

FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO ALEGRE  
FFFCMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEPATOLOGIA  
MESTRADO EM HEPATOLOGIA BÁSICA

**GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE B EM UMA  
COORTE DE PACIENTES AVALIADOS EM UM  
HOSPITAL GERAL**

**CARLOS EDUARDO BECKER**

Porto Alegre, 2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**CARLOS EDUARDO BECKER**

**GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE B EM UMA  
COORTE DE PACIENTES AVALIADOS EM UM  
HOSPITAL GERAL**

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Hepatologia Básica da Fundação  
Faculdade Federal de Ciências Médicas de  
Porto Alegre para obtenção do título de Mestre.*

**Orientador:** Prof. Dr. Angelo Alves de Mattos

**Co-orientador:** Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Porto Alegre, 2007

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B395g Becker, Carlos Eduardo

Genotipagem do vírus da hepatite B em uma coorte de pacientes avaliados em um hospital geral. / Carlos Eduardo Becker ; Orientação Angelo Alves de Mattos ; Co-orientação Maurício Reis Bogo. – Porto Alegre : Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 2007.

76 f. ; il. ; graf. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre - FFFCMPA, Programa de Pós-Graduação em Hepatologia Básica, 2007.

1. Hepatologia. 2. Vírus da hepatite B. 3. Genótipo – subtipos. 4. Genótipo – fatores de risco. 5. Dados demográficos. I. Título. II. Mattos, Angelo Alves de. III. Bogo, Maurício Reis.

CDD: 616.3623

CDU: 616.36-002

Eleonora Liberato Petzhold  
CRB10/1801

*Aos meus pais, **Onofre Jorge** e **Maria Ignez**, pela sua energia, força de trabalho, bravura, amor, carinho e, principalmente, pelo incentivo que sempre me deram em toda a minha vida.*

*À minha **avó**, a quem eu devo minha educação, índole, determinação e garra. Sempre presente, mostrou-me como encarar e superar as dificuldades, sendo meu exemplo na maneira de conduzir a vida. A minha referência em todos os momentos.*

*À **Cassandra**, pelo amor, compreensão, companheirismo e cumplicidade. Soube abdicar de muitos momentos de lazer, auxiliando-me na conquista deste objetivo.*

---

## **Agradecimentos**

---

A **Deus**, pois sem Ele e sem a Sua presença, nada somos e nada podemos fazer.

Aos **pacientes**, sem os quais este trabalho não seria possível.

À **Faculdade Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre**, pela oportunidade de realizar este mestrado.

Ao **Dr. Angelo Alves de Mattos**, por seu exemplo como profissional na área da saúde e determinação na realização de pesquisas, mas principalmente por ensinar-me a fazer ciência, mostrando caminhos ao invés de meras soluções. Agradeço pelo apoio, compreensão, incentivo, amizade, confiança e ensinamentos recebidos. Além disso, sou muito grato por receber a sua orientação e desenvolver esta pesquisa, possibilitando trilhar novos caminhos na minha vida profissional.

Ao **Dr. Maurício Reis Bogo**, pela co-orientação, amizade, gentileza, colaboração, presteza. Agradeço pelas conversas construtivas que tivemos e pelo conhecimento no desenvolvimento desta dissertação.

À **Dra. Fernanda Schild Branco de Araújo** e a **Dra. Gabriela Perdomo Coral**, pela amizade, ensinamentos, idéias e colaboração incondicional transmitidos durante toda a etapa desse trabalho.

À **Carolina Silva Schiefelbein** pela busca de informações que, sem dúvida alguma, contribuíram para elaboração desse trabalho.

Ao **Laboratório Central do Complexo Hospitalar Santa Casa**, pelo auxílio na fase inicial do estudo e na coleta e armazenamento das amostras dos pacientes; em especial ao **Dr. Carlos Franco Voegeli**, pelos ensinamentos recebidos por esse, que é sem dúvida, um exemplo de conduta e postura profissional.

Ao **Laboratório Weinmann**, pelo incentivo e valorização a capacitação dos seus profissionais. Agradeço a equipe do setor de Biologia Molecular, em especial a **Fabiana da Silva Pereira**, pela dedicação e colaboração na parte prática.

Aos **professores, pesquisadores** do Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS que me auxiliaram no desenvolvimento dessa dissertação.

À **equipe de Gastroenterologia e Hemodiálise do Complexo Hospitalar Santa Casa** que permitiu que os pacientes, sob seus cuidados, fossem incluídos nesse estudo.

E a **todas as pessoas** que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

---

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

---

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>anti-HBc</b>	Anticorpo contra o HBcAg
<b>anti-HBe</b>	Anticorpo contra o HBeAg
<b>anti-HBs</b>	Anticorpo contra o HBsAg
<b>anti-HBx</b>	Anticorpo contra o HBxAg
<b>anti-HCV</b>	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
<b>anti-HIV</b>	Anticorpo contra o HIV
<b>BCP</b>	Promotor Basal do Core
<b>CBGM</b>	Centro de Biologia Genômica e Molecular
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>cm</b>	Centímetro
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
<b>ddNTPs</b>	Didesoxirribonucleotídeo trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>g</b>	Gramas
<b>HBcAg</b>	Antígeno do centro do vírus da hepatite B
<b>HBeAg</b>	Antígeno e do vírus da hepatite B
<b>HBsAg</b>	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
<b>HBxAg</b>	Antígeno X do vírus da hepatite B
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferon-alfa
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>MS-1</b>	Designação da primeira linhagem do vírus da hepatite A
<b>MS-2</b>	Designação da primeira linhagem do vírus da hepatite B
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>pmol</b>	Picomol
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b>VHB</b>	Vírus da hepatite B
<b>VHC</b>	Vírus da hepatite C

---

## Sumário

---

<b>Lista de Figuras e Gráficos</b> .....	ix
<b>Lista de Tabelas</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>SUMMARY</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>1.1 Epidemiologia</b> .....	2
<b>1.2 História Natural</b> .....	5
<b>1.3 O Vírus da Hepatite B</b> .....	6
<i>1.3.1 A Classificação do Vírus da Hepatite B</i> .....	6
<i>1.3.2 O Genoma do Vírus da Hepatite B</i> .....	7
<i>1.3.3 Proteínas Virais</i> .....	9
<b>1.4 Diversidade Viral</b> .....	11
<i>1.4.1 Genótipos e Subtipos</i> .....	11
<i>1.4.2 Mutações do VHB</i> .....	14
<b>1.5 Relação dos Genótipos com a Resposta ao Tratamento Anti-Viral</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
<b>2.1 Objetivo Primário</b> .....	18
<b>2.2 Objetivos Secundários</b> .....	18
<b>3 PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	20
<b>3.1 Casuística</b> .....	20
<b>3.2 Extração de Ácidos Nucléicos</b> .....	21
<b>3.3 Reações de PCR</b> .....	22
<i>3.3.1 PCR Nested</i> .....	22
<i>3.3.2 Identificação dos Produtos das Reações</i> .....	24
<i>3.3.3 Controle de Qualidade</i> .....	24
3.3.3.1 Análises dos Controles .....	24
<b>3.4 Reação de Purificação</b> .....	25
<b>3.5 Reação de Seqüenciamento</b> .....	25
<b>3.6 Análise das Seqüências</b> .....	26
<b>3.7 Aspectos Éticos</b> .....	26
<b>3.8 Análise Estatística</b> .....	26

<b>4 RESULTADOS</b> .....	29
<b>4.1 Relação entre Dados Demográficos da População Avaliada e os Genótipos</b> .....	30
<b>4.2 Fatores de Risco Avaliados e os Genótipos</b> .....	31
<b>4.3 Genótipos, Padrão Sorológico e Laboratorial da Doença Hepática</b> .....	32
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	43
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45
<b>8 ANEXOS</b> .....	59
<b>8.1 Protocolo</b>	
<b>8.2 Consentimento Pós-Informação</b>	
<b>8.3 Dados e Resultados dos Pacientes Analisados</b>	

---

## Lista de Figuras e Gráficos

---

<b>Figura 1</b>	Distribuição geográfica da infecção crônica por VHB.....	3
<b>Figura 2</b>	Vírus da hepatite B visto à microscopia eletrônica.....	6
<b>Figura 3</b>	Vírus e partículas subvirais da hepatite B.....	7
<b>Figura 4</b>	Genoma do VHB.....	9
<b>Figura 5</b>	Distribuição dos genótipos da população estudada .....	29
<b>Gráfico 1</b>	Casos de hepatite B confirmados no Estado do Rio Grande do Sul, de 1996 a 2005.....	4
<b>Gráfico 2</b>	Casos de hepatite B confirmados em Porto Alegre, de 1996 a 2005.....	4

---

## Lista de Tabelas

---

<b>Tabela 1</b>	Relação dos genótipos e seus respectivos subtipos.....	11
<b>Tabela 2</b>	Distribuição geográfica mundial dos 8 genótipos do VHB.....	13
<b>Tabela 3</b>	Distribuição da idade dos pacientes nos diferentes genótipos .....	30
<b>Tabela 4</b>	Distribuição dos genótipos do VHB em relação ao sexo .....	30
<b>Tabela 5</b>	Distribuição dos genótipos do VHB em relação à raça.....	31
<b>Tabela 6</b>	Distribuição dos genótipos do VHB em relação ao fator de risco.....	32
<b>Tabela 7</b>	Distribuição dos genótipos do VHB em relação ao padrão sorológico e laboratorial da doença hepática.....	33

---

## RESUMO

---

---

## RESUMO

---

A hepatite pelo vírus B continua sendo um flagelo à humanidade. Muito tem sido a evolução do conhecimento desta doença e de seu agente etiológico. Nos últimos anos especial atenção tem sido dada à genotipagem do vírus da hepatite B (VHB).

Este estudo tem como objetivo implementar uma técnica para determinação do genótipos e subtipos do VHB.

Para esse fim foram avaliados 67 pacientes com marcadores de infecção crônica pelo VHB, que estavam em acompanhamento no ambulatório de gastroenterologia e na unidade de hemodiálise do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre – RS. Desses, 15 eram pacientes em hemodiálise e 52 estavam em acompanhamento ambulatorial. Foi aplicado aos pacientes um protocolo de estudo com dados demográficos, epidemiológicos e realizada a determinação de ALT e do HBeAg. Os genótipos e subtipos foram determinados após a extração do DNA, com a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) *in house* e, por fim, as amostras foram seqüenciadas. O nível de significância utilizado nesse estudo foi de 5%. A análise qualitativa para DNA-VHB, pela PCR, foi positiva em 79,1% das amostras (53/67). O genótipo foi determinado em todas as amostras DNA-VHB positivas. A análise demonstrou a presença dos genótipos A (34%), D (60,4%) e F (5,4%). Foram encontrados os seguintes subtipos: *adw*, *ayw* e *adw4*. Não se encontrou correlação significativa entre os genótipos do VHB e as variáveis demográficas estudadas (idade, sexo e cor), com os fatores de risco para a aquisição do VHB e com o padrão sorológico e laboratorial da doença hepática. Conclui-se que, após ter-se realizado com sucesso técnica para a determinação dos genótipos e subtipos do VHB, o mais prevalente genótipo observado foi o D. No entanto, há necessidade de estudos com maior casuística para que possamos avaliar as implicações da variabilidade genética na evolução clínica dos portadores do VHB.

---

## SUMMARY

---

---

## SUMMARY

---

The hepatitis caused by B virus continues being humanity calamity. There has been great evolution in terms of knowledge of this illness and its etiology agent. In recent years special attention has been given to the genotyped of the hepatitis B virus (VHB).

The objective of this study is to implement a technique for the determination of the genotypes and subtypes of the VHB.

To accomplish this objective 67 patients were evaluated with markers of chronic infection by the VHB, who were assisted in the clinic of gastroenterology and the unit of hemodialysis of the *Complexo Santa Casa* in Porto Alegre - RS. Among the 67 selected individuals, 15 were patients in hemodialysis and 52 patients were assisted in the ward. A record of study was applied to the patients with information about demographic data, epidemiologists, and the determination of ALT and HBeAg was done. The genotypes and subtypes were determined after the extraction of the DNA, after the chain reaction of polimerase (PCR) in house was done and, finally, the samples were sequenced. The level of significance used in this study was of 5%. The qualitative analysis for DNA-VHB, by the PCR, was positive in 79,1% of the samples (53/67). The genotype was determined in all positive DNA-VHB samples. The analysis demonstrated the presence of the genotypes A (34%), D (60.4%) and F (5.4%). The following subtypes were found: *adw*, *ayw* and *adw4*. There has not been found any significant correlation among the variable demographic studied (age, sex and color), with the factors of risk for the infection of the VHB and with the serological and laboratorial standard of the hepatical illness. It has been concluded that after having successfully done the technique for the determination of the genotypes and subtypes of the VHB, the most frequent was genotype D. However, there is the need for deeper studies, so that we will be able to evaluate the implications of the genetic variability in the clinical evolution of the VHB carriers.

---

# 1 INTRODUÇÃO

---

# 1 INTRODUÇÃO

A hepatite viral é uma das causas mais freqüentes de doença aguda e crônica do fígado. Quando analisamos os vírus hepatotrópicos, observamos que a descoberta do antígeno Austrália e sua posterior vinculação com o vírus da hepatite B (VHB) correspondeu a um dos grandes avanços científicos do século XX. Essa etapa desencadeou uma explosão de informação na literatura médica, com melhora da compreensão das hepatites virais agudas e crônicas [111, 117].

A despeito da importância da histologia, a história natural da hepatite pelo VHB e a avaliação da eficácia dos tratamentos antivirais é feita, basicamente, pelo acompanhamento das “provas de função hepática”, dos marcadores sorológicos do VHB e de sua atividade replicativa, medida diretamente pela quantificação do DNA viral em amostras de soro. Recentemente, pelo seqüenciamento do DNA viral, foram determinadas outras características virais relevantes para o prognóstico e avaliação da resposta terapêutica de um determinado paciente. Assim, a genotipagem do VHB e a determinação do subtipo viral tem ganho crescente prestígio quanto ao acompanhamento desses pacientes [107, 108, 110].

## 1.1 **Epidemiologia**

A existência de uma forma de hepatite de transmissão parenteral foi documentada pela primeira vez quando da sua transmissão por vacina antivaríólica, em 1885. Após essa data, vários casos foram referidos na literatura, até que, em 1947, Mccallum definiu o termo hepatite B para esta entidade [96].

Experimento realizado em uma instituição de deficientes mentais levou à identificação de dois agentes infecciosos independentes, denominados como MS-1 e MS-2, que foram associados com as hepatites A e B, respectivamente [57].

Em 1965, Blumberg *et al.* [12] descobriram no soro de um aborígene australiano um antígeno que foi denominado antígeno Austrália, inicialmente associado com uma série de diferentes doenças. Sua ligação com a hepatite B foi feita três anos depois por Okochi e Murakami [111] e Prince [117], recebendo posteriormente o nome de antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg).

## 1 Introdução

M

de 20 a

marca

com i

clínico

aqu

aus

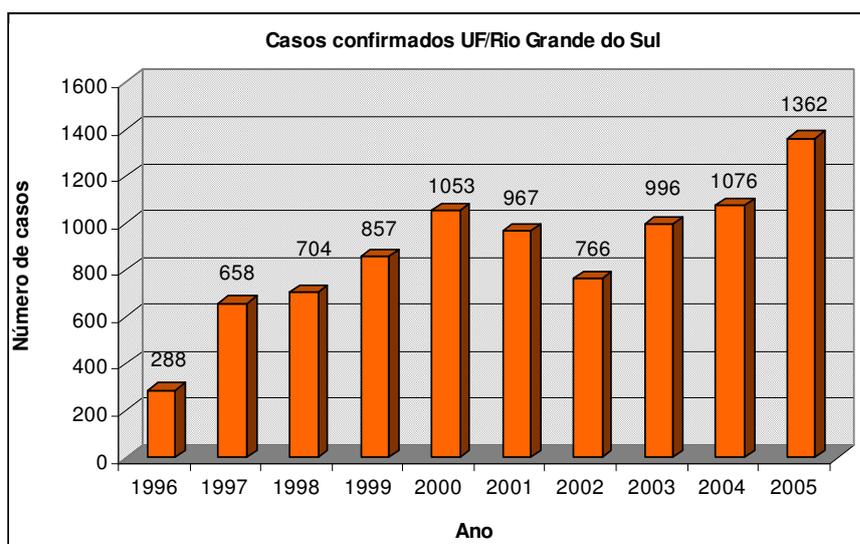
(a

O

p

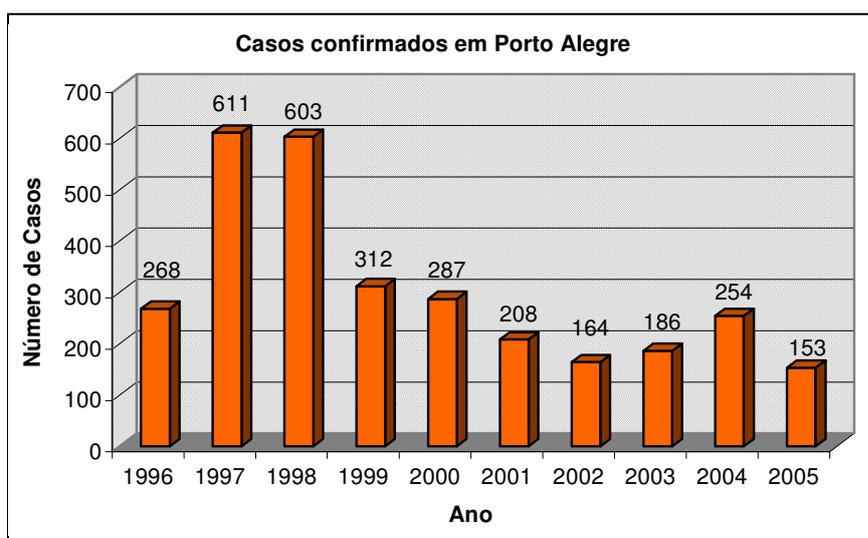
No Brasil, o Ministério da Saúde estima que pelo menos 15% da população já foi contaminada com VHB, sendo que os casos crônicos correspondem a cerca de 1% da população brasileira. A literatura médica refere à Região Sul como área de baixa endemicidade; as regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste de intermediária endemicidade, a região da Amazônia, o estado do Espírito Santo e a região oeste do estado de Santa Catarina de alta endemicidade [17, 18].

No Estado do Rio Grande do Sul e em Porto Alegre, as notificações de hepatite pelo VHB são representados pelos Gráficos 1 e 2.



Fonte: Secretaria Estadual da Saúde / RS  
SINAN/DVE/CEVS/SES-RS

**Gráfico 1** - Casos de hepatite B confirmados no Estado do Rio Grande do Sul, de 1996 a 2005.



Fonte: Secretaria Municipal da Saúde / Porto Alegre  
SINAN/EVDT/CGVS/SMS

**Gráfico 2** - Casos de hepatite B confirmados em Porto Alegre, de 1996 a 2005.

É estimado que, no mundo, 400 milhões de indivíduos sejam portadores crônicos do VHB [78]. Estudos epidemiológicos demonstram que a hepatite B é responsável por 2 milhões de mortes por ano [92], sendo a 9ª causa de morte no mundo [15].

De modo geral, a taxa de letalidade dos pacientes hospitalizados é de 0,8% a 2%, podendo aumentar nos indivíduos com mais de 40 anos de idade. No Brasil, a taxa de mortalidade é de 0,6 por 100.000 habitantes [16].

## **1.2 História Natural**

O VHB pode causar hepatite fulminante, aguda, crônica, cirrose e hepatocarcinoma (CHC) [42]. A hepatite fulminante ocorre em 0,5 a 1% dos casos [43]. A coinfeção do VHB com o vírus delta tem sido relacionado ao aumento do risco de hepatite fulminante [127]. A hepatite aguda é, geralmente, subclínica e anictérica em neonatos e crianças, ao contrário dos adultos onde aproximadamente 30-50% desenvolvem icterícia [97]. Um aspecto relevante da infecção é que até 90% dos recém-nascidos infectados pelo VHB podem desenvolver hepatite crônica. Esta pode evoluir de forma assintomática ou subclínica, sendo notada somente anos mais tarde, com o desenvolvimento de cirrose e/ou CHC [37]. Por outro lado, nos indivíduos infectados pelo VHB na fase adulta, entre 2 a 10% evoluirão para hepatite crônica [43].

A taxa mundial de incidência da progressão para cirrose em pacientes com hepatite crônica B é de 20% em 5 anos [37]. Fatores associados com um aumento da taxa de progressão à cirrose incluem elevados níveis no soro de VHB-DNA, episódios de exacerbação da doença e atividade necroinflamatória severa [61, 94]. A probabilidade de sobreviver após 5 anos do diagnóstico de cirrose é de 84% [119]. A descompensação hepática ocorre com uma taxa anual de 3% em pacientes cirróticos, com uma incidência cumulativa em 5 anos de 16% [37].

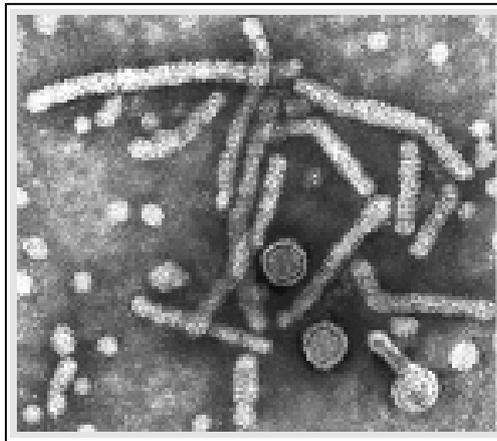
O CHC é um dos mais freqüentes tumores malignos existentes no mundo [41, 88]. É estimado que 53% dos casos de CHC estão relacionados ao VHB [114]. A literatura mostra que há relação entre a freqüência do estado de portador do VHB com a freqüência de hepatocarcinoma e que a incidência de CHC em áreas de alta endemicidade, é de 0,1 a cada 100 portadores crônicos assintomáticos e 1,0 a cada 100 pacientes com hepatite B crônica não cirróticos [98]. A idade mais avançada, o abuso de álcool, história familiar e a presença de cirrose são fatores importantes para desenvolvimento de CHC [10].

Pacientes que tiveram infecção passada pelo VHB, em casos de imunossupressão, como câncer, quimioterapia ou após transplante, o vírus pode ser reativado [27].

## 1.3 O Vírus da Hepatite B

### 1.3.1 A Classificação do Vírus da Hepatite B

O VHB é um vírus de DNA, com dimensões de 42 nm, envelopado, da família Hepadnaviridae e que possui 3.200 nucleotídeos [25, 43]. A Figura 2 mostra através da microscopia eletrônica as partículas virais.

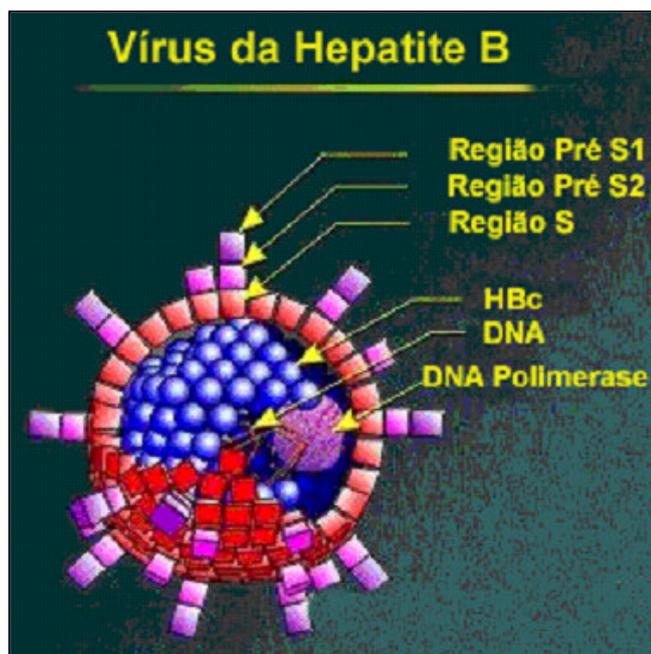


Fonte: Internet - [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov) - Centers for Disease Control and Prevention

**Figura 2** - Vírus da hepatite B visto à microscopia eletrônica.

O VHB é estável no éter e à temperatura de 20 a 27° C. É inativado em autoclave por 30 minutos e no calor seco (160° C) por uma hora [91]. A partícula viral completa, denominada de partícula de Dane; tem uma estrutura complexa, com duplo envoltório. O envoltório externo contém proteínas antigênicas denominadas de HBsAg; e o interno, junto com o DNA e uma enzima (DNA-polimerase), constitui o core, que apresenta uma proteína antigênica, o antígeno de centro da hepatite B (HBcAg) e um antígeno solúvel, antígeno e do vírus da hepatite B (HBeAg) [36, 118].

A Figura 3 mostra o VHB e suas partículas virais.



Fonte: Internet - [www.globalseve.net/~robertg/HBV/index.html](http://www.globalseve.net/~robertg/HBV/index.html)

**Figura 3** - Vírus e partículas subvirais da hepatite B.

### 1.3.2 O Genoma do Vírus da Hepatite B

O genoma do VHB consiste de 3.200 pares de bases, sendo o menor vírus DNA conhecido [69], contendo quatro genes, ou seja, estruturas sobrepostas para leitura genética, denominados S, C, P e X, os quais regulam a seqüência da produção de proteínas virais no ciclo replicativo do vírus. Os genes C e S possuem regiões iniciais denominadas pré-C e pré-S [11, 78, 86]:

a) O **gene S** corresponde à proteína principal do envelope e é dividido em S e pré-S [33].

As proteínas do envelope, pré-S1, pré-S2 e S, codificam 3 glicoproteínas da superfície: a S (*small*) de 24 kDa, é a mais abundante proteína do envelope viral; a M (*middle*), com 31 kDa, cujo significado permanece desconhecido, contém, além da proteína menor, mais uma extensão amino-terminal na qual está localizado o antígeno pré-S2; e a L (*large*), com 39 kDa, formada pela proteína M acrescida de uma extensão N-terminal que define o antígeno pré-S1 e é envolvida no reconhecimento viral pelos receptores do hepatócito. Quando a

proteína L não é secretada, acumulando-se dentro do retículo endoplasmático, este se torna hiperplásico, originando o aspecto celular de “vidro fosco” evidenciado pela histologia [33].

b) O **gene C** codifica para a principal proteína do core viral e está correlacionado com a infecciosidade. Esse gene possui dois códons de iniciação: a região pré-core e a região core. O gene pré-C/C codifica dois componentes virais: polipeptídeos formadores do nucleocapsídeo e que corresponde ao HBcAg e uma proteína que se tornará o HBeAg (antígeno solúvel) [80]. O nucleocapsídeo envolve o VHB-DNA (genoma viral) e a DNA-polimerase. No citosol dos hepatócitos, o nucleocapsídeo é envolvido pelo HBsAg, formando o vírus. O HBcAg é encontrado no tecido hepático e excepcionalmente no soro, contrastando com o antígeno solúvel HBeAg presente com regularidade no soro de pacientes com replicação do VHB [91].

Além da replicação celular, o VHB possui a propriedade de integrar seu genoma ao genoma do hospedeiro, momento em que pode agir como um vírus oncogênico [91].

Segundo Norder *et al.* [107], as regiões pré-core e core do gene C possuem variabilidade intermediária, sendo 69,9% dos genes conservados, ao contrário da região pré-S do gene S, que é a região que possui maior variabilidade genômica; somente 49,6% dos nucleotídeos se mantiveram constantes em seu estudo. A região S foi a região genômica que se manteve mais conservada (81,9%), quando todos os genomas foram comparados.

c) O **gene P** está relacionado à atividade da DNA polimerase. Esse gene se estende por cerca de 80% do genoma viral e é uma importante enzima pois está relacionada ao processo de replicação viral [67].

d) O **gene X** é uma proteína multifuncional que possui atividade de transativação e transcrição. Esse gene provavelmente seja uma proteína reguladora das funções do VHB como uma proteína quinase e como um ativador de transcrição. Isto faz com que aumente a atividade do VHB e também de outros vírus, como por exemplo o HIV e fatores de crescimento de oncogenes. Estudos preliminares, sugerem que o anti-HBx é um marcador encontrado em pacientes com VHB associado ao CHC [67, 134].

A Figura 4 mostra o genoma completo do VHB.



relacionados ao determinante "a" do HBsAg, comum a todos os subtipos, e contra determinantes específicos dos subtipos [13, 38, 40, 51, 58, 65, 76, 91, 130].

O HBcAg é uma proteína não glicosilada, que se correlaciona com replicação viral e doença ativa. Não tem importância prática para o diagnóstico de hepatite aguda, mas é de real valor na avaliação da replicação viral em material de biópsia hepática de pacientes com infecção crônica, uma vez que não é detectado no soro pelos métodos de rotina [91].

Durante a replicação do VHB, prioritariamente na fase aguda das doenças, podem ser detectados no soro anticorpos IgM para o HBcAg, que continuam a ser detectados semanas ou meses após a infecção. Em casos de hepatite B aguda, ou durante agudizações de hepatite B crônica, podem ser observadas elevadas concentrações de anti-HBc IgM. Para diagnosticar infecção viral aguda utilizam-se testes de detecção de anticorpos anti-HBc IgM, juntamente com determinações de HBsAg [38, 40, 45, 46, 48, 49, 53, 57, 91, 122, 144].

O anti-HBc IgG surge pouco tempo depois do início da infecção, podendo ser detectado no soro após o aparecimento do HBsAg. Os anticorpos anti-HBc subsistem tanto nos indivíduos que se recuperaram de uma infecção, como naqueles que desenvolvem o estado de portador do HBsAg. Assim, pode ser um indicador de infecção passada ou de infecção crônica [58]. Na falta de outros marcadores da hepatite B (indivíduos HBsAg não reagentes), o anti-HBc pode ser a única indicação de infecção viral pré-existente [50].

O HBeAg é um marcador de replicação viral ativa e está associado com a progressão da doença. O HBeAg surge no soro durante as infecções agudas pelo VHB, e só é detectável durante um intervalo de tempo. Habitualmente, a detecção do HBeAg está associada à presença de grandes quantidades de vírus. Na fase de recuperação após a hepatite B aguda, o HBeAg torna-se negativo, sendo substituído pelo anticorpo correspondente (anti-HBe). Quando persiste, sugere cronificação do processo. Podem, no entanto, ocorrer infecções crônicas pelo VHB sem detecção do HBeAg. A constatação do anti-HBe nestes indivíduos é uma indicação da presença de mutantes do VHB [19-21, 38, 40, 45, 57, 74, 99, 140].

Historicamente, na maioria das vezes o diagnóstico da hepatite pelo VHB era focado nos marcadores sorológicos das proteínas virais específicas e seus respectivos anticorpos. Entretanto a tecnologia molecular tem avançado muito, tendo-se hoje a possibilidade de avaliar qualitativamente e quantitativamente o DNA do VHB [32].

## 1.4 Diversidade Viral

### 1.4.1 Genótipos e Subtipos

Os genótipos do VHB, nos últimos anos, têm sido relacionados à progressão da doença hepática, assim como a resposta às terapias antivirais [55, 69, 85, 90, 113].

O curso da infecção pelo VHB depende de muitos fatores que podem influenciar a interação vírus-hospedeiro, sendo provavelmente de relevância, a variabilidade genética do vírus, incluindo genótipos e subtipos, os quais podem influenciar a expressão dos antígenos virais [54, 59, 69, 115].

Análises do genoma revelaram 8 genótipos (A-H) do VHB, com distribuição geográfica mundial distinta [82, 85, 131].

Além dos genótipos há 4 principais subtipos sorológicos do VHB (*adw*, *ayw*, *adr* e *ayr*) ou 9 subtipos secundários: *adw* (*adw2*, *adw4*); *ayw* (*ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*);

*ayi*, *ayw2* e

O determinante “a” é comum à maioria dos vírus e é atribuído a um epítipo descontínuo, ao qual são dirigidos anticorpos neutralizantes anti-HBs. Ela faz parte da região hidrofílica principal do HBsAg e sua estrutura terciária é muito importante para sua antigenicidade [22, 141].

Esses subtipos dependem de aminoácidos do HBsAg. Na posição 122 a Lisina determina a especificidade d, enquanto a Arginina determina a y. A posição 160 determina a especificidade w na presença de uma Lisina ou r na presença da Arginina. Na posição 127 uma Prolina determina as especificidades w1 e w2, a Treonina determina a w3 e uma Leucina ou Isoleucina determina a w4. A presença de uma Alanina na posição 159, determina o subtipo adrq+ e uma Glicina na mesma posição determina adrq- [47, 93, 106].

A divergência das seqüências do genoma completo dentro de um mesmo subtipo é de aproximadamente 8%, semelhante à encontrada entre diferentes subtipos. Assim, a subtipagem não reflete uma verdadeira variação genotípica nas seqüências codificadoras da proteína S [110].

Os genótipos do VHB tem distribuição geográfica mundial distinta. Globalmente, os genótipo A e D são mais prevalentes no Brasil, Europa, América do Norte, Índia e África; o genótipo B e C são encontrados com maior freqüência no Sudeste da Ásia, China e Japão; o genótipo E é restrito à África; o genótipo F é encontrado na população nativa da América do Sul e Central; o genótipo G foi descrito na França, Estados Unidos, México e o genótipo H foi encontrado na América Central [7, 69, 71, 85, 104] (Tabela 2).

A distribuição geográfica dos genótipos pode mudar devido a migração ou ao comportamento de risco populacional. Nos Estados Unidos, os genótipos B e C são resultados da imigração da população Asiática [31].

O VHB diverge entre os genótipos de acordo com a distribuição populacional nos diferentes continentes. Entretanto, estes estudos ainda estão incompletos em algumas partes do mundo, incluindo a América do Sul [102, 108, 135].

**Tabela 2** - Distribuição geográfica mundial dos 8 genótipos do VHB

Genótipo	Distribuição Geográfica Mundial
A	Nordeste da Europa, Espanha, Alemanha, Polônia, EUA, África Central, Índia, Brasil
B	Sudeste da Ásia, Taiwan, Japão, Indonésia, China, Hong Kong, Vietnã, Tailândia
C	Leste da Ásia, Taiwan, Japão, Coreia, China, Hong Kong, Tailândia, Indonésia, Polinésia, Ilhas Salomão, Vietnã, Índia, Austrália, EUA, Brasil
D	Mediterrâneo, Albânia, Turquia, Irã, Índia, Espanha, República Checa, Rússia, EUA, Brasil, Ilhas Salomão
E	Oeste da África
F	América do Sul e Central, Bolívia, Venezuela, Argentina, Brasil, Polinésia, Alasca
G	França, EUA
H	América Central

Fonte: Liu, C.J. *et al.* *Liver International* 2005;25:1097-1107 e Arauz-Ruiz, P. *et al.* *J Gen Virol* 2002;83:2059-2073.

A distribuição genotípica do VHB e sua correlação com o curso clínico da doença hepática ainda não estão claros [39, 62].

A maioria dos estudos indica que a gravidade da hepatite crônica é maior em pacientes com genótipo C comparado ao genótipo B [66, 85]. Estudo com pacientes de Taiwan, mostraram que a cirrose e o CHC são mais freqüentes em portadores do genótipo C do que B [85]. O genótipo C é mais prevalente em pacientes HBeAg positivos do que o genótipo B [31]. A literatura mostra que o risco de CHC além de aumentar com o aumento da carga viral por estar associado com o genótipo do VHB. Assim, no Japão e na China, o genótipo C do VHB está relacionado com o desenvolvimento do CHC [85, 95].

Similarmente, o genótipo D está associado com maior gravidade da doença hepática quando comparado ao genótipo A e pode também favorecer a ocorrência de CHC em pacientes jovens [69].

Na Europa, a maioria dos pacientes com o genótipo A tem hepatite crônica, e a maioria dos pacientes com o genótipo D têm hepatite aguda [95].

Sanchez-Tapias *et al.* [123] mostraram que a remissão bioquímica e o clearance do DNA do VHB foram mais freqüentes no genótipo A do que no D ou F; a taxa de depuração do HBsAg foi também mais alto, no genótipo A, quando comparado, com o genótipo D.

### 1.4.2 Mutações do VHB

As mutações do VHB em pacientes com hepatite crônica são freqüentes, sendo maiores naqueles imunossuprimidos, como pacientes em hemodiálise [34, 87, 109], em quimioterapia, diabéticos [109, 116] e nos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) [4, 56, 109].

Diversas são as mutações existentes, entretanto a variante mais freqüentemente encontrada nas infecções crônicas do VHB é a variante pré-core. Inicialmente descrita na Itália [19], envolvia casos de pacientes com sorologia negativa para o HBeAg, mas positiva para o HBsAg, anti-HBc, anti-HBe, presença de DNA viral e HBcAg no fígado.

São comuns na região Mediterrânea e no Extremo Oriente, apresentando mutações pontuais na região pré-core do genoma viral (posições 1896/1899). A presença da seqüência “selvagem” foi denominada M0, a presença da mutação no nucleotídeo 1896 de M1, onde ocorre a troca de guanina (G) para adenina (A) no nucleotídeo 1896 (G1896A) e a presença das duas mutações (G1896A/G1899A) de M2 [5, 29, 79, 81]. Essa mutação traduz um impedimento da produção do HBeAg. Tais casos geralmente traduzem doença mais grave, talvez devido à ausência do papel modulador da resposta imune desempenhado pelo HBeAg, evoluindo, muitas vezes, com hepatite crônica com intensa atividade [142]. Essas mutações podem estar associadas a uma progressão mais rápida da infecção pelo VHB, com maior freqüência de evolução para cirrose e carcinoma [137]. Essas mutações também foram encontradas em pacientes com doença hepática não avançada [75].

A mutação na região pré-core é dependente do genótipo e é encontrada com maior freqüência em pacientes com genótipo D, sendo incomum em pacientes com o VHB do genótipo A [30, 52, 83, 112, 121]. Essa mutação também é mais freqüente no genótipo B em relação ao C e uma análise multivariada mostrou que a mesma não está relacionada com a soro-conversão para o anti-HBe [132].

Outra mutação observada é a do Promotor Basal do Core (BCP), onde o HBeAg também é negativo e existe o padrão HBsAg, anti-HBe e DNA viral positivos. Nestes casos, no nucleotídeo 1762, ocorre troca de adenina (A) para timina (T) – (A1762T), e de guanina (G) para adenina (A) no nucleotídeo 1764 (G1764A). Essas duas mutações fazem com que haja uma *down-regulation* da produção do HBeAg [28]. Na população americana tais mutações são mais comuns nos genótipos C e D [72].

Alguns estudos revelam que mutações na região do core aumentam a taxa de replicação viral do VHB [30] e estes nucleotídeos acarretam hepatite crônica com maior atividade, doença mais grave após transplante de fígado, CHC e hepatites fulminantes [9].

Essas mutações ocorrem com maior frequência no genótipo C do que no B, independente do estado do HBeAg [30]. A mutação do gene X no BCP pode aumentar o risco de CHC [26, 73].

## 1.5 Relação dos Genótipos com a Resposta ao Tratamento Anti-Viral

No que diz respeito ao tratamento, Liu *et al.* [84] mostraram a eficácia do interferon (INF) convencional nos pacientes com hepatite B crônica genótipo B. Os resultados desse estudo mostraram que pacientes com genótipo C têm um nível basal elevado de aminotransferases e uma alta frequência de mutação do core promoter (A1762T/G1764A). A taxa de resposta, definida pela normalização do nível das aminotransferases, perda do HBeAg e negatização do VHB DNA após 48 semanas de tratamento foi de 41% e 15% em pacientes genótipos B e C, respectivamente. Esses dados sugerem que o genótipo C do VHB, comparado com o genótipo B, está associado com a alta frequência de mutação do core promoter e uma baixa taxa de resposta à terapia com IFN- $\alpha$ . Wai [139] também compararam a resposta da terapia com IFN- $\alpha$  entre os genótipos B e C. Eles encontraram dados semelhantes aos anteriores: a resposta foi melhor em pacientes com o genótipo B do que com o genótipo C (39% vs. 17%).

Pacientes com o genótipo A e sem mutações na região pré-core também respondem em maior frequência ao tratamento com IFN- $\alpha$  [143].

Outros estudos, considerando a resposta ao tratamento, demonstraram que pacientes com genótipos C e D apresentam uma baixa resposta à terapia com IFN- $\alpha$  quando comparados com os genótipos A ou B [63, 69]. Isso provavelmente se deve ao desenvolvimento de mais mutações no BCP dos genótipos C e D, comparado com os genótipos A e B [103].

O genótipo B mostrou ter melhor resposta à lamivudina do que o genótipo C [70]. Pacientes infectados com o genótipo B tiveram uma melhor resposta à lamivudina durante os três primeiros meses de tratamento, comparados aos pacientes infectados com o genótipo C. O subtipo *adw* é associado a um maior risco de resistência à lamivudina do que o subtipo *ayw* [69].

Zollner *et al.* [145] mostraram que há um risco maior de resistência à lamivudina do genótipo A em relação ao genótipo D; além disso, a média de tempo para que ocorra mutação no genótipo A, quando da utilização do medicamento, é de 4 meses comparado ao genótipo D onde o tempo é maior que 12 meses.

A despeito da importância epidemiológica e clínica do conhecimento dos genótipos do VHB, pouco se sabe sobre a distribuição genotípica desta infecção na América Latina [6, 135, 136]. No Brasil, esses estudos são pouco frequentes, e o número de linhagens analisadas

é pequena [23, 24, 44, 100, 120, 126, 136]. Desta forma, nos propomos avaliar a prevalência dos genótipos do VHB em uma coorte de pacientes avaliados em um hospital geral.

---

## **2 OBJETIVOS**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Primário**

- Implementar uma técnica para determinação dos genótipos e subtipos do vírus da hepatite B.

### **2.2 Objetivos Secundários**

- Avaliar a prevalência dos genótipos e os subtipos do VHB na população estudada.
- Avaliar a correlação dos dados demográficos e fatores de risco com os genótipos do VHB.
- Avaliar o *status* sorológico da doença hepática e sua correlação com os genótipos do VHB.

---

## **3 PACIENTES E MÉTODOS**

---

### **3 PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1 Casuística**

Foram avaliados 67 pacientes consecutivos, com marcadores de infecção crônica pelo VHB, que estavam em acompanhamento no ambulatório de gastroenterologia e na unidade de hemodiálise do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre – RS, no período de fevereiro de 2005 a setembro de 2006.

Os pacientes foram divididos em dois grupos:

a) pacientes HBeAg positivos subdivididos em:

- com alanina aminotransferase (ALT) dentro dos limites da normalidade;
- com ALT aumentada.

b) pacientes HBeAg negativos subdivididos em:

- com ALT dentro dos limites da normalidade;
- com ALT aumentada.

O valor de referência utilizado para ALT foi de 35 U/L.

Os critérios de inclusão foram: pacientes com positividade para o HBsAg no soro por um período superior a seis meses independente dos níveis séricos de aminotransferases.

Os critérios de exclusão foram: pacientes com anti-HCV positivo, anti-HIV positivo, ingestão de bebida alcoólica > 40 g/dia, uso de medicamentos potencialmente hepatotóxicos e pacientes que não assinaram o termo de consentimento informado.

Foi preenchido, junto ao paciente, pelo pesquisador o protocolo pré-estabelecido com dados demográficos, epidemiológicos e de exames laboratoriais (Anexo 8.1).

Do ponto de vista epidemiológico, considerou-se a hemodiálise como fator de risco para a aquisição do VHB, quando os pacientes tornaram-se HBsAg positivos após o início do programa dialítico.

#### **3.2 Métodos**

De cada paciente foi colhido, à vácuo, dois frascos de sangue total com EDTA (2 x 5 ml - Vacutainer BD / Becton Dickinson UK Ltda.) e posteriormente centrifugados entre

1.500 e 2.000 rpm. O plasma foi separado e as amostras foram estocadas em *freezer* a menos 20° C no Laboratório Central do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre.

Após a coleta, as amostras receberam um número seqüencial fazendo com que a identificação dos pacientes fosse conhecida apenas pelo autor do projeto.

Os testes sorológicos foram analisados, seguindo as especificações dos fabricantes. O HBsAg e o HBeAg foram analisados pelo método de eletroquimioluminescência (Elecsys 2010 – Roche). Para dosagem da ALT foi utilizado o método cinético colorimétrico (Advia 1650 – Bayer).

Os genótipos e subtipos foram determinados segundo Sitnik *et al.* [126].

### 3.2.1 Extração de Ácidos Nucléicos

A extração do DNA, realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) *in house* e o seqüenciamento das amostras foram realizados no CBGM/PUCRS (Centro de Biologia Genômica e Molecular / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) e no Laboratório Weinmann Ltda, ambos de Porto Alegre – RS

A estabilidade das amostras, para realização da extração de ácidos nucleicos, é de até 6 meses quando armazenadas a menos 20° C, segundo fabricante do kit [QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN Inc., Calif.)].

#### **Protocolo de extração para sangue:**

- as amostras foram equilibradas à temperatura ambiente;
- foi ligado o termobloco a  $56 \pm 2^\circ$  C;
- tampão AE (eluente) foi equilibrado à temperatura ambiente;
- nos casos em que ocorreu precipitação no tampão AL (lisante) foi dissolvido por incubação à  $70 \pm 2^\circ$  C;
  - todos passos de centrifugação foram feitos à temperatura ambiente;
  - verificou-se se o volume adequado de etanol foi adicionado aos tampões AW1 (tampão de lavagem, 242 mL) e AW2 (tampão de lavagem, 324 mL) antes de serem usados pela primeira vez.

A seguir, obdeceu-se aos seguintes passos:

- a) pipetou-se Protease (ou Proteinase K) no fundo de um tubo de micro-centrífuga;
- b) adicionou-se o tampão AL ao tubo;
- c) adicionou-se a amostra. Após, agitou-se no vórtex;
- d) incubou-se a  $56 \pm 2^\circ$  C por aproximadamente 20 minutos;
- e) centrifugou-se brevemente para remover resíduos da tampa;

- f) adicionou-se etanol (96% – 100%), e agitou-se novamente no vórtex;
- g) transferiu-se a mistura do passo f para uma coluna QIAamp identificada, sendo essa centrifugada. Após a centrifugação descartou-se o tubo contendo o filtrado e esse foi transferido da coluna para um novo tubo coletor;
- h) adicionou-se sobre a coluna o tampão AW1, evitando encostar na membrana; centrifugou-se novamente. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor e o tubo contendo o filtrado foi descartado;
- i) adicionou-se sobre a coluna o tampão AW2, evitando encostar na membrana; centrifugou-se novamente;
- j) a coluna foi colocada em um tubo *ependorf*, previamente identificado, e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Adicionou-se tampão AE e a coluna foi centrifugada novamente.

### 3.2.2 Reações de PCR

O DNA extraído foi amplificado por uma reação que utiliza *primers* e a partir da ligação com estes *primers* ocorre a PCR em que a enzima DNA Polimerase amplifica o DNA alvo.

Para isso ocorrer é necessário preparar a PCR. A mistura de reação contém as substâncias necessárias para fazer novas cópias de DNA no processo da PCR e foi realizada em sala especial, que não continha amostras biológicas, para que não houvesse contaminação com DNA de outro material que não seja o estudado. Foram colocadas as seguintes substâncias:

- a) **solução tampão** para manter a mistura de reação no pH e condições iônicas ideais para a reação;
- b) **desoxinucleosídeos trifosfatados** (dATP; dTTP; dGTP; dCTP) que são quatro componente químicos diferentes que atuam na construção da molécula de DNA, Adiciona-se uma mistura de todos os dNTP's em concentrações iguais à reação;
- c) **primers** serve para sintetizar a seqüência alvo no sentido 3' - 5' e outro para o sentido inverso isto é, 5' - 3';
- d) **Taq Polimerase** que irá promover a síntese de DNA apenas na região em dupla fita;
- e) *MgCl<sub>2</sub>*.

### 3.2.2.1 PCR Nested

O tipo de PCR realizado no estudo foi a PCR *Nested*, onde para melhorar a especificidade e a eficiência da reação, o segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente e depois, utilizando este primeiro produto, a amplificação da real seqüência-alvo. Estas duas etapas (*rounds*) são realizadas concomitantemente. O limite de sensibilidade do teste da PCR utilizado foi de 400 cópias/mL.

A reação ocorre em um termociclador que, através de sucessivas mudanças de temperatura, direciona as três etapas da reação:

- **Desnaturação:** aquecendo a reação a uma temperatura específica, as duas cadeias de DNA fita-dupla são separadas, tornando-se DNA fita-simples.
- **Anelamento:** nesta fase ocorre o pareamento do *primer*, com uma região complementar da fita do DNA da amostra. Somente se o DNA contiver a seqüência alvo, os *primers* irão anelar, marcando o ponto de partida para enzima Taq DNA polimerase.
- **Extensão:** a partir do *primer*, a Taq DNA polimerase adiciona nucleotídeos de forma a completar a cópia da seqüência alvo da fita molde, gerando uma fita-dupla a partir de cada fita-simples de DNA.

Ao final do primeiro ciclo da PCR, duas seqüências-alvo completas foram sintetizadas tendo como molde o DNA da seqüência original. Em cada ciclo sucessivo, as cadeias são novamente desnaturadas, originando duas cadeias fita-simples, nas quais os *primers* irão anelar e novas fitas de DNA serão sintetizadas pela DNA polimerase. O objetivo é de que no final da reação da PCR a seqüência de interesse seja encontrada em grande quantidade, facilitando sua detecção.

Os soros dos pacientes foram tratados como descrito acima e submetidos a duas rodadas de amplificação, usando seqüencialmente *primers* externos (FHBS1 e RHBS1) e internos (FHBS2 e RHBS2). Os *primers* selecionados foram os seguintes: FHBS1, 5'-GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTC-3'; FHBS2, 5'-CGT GGT GGA CTT CTC TCA ATT TTC-3'; RHBS1, 5'-AAA TKG CAC TAG TAA ACT GAG CCA-3'; e RHBS2, 5'-GCC ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC-3' [126].

A amplificação nas duas rodadas da PCR ocorreu com os seguintes ciclos em um termociclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA, USA).

A reação consistiu de:

- a) desnaturação inicial à 94° C por 20 segundos
- b) 30 ciclos de desnaturação à 94° C por 20 segundos
- c) 30 ciclos de anelamento à 56° C por 20 segundos
- d) 30 ciclos de extensão à 72° C por 30 segundos
- e) extensão final à 72° C por 1 minuto

f) manutenção das amostras à 4º C

### 3.2.2.2 Identificação dos Produtos das Reações

A detecção dos produtos amplificados é feita através de eletroforese em gel de agarose.

Os ensaios de eletroforese valem-se do princípio que determina que a carga global de uma fita de DNA é negativa. Ao final do processo, as cadeias de DNA estarão próximas ao cátodo (positivo), atraente de moléculas de carga negativa. No entanto, o foco da técnica é separar os fragmentos por tamanho, uma vez que a reação gera fragmentos de mesma extensão. O princípio baseia-se no fato de que cadeias maiores demoram mais tempo para passar pelos poros do gel de agarose e as cadeias menores viajam mais rapidamente através dela. A distância que o fragmento percorreu, a partir do ponto de aplicação, é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel, esses chamados de *ladders* (escadas).

Para identificar o produto das reações da PCR, aplicou-se uma voltagem que variou 70 V e 110 V, dependendo do tamanho da cuba utilizada. Foram utilizadas concentrações de 0,5% a 3% de agarose no gel. A visualização dos produtos no gel após a corrida foi realizada pela reação de ligação do DNA com brometo de etídio (EtBr). Esse composto tem a capacidade de inserir-se nas fendas da cadeia de DNA e apresenta fluorescência quando excitado com radiação ultravioleta. Adicionou-se o EtBr no gel de agarose liquefeito antes da corrida.

As bandas foram observadas em transiluminador com luz ultravioleta e o gel foi fotografado com máquina tipo Polaroid.

Os produtos da PCR foram purificados enzimaticamente e seqüenciados.

### 3.2.2.3 Controle de Qualidade

#### **Controles utilizados**

- Controle negativo: Água bidestilada estéril (ampola).
- Controle positivo: é utilizado um controle positivo específico composto de DNA para cada agente infeccioso a ser testado.

### 3.2.2.3.1 Análises dos Controles

- Controle negativo: não deve apresentar bandas.
- Controle positivo: VHB deve apresentar banda de 417 pares de bases (pb).

### 3.2.3 Reação de Purificação

Os produtos da PCR foram purificados enzimaticamente e seqüenciados.

A reação de purificação tem, como objetivo, deixar apenas o DNA íntegro, clivando os demais componentes para que estes não interfiram no seqüenciamento.

Os reagentes utilizados na purificação dos amplificadores são: clorofórmio, exonuclease I (EXO I), *Shrimp alkaline phosphatase* (SAP).

A seqüência de procedimentos para realizar a purificação foi:

1. identificar um tubo da PCR para cada amostra e pipetar 2,0 µl de enzima SAP/EXO;
  2. adicionar 2,0 µl do produto amplificado extraído com clorofórmio;
  3. colocar as amostras no termociclador e selecionar o programa SAP/EXO;
- Programa: 15 minutos a 37° C e 15 minutos a 80° C.

### 3.2.4 Reação de Seqüenciamento

Para o seqüenciamento, foi utilizada a técnica de seqüenciamento pela PCR (*cycle sequencing*), derivada da metodologia de Sanger *et al.* [124], utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes (Kit ABI PrismR BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O seqüenciador automático utilizado foi o ABI PrismR 377 (Applied Biosystems).

Para a reação de seqüenciamento, utilizou-se 3-10 ng do DNA, 2,5 µl (3,2 pmol) de *primer* (qualquer *primer* da última amplificação realizada), 4 µl da mistura de reação do *Kit* de seqüenciamento, 4 µl de tampão Tris-HCl (pH 9,0) e MgCl<sub>2</sub> 5X e 7,5 µl de água destilada estéril para um volume final de 20 µl.

Em seguida, as amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura em um termociclador (PTC-200, MJ Research, Watertown, MA, USA) com um programa específico para a síntese da fita complementar e incorporação dos ddNTPs marcados (25 ciclos de 96° C por 30 segundos, 50° C por 15 segundos e 60° C por 4 minutos).

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas com isopropanol para a retirada dos ddNTPs marcados não incorporados. Aos 20 µl de reação, foram adicionados 80 µl de isopropanol 75%. Os microtubos foram submetidos à forte agitação por 10 segundos e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 14.000 rpm à temperatura ambiente. Em seguida, removeu-se o isopropanol e adicionaram-se 1.000 µl de etanol 70% ao precipitado. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o etanol foi retirado e as amostras foram incubadas a 90° C por 2 minutos para a retirada total do etanol.

Às amostras adicionaram-se 6 µl de tampão de amostra [5 partes de formamida: 1 parte de *blue dextran* (Applied Biosystems)], homogeneizou-se várias vezes, centrifugou-se por 15 segundos e incubou-se a 95° C por 5 minutos para desnaturação. Imediatamente após a incubação, as amostras foram colocadas no gelo até a aplicação de 1,5 µl em gel de poliacrilamida.

O gel de separação consistiu em um gel de poliacrilamida 5% (Long Ranger™ Gel Solution, FMC) com uréia 6M em tampão TBE 1X concentrado em placas de 36 cm por 0,5 mm de espessura. A eletroforese foi realizada no seqüenciador automático.

### 3.2.5 Análise das Seqüências

As análises dos genótipos e subtipos virais foram realizadas através da comparação das seqüências, obtidas com seqüências já conhecidas dos diferentes genótipos do VHB. Para análise das seqüências foi utilizado o programa Chromas Versão 2.31 (Technelysium Pty Ltd) e para tradução da seqüência o programa DNA for Windows Versão 2.2 (David Dixon) e para comparação da seqüência encontrada com as já conhecidas, ou seja para identificar o genótipo e subtipo, o programa GeneMapper Versão 3.7 (Applied Biosystems).

### 3.2.6 Aspectos Éticos

O Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre/Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre aprovou esse protocolo sob Parecer nº 065/04 e Protocolo nº 823/04. O consentimento pós-informação pode ser apreciado no anexo 8.2.

### **3.2.7 Análise Estatística**

Foi realizada análise descritiva, através de médias e desvio padrão para variáveis contínuas e frequência absoluta relativa para variáveis categóricas.

Para comparação de grupos, foram utilizados teste T-Student, análise de variância e teste Qui-Quadrado, dependendo do tipo de variável na comparação. Para todas comparações foi considerado nível de significância de 5%. O programa utilizado foi SPSS versão 13.0 for Windows (*Statistical Product for Service Solutions*).

---

## **4 RESULTADOS**

---

## 4 RESULTADOS

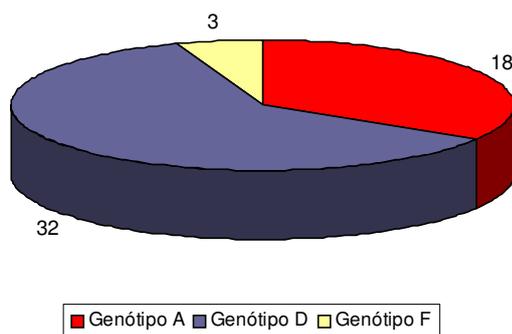
Foram analisados, durante o período de estudo, 67 pacientes HBsAg positivos, sendo que 15 desses estavam em programa de hemodiálise.

Os resultados dos genótipos, subtipos, idade, sexo, cor, fator de risco, valor de ALT e resultado do HBeAg dos pacientes encontram-se no Anexo 8.3.

A análise qualitativa para o VHB-DNA, por PCR, foi positiva em 79,1% das amostras (53/67). Assim, em 14 amostras HBsAg positivas, o resultado do VHB-DNA pela PCR foi negativo.

O genótipo foi determinado em todas as amostras VHB-DNA positivas.

A análise dos genótipos, nas amostras VHB-DNA positivas, demonstrou a presença dos genótipos A, D e F, sendo que o genótipo mais freqüente foi o tipo D, encontrado em 32 pacientes (60,4%) da população genotipada. O segundo genótipo mais freqüente foi o A, com 18 casos (34,0%). O genótipo F foi encontrado em apenas 3 amostras (5,4%). A distribuição dos genótipos encontrados dentre as 53 amostras VHB-DNA positivas estudadas está demonstrada na Figura 5.



**Figura 5** - Distribuição dos genótipos da população estudada.

Nos 53 pacientes que foi realizada a genotipagem, foi estudada a classificação dos vírus circulantes em subtipo. Foram encontrados os seguintes subtipos: *adw*, *ayw* e *adw4*. O genótipo A apresentou somente o subtipo *adw*, o genótipo D somente *ayw* e o genótipo F apresentou o subtipo *adw4*.

### 4.1 Relação entre Dados Demográficos da População Avaliada e os Genótipos

A idade dos pacientes, cuja amostra foi genotipada, variou de 23 a 79 anos (média =  $46,73 \pm 13,05$ ). A distribuição da média idade dos pacientes em relação ao genótipo pode ser observada na Tabela 3.

**Tabela 3** - Distribuição da idade dos pacientes nos diferentes genótipos

	Genótipo A	Genótipo D	Genótipo F	Indetectável	Total
Média da Idade em anos (Erro Padrão)	48,78 (3,95)	46,41 (2,10)	35,33 (1,45)	47,29 (2,94)	46,73 (1,59)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de idade dos pacientes com diferentes genótipos do VHB ( $p = 0,436$ ).

Quando avaliamos o gênero dos pacientes genotipados, observamos que 75,5% eram do sexo masculino ( $n = 40$ ), enquanto 24,5% eram do sexo feminino ( $n = 13$ ). A distribuição dos gêneros em relação aos genótipos está representado na Tabela 4.

**Tabela 4** - Distribuição dos genótipos do VHB em relação ao sexo

	Genótipo A	Genótipo D	Genótipo F	Indetectável	Total
Mulheres	6	7	0	3	16
	(37,5%)	(43,7%)	–	(18,8%)	(100%)
Homens	12	25	3	11	51
	(23,5%)	(49,0%)	(5,9%)	(21,6%)	(100%)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos genótipos do VHB, quando avaliado o sexo dos pacientes ( $p = 0,584$ ).

A maioria dos pacientes, cujo vírus foi genotipado, pertencia à raça branca (92,5%), estando na Tabela 5 a distribuição dos pacientes quanto a raça e o genótipo.

**Tabela 5** - Distribuição dos genótipos do VHB em relação à raça

	Genótipo A	Genótipo D	Genótipo F	Indetectável	Total
Negro	3	1	0	3	7
	(42,9%)	(14,2%)	–	(42,9%)	(100%)
Branco	15	31	3	11	60
	(25,0%)	(51,7%)	(5,0%)	(18,3%)	(100%)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diversos genótipos, quando avaliada a raça dos pacientes ( $p = 0,192$ ).

## 4.2 Fatores de Risco Avaliados e os Genótipos

Na amostra dos pacientes estudados, 23,9% (16/67) adquiriram o vírus através de relações sexuais observando-se 6 genótipos A, 6 genótipos D e 4 indetectáveis; 4,5% (3/67) eram usuário de drogas IV sendo 2 genótipo D e 1 genótipo F. Três (4,5%) pacientes apresentaram como único fator de risco a transfusão sangüínea sendo todos do genótipo A. Três (4,5%) se contaminaram com o VHB através de transmissão vertical sendo 2 genótipos D e 1 genótipo A; dois (2,9%) pacientes através de acidente de punção sendo 1 genótipo D e 1 genótipo F. A hemodiálise foi detectada como fator de risco em 26/67 (38,8%) pacientes estudados sendo o mais prevalente. Destes, 7 eram genótipo A, 11 genótipo D e em 8 casos não foi possível a identificação do genótipo. Outros fatores de risco foram citados por 20,9% (14/67) pacientes como: cirurgias (9) e causas desconhecidas (5). Esse grupo revelou 1 genótipo A, 10 genótipos D, 1 genótipo F e 2 indetectáveis (Tabela 6).

**Tabela 6** - Distribuição dos genótipos do VHB em relação ao fator de risco

	Genótipo A	Genótipo D	Genótipo F	Indetectável	Total
Sexual	6	6	0	4	16
	(37,5%)	(37,5%)	–	(25,0%)	(100%)
Drogas IV	0	2	1	0	3
	–	(66,7%)	(33,3%)	–	(100%)
Transfusão	3	0	0	0	3
	(100,0%)	–	–	–	(100%)
Transmissão Vertical	1	2	0	0	3
	(33,3%)	(66,7%)	–	–	(100%)
Acidente de Punção	0	1	1	0	2
	–	(50,0%)	(50,0%)	–	(100%)
Diálise	7	11	0	8	26
	(26,9%)	(42,3%)	–	(30,8%)	(100%)
Outros	1	10	1	2	14
	(7,1%)	(71,5%)	(7,1%)	(14,3%)	(100%)

A distribuição dos genótipos do VHB, em relação ao fator de risco, não pode ser avaliada estatisticamente em função da extratificação das variáveis e pelo baixo número de pacientes em cada grupo. Em função disso, foi realizada apenas uma análise descritiva dos resultados obtidos.

### 4.3 Genótipos, Padrão Sorológico e Laboratorial da Doença Hepática

Em 26,9% (18/67) dos casos, os pacientes eram HBeAg positivos e possuíam ALT aumentada, sendo que a distribuição dos genótipos neste subgrupo foi de 4 genótipos A, 10 genótipos D, 1 genótipo F e 3 indetectáveis. Destes 18 pacientes, 11 pacientes realizaram biópsia, sendo 8 com diagnóstico de hepatite crônica e 3 com cirrose. No grupo HBeAg positivos e ALT normal, ou seja 10,5% dos casos (7/67) a distribuição genotípica foi de 5 genótipos A e 2 genótipos D. Nenhum destes pacientes realizou biópsia hepática.

Em relação ao grupo de pacientes HBeAg negativos com ALT aumentada 40,3% (27/67) encontraram-se 8 genótipos A, 14 genótipos D, 2 genótipos F e 3 genótipos indetectáveis. Desses pacientes, 6 realizaram biópsia hepática, 4 deles apresentam hepatite crônica e 2 cirrose.

Em relação ao subgrupo de pacientes HBeAg negativos com ALT normal 22,3% (15/67) a distribuição genotípica foi de 1 genótipo A, 6 genótipos D e 8 genótipos em que não se conseguiu realizar a identificação. Em nenhum caso foi realizado biópsia hepática.

Os dados referentes aos parâmetros avaliados podem ser observados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Distribuição dos genótipos do VHB em relação ao padrão sorológico e laboratorial da doença hepática

	Genótipo A	Genótipo D	Genótipo F	Indetectável	Total
HBeAg + ALT	4 (22,2%)	10 (55,6%)	1 (5,6%)	3 (16,6%)	18 (100%)
HBeAg + ALT Normal	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)
HBeAg + (Total)	9 (36,0%)	12 (48,0%)	1 (4,0%)	3 (12,0%)	25 (100%)
HBeAg – ALT	8 (29,6%)	14 (51,9%)	2 (7,4%)	3 (11,1%)	27 (100%)
HBeAg – ALT Normal	1 (6,7%)	6 (40,0%)	0 (0%)	8 (53,3%)	15 (100%)

Como pode ser observado dentre os 25 pacientes com HBeAg positivo, na quase totalidade o VHB é genótipo A (36,0%) e D (48,0%). Nos pacientes com HBeAg negativo e ALT aumentada, o percentual com genótipo A e D foi 29,6% e 51,9% respectivamente. Por outro lado, os pacientes com HBeAg negativo e ALT normal (prováveis portadores inativos) o genótipo do VHB em 6,7% foi A e 40,0 % foi D. Não foram considerados os resultados dos genótipos indetectáveis para análise estatística dos dados referente à tabela 8. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos genótipos do VHB quando avaliado o padrão sorológico e laboratorial da doença hepática dos pacientes ( $p = 0,313$ ).

---

## **5 DISCUSSÃO**

---

## 5 DISCUSSÃO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 30% da população mundial já foram infectados com o VHB e cerca de 350 - 400 milhões de indivíduos são portadores crônicos da doença. Em nosso meio, a prevalência da infecção pelo VHB é baixa, estando ao redor de 0,4% [128].

A história natural da infecção pelo VHB compreende três fases distintas. Durante a *fase de imunotolerância* da infecção pelo VHB, observa-se a presença do HBsAg, do HBeAg e altos títulos de VHB-DNA ( $10^5 - 10^{10}$  cópias por mL), sendo a ALT normal ou discretamente elevada e na histologia inflamação mínima ou inexistente. A *fase de clareamento viral* é caracterizada por destruição dos hepatócitos infectados, replicação viral elevada ou flutuante, possibilidade de soroconversão HBeAg para anti-HBe e ALT elevada secundária à vigorosa resposta imunológica e a histologia revela lesões mais “floridas”. A terceira fase da infecção crônica pelo VHB, *fase de integração*, resulta da persistência viral, no genoma do hospedeiro, quando a resposta imunológica não é suficiente para eliminar o vírus. Há a presença no soro do HBsAg, o anti-HBe é positivo, títulos baixos ou indetectáveis do VHB-DNA, a ALT é normal e, na maioria das vezes, mínima lesão histológica hepática, caracterizando a fase não replicativa (portador inativo do VHB). Ressalta-se que a cirrose ativa pode ser observada nessa fase, caso tenha ocorrido injúria hepática importante prévia e soroconversão do sistema e.

A partir da década de 1990, iniciaram os estudos que revelaram a diversidade genômica do VHB, com o isolamento de 8 genótipos (A-H) [101, 105, 106]. Posteriormente, alguns autores demonstraram que o amplo espectro de manifestações clínicas que envolvem a doença hepática pelo VHB [66, 69, 85, 95], bem como a resposta ao tratamento antiviral [63, 64, 70, 145], poderiam estar relacionados aos genótipos do vírus B.

No Brasil, poucos estudos que demonstrem a prevalência dos genótipos e subtipos do VHB foram publicados até o presente [23, 24, 44, 100, 120, 126, 136], para tanto existem algumas razões que poderiam ser aventadas como: a pouca oferta de *kits* comerciais para genotipagem e subtipagem do VHB, o que faz com que as técnicas da PCR sejam realizadas *in house* e o alto custo dos equipamentos e reagentes que envolvem a realização das técnicas de biologia molecular, aumentando consideravelmente a dificuldade na realização dos estudos nessa linha de pesquisa.

No Rio Grande do Sul, até o presente estudo, nenhum centro havia realizado a técnica de PCR para a determinação da genotipagem do vírus B da hepatite. Assim, esse estudo objetivou, primariamente, a tentativa de implementação de uma técnica ainda não realizada em nossa região. Uma vez alcançado o objetivo primário, analisamos a soroprevalência dos genótipos e subtipos do VHB em uma população de pacientes com marcadores sorológicos da infecção viral B, que estavam em acompanhamento ambulatorial e em uma unidade de hemodiálise de um hospital geral.

Dos 67 pacientes HBsAg positivos incluídos no estudo, o DNA viral estava presente nas amostras de sangue de 53 (79,1%). Dos 14 casos em que não foi identificado o DNA do VHB no soro, 11 (78,5%) foram também negativos para o HBeAg, sendo que em 8 as aminotransferases eram normais. As razões para a ausência do DNA do VHB no soro, em pacientes com HBsAg positivo, permanecem desconhecidas, no entanto, a presença de variantes do VHB com um baixo nível de replicação, neste estudo traduzidas pela ausência do HBeAg, mecanismos inibitórios relacionados ao sistema imunológico dos pacientes infectados ou resultado falso-positivo do antígeno viral podem ser consideradas. No entanto, deve ser ressaltado que o maior número de casos ocorreu em pacientes HBeAg negativos e com aminotransferases normais, sugerindo ser esta uma população de portadores inativos do VHB. Outros parâmetros relacionados à detecção do DNA do VHB devem ser analisados, tais como o método diagnóstico utilizado; as condições de armazenamento das amostras e o tipo de material biológico analisado (soro, células mononucleares do sangue periférico e tecido hepático). No presente estudo, os frascos utilizados para coleta dos pacientes eram comerciais, a vácuo, e de apenas um fabricante; o material imediatamente após a coleta e após a centrifugação foi estocado em *freezer* a menos 20° C e processado no mesmo mês da coleta, apesar de haver estabilidade por 6 meses. Acreditamos que essas etapas foram cruciais para a adequada realização do teste.

A presença de 79,1% de positividade do DNA viral em nossa amostra vai ao encontro dos 76% encontrados por Carrilho *et al.* [23]. Chu *et al.* [30] em estudo realizado nos Estados Unidos, em 694 pacientes provenientes de 17 centros de referência em hepatologia, também encontrou 76% de positividade. Esse cenário foi semelhante ao encontrado por outros autores [136] em uma população de pacientes em hemodiálise de Goiânia nos quais o VHB-DNA pela PCR foi positivo entre 67% e 88% dos pacientes HBsAg positivos e por Sunbul *et al.* [133] em estudo realizado em 88 pacientes com hepatite B crônica na Turquia, onde a positividade do DNA viral foi de 88,6%.

Os resultados encontrados nessa análise demonstram uma prevalência elevada do genótipo D (60,4%) seguido do genótipo A (34,0%). O genótipo F foi encontrado em apenas 5,4% da população genotipada.

A distribuição dos genótipos, na população brasileira correlaciona-se à origem dos nossos ascendentes. A presença dos genótipos A e D sugere a influência da afro-descendência, ocorrida por conta do período da escravidão passada, além da influência da colonização européia. O Instituto Oswaldo Cruz (IOC), pioneiro em estabelecer os genótipos do vírus que circulam no Brasil, identificou que cerca de 50% dos vírus encontrados no país são do genótipo A, subtipo africano, possivelmente relacionado à introdução dos africanos no Brasil pelo comércio escravo [136]. No Rio Grande do Sul, há um predomínio de descendentes europeus. Aproximadamente 90% dos pacientes aqui apresentados eram da raça branca, motivo que poderia explicar a menor prevalência do genótipo A encontrada nesse estudo. Esses mesmos genótipos também foram encontrados em outros 5 estudos realizados no Brasil nos estados de Goiânia, Rio de Janeiro e Santa Catarina [23, 24, 44, 100, 136]. O estudo realizado na região Sul [23] demonstrou a mesma frequência dos genótipos do VHB que encontramos, sendo o genótipo D o mais freqüente, em seguida o genótipo A e o menos freqüente o genótipo F. O genótipo D é encontrado, principalmente, na região do Mediterrâneo, local de uma importante leva de imigrantes que se dirigiram a região Sul do Brasil, como italianos, espanhóis e portugueses [85, 108]. O genótipo F é característico da população nativa das Américas, com um aumento desse genótipo na Argentina [135], o que então não surpreende de ter sido encontrado no estudo em foco.

Na presente análise, o genótipo D foi o mais prevalente no grupo dos pacientes com hepatite B crônica, indo ao encontro de resultados já publicados [1]. Entretanto um estudo realizado na Bahia [120] em indivíduos com diagnóstico de hepatite B crônica, demonstrou que o genótipo mais freqüente foi o A, seguido do genótipo F, contrastando com o resultado aqui demonstrado.

No estudo em foco, os genótipos B, C, E, G e H não foram encontrados na análise dos pacientes. Os genótipos B e C são encontrados com maior frequência no Sudeste da Ásia, China e Japão [31, 132] e como não avaliamos nenhum paciente com descendência oriental, ou proveniente dessa região, acreditamos que, por isso, não foram encontrados. Sitnik *et al.* [126] publicaram o primeiro estudo que detectou os genótipos B e C no Brasil em uma população de mais de 100 pacientes. No entanto, todos infectados com os genótipos B ou C eram de origem asiática. Sumi *et al.* [132], em uma população de 258 pacientes japoneses com infecção crônica pelo VHB, revelaram os genótipos C (86%) e B (12%) como os mais prevalentes, sendo o genótipo A identificado em apenas 11/585 (1,9%) casos. O genótipo E foi encontrado apenas em algumas regiões da África e ainda não foi identificado em estudos brasileiros [23, 24, 100, 126, 136]. Stuyver *et al.* [131] em um estudo pioneiro na identificação do genótipo G do VHB em uma população de 121 pacientes na França e EUA, demonstraram a maior prevalência do genótipo A (54%) nesta população seguida pelo D (19%). Da mesma forma, o genótipo G foi identificado por outros autores na França,

Alemanha e EUA [93, 131]. O genótipo H foi encontrado apenas na região da América Central [3, 7].

Os subtipos encontrados foram o *ayw* (60,4%) nos pacientes com genótipo D, *adw* (34%) nos com genótipo A e o *adw4* (5,4%) nos com genótipo F. Teles *et al.* [136] estudando uma população de pacientes em hemodiálise em Goiânia, demonstraram o subtipo *adw2* em 44% e *ayw3* em 41% dos pacientes subtipados. Os subtipos menos freqüentes foram o *adw4* e *ayw2* em 3% da população estudada. A alta prevalência dos subtipos observada em pacientes em hemodiálise pode estar relacionada à transmissão nosocomial deste subtipo pelos aparelhos de diálise. Em estudo realizado no estado de Goiânia, em 51 pacientes HBsAg positivos atendidos pela rede pública de saúde, 62,7% foram subtipo *adw2*, 23,5% *ayw3*, 9,8% *ayw2* e 3,9% *adw4* [125]. Em outro estudo brasileiro, realizado em mineiros expostos à malária que trabalhavam na região amazônica, se encontrou 59% do subtipo *adw2*, 8,1% *adw4* e *adw3* e 5,4% *ayw2* [129].

A relação entre os genótipos e os subtipos dá-se através da seqüência de DNA, já que tanto a definição dos genótipos quanto a dos subtipos depende dessa seqüência.

A média de idade encontrada no grupo de doentes foi de 46,7 anos, semelhante nos pacientes com genótipos A e D. A maior média de idade, 48,78 anos, foi encontrado no genótipo A e a menor média de idade foi encontrada no genótipo F, 35,33 anos. Não foi encontrado diferença significativa entre as médias das idades, isso provavelmente deve-se ao fato do estudo abranger um número pequeno de pacientes em cada grupo. Em regiões onde a infecção crônica pelo VHB é pouco freqüente, como no Estado do Rio Grande do Sul, a prevalência mais alta foi registrada nos pacientes entre os 20 e os 40 anos de idade [35].

A maioria dos pacientes genotipados, nesse estudo, foram do gênero masculino (75,5%), apesar de um maior número de mulheres estarem infectadas com o genótipo A (37,5%) e de homens com o genótipo D (49,0%), não houve diferença estatística entre o gênero e os genótipos do VHB. Alguns outros autores, realizando estudos sobre genotipagem do VHB em pacientes com hepatite B crônica, encontraram o percentual de pacientes masculinos semelhante ao do presente trabalho, como Sitnik *et al.* [126] em estudo brasileiro (76,5%) e Abdo *et al.* [1] (72,9%), Chu *et al.* [30] (68%) e Sumi *et al.* [132] (75,5%) em estudos internacionais.

A maioria dos pacientes, cujo vírus foi genotipado eram da raça branca (92,5%), sendo o genótipo D o mais prevalente neste grupo. Contrariamente, nos pacientes de raça negra, o genótipo A foi detectado em um maior número de casos. Não foi observado, no entanto, diferença nesses índices. A proporção de brancos e negros do estudo vai ao encontro dos dados oficiais referentes ao Estado do Rio Grande do Sul, onde revela que 84,5% da população é branca [60]. Carrilho *et al.* [23] também analisaram a raça dos

pacientes, onde 94% da população estudada, proveniente do estado de Santa Catarina, eram da raça branca.

No que diz respeito aos fatores de risco, a diálise foi a mais prevalente (38,8%) entre os pacientes estudados. Sabe-se que os centros de hemodiálise são potenciais transmissores do VHB por excessiva reutilização do material, métodos ineficientes de esterilização das membranas e falha em aderir às precauções universais de esterilização. Da mesma forma, atraso em identificar pacientes infectados com o VHB e conseqüentemente os isolarem em sala e equipamento específicos (sala amarela), favorecem a transmissão nosocomial [23, 136]. A prevalência da infecção pelo VHB em pacientes com nefropatia submetidos à hemodiálise pode ser tão elevada quanto 10%, índice este superior aos 2,7% entre os trabalhadores dos centros de hemodiálise e de 2,7% entre pacientes do grupo controle estudados por Carrilho *et al.* [23]. Ainda, esse estudo mostrou que o risco de um paciente em hemodiálise adquirir o VHB aumenta 1.47 vezes para cada mês de tratamento; 1.96 vezes se os centros dialíticos reutilizam os filtros mais de 10 vezes e para 3.42 vezes se o número de pacientes por trabalhador do centro é superior a 5.

Deve ser ressaltado que a maior prevalência de pacientes, tendo como fator de risco a hemodiálise, atende a um viés de seleção, uma vez que houve busca ativa de pacientes a uma unidade de tratamento de pacientes com insuficiência renal.

A distribuição dos genótipos difere entre os centros de hemodiálise. Assim, Teles *et al.* [136] estudando uma população de pacientes em hemodiálise em Goiânia verificaram uma prevalência similar de pacientes infectados com o genótipo A e com o D (50% x 46%). Nesse estudo, o genótipo F estava presente em apenas 3,8% dos casos. No entanto em outro estudo, igualmente nacional, Ferreira *et al.* [44] demonstraram o genótipo D como o mais freqüente (61,5%) nos pacientes em hemodiálise. Tal resultado também foi apresentado por Carrilho *et al.* [23], em um estudo onde analisaram a freqüência e fatores de risco para a infecção pelo VHB em 22 centros de hemodiálise em Santa Catarina, onde 57% dos pacientes em hemodiálise eram igualmente do genótipo D. No estudo aqui realizado, observamos a presença dos genótipos A e D do VHB.

Alguns estudos internacionais, envolvendo esse mesmo grupo de pacientes, demonstraram resultados distintos, por exemplo, no México, todos os pacientes eram genótipo H; na Turquia, todos estavam infectados pelo genótipo D e, na Indonésia, todos os pacientes eram genótipo B [3, 14, 89].

Apesar de mais de um genótipo ter sido identificado em alguns centros, nenhum paciente foi infectado com dois genótipos distintos indicando que, provavelmente, uma vez infectado, o paciente desenvolve resistência à superinfecção por outro genótipo.

Além da hemodiálise, outros fatores de risco foram avaliados no presente estudo como transmissão sexual, drogas IV, transfusão sangüínea, transmissão vertical, acidentes de punção e cirurgias.

O segundo fator de risco mais prevalente foi a transmissão sexual 16/67 (23,9%), nesse grupo, os genótipos D e A do VHB foram encontrados em um mesmo número de pacientes.

Nos três casos em que o fator de risco identificável foi o uso de drogas IV, observamos que em dois o genótipo do VHB foi o D. Esse dado vai ao encontro do descrito por Alam *et al.* [2] e Van Steenbergem *et al.* [138] como sendo o mesmo o mais freqüente entre usuários de drogas ilícitas.

A despeito do risco de transmissão do VHB por transfusão ser de 1 a cada 50.000 a 63.000 unidades transfundidas [8], observamos 3 casos, onde o único fator epidemiológico identificável foi a transfusão. Em todos, o genótipo do VHB foi do tipo A.

Avaliando os pacientes em relação ao padrão sorológico de replicação viral e os níveis de aminotransferases, os mesmos foram assim divididos: 18/67 (26,9%) HBeAg positivos e ALT aumentada; 7/67 (10,5%) HBeAg positivos e ALT normal; 27/67 (40,3%) HBeAg negativos e ALT aumentada (prováveis mutantes pré-core) e 15/67 (22,3%) HBeAg negativos e ALT normal (prováveis portadores inativos do VHB).

O genótipo D foi o mais prevalente nos pacientes com replicação viral (HBeAg reagente) e ALT aumentada. No entanto, o estudo realizado em Salvador [120] demonstrou que de 12 casos que estavam em fase de replicação viral, 10 (83%) eram infectados pelo genótipo A.

Quando consideramos os pacientes HBeAg positivos e ALT normal, verificamos que 71% estavam infectados com o genótipo A. Esse resultado vai ao encontro do estudo publicado por Ribeiro *et al.* [120] onde 60% dos pacientes com os mesmos marcadores e resultados eram genótipo A.

Nos casos de hepatite B crônica com HBeAg não reagente e ALT aumentada, sugerindo a possibilidade de mutação pré-core, o genótipo D foi o mais prevalente; no entanto aproximadamente 30% estavam infectados pelo genótipo A. Outro estudo brasileiro realizado por Castro *et al.* [24] apontaram que as mutações das regiões do core e pré-core estavam presentes em apenas 20% dos pacientes infectados com o genótipo A, significativamente menor que os infectados com o genótipo D. Ribeiro *et al.* [120] não evidenciaram pacientes com vírus mutante pré-core. Sitnik *et al.* [126], também no Brasil, mostraram que a mutação pré-core estava presente em 88% dos pacientes infectados com o genótipo D. Resultado semelhante foi descrito por Sumi *et al.* [132] que demonstraram que a mutação da região pré-core mais freqüente, foi principalmente encontrada em associação com o genótipo D.

No grupo de pacientes HBeAg não reagente e ALT normal, em 8 casos (53,3%) o DNA-VHB foi indetectável, possivelmente porque sendo pacientes “portadores inativos do VHB” a carga viral estava abaixo do limite de sensibilidade do teste da PCR utilizado (400 cópias/ml). Em 7 dos 8 pacientes, foi detectado o anti-HBe no soro, indicando soroconversão do HBeAg. No entanto não podemos deixar de considerar que o caso com o anti-HBe negativo possa de fato não estar infectados com o VHB e o resultado do HBsAg tenha sido falso-positivo.

Nos 7 casos em que o DNA-VHB foi detectado, 6 estavam infectados pelo genótipo D e o outro paciente pelo genótipo A. Ribeiro *et al.* [120] ao estudarem 76 portadores crônicos do VHB em uma população de Salvador, onde 61 pacientes (80%) eram portadores inativos, detectaram o genótipo A em 53 casos (70%).

O genótipo F foi encontrado em apenas 3 casos em nosso estudo (5,4%) e em todos a ALT estava aumentada, sendo que um deles o HBeAg era positivo. O mesmo genótipo tem sido relacionado a um pior prognóstico com alta frequência de desenvolvimento de cirrose e CHC [68].

Dos resultados do presente estudo, a despeito de termos obtido êxito em implementar uma técnica para determinação dos genótipos e subtipos do VHB, entende-se necessários estudos prospectivos, com um maior número de casos, para que possamos, no futuro, conhecer o impacto que a determinação dos genótipos possa proporcionar na avaliação da evolução das hepatopatias e nas decisões a respeito do manejo terapêutico dos pacientes com doença hepática crônica relacionada ao VHB.

---

## **6 CONCLUSÕES**

---

## 6 CONCLUSÕES

1) Foi implementada técnica para avaliar os genótipos e subtipos do VHB em pacientes com marcadores de infecção crônica, sendo a PCR positiva em 79,1% dos casos, demonstrando nestes, o sucesso na determinação dos genótipos.

2) Foram encontrados, na população estudada, os genótipos A, D e F, sendo que o genótipo mais freqüente foi o tipo D, encontrado em 60,4% da população genotipada. O genótipo A foi observado em 34,0% e o F em 5,4%.

3) O genótipo A apresentou somente o subtipo *adw*, o genótipo D somente o *ayw* e o F apenas o subtipo

---

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- [1] ABDO A.A. *et al.* Hepatitis B genotypes: relation to clinical outcome in patients with chronic hepatitis B in Saudi Arabia. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 7019-7024, 2006.
- [2] ALAM, M.M. *et al.* Common genotypes of hepatitis B virus prevalent in injecting drug abusers (addicts) of North West Frontier Province of Pakistan. **Virology Journal**, v. 4, p. 1-6, 2007.
- [3] ALVARADO-ESQUIVEL, C. *et al.* Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico: Predominant circulation of hepatitis B virus genotype H. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 6540-6545, 2006.
- [4] ANDERSON, M.G.; EDDLESTON, A.L.W.F.; MURRAY-LYON, I.M. Altered natural history of hepatitis B in homosexual males—a reflection of altered immune responsiveness. **Journal of Medical Virology**, v. 17, p. 167-173, 1985.
- [5] AKAHANE, Y. *et al.* Chronic active hepatitis with hepatitis B virus DNA and antibody against e antigen in the serum: disturbed synthesis and secretion of e antigen from hepatocytes due to a point mutation in the precore region. **Gastroenterology**, v. 99, p. 1113-1119, 1999.
- [6] ARAUZ-RUIZ, P. *et al.* Genotype F prevails in HBV infected patients of Hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. **Journal of medical Virology**, v. 51, p. 305-312, 1997.
- [7] \_\_\_\_\_. Genotype H: A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2059-2073, 2002.
- [8] AREIAS, J. Medicina temas atuais: **Hepatites víricas**. Porto Alegre: 2001, 170 p.
- [9] BAUMERT, T.F. *et al.* Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, p. 2268-2276, 1996.

- [10] BEASLEY, R.P. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 61, p. 1942-1956, 1988.
- [11] BIMBAUM, B.S.; NASSAL, M. Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. **Journal of Virology**, v. 64, p. 3025-3030, 1990.
- [12] BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J.; VISNICH, S. A "new" antigen in leukemia sera. **Journal of American Medical Association**, v. 191, p. 541-546, 1965.
- [13] BORNHAK, H. *et al.* Quantitation of anti-HBs in solid phase immunoassays. What influences the results? De: Virushepatitis A bis E. **Diagnose, Therapie Prophylaxe**. Ed. Kilian, 1994, p. 212-221.
- [14] BOZDAYI, A.M. *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. **Archives of Virology**, v. 149, p. 2115-2129, 2004.
- [15] BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CIVES – Centro de Informação em Saúde para Viajantes – Programa Nacional de Hepatites Virais. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/> (acesso em 25.09.07).
- [16] BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE – Fundação Nacional de Saúde – **Informe Epidemiológico**. n. 5.14, p. 10-13, 2000.
- [17] BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE – Programa Nacional de Hepatites Virais. **Avaliação da Assistência às Hepatites Virais no Brasil**. Brasília, 2002, p. 1-61.
- [18] BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE – Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das hepatites virais. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/hepatite.htm> (acesso em 20.08.07).
- [19] BRUNETTO, M.R. *et al.* A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis. B. **Journal of Hepatology**, v.10, p. 258-261, 1990.
- [20] BRUSS, V. *et al.* Formation of transmembranous hepatitis B e-antigen by translational in vitro processing of the viral precore protein. **Virology**, v. 163, p. 268-275, 1988.
- [21] CARMAN, W.E. *et al.* Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. **Lancet**, p. 588-591, 1989.

- [22] \_\_\_\_\_. Vaccine-induced escape mutant of Hepatitis B Virus. **Lancet**, v. 336, p. 325-329, 1990.
- [23] CARRILHO, F.J. et al. Hepatitis B vírus infection in haemodialysis centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. **BMC Public Health**, v. 4, p. 7-11, 2004.
- [24] CASTRO, L.; NIEL, C.; GOMES, S.A. Low frequency of mutations in the core promoter and precore regions of hepatitis B vírus in anti-HBe positive Brazilian carriers. **BMC Microbiology**, v. 1, p. 1-10, 2001.
- [25] CASTRO, R.S. Epidemiologia da hepatite vírica. **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas**, v. 2, p. 89-99, 1999.
- [26] CHAN, H.L. *et al.* Phylogenetic, virological, and clinical characteristics of genotype C hepatitis B virus with TCC at codon 15 of the precore region. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p 681-687, 2006.
- [27] CHEMIN, I. *et al.* High incidence of hepatitis virus infection and severe liver dysfunction in patients receiving chemotherapy for hematologic malignancies. **European Journal of Haematology**, v. 67, p. 45-50, 2001.
- [28] CHEN, C.H. *et al.* Clinical significance B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutation affecting HBV and Antigen Expression in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 6000-6006, 2005.
- [29] \_\_\_\_\_. Comparison of sequence changes of precore and core promoter regions in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with and without HBeAg clearance in lamivudina therapy. **Journal of Hepatology**, v. 44, p. 76-82, 2006.
- [30] CHU, C.J. *et al.* Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. **Hepatology**, v. 38, p. 619-628, 2003.
- [31] \_\_\_\_\_. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. **Gastroenterology**, v. 125, p. 444-451, 2001.
- [32] CLARKE, B.; BLOOR, S. Molecular genotyping of hepatitis B virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 25, p. S41-S45, 2002. Supplement.
- [33] CRIVELLI, O. *et al.* Progress in hepatitis research: Hepatitis B Virus (HBV), Hepatitis C Virus (VHC), Hepatitis Delta Virus (HDV). Sorin Bio, p. 9-20, 1991.

- [34] CROSNIER, J. *et al.* Randomizes placebo-controlled trial of hepatitis B surface antigen vaccine in French haemodialysis units. II. Haemodialysis patients. **Lancet**, v. 1, p. 797-800, 1981.
- [35] DA SILVA, L.; FRANÇA, A.V.C; CARRILHO, F.J. Tratamento das hepatites crônicas virais. In: DA SILVA, L.C. **Hepatites Agudas e Crônicas**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p.282-289.
- [36] DANE, D.S.; CAMERON, C.H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. **Lancet**, v. 1, p. 695-698, 1970.
- [37] DE FRANCHIS, R. *et al.* EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus Statement. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. S3-S25, 2003. Supplement.
- [38] DEPARTMENT OF LABOR. Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910. 1030. Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; Final Rule. **Federal Register**, v. 56, p. 64175-64182, 1991.
- [39] DING, X. *et al.* Different hepatitis B virus genotype distributions among asymptomatic carriers and patients with liver diseases in Nanning, southern China. **Hepatology Research**, v. 22, p. 37-44, 2002.
- [40] DIRECTIVA DO CONSELHO (90/679/EEC). **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, n. L374, de 31 de Dezembro de 1990.
- [41] EL-SERAG, H.B. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. **Gastroenterology**, v. 127, p. S27-S34, 2004. Supplement.
- [42] FATTOVICH, G. Natural history of hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v.1, p. S50-S58, 2003. Supplementum.
- [43] FERREIRA, A.W.; AVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 74-78.
- [44] FERREIRA, R.C. *et al.* Hepatitis B virus infection profile in hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors, and genotypes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 689-692, Sep. 2006.
- [45] FRÖSNER, G. **Moderne hepatitisdiagnostik**. Kilian Verlag, Marburg, 1996.

- [46] GALLINA, A. *et al.* A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. **Journal of Virology**, v. 63, n. 11, p. 4645-4652, 1989.
- [47] GASPAR, A.M.C.; YOSHIDA, C.F.T. Geographic distribution of HBsAg subtypes in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 253-258, 1987.
- [48] GERLICH, W.H.; ROBINSON, W.S. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. **Cell**, v. 21, p. 801-809, 1980.
- [49] \_\_\_\_\_. Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. **Journal of Virology**, v. 42, n. 3, p. 761-766, 1982.
- [50] \_\_\_\_\_. A critical appraisal of anti-HBc, HBV DNA and anti-HCV in the diagnosis of viral hepatitis. **Biotest Bulletin**, v. 4, p. 283-293, 1991.
- [51] GOLD, J.W. *et al.* Passive hemagglutination assay for antibody to subtypes of hepatitis B antigen. **Journal of Immunology**, v. 112, p. 1100-1106, 1974.
- [52] GRANDJACQUES, C. *et al.* Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. **Journal of Hepatology**, v. 33, p. 430-439, 2000.
- [53] GUDAT, F. *et al.* Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B. **Laboratory Investigation**, v. 32, n. 1, p. 1-9, 1975.
- [54] GÜNTHER, S. *et al.* Naturally occurring variants of hepatitis B virus. **Advances in Virus Research**, v. 52, p. 125-137, 1999.
- [55] \_\_\_\_\_. Genetic variation in HBV infection: genotypes and mutants. **Journal of Clinical Virology**, v. 36, p. S3-S11, 2006. Supplement.
- [56] HADLER, S.C. *et al.* Outcome of hepatitis B virus infection in homosexual men and its relation to prior human immunodeficiency virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 163, p. 454-459, 1991.
- [57] HOLLINGER, F.B. Hepatitis B Virus. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. (eds.). **Virology**. 2<sup>nd</sup>, New York: Raven Press, 1990. v. 2, p. 2171-2236.

- [58] HOOFNAGLE, J.H. Type B hepatitis: Virology, serology and clinical course. **Seminars in Liver Disease**, v. 1, p. 7-14, 1981.
- [59] HUNT, C.M. *et al.* Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. **Hepatology**, v. 31, p. 1037-1044, 2000.
- [60] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios** – PNDA, 2005.
- [61] ILOEJE, U.H. *et al.* Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. **Gastroenterology**, v. 130, n. 3, p. 678-686, 2006.
- [62] ISHIKAWA, K.; KOYAMA, T.; MASUDA, T. Prevalence of HBV genotypes in asymptomatic carrier residents and their clinical characteristics during long-term follow-up: The relevance to changes in the HBeAg/anti-HBe system. **Hepatology Research**, v. 24, p. 1-7, 2002.
- [63] JANSSEN, H.L. *et al.* Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudina for HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomized trial. **Lancet**, v. 65, p. 123-129, 2005.
- [64] JANSSEN, H.L.; BUSTER, E.H.C.J. Antiviral treatment for chronic hepatitis B virus infection – immune modulation or viral suppression? **New England Journal of Medicine**, v. 264, p. 175-185, 2006.
- [65] JILG, W.; SCHIMIDT, M.; DEINHARDT, F. Immune response to hepatitis B revaccination. **Journal of Medical Virology**, v. 24, p. 377-384, 1988.
- [66] JUTAVIJUTTUM, P. *et al.* Genotypes of hepatitis B virus among voluntary blood donors in northern Thailand. **Hepatology Research**, v. 20, p. 1-4, 2006.
- [67] KANN, M.; GEERLICH, W. Hepadnaviridae. Structure and Molecular Virology. In: ZUCKERMAN, A.J.; THOMAS, H.C. **Viral Hepatitis**. 2<sup>nd</sup>, London: Churchill-Livingstone, 1998; p. 77-105.
- [68] KAO, J. *et al.* Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterology**, v. 118, p. 554-559, 2000.
- [69] \_\_\_\_\_. Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, p. 643-650, 2002.

- [70] KAO J.H.; LIU C.J.; CHEN D.S. Hepatitis B viral genotypes and lamiduvine resistance. **Journal of Hepatology**, v. 36, p. 303-304, 2002.
- [71] KATO H. *et al.* Frequent coinfection with hepatitis B virus strains of distinct genotypes detected by hybridization with type-specific probes immobilized on a solid-phase support. **Journal of Virology Methods**, v. 110, p. 29-35, 2003.
- [72] KEEFE E.B. *et al.* HBV genotypes in the United States results of a nation-wide study. **Gastroenterology**, v. 122, A-627, 2002.
- [73] KUANG, S.Y. *et al.* Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 101, p. 3575-3580, 2004.
- [74] KUHNS, M.C. *et al.* Quantitation of hepatitis B virus DNA by solution hybridization: comparison with DNA polymerase and hepatitis B e antigen during antiviral therapy. **Journal of Medical Virology**, v. 27, p. 274-281, 1989.
- [75] KURASAKI, M. *et al.* Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. **Journal of Medical Virology**, v. 49, p. 115-123, 1986.
- [76] LANDER, J.J. *et al.* Antibody to hepatitis associated antigen. Frequency and patterns of response as detected by radioimmunoprecipitation. **Journal of American Medical Association**, v. 220, p. 1079-1082, 1972.
- [77] LAPERCHE, S. *et al.* Determination of hepatitis B virus subtypes by an enzyme immunoassay method using monoclonal antibodies to type-specific epitopes of HBsAg. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 8, p. 447-453, 2001.
- [78] LEE, W.M. Hepatitis B virus infection. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1733-1745, 1997.
- [79] LI, J.S. *et al.* Rapid detection and further characterization of infe

- [81] LIM, C.K. *et al.* Correlations of HBV genotypes, mutations affecting HBeAg expression and HBeAg/anti-HBe status in HBV Carriers. **International Journal of Medical Science**, v.3, n. 1, p. 14-20, 2006.
- [82] LINDH, M.; ANDERSSON, A.S.; GUSDAL, A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus: Large scale analysis using a new genotyping method. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p.1285-1293, 1997.
- [83] \_\_\_\_\_. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p.775-782, 1999.
- [84] LIU, C.J. *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis B viral serotypes and genotypes in Taiwan. **Journal of Biomedical Science**, v. 9, 166-170, 2002.
- [85] \_\_\_\_\_. Therapeutic implication of hepatitis B virus genotypes. **Liver International**, v. 25, p. 1097-1107, 2005.
- [86] LOCARNINI, S. Clinical relevance of viral dynamics and genotypes in hepatitis B virus. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, p. S322-S328, 2002. Supplement.
- [87] LONDON, W.T. *et al.* Host responses to hepatitis B infection in patients in a chronic hemodialysis unit. **Kidney International**, v. 12, p. 51-58, 1977.
- [88] LUPBERGER, J.; HILDT, E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p. 74-81, 2007.
- [89] LUSIDA, M.I. *et al.* Genotype and subtype analyses of hepatitis B virus (HBV) and possible co-infection of HBV and hepatitis C virus (HCV) or hepatitis D virus (HDV) in blood donors, patients with chronic liver disease and patients on hemodialysis in Surabaya, Indonesia. **Microbiology and Immunology**, v. 47, p. 969-975, 2003.
- [90] LYRA, A.C. *et al.* Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among patients with acute viral hepatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 39, p. 81-82, 2005.
- [91] LYRA, L.G.C. Hepatite pelo virus B. In: MATTOS, A.A.; DANTAS, W. **Compêndio de hepatologia**. 2 ed. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 2001. Cap. 28, p. 471-486.

- [92] MADDREY, W.C. Hepatitis B: An important public health issue. **Journal of Medical Virology**, v. 61, p. 362-366, 2000.
- [93] MAGNIUS, L.; NORDER, H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. **Intervirolgy**, v. 38, p. 24-34, 1995.
- [94] MALIK, A.H.; LEE, W.M. Chronic hepatitis B virus infection: Treatment strategies for the next millennium. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, p. 723-731, 2000.
- [95] MAYERAT, C.; MANTEGANI, A.; FREI, P.C. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? **Viral Hepatology**, v. 6, p. 299-304, 1999.
- [96] MCCALLUM, F.O. Homologous serum jaundice. **Lancet**, v. 2, p. 691-692, 1947.
- [97] MCMAHON, B.J, *et al.* Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. **Journal of Infectious Diseases**, v. 151, p. 599-603, 1985.
- [98] \_\_\_\_\_. Screening for hepatocellular carcinoma in Alaska natives infected with chronic hepatitis B: A 16-year population based study. **Hepatology**, v. 32, p. 842-846, 2000.
- [99] MILICH, D.R. *et al.* Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? **Proceedings of National Academy of Science**, v. 87, p. 6599-6603, 1990.
- [100] MORAES, M.T.B.; GOMES, S.A.; NIEL, C. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D e F Isolated in Brazil. **Archives of Virology**, v. 141, p. 1767-1773, 1996.
- [101] NEURATH, A.R.; THAVALA, Y. Hepadnaviruses. In: VAN REGNMORTEL, M.H.V. **Immunicchemistry of virusis II: The basis for serodiagnosis and vaccines**. Elsevier, Amsterdam: Elsevier, p. 403-58, 1990.
- [102] NIEL, C. *et al.* Genectic diversity of hepatitis B vírus strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 44, p. 180-186, 1994.

- [103] NIESTERS, H.; PAS, S.; DE MAN, R.A. Detection of hepatitis B virus genotypes and mutants: Current status. **Journal of Clinical Virology**, v. 34, p. S4-S8, 2005. Supplementum.
- [104] NIITSUMA, H. *et al.* An adult patient with acute hepatitis B virus (genotype A) infection who became a chronic carrier. **Acta Hepatol JPN** v. 40, p. 346-349, 1999.
- [105] NORDER, H.; HAMMAS, B.; MAGNIUS, L.O. Typing of hepatitis B virus genomes by a simplified polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v. 31, p. 215-221, 1990.
- [106] NORDER, H.; COUROUCE, A.M.; MAGNIUS, L.O. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 3141-3145, 1992.
- [107] \_\_\_\_\_. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology**, v. 198, p. 489-503, 1994.
- [108] \_\_\_\_\_. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1341-1348, 1993.
- [109] OGAWA, M. Clinical features and viral sequences of various genotypes of hepatitis B virus compared among patients with acute hepatitis B. **Hepatology Research**, v. 23, p. 167-177, 2002.
- [110] OKAMOTO, H. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 2575-2583, 1988.
- [111] OKOCHI, K.; MURAKAMI, S. Observation on Austrália antigen in Japanese. **Vox Sang**, v. 15, p. 374-385, 1968.
- [112] ORITO, E. *et al.* A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotype B and C. **Hepatology**, v. 33, p. 218-223, 2001.
- [113] \_\_\_\_\_. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. **Hepatology**, v. 34, p. 590-594, 2001.

- [114] PARKIN, D.M.; BRAY, F.I.; DEVESA, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**, v.37, n. 8, p. S4-S66, 2001. Supplementum.
- [115] PERRILLO, R.P. Acute flares in chronic hepatitis B: The natural and unnatural history of an immunologically mediated liver disease. **Gastroenterology**, v. 120, p. 1009-1022, 2001.
- [116] POLISH, L.B. *et al.* Nosocomial transmission of hepatitis virus associated with the use of a spring-loaded finger stick device. **New England Journal of Medicine**, v326, p. 721-725, 1992.
- [117] PRINCE, A.M. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. **Proceedings National Academy of Sciences**, v. 60, p. 814-821, 1968.
- [118] RANEY, A.K.; MCLACHLAN, A. Molecular biology of the hepatitis B virus. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 1-38, 1991.
- [119] REALDI, G. *et al.* Survival and prognostic factors in 366 patients with compensated cirrhosis type B: A multicenter study. The investigation of the European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). **Journal of Hepatology**, v. 21, p. 656-666, 1994.
- [120] RIBEIRO N.R.C. *et al.* Distribution of hepatitis B vírus genotypes among patients with chronic infection. **Liver International**, v. 26, p. 636-642, 2006.
- [121] RODRIGUES-FRIAS, F. *et al.* Hepatitis B virus infection: Precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. **Hepatology**, v. 22, p. 1641-1647, 1995.
- [122] ROOSSINCK, M.J. ; SIDDIQUI, A. In vivo phosphorylation and protein analysis of hepatitis B virus core antigen. **Journal of Virology**, v. 61, p. 955-961, 1987.
- [123] SANCHEZ-TAPIAS, J.M. *et al.* Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. **Gastroenterology**, v.123, n. 6, p. 1848-1856, 2002.
- [124] SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 74, p. 5463-5469, 1977.

- [125] SILVA, C.O. *et al.* Soroprevalence of hepatitis B virus infection in individuals with clinical evidence of hepatitis in Goiânia, Goiás. Detection of viral DNA and determination of subtypes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 331-334, 2002.
- [126] SITNIK, R. *et al.* Hepatitis B vírus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2455-2460, 2004.
- [127] SMEDILE, A. *et al.* Influence of delta infection on severity of hepatitis B. **Lancet**, v. 2, p. 945-947, 1982.
- [128] SOUTO, F.J.D. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. **GED Gastroenterologia Endoscopia Digestiva**, v.18, p. 143-150, 1999.
- [129] SOUTO, F.J.D. ; FONTES, C.J.; GASPAR, A.M.C. Prevalence of hepatitis B and C vírus markers among Malaria-exposed gold miners in brazilian amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1-5, 2001.
- [130] STIKO - Recommendations, Bundesgesundhbl . v. 1, n. 96, p. 32-42, 1996.
- [131] STUYVER, L. *et al.* A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 67-74, 2000.
- [132] SUMI, H. *et al.* Influence of hepatitis B vírus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. **Hepatology**, v. 37, p. 19-26, 2003.
- [133] SUNBUL, M.; LEBLEBICIOGLU, H. Distribution os hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 1976-1980, 2005.
- [134] TANG, H. *et al.* Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. **Cancer Science**, v. 97, p. 977-983, 2006.
- [135] TELENTA, P.F.S. *et al.* Increased prevalence of genotype F hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1873-1875, 1997.
- [136] TELES, S.A. *et al.* Hepatitis B vírus: Genotypes and subtypes in brazilian hemodialysis patients. **Artificial Organs**, v. 23, p. 1074-1078, 1999.

- [137] TILLMANN, H. *et al.* Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. **Gut**, v. 37, p. 568-573, 1995.
- [138] VAN STEENBERGEN J.E. *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Amsterdam 1992-1997. **Journal of Medical Virology**, v. 66, p. 159-165, 2002.
- [139] WAI, C.T. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. **Hepatology**, v. 36, p. 1425-1430, 2002.
- [140] WANG, J. *et al.* Proteolytic conversion of hepatitis B virus e antigen precursor to end product occurs in a postendoplasmatic reticulum compartment. **Journal of Virology**, v. 66, p. 5080-5083, 1991.
- [141] WATERS, J.A. *et al.* Loss of the common "a" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutants. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 2543-2547, 1992.
- [142] YEE, J.K. A liver-specific "enhancer" in the core promoter region of human hepatitis B virus. **Science**, v. 61, p. 658-661, 1989.
- [143] ZHANG, X. *et al.* Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. **Journal of Medical Virology**, v. 48, p. 8-16, 1996.
- [144] ZHOU, S.; STRANDING, D.N. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. **Proceedings National Academy of Science**, v. 89, p. 10046-10050, 1992.
- [145] ZOLLNER, B. *et al.* Viral features of lamivudina resistant hepatitis B genotypes A and D. **Hepatology**, v. 9, p. 42-50, 2004.

---

## **8 ANEXOS**

---

## 8 ANEXOS \_\_\_\_\_

### 8.1 Protocolo

	Data: __/__/__
	Nº: _____
<b>PROTÓCOLO</b>	
Nome do paciente: _____	
Idade: _____ anos Sexo: ( ) 1 - Feminino / 2 - Masculino	
Data de nascimento: __ / __ / __ Cor: ( ) 1 - Branco / 2 - Negro	
Endereço: _____ _____	
Cidade: _____ Fone: _____ Celular: _____	
<b>Fatores de risco para infecção pelo VHB:</b>	
( ) drogas IV	Data: _____
( ) sexual	Data: _____
( ) transfusão sanguínea	Data: _____
( ) diálise	Data: _____
( ) transmissão vertical	Data: _____
( ) acidente de punção	Data: _____
( ) outros	Data: _____ Descrição: _____
<b>Exames:</b>	
	HBeAg: _____
	ALT: _____ U/L
	Biópsia Hepática: ( ) Sim ( ) Não
<b>Avaliação Molecular:</b>	
Genótipo VHB: _____	
Subtipo VHB: _____	

## 8.2 Consentimento Pós-Infirmação



Faculdade de Física, Faculdade de Engenharia e Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Porto Alegre

Data: \_\_/\_\_/\_\_

### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Nº: \_\_\_\_\_

Estamos realizando, neste hospital um trabalho de pesquisa sobre o Vírus da Hepatite B (VHB) e gostaríamos de saber se o senhor(a) se dispõe a ajudar-nos.

Muitas pessoas são atendidas diariamente, depois de saber que têm o VHB após fazer exames de laboratório. Elas podem ter-se contaminado através de relações sexuais, uso de drogas, após ter feito cirurgia ou durante o parto.

Esse vírus pode ser responsável por causar cirrose e câncer de fígado em momentos diferentes ou ao mesmo tempo. Já se sabe que existem diferentes tipos de vírus, por nós chamados de genótipos que, através de uma detecção, poderemos saber quais os tipos de vírus da Hepatite B existem na cidade de Porto Alegre – RS, qual é o tipo mais agressivo, qual favorece as pessoas adoecerem mais rápido e quais pessoas responderam melhor ao tratamento.

Muitos estudos estão sendo feitos por todo o mundo, mas muito poucos em nossa região, por isso estamos realizando esse trabalho.

Para colaborar conosco, você terá que responder poucas perguntas e coletar sangue como você sempre fez nos exames de rotina. Com esse estudo, o senhor(a) saberá o tipo (genótipo), subtipo. As informações referentes aos resultados encontrados neste estudo, seu nome e outros dados pessoais serão mantidos em absoluto sigilo.

A sua decisão em participar ou não desta pesquisa não irá influenciar de forma nenhuma na qualidade do atendimento oferecida pela equipe médica deste hospital, e serão realizados os exames laboratoriais usuais. Essa pesquisa não terá nenhum custo extra a você.

Caso queira retirar-se do estudo, estará livre para fazê-lo em qualquer momento que desejar. Se tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, por favor, entre em contato para que possamos explicá-la.

### PESQUISADOR

Endereço: Rua Felipe Nery 253/303 – POA  
RS - CEP: 90440-150 Fone: 51 99997240

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

### 8.3 Dados e Resultados dos Pacientes Analisados

	ID	Genótipo	Subtipo	I	S	C	FR	ALT	HBeAg
1.	ASM	D	<i>ayw</i>	34	2	1	1	53	1
2.	PGM	F	<i>adw4</i>	38	2	1	1	49	1
3.	JONL	D	<i>ayw</i>	38	2	1	2	46	0
4.	SIB	D	<i>ayw</i>	52	2	1	4	101	1
5.	AAB	D	<i>ayw</i>	56	2	1	6	114	0
6.	EAS	D	<i>ayw</i>	34	2	1	4	51	0
7.	CRPS	Indetectável	Indetectável	44	2	1	4	17	0
8.	LMO	D	<i>ayw</i>	50	2	1	4	45	0
9.	COC	A	<i>adw</i>	61	2	1	4	15	1
10.	LGAM	D	<i>ayw</i>	44	2	1	4	58	0
11.	CUMG	D	<i>ayw</i>	79	2	1	7	29	1
12.	AMG	D	<i>ayw</i>	43	1	1	7	18	0
13.	LH	D	<i>aym</i>	53	2	1	7	15	0
14.	CJ	D	<i>ayw</i>	40	2	1	2	55	1
15.	MS	A	<i>adw</i>	25	1	1	3	22	1
16.	LCPM	Indetectável	Indetectável	51	2	2	4	44	0
17.	NMLA	D	<i>ayw</i>	47	1	1	5	26	0
18.	JRT	A	<i>adw</i>	27	1	1	2	72	0
19.	LCG	D	<i>ayw</i>	57	1	1	4	124	1
20.	NG	D	<i>ayw</i>	45	2	1	4	52	0
21.	AS	D	<i>ayw</i>	61	2	1	4	108	1
22.	AATN	A	<i>adw</i>	73	2	1	3	114	1
23.	JAS	D	<i>ayw</i>	44	2	1	2	15	0
24.	RSF	A	<i>adw</i>	38	2	1	2	58	1
25.	IP	D	<i>ayw</i>	55	1	1	7	60	0
26.	ALSR	A	<i>adw</i>	40	2	1	2	52	0
27.	CFCZ	D	<i>ayw</i>	38	1	1	7	51	0
28.	LAP	Indetectável	Indetectável	51	2	1	2	52	0
29.	LCG	D	<i>ayw</i>	62	2	1	7	72	0
30.	RNMS	A	<i>adw</i>	36	1	1	5	72	1
31.	AC	D	<i>ayw</i>	46	1	1	2	145	1
32.	EMDS	F	<i>adw4</i>	35	2	1	6	52	0
33.	JJH	D	<i>ayw</i>	23	2	1	5	95	0
34.	JBB	Indetectável	Indetectável	54	2	2	4	25	0
35.	RCC	Indetectável	Indetectável	33	2	1	4	8	0
36.	JS	A	<i>adw</i>	52	2	2	4	47	1
37.	EMSA	A	<i>adw</i>	34	2	1	4	45	0
38.	RMB	D	<i>ayw</i>	44	2	1	4	71	1
39.	ARB	A	<i>adw</i>	75	2	1	4	43	0
40.	LGB	D	<i>ayw</i>	48	2	1	1	158	0
41.	MT	A	<i>adw</i>	57	2	1	4	53	0
42.	AMO	A	<i>adw</i>	62	1	1	2	30	1

Cont. tabela

	ID	Genótipo	Subtipo	I	S	C	FR	ALT	HBeAg
43.	PLR	A	<i>adw</i>	40	1	1	7	20	1
44.	ABS	D	<i>ayw</i>	37	2	1	2	18	1
45.	GJS	A	<i>adw</i>	70	2	2	4	13	1
46.	FJB	A	<i>adw</i>	72	2	1	4	49	0
47.	MPSR	Indetectável	Indetectável	65	1	1	4	15	0
48.	PVP	A	<i>adw</i>	47	2	1	2	34	0
49.	FLP	D	<i>ayw</i>	43	2	1	7	28	0
50.	APH	Indetectável	Indetectável	56	2	1	7	57	0
51.	OBR	Indetectável	Indetectável	60	2	1	2	9	0
52.	LSA	Indetectável	Indetectável	48	1	1	7	867	1
53.	MHL	A	<i>adw</i>	37	1	2	3	60	0
54.	DVR	Indetectável	Indetectável	53	2	1	4	42	1
55.	ZC	D	<i>ayw</i>	35	1	1	4	66	1
56.	AP	A	<i>adw</i>	32	2	1	2	41	0
57.	CAPR	Indetectável	Indetectável	26	2	1	2	34	0
58.	CCM	Indetectável	Indetectável	32	1	2	2	26	0
59.	RJ	D	<i>ayw</i>	58	2	1	7	28	0
60.	BH	Indetectável	Indetectável	46	2	1	4	28	0
61.	ALV	D	<i>ayw</i>	41	2	1	4	65	1
62.	HG	Indetectável	Indetectável	43	2	1	4	79	1
63.	CJ	D	<i>ayw</i>	40	2	1	2	112	1
64.	AC	D	<i>ayw</i>	33	2	1	4	129	0
65.	RB	D	<i>ayw</i>	72	2	1	7	43	0
66.	LC	F	<i>adw4</i>	33	2	1	7	52	0
67.	TJ	D	<i>ayw</i>	33	2	2	7	211	0

**LEGENDA:**

I (Idade) = em anos

S (Sexo) = 1 - Feminino / 2 - Masculino

C (Cor) = 1 - Branco / 2 - Negro

FR (Fatores de Risco) = 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7

1 - drogas IV

2 - sexual

3 - transfusão sangüínea

4 - diálise

5 - transmissão vertical

6 - acidente de punção

7 - outros (cirurgias e causas desconhecidas)

ALT = em U/L

HBeAg = 1 - reagente / 0 - não reagente

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)