-HBs). Em um estudo realizado por Oon e colaboradores (1995) em Singapura, foram identificadas mutações em várias posições do determinante antigênico *a* do HBsAg, em 41 crianças infectadas pelo HBV, que tinham sido vacinadas previamente para o HBV. Estas mutações incluem a G145R (primeira mutação descrita de escape da vacina – Carman et al., 1990), D144A, M133L, Q129H e I/T126A. Estas mutações resultam em uma mudança de antigênicidade do HBsAg, diminuindo a afinidade deste antígeno ao anticorpo neutralizante anti-HBs. A emergência de cepas mutantes de escape à vacina também foi confirmada no Japão (Miyake et al., 1996), China (He et al., 1998), Espanha (Wallace et al., 1994), Gâmbia (Fortuin et al., 1994) e Alemanha (Zuckerman et al., 1994).

Por um outro lado, algumas mutações de aminoácidos na proteína S têm sido relacionadas à inibição ou diminuição da secreção de vírions (G145R, Kalinina et al., 2003), de partículas incompletas de HBsAg (R79K, Blanchet and Sureau, 2006) ou de ambos (L77R, Chua et al., 2005; R169P, Khan et al., 2004). Resíduos de cisteína localizados nas posições 48, 65, 69 e 107 do HBsAg têm sido descritas como essenciais para a secreção de partículas incompletas de HBsAg (Mangold & Streeck, 1993). Além disso, Jenna & Sureau (1999) mostraram que deleções na porção carboxi-terminal do HBsAg também geram uma inibição da secreção dessas partículas.

1.14.3 – Hepatite B Oculta

O desenvolvimento de ensaios de PCR mais sensíveis tem permitido a detecção do DNA do HBV no soro e/ou fígado de pacientes negativos para o HBsAg. A detecção do DNA do HBV em pacientes com sorologia negativa para o HBsAg caracteriza a ocorrência de infecção oculta pelo HBV (Hu et al., 2002). A hepatite B oculta é um tema que preocupa pesquisadores do mundo inteiro. Este tipo de infecção é frequentemente observado em pacientes de hemodiálise e pacientes infectados pelo HCV (Torbenon & Thomas, 2002). Muitas questões são levantadas, como o impacto clínico da infecção oculta e o impacto da infecção oculta na transmissão do vírus. A possibilidade de contaminação e disseminação destes vírus causadores de infecções ocultas não pode ser desprezada. As seguintes causas para a falta de detecção do HBsAg podem ser: a) Ocorrência de baixos níveis de replicação do vírus ocasionando produção insuficiente de HBsAg para a detecção

em ensaios sorológicos; b) Presença de mutações que possam diminuir a afinidade do HBsAg pelos testes comerciais de diagnóstico; c) Possível inibição da secreção do HBsAg em cultura de células e a identificação de mutações que possam ser responsáveis por esta retenção intracelular do antígeno (Carman, 1997; Kalinina et al., 2003; Jeantet et al., 2004).

Por terem as mesmas vias de transmissão, a co-infecção HBV/HIV é comum. Evidência sorológica de infecção presente ou passada pelo HBV é encontrada em até 90% dos indivíduos infectados pelo HIV e cerca de 10% destes pacientes estão cronicamente infectados pelo HBV (Tsu et al., 1993; Thio & Locarnini, 2007). A co-infecção com o HIV resulta em uma considerável modificação da história natural da infecção pelo HBV, principalmente através do impacto que esta infecção causa ao sistema imune. A co-infecção HIV/HBV está associada com o aumento da taxa de cronicidade da hepatite B, com altos níveis de replicação do HBV, uma baixa taxa de soroconversão para anti-HBe e anti-HBs e com níveis mais baixos de ALT. A atividade necro-inflamatória nestes pacientes é mais baixa, entretanto, a progressão para cirrose é mais rápida e a mortalidade relacionada à doença hepática é mais alta do que na monoinfecção pelo HBV (Puoti et al., 2006; Thio & Locarnini, 2007). Além disso, três medicamentos que fazem parte da HAART (lamivudina, tenofovir e emtricitabina) são potentes inibidores da replicação do HBV.

Os dados sobre a hepatite B oculta em pacientes HIV positivos são bastante divergentes, com relatos de prevalência variando de 0 a 89% (Hofer et al., 1998; Núñez et al., 2002; Nebbia et al., 2007). Diferenças na composição das populações estudadas, bem como na sensibilidade dos ensaios utilizados, podem ser a razão para tal divergência nos valores. Estudos realizados no Brasil, mostraram uma prevalência de infecção oculta em pacientes infectados pelo HIV e com sorologia positiva para anti-HBc de 16% e 19% (Santos et al., 2003; Sucupira et al., 2006).

1.14.4 – HBsAg como Apresentador de Epítopos Exógenos - Enfoque HCV

O HBsAg é expresso em altos níveis pelas células infectadas e tem a capacidade de se auto-organizar formando partículas virais sem nucleocapsídeo (partículas subvirais ou incompletas), contendo apenas o envelope lipoprotéico (Laub et al., 1983). Cada partícula de HBsAg é composta por 100 a 150 sub-unidades da proteína S. Devido ao seu alto potencial imunogênico, partículas de HBsAg estão sendo empregadas para carrear e apresentar epítopos de diversos agentes

infecciosos, tais como o *Clostridium tetani* (Chengalvala et al., 1999), a glicoproteína D do *Herpes simplex* (Valenzuela et al., 1985), proteína do capsídeo do poliovírus (Delpeyroux, et al., 1986), antígenos derivados do parasito da malária (Von Brunn et al., 1991), vírus da dengue (Bisht, et al., 2002) e HIV (Michel et al., 2007).

A infecção pelo HCV atinge cerca de 2 a 3% da população mundial. Mais de 70% das infecções pelo HCV se tornam crônicas, sendo que destas, 5 a 20% progride para cirrose e carcinoma hepatocelular (Jin et al., 2002). Sendo um vírus identificado apenas em 1989 (Choo et al., 1989), acredita-se que um considerável número de indivíduos ainda desconheça o seu estado de portador crônico para esta infecção. Até o momento, não existe uma vacina disponível contra a infecção pelo HCV e o tratamento com drogas antivirais, são eficazes em apenas 40% dos pacientes (Fried & Sambrook, 1995).

O HCV é um vírus que apresenta semelhanças em relação à sua estrutura e organização genômica, como os pestivírus e flavivírus, sendo classificado como um novo gênero *Hepacivirus*, dentro da família *Flaviviridae* (Robertson et al., 1998).

O HCV é entre os vírus de importância clínica que infectam o homem, um dos que possuem a maior taxa de mutação, existindo dentro de um indivíduo como *quasiespecies* (Martell et al., 1992). Atualmente o HCV é dividido em seis genótipos (1 a 6) e múltiplos subtipos, os quais apresentam diferenças significativas com relação à prevalência global, alguns com distribuição mundial, outros mais restritos a certas regiões (Bukh et al., 1997). No Brasil, os poucos estudos realizados nesta área têm demonstrado uma maior prevalência para os genótipos 1, 2 e 3 (Bassit et al., 2000; Espírito-Santo et al., 2007).

O HCV é um vírus envelopado cujo genoma é formado por um filamento simples de RNA de polaridade positiva, contendo aproximadamente 9.400 nucleotídeos. O RNA viral possui uma longa fase de leitura aberta que codifica para uma poliproteína precursora de cerca de 3.000 aminoácidos (Choo et al., 1991). Mais de 10 proteínas diferentes são codificadas a partir do genoma do HCV, como resultado do processamento proteolítico co- e pós-traducional da poliproteína precursora. Este processamento depende de enzimas codificadas pelo genoma viral (proteínases NS3 e NS2-NS3) e da célula hospedeira (signalase ou peptidase-sinal). As proteínas estruturais – proteína do capsídeo ou core (C), glicoproteínas do envelope 1 (E1) e envelope 2 (E2) – estão localizadas na extremidade amino-terminal, e as proteínas não-estruturais – NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b – estão localizadas na extremidade carboxi-terminal da poliproteína (Grakoui et al., 1993).

Em estudos com o HCV, mostrou-se que a apresentação de epítomos da região do core (Major et al., 1995; Geissler et al., 1998) e do envelope E2 (Netter et al., 2001; Jin et al., 2002) é muito mais eficiente quando estas se encontram fusionadas ao HBsAg. As glicoproteínas do envelope E1 e E2 do HCV apresentam domínios altamente variáveis em suas seqüências quando comparados entre diferentes isolados. Na extremidade N-terminal da proteína E2 há uma região caracterizada por um elevado grau de variabilidade chamada região hipervariável 1 (HVR1), importante na neutralização do HCV (Bukh et al., 1997; Drazan, 2000). Contudo, a alta variabilidade deste fragmento antigênico desempenha um papel fundamental no mecanismo de escape viral da resposta imune do hospedeiro e representa o maior obstáculo no desenvolvimento de uma vacina contra o HCV (Forns et al., 2002).

2 – JUSTIFICATIVA

O HBsAg tem um papel fundamental no diagnóstico e prevenção da hepatite B. Este antígeno é o marcador sorológico indicativo de infecção presente pelo HBV, bem como, o único componente da vacina contra o HBV. A presente tese consiste em quatro estudos nos quais a expressão do HBsAg *in vitro* e a sua detecção por ensaios imunoenzimáticos são avaliados em diferentes contextos.

O primeiro artigo aborda a questão da infecção oculta pelo HBV em pacientes infectados pelo HIV. A hepatite B oculta é um tema que preocupa pesquisadores do mundo inteiro. Muitas questões são levantadas, como o impacto clínico da infecção oculta e o impacto da infecção oculta na transmissão do vírus. A importância clínica da hepatite B oculta em pacientes infectados pelo HIV se deve principalmente a possibilidade de reativação da infecção pelo HBV após baixa da imunidade ou após interrupção do tratamento com lamivudina. Dados sobre a prevalência da hepatite B oculta em pacientes HIV positivos são bastante divergentes, com valores variando de 0 a 89%.

O segundo e o terceiro artigo analisam a influência de variações de aminoácidos relacionadas ou não aos genótipos do HBV nos níveis de detecção e secreção do HBsAg. O principal epítipo para células B do HBsAg, o determinante a, engloba um total de 24 aminoácidos, e é o alvo dos testes de detecção para o HBsAg. Algumas variações específicas de aminoácidos nesta região da proteína estão associadas aos genótipos do HBV. A influência dos diferentes genótipos na sensibilidade de ensaios sorológicos de detecção do HBsAg tem sido pouco investigada, sobretudo com respeito ao genótipo F, o qual é encontrado somente nas Américas do Sul e Central. Por um outro lado, tem sido demonstrado que mutações não relacionadas aos genótipos na região do determinante a podem resultar em alterações na antigenicidade do HBsAg, dificultando o reconhecimento de tais mutantes pelos testes comerciais de detecção. Além disso, mutações no HBsAg relacionadas à inibição ou diminuição da secreção deste antígeno pelas células infectadas têm sido também descritas.

O quarto estudo desta tese, consiste em uma minuta de pedido de patente, que se refere à construção de plasmídeos recombinantes que permitem a obtenção de um alto rendimento de HBsAg expresso *in vitro*, bem como a inserção de antígenos exógenos para a obtenção de imunógenos bivalentes. O estudo contempla ainda a construção e expressão de partículas quiméricas de HBsAg

fusionadas a um peptídeo do envelope do HCV. Partículas híbridas de HBsAg, também denominadas quimeras, têm-se revelado em diferentes experimentos de imunização como proteínas bastante eficientes na apresentação de epítomos virais. Em estudos com o HCV, mostrou-se que a apresentação de epítomos da região do core e do envelope E2 é muito mais eficiente quando estas se encontram fusionadas ao HBsAg. Até o momento, não existe uma vacina disponível contra a infecção pelo HCV e o tratamento com drogas antivirais, é eficaz em apenas 40% dos pacientes.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

- Realizar estudos de expressão *in vitro* do HBsAg de casos de infecção oculta pelo HBV; de diferentes genótipos; e de partículas quiméricas de HBsAg e HCV.

3.2 – Objetivos Específicos

Artigo 1:

- Avaliar a prevalência de infecção oculta pelo HBV em amostras sorológicas de pacientes infectados pelo HIV, do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC – FIOCRUZ), com sorologia negativa para o HBsAg e sorologia positiva para anti-HBc.
- Investigar as possíveis causas de infecção oculta para o HBV nestes pacientes através de ensaios de transfecção transitória em células eucarióticas que expressam o HBsAg produzido por estas variantes.

Artigo 2:

- Construir plasmídeos de expressão contendo as regiões genômicas das proteínas M e S do envelope do HBV dos genótipos A, D e F circulantes no Brasil.
- Comparar os níveis de detecção do HBsAg entre os genótipos A, D e F e entre as formas protéicas M e S.

Artigo 3:

- Avaliar a influência de uma mutação, identificada no HBsAg de um isolado do genótipo F, nos níveis de secreção deste antígeno por células transfectadas.
- Comparar os níveis de expressão e secreção do HBsAg entre duas células eucarióticas amplamente utilizadas em ensaios de expressão do HBsAg.

Minuta de Patente:

- Caracterizar a seqüência nucleotídica e produtos de expressão de isolados do HBV e identificar formas de HBsAg adequadas para serem utilizadas como agentes imunogênicos.
- Construir partículas híbridas de HBsAg para apresentação de antígenos do HCV utilizando-se sítios naturais de restrição no gene do HBsAg como sítios de inserção para os fragmentos do HCV.

4 – RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente tese serão apresentados sob forma de artigos científicos ou minuta de pedido de patente, e serão listados a seguir na ordem em que serão discutidos.

1. Araujo NM, Branco-Vieira M, Silva AC, Pilotto JH, Grinsztejn B, de Almeida AJ, Trepo C, Gomes SA 2008. Occult Hepatitis B Virus Infection in HIV-Infected Patients: Evaluation of Biochemical, Virological and Molecular Parameters. *Hepatology Research*. Artigo aceito para publicação.
2. Araujo NM, Vianna COA, Moraes MTB, Gomes SA. Influence of amino acid variations linked or not to hepatitis B virus genotypes on the detection of hepatitis B virus surface antigen. Manuscrito submetido para publicação.
3. Araujo NM, Vianna COA, Soares CC, Gomes SA 2008. A Unique Amino Acid Substitution, L215Q, in the Hepatitis B Virus Small Envelope Protein of a Genotype F Isolate That Inhibits Secretion of Hepatitis B Virus Subviral Particles. *Intervirology* 51: 81–86.
4. Vetores de expressão do gene de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) que permitem a inserção de epítomos de outros agentes infecciosos em região estratégica do HBsAg: Modelo – Produção de quimeras do HBsAg com a região hipervariável 1 da proteína E2 do vírus da hepatite C.

Artigo 1. Araujo NM, Branco-Vieira M, Silva AC, Pilotto JH, Grinsztejn B, de Almeida AJ, Trepo C, Gomes SA 2008. Occult Hepatitis B Virus Infection in HIV-Infected Patients: Evaluation of Biochemical, Virological and Molecular Parameters. *Hepatology Research*. Artigo aceito para publicação.

Artigo 2. Araujo NM, Vianna COA, Moraes MTB, Gomes SA. Influence of Amino Acid Variations Linked or not to Hepatitis B Virus Genotypes on the Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen. Manuscrito submetido para publicação na revista Virus Genes.

Artigo 3. Araujo NM, Vianna COA, Soares CC, Gomes SA 2008. A Unique Amino Acid Substitution, L215Q, in the Hepatitis B Virus Small Envelope Protein of a Genotype F Isolate That Inhibits Secretion of Hepatitis B Virus Subviral Particles. *Intervirology* 51: 81–86.

Minuta para pedido de patente: Vetores de expressão do gene de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) que permitem a inserção de epítopos de outros agentes infecciosos em região estratégica do HBsAg: Modelo – Produção de quimeras do HBsAg com a região hipervariável 1 da proteína E2 do vírus da hepatite C.

5 – DISCUSSÃO

O HBsAg é o principal marcador sorológico para o diagnóstico da infecção aguda ou crônica pelo HBV. A falta de detecção do HBsAg no soro é considerada um indicativo de ausência de replicação viral (Weber, 2005). Entretanto, o desenvolvimento de ensaios de PCR mais sensíveis tem permitido a detecção do DNA viral em soros de pacientes negativos para o HBsAg (Raimondo et al., 2007). A detecção do DNA do HBV no soro e/ou fígado de pacientes com sorologia negativa para o HBsAg caracteriza a ocorrência de infecção oculta pelo HBV (Hu, 2002).

A ausência de detecção do HBsAg em ensaios sorológicos comerciais tem sido atribuída a diferentes fatores, tais como, 1- baixo nível de replicação viral e ausência de partículas virais suficientes no soro para permitir a detecção pelos testes de diagnóstico; 2- presença de múltiplas mutações no gene do HBsAg, principalmente na região do determinante antigênico *a* (resíduos 124 a 147) que acarretam em alterações conformacionais do antígeno dificultando o seu reconhecimento pelos testes, como é o caso dos mutantes de escape à vacina; 3- ocorrência de mutações no gene do HBsAg que levam à inibição da secreção deste antígeno pelas células infectadas (Carman, 1997; Kalinina et al., 2003; Jeantet et al., 2004).

No primeiro artigo, intitulado “Occult Hepatitis B Virus Infection in HIV-Infected Patients: Evaluation of Biochemical, Virological and Molecular Parameters” analisou-se a prevalência da infecção oculta pelo HBV, bem como, os fatores associados a este tipo de infecção, em pacientes HIV positivos. Por terem as mesmas vias de transmissão, a co-infecção HBV/HIV é comum. Evidência sorológica de infecção presente ou passada pelo HBV é encontrada em até 90% dos indivíduos infectados pelo HIV (Twu et al., 1993). No Brasil, as informações sobre a prevalência de HBsAg em pacientes HIV positivos é ainda limitada. Os poucos dados disponíveis descrevem uma prevalência variando de 3.7 a 24.3% (Treitinger et al., 1999; Pavan et al., 2003; Santos et al., 2003; Monteiro et al., 2004; Souza et al., 2004; de Almeida-Pereira et al., 2006).

Os dados sobre a prevalência de hepatite B oculta em pacientes HIV positivos são bastante divergentes, variando de 0 a 89% (Hofer et al., 1998; Núñez et al., 2002). Esta alta divergência se deve provavelmente a diferenças na composição da população estudada e na sensibilidade dos métodos de detecção do DNA do HBV. Neste nosso trabalho, foi encontrada uma prevalência de 14% de infecção oculta

pelo HBV em pacientes infectados pelo HIV e com sorologia positiva para anti-HBc. Esta prevalência foi similar às demais encontradas em trabalhos anteriores com pacientes HIV positivos do Rio de Janeiro (16%, Santos et al., 2003, e 19%, Sucupira et al., 2004).

A importância clínica da hepatite B oculta em pacientes infectados pelo HIV se deve principalmente a possibilidade de reativação da infecção pelo HBV após baixa da imunidade ou após interrupção do tratamento com lamivudina (Hino et al., 2002; Altfeld et al., 1998). Alguns estudos têm demonstrado correlação entre hepatite B oculta e aumento dos níveis de ALT nesses pacientes (Hofer et al., 1998; Filippini et al., 2006). Entretanto, no nosso estudo e em outros dois (Shire et al., 2004; Nebbia et al., 2007), tal correlação não foi observada.

A infecção pelo HCV é um fator de inibição da replicação do HBV (Rodríguez-Iñigo et al., 2005) e conseqüentemente, da produção de HBsAg. A presença de infecção pelo HCV tem sido associada com a ocorrência de infecção oculta pelo HBV em pacientes HIV negativos (Torbenson & Thomas, 2002). No nosso trabalho, uma associação estatisticamente significativa entre a infecção pelo HCV e hepatite B oculta em pacientes HIV positivos, foi observada.

Uma baixa carga viral do HBV ($\leq 10^4$ cópias/ml) e mutações no HBsAg foram encontradas em cinco e dois, respectivamente, dos seis pacientes que apresentaram hepatite B oculta no nosso estudo. A carga viral mais alta observada foi de 1.2×10^6 cópias/ml, que apesar de ser substancial, é ainda baixa, quando comparada com os títulos de 10^8 a 10^{11} cópias/ml encontrados normalmente nos pacientes crônicos (Chemin & Trepo, 2005). As seqüências do HBsAg do paciente com maior carga viral para o HBV exibiram a mutação R79H e uma mutação de códon de parada da tradução (L216*). O HBsAg mutante não pôde ser detectado por ELISA no meio de cultura e nem no extrato celular, após os ensaios de transfeção. Ambas as mutações foram previamente descritas e associadas à falta de detecção do HBsAg por ELISA e à uma detecção fraca por Western blot (Märschenz et al., 2006).

A rara mutação tripla de resistência à lamivudina foi encontrada em um outro paciente deste estudo, que estava sob tratamento antiretroviral desde 2003. Isolados de HBV resistentes à lamivudina já foram previamente detectados em 50% dos pacientes com infecção oculta pelo HBV e co-infectado pelo HCV (Besisik et al., 2003) e em 31% dos pacientes com infecção oculta pelo HBV e co-infectado pelo HIV (Selabe et al., 2007). A tripla mutação de resistência à lamivudina causa concomitantemente as substituições E164D e I195M no HBsAg, como o resultado

das fases de leitura sobrepostas da polimerase e do envelope viral (Locarnini, 1998). Torresi e colaboradores (2002) demonstraram que ambas as mutações E164D e I195M reduzem a afinidade do HBsAg *in vitro* pelos anticorpos ant-HBs. Esse resultado foi corroborado pelo nosso estudo, uma vez que o HBsAg mutado E164D/I195M foi muito pouco ou não foi detectado pelo ensaio comercial utilizado. Além disso, a mutação Y100C, previamente encontrada em 4/10 doadores de sangue com hepatite B oculta na Venezuela (Gutiérrez et al., 2004), foi detectada em todos os clones contendo as seqüências de HBsAg desses dois pacientes.

Além de mutações que isoladamente podem afetar a detecção do HBsAg pelos ensaios comerciais, a influência dos diferentes genótipos do HBV (que correspondem a um conjunto específico de variações de aminoácidos) na sensibilidade dos testes de detecção, tem sido analisada.

Em termos de variabilidade genética, há uma distinção entre os genótipos do HBV e os isolados mutantes. Os diferentes genótipos são formas estáveis do vírus resultantes de variações randômicas selecionadas ao longo dos anos. Por um outro lado, os mutantes surgem a partir de pressões seletivas oriundas de tratamento antiviral, vacina ou terapia com imunoglobulina (Weber, 2005).

A possível influência dos diferentes genótipos do HBV na detecção do HBsAg provavelmente se deve a presença de determinadas variações de aminoácidos, dentro ou próximas do determinante a, que são características de cada genótipo, tais como as substituições em resíduos não conservados nas posições 110, 114, 118, 122, 127, 131, 134, 140, 143, 158, 159 e 161 (Magnius & Norder, 1995; Schaefer, 2005). A sensibilidade de quatro testes comerciais para a detecção do HBsAg dos genótipos A a F foi previamente testada. Os resultados mostraram falha de um dos testes em detectar os genótipos A a D e F, e de outro teste em detectar o genótipo F, ambos na concentração de 0.1 e 0.5 ng/ml (Weber, 2005).

No manuscrito intitulado "Influence of Amino Acid Variations Linked or not to Hepatitis B Virus Genotypes on the Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen", plasmídeos contendo as regiões genômicas representando o consenso ou formas variantes das duas proteínas de envelope do HBV (M e S) dos genótipos A, D e F, foram construídos e transfectados em células CHO.

Os níveis de HBsAg detectado no meio de cultura e no extrato celular foram avaliados por um teste de ELISA comercial. O ELISA utilizado aqui, diferentemente da maioria dos ensaios comerciais de detecção do HBsAg, utiliza anticorpos policlonais tanto para a detecção como para a captura do antígeno. Um estudo

anterior, que comparou a sensibilidade de sete ensaios comerciais, incluindo o do nosso estudo, para alguns HBsAg mutantes, revelou uma melhor sensibilidade dos testes que utilizam anticorpos policlonais, em relação aos monoclonais (Ireland et al. 2000).

Níveis detectáveis de HBsAg foram observados para todas as construções plasmidiais. Entretanto, os valores de detecção de HBsAg variaram entre as diferentes construções. Culturas de células transfectadas com os plasmídeos codificando a proteína M apresentaram níveis mais altos de detecção do HBsAg do que com as respectivas formas S. Isto pode ser explicado pela presença de anticorpos policlonais no teste de detecção utilizado. As proteínas M teriam sido capturadas e detectadas por anticorpos gerados pelas regiões pre-S2 e S, enquanto que as proteínas S, somente por anticorpos anti-S, havendo assim, um sinal mais intenso de detecção para as proteínas M.

Uma variação nos níveis de detecção do HBsAg codificado pelos plasmídeos contendo as seqüências consenso da proteína M dos genótipos A, D e F, foi observada. Os genótipos D e F apresentaram uma redução média nos valores de detecção do HBsAg de 37% e 30%, respectivamente, em comparação ao genótipo A. Sugiyama e colaboradores (2006) demonstraram uma correlação entre os genótipos A, B, C e D e níveis de detecção diferenciados de HBsAg no meio de cultura. Neste estudo, os níveis de HBsAg secretado foram mais altos para o genótipo A e mais fracos para o genótipo D, o que foi atribuído a uma maior eficiência de transcrição para o genótipo A em relação aos demais genótipos. Entretanto, neste caso, a expressão do HBsAg foi realizada com plasmídeos contendo o genoma completo do HBV, e assim, os promotores naturais do HBV foram utilizados no processo de transcrição. No nosso estudo, a expressão do HBsAg foi feita a partir do forte promotor de CMV presente no vetor pcDNA3, e, portanto, uma mesma eficiência da transcrição é esperada para todas as construções.

O conjunto de variações de aminoácidos T131N, S143T e G159A; T114S, K122R, P127T, F134Y e Y161F; e I110L, P127L, T140S e F158, são substituições naturais associadas aos genótipos A, D e F, respectivamente. Possivelmente, o conjunto de variações de aminoácidos do genótipo D pôde ter influenciado negativamente a detecção do HBsAg deste genótipo, pelo menos, com relação ao teste imunoenzimático escolhido para este estudo.

Um resultado interessante foi que a presença das únicas substituições T143M e T125M nas proteínas M dos genótipos A e D, respectivamente, alterou consideravelmente os valores de detecção do HBsAg em comparação as formas consenso. Este resultado sugere que uma única mutação pode exercer mais influência na antigenicidade do HBsAg do que o conjunto de aminoácidos característicos de cada genótipo. A substituição T143M, que promoveu uma redução de 44% nos valores médios de detecção do HBsAg da proteína M do genótipo A, foi previamente detectada em crianças vacinadas e não vacinadas (Hsu et al., 1999) e em três indivíduos assintomáticos, sendo um deles vacinado para o HBV (Thakur et al., 2005). Neste último estudo, a variação T143M foi detectada juntamente com o mutante de escape vacinal G145R. Além disso, a falha de alguns testes comerciais em detectar o HBsAg com mutação na posição 143 tem sido relatada (Levicnik-Stezinar, 2004; La'ulu & Roberts, 2006). Entretanto, nestes casos, a mutação identificada foi a T143L.

A outra variação natural no determinante a do HBsAg observada no nosso estudo foi a T125M. De um total de 91 seqüências completas do HBV do genótipo D disponíveis no GenBank, 16 (17,6%) possuíam o resíduo Met na posição 125, enquanto que as 75 seqüências restantes tinham o resíduo Thr. Esta variação representa uma substituição não conservativa, e, portanto, pode influenciar a conformação do determinante a do HBsAg e a ligação do HBsAg com os anticorpos neutralizantes anti-HBs. Um estudo prévio mostrou que a presença desta única mutação T125M não inibe a ligação do HBsAg a anticorpos anti-HBs mono e policlonais (Zheng et al., 2004). No nosso estudo, entretanto, a presença da única substituição T125M na proteína M do genótipo D, gerou um aumento de 34% nos níveis médios de detecção do HBsAg, em comparação a sua respectiva forma M consenso. A presença da substituição T125M no determinante antigênico a do HBsAg provavelmente alterou a sua conformação, promovendo um aumento nos níveis de detecção deste antígeno pelo teste imunoenzimático utilizado neste estudo. Entretanto, estudos para avaliar a influência destas variações na detecção do HBsAg, utilizando o genoma completo do HBV, bem como, diferentes sistemas de expressão e testes comerciais, são necessários.

No terceiro artigo intitulado "A Unique Amino Acid Substitution, L215Q, in the Hepatitis B Virus Small Envelope Protein of a Genotype F Isolate That Inhibits Secretion of Hepatitis B Virus Subviral Particles", foi identificada uma mutação de leucina para glutamina (L215Q) na porção carboxi-terminal da proteína S do HBsAg

de um isolado do genótipo F, responsável por uma considerável inibição da secreção das partículas subvirais de HBsAg. Sabe-se que a retenção intracelular de proteínas pode causar estresse celular (Pahl & Baeuerle, 1995; Wang et al., 1996). Em camundongos transgênicos, a inibição da secreção de HBsAg tem sido associada à ocorrência de dano celular mediado por interferon-gama (Gilles et al., 1992). Além disso, uma associação entre inibição da secreção de HBsAg e hepatite B oculta tem sido proposta (Sengupta et al., 2007).

Neste estudo foi feita a cinética da secreção do HBsAg de genótipo F selvagem e mutante (L215Q) em células CHO e HuH7. Por serem células de hepatoma humano e com isso serem mais próximas do ambiente *in vivo* do HBV, as células HuH7 secretaram níveis de HBsAg até 99 vezes mais altos que as células CHO.

Dentre 1.220 seqüências de HBV disponíveis em bancos de dados, somente duas exibiram uma variação no resíduo 215 do HBsAg. Entretanto, em ambas as seqüências, a variação era de leucina para valina (L215V).

A presença de aminoácidos polares em segmentos de transmembrana parece estar crucialmente envolvida com a retenção de proteínas no retículo endoplasmático (Bonifacino et al., 1991; Sato et al., 2003). Em um estudo prévio, foi mostrado que a deleção de aminoácidos nas posições 214 a 218 do HBsAg, e a posterior substituição nestas posições por resíduos de lisina (aminoácido polar de carga positiva), resultou em uma secreção deficiente de partículas subvirais de HBsAg (Jenna & Sureau, 1999).

No nosso estudo, a substituição de um resíduo não polar de leucina por um resíduo fortemente polar de glutamina no centro do segmento de transmembrana TM4 (posição 215) do HBsAg, deve ter afetado a conformação deste antígeno, gerando possivelmente uma inserção errada do HBsAg no retículo endoplasmático e, conseqüente, retenção intracelular. Mutações que inibem a secreção do HBsAg, como a L215Q descrita neste estudo, podem ter importantes implicações no diagnóstico do HBV.

A partícula de HBsAg é uma estrutura altamente organizada, sendo composta por até 150 moléculas da proteína S, o que confere um elevado grau de imunogenicidade para a partícula. Devido ao seu forte potencial imunogênico, o HBsAg tem sido utilizado com bastante sucesso para carrear e apresentar epítomos de diversos agentes infecciosos, tais como o *Clostridium tetani* (Chengalvala et al., 1999), a glicoproteína D do *Herpes simplex* (Valenzuela et al., 1985), proteína do capsídeo do poliovírus (Delpeyroux, et al., 1986), antígenos derivados do parasito da

malária (Von Brunn et al., 1991), vírus da dengue (Bisht, et al., 2002) e HIV (Michel et al., 2007).

O HCV é entre os vírus de importância clínica que infectam o homem, um dos que possuem a maior taxa de mutação, existindo dentro de um indivíduo como *quasiespecies*. A região HVR1 do envelope E2 do HCV contém os principais determinantes neutralizantes que possuem atividade protetora em experimentos com animais. Contudo, a alta variabilidade deste fragmento antigênico desempenha um papel fundamental no mecanismo de escape viral da resposta imune do hospedeiro e representa o maior obstáculo no desenvolvimento de uma vacina contra o HCV.

No estudo sobre a construção de partículas de HBsAg quiméricas como carreadoras e apresentadoras de epítomos do HCV, construímos plasmídeos contendo a região S do HBsAg isolada ou fusionada a um segmento do HCV (129 pb) correspondente à região HVR1 e parte da proteína de envelope E1. A região S do genótipo A, subgenótipo A1, foi escolhida para iniciar as construções dos plasmídeos quiméricos, uma vez que este subgenótipo é o mais prevalente na população brasileira (Araujo et al., 2004; Mello et al., 2007). Além disso, os nossos resultados de expressão do HBsAg dos genótipos A, D e F, mostraram maiores níveis de detecção para o genótipo A.

Estudos têm demonstrado que os anticorpos anti-HVR1 possuem atividade neutralizante e que o soro de alguns pacientes com atividade anti-HVR1 apresentam reatividade cruzada para diferentes variantes dessa região (Puntoriero et al., 1998; Scarselli et al., 1995), interferindo na entrada do vírus na célula (Ziebert et al., 1995; Zhou et al., 1999), prevenindo a infecção *in vitro* (Shimizu, et al., 1996; Zhou et al., 2000) e *in vivo* (Choo et al., 1994).

Dessa forma, utilizamos a região imunodominante HVR1 do HCV como seqüência heteróloga a ser inserida dentro da principal região imunogênica do HBsAg, o determinante a. A análise da expressão das proteínas recombinantes foi realizada através da transfecção transitória de células HuH7 com as construções plasmidiais obtidas. Os resultados revelaram que a inserção de um peptídeo do HCV correspondente a 43 aminoácidos no interior do determinante imunogênico a do HBsAg, não alterou os padrões de secreção e antigenicidade do HBsAg. Os níveis de detecção do HBsAg quimérico foram similares ao do tipo selvagem, tanto nas construções realizadas com o vetor de expressão pcDNA3 quanto nas que utilizamos o vetor pCI.

A inserção de seqüências heterólogas no HBsAg tem sido preferencialmente realizada no *loop* hidrofóbico externo desta proteína. Alguns estudos têm utilizado um sítio único natural para a endonuclease *Bam*HI entre os resíduos 112 e 113 do HBsAg para inserir fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (Delpeyroux, et al., 1987). Isso resulta na apresentação de epítomos heterólogos próximos à região de transmembrana do HBsAg, o que não proporciona uma exposição ideal do epítopo (Netter et al., 2001). Além disso, a inserção neste sítio, de peptídeos maiores que 33 aminoácidos inibiu a secreção de HBsAg quimérico em outros trabalhos (Delpeyroux, et al., 1987). Para permitir uma melhor exposição de proteínas heterólogas dentro do HBsAg, Netter e colaboradores (2001) construíram sítios artificiais de restrição para a inserção de fragmentos exógenos de HCV entre os aminoácidos 127 e 128 no determinante *a* do HBsAg. Entretanto, neste trabalho, além dos sítios de inserção utilizados terem sido artificialmente construídos, a inserção de peptídeos maiores que 36 aminoácidos inibiu a secreção da partícula quimérica.

No presente trabalho, nós encontramos um sítio natural de restrição para a endonuclease *Eco*NI, localizado entre os aminoácidos 128 e 129 do determinante *a* do HBsAg de cepas de HBV do genótipo A, subgenótipo A1, que é um subgenótipo frequentemente encontrado no Brasil e no continente Africano, porém mais raro nas demais áreas geográficas (Bowyer et al., 1997; Araujo et al., 2004). A descoberta desse sítio natural de restrição nos permitiu inserir um peptídeo de 43 aminoácidos dentro do determinante *a* do HBsAg, sem que fossem alteradas as propriedades do HBsAg.

As células transfectadas com as construções realizadas com os vetores pcDNA3 e pCI apresentaram níveis detectáveis do HBsAg recombinante. Contudo, os valores de detecção do HBsAg foram mais elevados com as construções no vetor pCI. Este vetor possui um íntron quimérico localizado a jusante do promotor CMV e a montante do gene a ser expresso (pCI-neo Mammalian Expression Vector Technical Bulletin, 2007). Estudos de transfecção têm demonstrado que um íntron flanqueando a região de interesse frequentemente aumenta os níveis de expressão do gene expresso (Gross, et al., 1987; Huang, et al., 1990). Transfecções transitórias realizadas em células 293 resultaram em um aumento de aproximadamente 20 vezes na expressão do gene CAT quando o íntron do vetor pCI estava presente (Brondyk, 1994), enquanto que um aumento de 20 a 100 vezes foi observado na expressão do gene S do HBV (Schirmbeck & Reimann, 2001).

O uso de partículas de HBsAg na apresentação de antígenos exógenos pode ser uma ferramenta útil para o desenvolvimento de vacinas bivalentes. Para o nosso trabalho, a avaliação da antigenicidade e imunogenicidade dos plasmídeos recombinantes construídos deve ser realizada *in vivo* para se compreender a dinâmica da produção de anticorpos para ambos os vírus. Uma vacina eficiente para o HCV certamente deverá englobar um amplo espectro de seqüências HCV específicas, podendo ser o resultado de uma combinação de partículas híbridas ou mesmo uma partícula que expresse múltiplos epítomos representativos de suas *quasiespecies*.

6 – CONCLUSÕES

- A prevalência de infecção oculta pelo HBV encontrada nos pacientes HIV positivos com sorologia positiva para anti-HBc analisados neste estudo foi de 14%.
- A hepatite B oculta não foi associada à elevação nos níveis de ALT, porém foi significativamente associada à presença de infecção pelo HCV.
- A detecção de mutações no HBsAg e da baixa carga viral do HBV nos pacientes com hepatite B oculta, confirmam que diferentes fatores podem ser responsáveis pela ocorrência da infecção oculta.
- A alta prevalência de infecção oculta pelo HBV e o crescente risco de se desenvolver resistência à lamivudina, ressaltam a necessidade da utilização de testes moleculares sensíveis para a detecção do DNA do HBV, bem como, de mutações de resistência aos antivirais, para um melhor acompanhamento dos pacientes co-infectados pelo HBV e HIV.
- Uma influência dos genótipos do HBV nos níveis de detecção do HBsAg por ELISA foi observada. Dentre as proteínas M do HBsAg, a do genótipo A foi a que apresentou os maiores níveis de detecção do HBsAg, seguida pelo genótipo F (redução de 30%) e por último, do genótipo D (redução de 37%).
- A presença das únicas mutações T143M e T125M no determinante antigênico a do HBsAg dos genótipos A e D, respectivamente, alterou consideravelmente os níveis de detecção do HBsAg comparados às das respectivas formas consenso.
- Foi identificada uma mutação na porção carboxi-terminal do HBsAg de um isolado do genótipo F na posição 215 (L215Q), que inibe a secreção de partículas subvirais de HBsAg.
- Os níveis de secreção do HBsAg pelas células HuH7 foram até 99 vezes mais elevados que os obtidos pelas células CHO.
- Mutações únicas de aminoácidos no HBsAg podem ter uma maior influência nos padrões de secreção e detecção do HBsAg e, conseqüentemente, no diagnóstico do HBV, do que o conjunto de aminoácidos característicos de cada genótipo.
- O uso de partículas de HBsAg na apresentação de antígenos exógenos pode ser uma ferramenta útil para o desenvolvimento de vacinas bivalentes.

- Um sítio de restrição presente em algumas cepas do genótipo A foi identificado e utilizado como sítio de inserção no HBsAg para epítomos do HCV.
- A inserção de um fragmento de 127 pb, correspondente a região HVR1 e parte da proteína de envelope E1 do HCV, dentro do determinante antigênico a do HBsAg, não alterou os níveis de secreção e a antigenicidade do HBsAg.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberti A, Tremolada F, Fattovich G, Bortolotti F, Realdi G 1983. Virus replication and liver disease in chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci* 28:962-966.
- Alter HJ, Purcell RH, Gerin JL, London WT, Kaplan PM, McAuliffe VJ, Wagner J, Holland PV 1977. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by hepatitis B surface antigen-positive saliva and semen. *Infect Immun* 16:928-933.
- Alter MJ 1993. Community acquired viral hepatitis B and C in United States. *Gut* 34:S17-S19.
- Altfeld M, Rockstroh JK, Addo M, Kupfer B, Pult I, Will H, Spengler U 1998. Reactivation of hepatitis B in a long-term anti-HBs-positive patient with AIDS following lamivudine withdrawal. *J Hepatol* 29:306-309.
- Araujo NM, Mello FC, Yoshida CF, Niel C, Gomes SA 2004. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. *Arch Virol* 149:1383-1395.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO 2002. Genotype H: a new Ameridian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 83:2059-2073.
- Arboleda M, Castilho MC, Fonseca JCF, Albuquerque BC, Saboia RC, Yoshida CFT 1995. Epidemiological aspects of hepatitis B and D virus infection in the Northern region of Amazonas, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:481-483.
- Assad S, Francis A 2000. Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine* 18:57-67.
- Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via fecal-oral route. *Intervirology* 20:23-31.
- Balsano C, Bilet O, Bennoun M, Cavard C, Zider A, Grimber G, Natoli G, Briand P, Levrero M 1994. Hepatitis B virus X gene product acts as a transactivator *in vivo*. *J Hepatol* 21:103-109.
- Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK 1972. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* 109:842-848.
- Bartenschlager R, Schaller H 1992. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J* 11:3413-3420.

- Bassit L, da Silva LC, Ribeiro-Dos-Santos G, Maertens G, Carrilho FJ, Fonseca LE, Alves VA, Gayotto LC, Pereira AN, Takei K, Chamone D, Saez-Alquezar A 2000. Chronic hepatitis C virus infections in Brazilian patients: association with genotypes, clinical parameters and response to long term alpha interferon therapy. *Newslab* 8:136-151.
- Bayer ME, Blumberg BS, Werner B 1968. Particles associated with Australian antigen in the sera of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature* 218:1057-1059.
- Beasley RP, Hwang LY 1987. Postnatal infectivity of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. *J Infect Dis* 147:185-190.
- Beltrami EM, Williams IT, Shapiro CN, Chamberland ME 2000. Risk and management of blood-borne infections in health care workers. *Clin Microbiol Rev* 13:385-407.
- Besisik F, Karaca C, Akyüz F, Horosanli S, Onel D, Badur S, Sever MS, Danalioglu A, Demir K, Kaymakoglu S, Cakaloglu Y, Okten A 2003. Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *J Hepatol* 38:506-510.
- Bisht H, Chugh DA, Raje M, Swaminathan SS, Khanna N 2002. Recombinant dengue virus type 2 envelope/hepatitis B surface antigen hybrid protein expressed in *Pichia pastoris* can function as a bivalent immunogen. *J Biotechnol* 99:97-110.
- Blanchet M, Sureau C 2006. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol* 80:11935-11945.
- Blum HE 1993. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 35:40-50.
- Blumberg BS 1997. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7121-7125.
- Blumberg BS, Gerstley BJS, Hungford DA, London WT, Sutnick AI 1967. Serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Int Med* 66:924-931.
- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S 1965. A "new" antigen in leukemic sera. *JAMA* 191:541-546.

- Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, Ebert JW 1983. Inactivation of hepatitis B virus by intermediate-to-high level disinfectant chemicals. *J Clin Microbiol* 18:535-538.
- Bonifacino JS, Cosson P, Shah N, Klausner RD 1991. Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 10:2783-2793.
- Bowyer SM, Staden Lv, Kew MC, Sim JGM 1997. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. *J Gen Virol* 78:1719-1729.
- Brasil, Ministério da Saúde 1995. Hepatites Virais In: *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Fundação Nacional de Saúde/CENEPI. p. 179-196.
- Brondyk B 1994. pCI and pSI Mammalian Expression Vectors. *Promega Notes* 49:7-11.
- Brunetto M, Stemmler M, Schodel F, Will H, Ottobrelli A, Rizetto M, Verme Bonifo F 1989. Identification of HBV variants which cannot produce pre-C-derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis. *Ital J Gastroenterol* 21:151-154.
- Bukh J, Emerson SU, Purcell RH 1997. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus and related viruses. In: Rizzeto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G. *Viral hepatitis and liver disease*. Turin: Minerva Médica; p.167-175.
- Carman WF 1997. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 4:11-20.
- Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC 1990. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336:325-329.
- Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC 1989. Mutation preventing formation of hepatitis B virus e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* ii:588-591.
- CDC 1991. Hepatitis B Virus: A Comprehensive Strategy for Eliminating Transmission in the United States Through Universal Childhood Vaccination: Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). *MMWR* 40:1-19.
- Chemin I, Trepo C 2005. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol* 34:S15-S21.

- Chen WN, Oon CJ 1999. Human hepatitis B virus mutants: significance of molecular changes. *FEBS Lett* 453:237-242.
- Chengalvala MV, Bhat RA, Bhat BM, Vernon SK, Lubeck MD 1999. Enhanced immunogenicity of hepatitis B surface antigen by insertion of a helper T cell epitope from tetanus toxoid. *Vaccine* 17:1035-1041.
- Chisari FV, Ferrari C 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 13:29-60.
- Choo QL, Kuo G, Ralston R, Weiner A, Chien D, Van Nest G, Han J, Berger K, Thudium K, Kuo C, et al. 1994. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1294-1298.
- Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ et al. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2451-2455.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.
- Chua PK, Wang RY, Lin MH, Masuda T, Suk FM, Shih C 2005. Reduced secretion of virions and hepatitis B virus (HBV) surface antigen of a naturally occurring HBV variant correlates with the accumulation of the small S envelope protein in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Virol* 79:13483-13496.
- Couroucé-Pauty AM, Plancon A, Soulier JP 1983. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang* 44:197-211.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australian-antigen-associated hepatitis. *Lancet* i:695-698.
- Dash S, Rao KVS, Joshi B, Nayak NC, Panda SK 1991. Significance of natural polymerized albumin and its receptor on hepatitis B infection of hepatocytes. *Hepatology* 13:134-142.
- Davison F, Alexander GJM, Trowbridge R, Fagan EA, William R 1987. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva, and leucocytes of chronic HBsAg carriers. *J Hepatol* 4:37-44.
- de Almeida Pereira RA, Mussi AD, de Azevedo e Silva VC, Souto FJ 2006. Hepatitis B Virus infection in HIV-positive population in Brazil: results of a survey in the state of Mato Grosso and a comparative analysis with other regions of Brazil. *BMC Infect Dis* 6:34.

- de Castro L, Niel C, Gomes SA 2001. Low frequency of mutations in the core promoter and precore regions of hepatitis B virus in anti-HBe positive Brazilian carriers. *BMC Microbiology* 1:10.
- Dejean A, Sonigo P, Wain-Hobson S, Tiollais P 1984. Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5350-5354.
- Delaney WE 4th, Yang H, Westland CE, Das K, Arnold E, Gibbs CS, Miller MD, Xiong S 2003. The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *J Virol* 77:11833-11841.
- Delpeyroux F, Chenciner N, Lim A, Lambert M, Malpière Y, Streeck RE 1987. Insertions in the hepatitis B surface antigen: effect on assembly and secretion of 22-nm particles from mammalian cells. *J Mol Biol* 195:343-350.
- Delpeyroux F, Chenciner N, Lim A, Malpière Y, Blondel B, Crainic R, van der Werf S, Streeck RE 1986. A poliovirus neutralizing epitope expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles. *Science* 233:472-475.
- Devesa M, Rodríguez C, León G, Liprandi F, Pujol FH 2004. Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. *J Med Virol* 72:377-384.
- Diamantis ID, McGandy CE, Chen TJ, Liaw YF, Gudat F, Bianchi L 1992. Hepatitis B x gene expression in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 15:400-403.
- Drazan KE 2000. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 6:396-406.
- Espírito-Santo MP, Carneiro MA, Reis NR, Kozłowski AG, Teles SA, Lampe E, Yoshida CF, Martins RM 2007. Genotyping hepatitis C virus from hemodialysis patients in Central Brazil by line probe assay and sequence analysis. *Braz J Med Biol Res* 40:545-550.
- Fattovich G, Giustina G, Favaro S, Ruol A 1996. A survey of adverse events in 11,241 patients with chronic viral hepatitis treated with alfa interferon. *J Hepatol* 24:38-47.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026-1028.
- Feitelson MA, Duan LX 1997. Hepatitis B virus X antigen in pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 150:1141-1157.

- Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT 1993. HBxAg and p53 are associated *in vitro* and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 8:1109-1117.
- Filippini P, Coppola N, Pisapia R, Scolastico C, Marrocco C, Zaccariello A, Nacca C, Sagnelli C, De Stefano G, Ferraro T, De Stefano C, Sagnelli E 2006. Impact of occult hepatitis B virus infection in HIV patients naive for antiretroviral therapy. *AIDS* 20:1253-1260.
- Fiordalisi G, Cariani E, Mantero G, Zanetti A, Tanzi E, Chiaramonte M, Primi D 1990. High genomic variability in the pre-C region of hepatitis B virus in anti-HBe, DNA-HBV positive chronic hepatitis. *J Med Virol* 31:297-300.
- Forns X, Bukh J, Purcell RH 2002. The challenge of developing a vaccine against hepatitis C virus. *J Hepatol* 37:684-695.
- Fortuin M, Karthigesu V, Allison L, Howard C, Hoare S, Mendy M, Whittle HC 1994. Breakthrough infections and identification of a viral variant in Gambian children immunized with hepatitis B vaccine. *J Infect Dis* 169:1374-1376.
- François G, Kew M, Van Damme P, Mphahlele MJ, Meheus A 2001. Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? *Vaccine* 19:3799-3815.
- Fried MW, Sambrook J 1995. Therapy of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 15:82-91.
- FUNASA 2001. *Manual dos Centros de Referência de Imunológicos Especiais* 59-63.
- Galle PR, Hagelstein J, Kommerell B, Volkmann M, Schranz P, Zentgraf H 1994. In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 106:664-673.
- Ganem D, Prince AM 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350:1118-1129
- Ganem D 1996. *Hepadnaviridae* and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott – Raven. p. 2703 -2737.
- Ganem D, Varmus HE 1987. The molecular biology of hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem* 56:651-693.
- Garcia P, Ou J, Rutter WJ, Walter P 1988. Targeting of precore protein of hepatitis B virus to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* 106:1093-1104.

- Gavilanes F, Gonzalez-Ros JM, Peterson DL 1982. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem* 257:7770-7777.
- Geissler M, Tokushige K, Wakita T, Zurawski VR, Wands JR 1998. Differential cellular and humoral responses to HCV core and HBV envelope proteins after genetic immunizations using chimeric constructs. *Vaccine* 16:857-867.
- Gerlish WH, Robinson WS 1980. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21:801-809.
- Gilles PN, Guerrette DL, Ulevitch RJ, Schreiber RD, Chisari FV 1992. HBsAg retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiological concentrations of interferon-gamma. *Hepatology* 16:655-663.
- Gomes SA 2003. Genoma Viral. In: Focaccia R. Tratado das Hepatites Virais. São Paulo: Atheneu; p. 119-125.
- Gonçales FL 1997. Hepatite por vírus B. In: Focaccia R. *Hepatites Virais*. São Paulo: Atheneu. p. 27-49.
- Grabow WOK, Prozesky OW, Applebaum PC and Lecatsas G 1975. Absence of hepatitis B antigens from feces and sewage as a result of enzymatic destruction. *J Infect Dis* 131:658-664.
- Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol*. 67:1385-1395.
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15655-15660.
- Grob PJ 1998. Hepatitis B: virus, pathogenesis and treatment. *Vaccine* 16: S11-S16.
- Gross MK, Kainz MS, Merrill GF 1987. Introns are inconsequential to efficient formation of cellular thymidine Kinase mRNA in mouse L cells. *Mol Cell Biol* 7:4576-457681.
- Gutiérrez C, Devesa M, Loureiro CL, León G, Liprandi F, Pujol FH 2004. Molecular and serological evaluation of surface antigen negative hepatitis B virus infection in blood donors from Venezuela. *J Med Virol* 73:200-207.
- He JW, Lu Q, Zhu QR, Duan SC, Wen YM 1998. Mutations in the 'a' determinant of hepatitis B surface antigen among Chinese infants receiving active postexposure hepatitis B immunization. *Vaccine* 16:170-173.

- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol* 52:396-402.
- Hino K, Basuni AA, Ireland J, Newell A, Mphahlele J, Smit EJ, Ngui SL, Teo CG, Carman WF 2002. Reappearance of hepatitis B surface antigen in immunocompromised individuals: reinfection or reactivation? *Dig Dis Sci* 47:415-418.
- Hino O, Shows T, Rogler CE 1986. Hepatitis B virus integration site in hepatocellular carcinoma at translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8338-8342.
- Hofer M, Joller-Jemelka HI, Grob PJ, Lüthy R, Opravil M 1998. Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. Swiss HIV Cohort Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:6-13.
- Hollinger FB 1996. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott – Raven. p. 2739 -2807.
- Hollinger FB 1991. Hepatitis B virus. In *Viral Hepatitis*. New York: Raven Press. p. 1-37.
- Hoofnagle, Di Bisceglie AM 1991. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Sem Liv Dis* 11:73-83.
- Hsu HY, Chang MH, Liaw SH, Ni YH, Chen HL 1999. Changes of hepatitis B surface antigen variants in carrier children before and after universal vaccination in Taiwan. *Hepatology* 30:1312-1317.
- Hu KQ 2002. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 9:243-257.
- Hu X, Margolis HS, Purcell RH, Ebert J, Robertson BH 2000. Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1661-1664.
- Huang MTF & Gorman CM 1990. Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucl Acids Res* 18:937-947.
- Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K 2004. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 85:283-292.

- Ireland JH, O'Donnell B, Basuni AA, Kean JD, Wallace LA, Lau GK, Carman WF 2000. Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. *Hepatology* 31:1176-1182.
- Jeantet D, Chemin I, Mandrand B, Tran A, Zoulim F, Merle P, Trepo C, Kay A 2004. Cloning and expression of surface antigens from occult chronic hepatitis B virus infections and their recognition by commercial detection assays. *J Med Virol* 73:508-515.
- Jeantet D, Chemin I, Mandrand B, Zoulim F, Trepo C, Kay A 2002. Characterization of two hepatitis B virus populations isolated from a hepatitis B surface antigen-negative patient. *Hepatology* 35:1215-1224.
- Jenna S, Sureau C 1999. Mutations in the carboxyl-terminal domain of the small hepatitis B virus envelope protein impair the assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol* 73:3351-3358.
- Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y, Li GD 2002. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis C virus E2 fused to the gene for hepatitis B surface antigen elicits immune responses to both HCV and HBV. *World J Gastroenterol* 8:505-510.
- Johnson MA, Moore KH, Yuen GJ, Bye A, Pakes GE 1999. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. *Clin Pharmacokinet* 36:41-66.
- Kalinina T, Iwanski A, Will H, Sterneck M 2003. Deficiency in virion secretion and decreased stability of the hepatitis B virus immune escape mutant G145R. *Hepatology* 38:1274-1281.
- Karayiannis P 2004. Current therapies for chronic hepatitis B virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2:745-760.
- Kay A, Zoulim F 2007. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 127:164-176.
- Khan N, Guarnieri M, Ahn SH, Li J, Zhou Y, Bang G, Kim KH, Wands JR, Tong S 2004. Modulation of hepatitis B virus secretion by naturally occurring mutations in the S gene. *J Virol* 78:3262-3270.
- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Yuzo, Kidd AH 2002. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 83:1267-1280.
- Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G 1991. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 23:317-320.

- Klingmuller U, Schaller H 1993. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol* 67:7414-7422.
- Kramvis A, Weitzmann L, Owiredu WKBA, Kew MC 2002. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol* 83:835-839.
- Krugman S 1989. Hepatitis B: Historical aspects. *Am J Infect Control* 17:165-167.
- Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanya D, Zekeng L, Ndembu N, Ngansop C, Kaptue L, Miura T, Ido E, Hayami M, Ichimura H, Mizokami M 2005. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 86:2047-2056.
- Lanford RE, Chaves D, Brasky KM, Burns III RB 1998. Isolation of a hepadnavirus from the wolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5757-5761.
- Laub O, Rall LB, Truett M, Shaul Y, Standring DN, Valenzuela P, Rutter WJ 1983. Synthesis of hepatitis B surface antigen in mammalian cells: expression of the entire gene and the coding region. *J Virol* 48:271-280.
- La'ulu SL, Roberts WL 2006. The analytic sensitivity and mutant detection capability of six hepatitis B surface antigen assays. *Am J Clin Pathol* 125:748-751.
- Le Bouvier GL 1971. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis* 123:671-675.
- Levene C, Blumberg BS 1969. Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. *Nature* 221:195-196.
- Levicnik-Stezinar S 2004. Hepatitis B surface antigen escape mutant in a first time blood donor potentially missed by a routine screening assay. *Clin Lab* 50:49-51.
- Liaw YF, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Chien RN, Dent J, Roman L, Edmundson S, Lai CL 2000. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *Gastroenterology* 119:172-180.
- Lien JM, Petcu DJ, Aldrich CE, Mason WS 1987. Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J Virol* 61:3832-3840.
- Locarnini SA 1998. Hepatitis B virus surface antigen and polymerase gene variants: potential virological and clinical significance. *Hepatology* 27:294-297.

- Lok A, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, Liaw YF, Mizokami M, Kuiken C; Hepatitis B Virus Drug Resistance Working Group 2007. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 46:254-265.
- Lurman A 1885. Eine icterusepidemic. *Berl Klin Wochenschr* 22:20-23.
- Lyra LGC, Damasceno AP, Cotrim P, Mota E, Silva L 1986. Prevalence of antibody to hepatitis B virus in an urban population of Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 28:406-409.
- MacCallum FO 1947. Homologous serum jaundice. *Lancet* ii:691-692.
- Magnius LO, Norder H 1995. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 38:24-34.
- Major ME, Vitvitski L, Mink MA, Schleef M, Whalen RG, Trépo C, Inchauspé G. 1995. DNA-based immunization with chimeric vectors for the induction of immune responses against the hepatitis C virus nucleocapsid. *J Virol* 69:5798-5805.
- Mangold CM, Streeck RE 1993. Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol* 67:4588-4597.
- Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC 1991. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. *Sem Liver Dis* 11:84-92.
- Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2941-2945.
- Märschensch S, Endres AS, Brinckmann A, Heise T, Kristiansen G, Nürnberg P, Krüger DH, Günther S, Meisel H 2006. Functional analysis of complex hepatitis B virus variants associated with development of liver cirrhosis. *Gastroenterology* 131:765-780.
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66:3225-29.
- Maruyama T, Mitsui H, Maekawa H, Yamada H, Hirayama M, Iino S, Yasuda K, Koike K, Kimura S, Milich DR 2000. Emergence of the precore mutant late in chronic hepatitis B infection correlates with the severity of liver injury and mutations in the core region. *Am J Gastroenterol* 85:2894-2904.

- Mason WS, Seal G, Summers J 1980. Virus of Pekin ducks with structural and biochemical relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36:829-836.
- McIntyre N 1990. Clinical presentation of acute viral hepatitis. *Br Med Bull* 46:535-547.
- Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR 1998. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 27:628-633.
- 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 2007. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 7:103.
- Michel M, Lone Y, Centlive M, Roux P, Wain-Hobson S, Sala M 2007. Optimisation of secretion of recombinant HBsAg virus-like particles: Impact on the development of HIV-1/HBV bivalent vaccines. *Vaccine* 25:1901-1911.
- Milich DR, Jones JE, Hughes L, Prince J, Raney AK, McLachlan A 1990. Is a function of the secreted hepatitis B virus e antigen to induce immunological tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6599-6603.
- Milich DR, McLachlan A 1986. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and T-cell-dependent antigen. *Science* 234:1398-1401.
- Miyake Y, Oda T, Li R, Sugiyama K 1996. A comparison of amino acid sequences of hepatitis B virus S gene in 46 children presenting various clinical features for immunoprophylaxis. *Tohoku J Exp Med* 180:233-247.
- Monteiro MR, do Nascimento MM, Passos AD, Figueiredo JF 2004. Seroepidemiological survey of hepatitis B virus among HIV/AIDS patients in Belem, Para – Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 37(Suppl 2): 27-32.
- Moraes MTB, Gomes SA, Niel C 1996. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotype A, D and F isolated in Brazil. *Arch Virol* 141:1767-1773.
- Mutimer D 2001. Hepatitis B virus infection: resistance to antiviral agents. *J Clin Virol* 21:239-242.
- Nassal M, Schaller H 1996. Hepatitis B virus replication – an update. *J Viral Hepat* 3:217-226.
- Nassal M, Rieger A 1993. An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys-61 determines the structure of the secretory core gene product (e antigen) of hepatitis B virus. *J Virol* 67:4307-4315.

- Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF, Gaspar AM, Repp R, Gerlich WH 1993. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype *adw4*. *J Gen Virol* 74:1627-1632.
- Nebbia G, Garcia-Diaz A, Ayliffe U, Smith C, Dervisevic S, Johnson M, Gilson R, Tedder R, Geretti AM 2007. Predictors and kinetics of occult hepatitis B virus infection in HIV-infected persons. *J Med Virol* 79:1464-1471.
- Netter HJ, Macnaughton TB, Woo W, Tindle R, Gowans E 2001. Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. *J Virol* 75:2130-2141.
- Neurath AR, Kent SBH, Strick N, Parker K 1986. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46:429-436.
- Ninomiya M, Takahashi M, Shimosegawa T, Okamoto H 2007. Analysis of the entire genomes of fifteen torque teno midi virus variants classifiable into a third group of genus Anellovirus. *Arch Virol* 152:1961-1975.
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241:92-97.
- Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO 2004. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47:289-309.
- Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Couroucé AM, Mushahwar IK, Magnius LO 1993. 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* 74:1341-1348.
- Norder H, Couroucé AM, Magnius LO 1992a. Molecular basis of Hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 73:3141-3145.
- Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Couroucé AM, Magnius LO 1992b. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 73:1201-1208.
- Núñez M, Ríos P, Pérez-Olmeda M, Soriano V 2002. Lack of 'occult' hepatitis B virus infection in HIV-infected patients. *AIDS* 16:2099-2101.

- Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Takana T, Miyakawa Y, Mayumi M 1990. Hepatitis B viruses with pre-C region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 64:1298-1303.
- Okamoto H, Omi S, Wang Y, Itoh Y, Tsuda F, Tanaka T, Akahane Y, Miyakawa Y, Mayumi M 1989. The loss of subtypic determinants in alleles, d/y or w/r, on hepatitis B surface antigen. *Mol Immunol* 26:197-205.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69:2575-2583.
- Okamoto H, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M 1987a. Site-directed mutagenesis of hepatitis B surface antigen sequence at codon 160 from arginine to lysine for conversion of subtypic determinant from r to w. *Biochem Biophys Res Commun* 148:500-504.
- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M 1987b. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* 57:231-236.
- Okochi K, Murakami S 1968. Observations on Australian antigen in Japanese. *Vox Sang* 15:374-385.
- Oliveira MLA, Bastos FI, Telles PR, Yoshida CFT, Schatzmayr HG, Paetzold U, Pauli G, Schreier E 1999. Prevalence and risk factors for HBV, HCV and HDV infections among injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 32:1107-1114.
- Oon CJ, Lim GK, Ye Z, Goh KT, Tan KL, Yo SL, Hopes E, Harrison TJ, Zuckerman AJ 1995. Molecular epidemiology of hepatitis B virus vaccine variants in Singapore. *Vaccine* 13:699-702.
- Pahl HL, Baeuerle PA 1995. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J* 14:2580-2588.
- Partelini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Brechot C 1995. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 21:313-321.

- Pavan MH, Aoki FH, Monteiro DT, Goncales NS, Escanhoela CA, Goncales Junior FL 2003. Viral hepatitis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Braz J Infect Dis* 7:253-261.
- Perrillo RP, Campbell CR, Strang S, Bodicky CJ, Costigan DJ 1984. Immune globulin and hepatitis B: immune globulin prophylactic measures for intimate contacts exposed to acute type B hepatitis. *Arch Intern Med* 144:81-85.
- Persson B, Argos P 1994. Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J Mol Biol* 237:182-192.
- pCI-neo Mammalian Expression Vector Technical Bulletin 2007. Promega, #TB215. Disponível em: <http://www.promega.com/tbs/tb215/tb215.pdf>. Acesso em Jan. 08.
- Piot P, Goilav C, Kegels E 1990. Hepatitis B: transmission by sexual contact and needle sharing. *Vaccine* 8 (Suppl):S37-40; discussion S41-43.
- Pontisso P, Petit MA, Vankowski M, Peeples M 1989. Human liver plasma membrane contains receptors for the hepatitis B virus pre S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre S2 region. *J Virol* 63:1981-1988.
- Prince AM 1968. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 60:814-821.
- Pult I, Netter HJ, Bruns M, Prassolov A, Sirma H, Hohenberg H, Chang SF, Frolich K, Krone O, Kaleta EF, Will H 2001. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology* 289:114-128.
- Puntoriero G, Meola A, Lahm A, Zucchelli S, Ercole BB, Tafi R, Pezzanera M, Mondelli MU, Cortese R, Tramontano A, Galfre' G, Nicosia A 1998. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *Embo J* 17:3521-3533.
- Puoti M, Torti C, Bruno R, Filice G, Carosi, G 2006. Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. *J Hepatol* 44:S65-S70.
- Rapicetta M, Ferrari C, Levrero M 2002. Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection. *J Med Virol* 67:454-457.
- Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G 2007. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 46:160-170.
- Rizzeto M, Canesse MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G 1977. Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system

- (delta/antidelta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *Gut* 18:998-1003.
- Robertson BH 2001. Viral hepatitis and primates: historical and molecular analysis of human and nonhuman primate hepatitis A, B and GB-related viruses. *J Viral Hepat* 8: 233-242.
- Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *Arch Virol* 143:2493-2503.
- Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, Platero C, López-Alcorocho JM, Pardo M, Castillo I, Carreño V 2005. Hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV) can coinfect the same hepatocyte in the liver of patients with chronic HCV and occult HBV infection. *J Virol* 79:15578-15581.
- Santos EA, Yoshida CF, Rolla VC, Mendes JM, Vieira IF, Arabe J, Gomes SA 2003. Frequent occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:92-98.
- Sato K, Sato M, Nakano A 2003. Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol Biol Cell* 14:3605-3616.
- Sato S, Suzuki K, Akahane Y, Akamatsu K, Akiyama K, Yunomura K, Tsuda F, Tanaka T, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M 1995. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Intern Med* 122:241-248.
- Scarselli E, Cerino A, Esposito G, Silini E, Mondelli UM, Traboni G 1995. Occurrence of antibodies reactive with more than one variant of the putative envelope glycoprotein (gp70) hypervariable region 1 in viremic hepatitis C virus-infected patients. *J Virol* 69:4407-4412.
- Schaefer S 2005. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* 12:111-124.
- Schirmbeck, R & Reimann, J 2001. Revealing the Potential of DNA-Bases Vaccination: Lessons Learned from the Hepatitis B virus Surface Antigen. *Biol Chem* 382:543-552.
- Seeger C, Mason W 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:51-68.

- Seeger C, Ganem D, Varmus HE 1986. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232:477-484.
- Selabe SG, Lukhwareni A, Song E, Leeuw YG, Burnett RJ, Mphahlele MJ 2007. Mutations associated with lamivudine-resistance in therapy-naïve hepatitis B virus (HBV) infected patients with and without HIV co-infection: implications for antiretroviral therapy in HBV and HIV co-infected South African patients. *J Med Virol* 79:1650-1654.
- Sells MA, Zelent AZ, Shvartsman M, Acs G 1988. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol* 62:2836-2844.
- Sengupta S, Rehman S, Durgapal H, Acharya SK, Panda SK 2007. Role of surface promoter mutations in hepatitis B surface antigen production and secretion in occult hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 79:220-228.
- Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T, Farci P, Purcell RH, Yoshikura H 1996. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 223:409-412.
- Shire NJ, Rouster SD, Rajicic N, Sherman KE 2004. Occult hepatitis B in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 36:869-75.
- Simons JN, Leary TP, Dawson GP 1995. Isolation of a novel virus-like sequence associated with human hepatitis. *Nature Med* 1:564-569.
- Sjogren M 1994. Serologic diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 23:457-478.
- Souto FJD 1999. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *Gastroenterol Endosc Dig* 18:143-150.
- Souza MG, Passos AD, Machado AA, Figueiredo JF, Esmeraldino LE 2004. HIV and hepatitis B virus co-infection: prevalence and risk factors. *Rev Soc Bras Med Trop* 37:391-395.
- Sprengel R, Kaleta EF, Will H 1988. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 62:3832-3839.
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 81:67-74.

- Sucupira MV, Mello FC, Santos EA, Niel C, Rolla VC, Arabe J, Gomes SA 2006. Patterns of hepatitis B virus infection in Brazilian human immunodeficiency virus infected patients: high prevalence of occult infection and low frequency of lamivudine resistant mutations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:655-660.
- Sugauchi F, Kumada H, Sakugawa H, Komatsu M, Niitsuma H, Watanabe H, Akahane Y, Tokita H, Kato T, Tanaka Y, Orito E, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M 2004a. Two subtypes of genotype B (Ba and Bj) of hepatitis B virus in Japan. *Clin Infect Dis* 38:1222-1228.
- 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 2004b. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *J Gen Virol* 85:811-820.
- Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ito K, Acharya SK, Gish RG, Kramvis A, Shimada T, Izumi N, Kaito M, Miyakawa Y, Mizokami M 2006. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology* 44:915-924.
- Summers J, Smolec JM, Snyder R 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4533-4537.
- Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, Mishiro S 2000. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* 145:979-993.
- Thakur V, Kazim SN, Guptan RC, Hasnain SE, Bartholomeusz A, Malhotra V, Sarin SK 2005. Transmission of G145R mutant of HBV to an unrelated contact. *J Med Virol* 76:40-46.
- Teles SA, Martins RM, Vanderborght B, Stuyver L, Gaspar AM, Yoshida CF 1999. Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. *Artif Organs* 23:1074-1078.
- Teles SA, Martins RMB, Silva SA, Gomes DMF, Cardoso DDP, Vanderborght BOM, Yoshida CFT 1998. Hepatitis B virus infection profile in Central Brazilian hemodialysis population. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 40:281-286.
- Thio CL, Locarnini S 2007. Treatment of HIV/HBV coinfection: clinical and virologic issues. *AIDS Rev* 9:40-53.
- Thomas H 1991. Pathogenesis of chronic active hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 6 (suppl.1):4-6.

- Thung SN, Gerber MA 1984. Polyalbumin receptors: their role in attachment of hepatitis B virus to hepatocytes. *Sem Liver Dis* 4:69-75.
- Tiollais P, Pourcel C, Dejean A 1985. The hepatitis B virus. *Nature* 317:489-95. Review.
- Toh H, Hayashida H, Miyata T 1983. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature* 305:827-829.
- Torbenson M & Thomas DL 2002. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2: 479-486.
- Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgton K, Zhuang H, Locarnini SA, Fyfe J, Sozzi T, Jackson DC 2002. Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* 293:305-313.
- Treitinger A, Spada C, Silva EL, Miranda AF, Oliveira OV, Silveira MV, Verdi JC, Abdalla DS 1999. Prevalence of serologic markers of HBV and HCV infection in HIV-1 seropositive patients in Florianópolis, Brazil. *Braz J Infect Dis* 3:1-5.
- Truant R, Antunovic J, Greenblatt J, Prives C, Cromlish JA 1995. Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 response element-directed transactivation. *J Virol* 69:1851-1859.
- Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K 1987. Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:444-448.
- Twu SJ, Detels R, Nelson K, Visscher BR, Kaslow R, Palenicek J, Phair J 1993. Relationship of hepatitis B virus infection to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 167:299-304.
- Valenzuela PD, Coit MA, Medina-Selby CH, Huo G, van Nest RL, Burke PB, Urdea MS, Graves PV 1985. Antigen engineering in yeast: synthesis and assembly of hybrid hepatitis B surface antigen-herpes simplex 1 gD particles. *Bio Technology* 3:323-326.
- Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, Zuckerman AJ, Harrison TJ 1988. The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolate from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol* 69:1383-1389.
- Von Brunn A, Früh K, Müller HM, Zentgraf HM, Bujard H 1991. Epitopes of the human malaria parasite *P. falciparum* carried on the surface of HBsAg particles elicit an immune response against parasite. *Vaccine* 9:477-484.

- Wallace LA, Carman WF 1994. Clinical implications of hepatitis B virus envelope protein variation. *Int J Clin Lab Res* 24:80-85.
- Wallace LA, Echevarria JE, Echevarria JM, Carman WF 1994. Molecular characterization of envelope antigenic variants of hepatitis B virus from Spain. *J Infect Dis* 170:1300-1303.
- Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, Boorstein R, Kreibich G, Hendershot LM, Ron D 1996. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* 16: 4273-4280.
- Weber B 2005. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 32:102-112.
- Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H 1987. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 61:904-911.
- Wollersheim M, Debelka U, Hofschneider PH 1988. A *trans*-activating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state. *Oncogene* 3:545-552.
- Zheng X, Weinberger KM, Gehrke R, Isogawa M, Hilken G, Kemper T, Xu Y, Yang D, Jilg W, Roggendorf M, Lu M 2004. Mutant hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) are immunogenic but may have a changed specificity. *Virology* 329:454-464.
- Zhou YH, Shimizu YK, Esumi M 2000. Monoclonal antibodies to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus capture virus and inhibit virus adsorption to susceptible cells in vitro. *Virology* 269:276-283.
- Zhou YH, Moriyama M, Esumi M 1999. Multiple-sequence-reactive antibodies induced by a single peptide immunization with hypervariable region 1 of hepatitis C virus. *Virology* 256:360-370.
- Zhou YJ 1980. A virus possibly associated with hepatitis and hepatoma in ducks. *Shan Med J* 3:641-644.
- Zhou YZ, Slagle BL, Donehower LA, vanTuinen P, Ledbetter DH, Butel JS 1988. Structural analysis of a hepatitis B virus genome integrated into chromosome 17p of human hepatocellular carcinoma. *J Virol* 62:4224-4231.
- Ziebert A, Schreier E, Roggendorf M 1995. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* 208:653-661.

Zuckerman AJ 1999. More than one third of world's population has been infected with hepatitis B virus. *Br Med J* 318:1213A.

Zuckerman AJ, Harrison TJ, Oon CJ 1994. Mutations in S region of hepatitis B virus. *Lancet* 343(8899):737-738.

ANEXOS