

Alessandra Stilhano Nascimento

**Avaliação dos marcadores sorológicos e estudo de
genotipagem da hepatite B em pacientes
hemodialisados**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Coordenadoria de
Controle de Doenças da
Secretaria de Estado da Saúde de
São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. João Renato
Rebello Pinho

**São Paulo
2005**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Alessandra Stilhano Nascimento

**Avaliação dos marcadores sorológicos e estudo de
genotipagem da hepatite B em pacientes
hemodialisados**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Coordenadoria de
Controle de Doenças da
Secretaria de Estado da Saúde de
São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. João Renato
Rebello Pinho

**São Paulo
2005**

Dedico...
Aos meus pais, Wilson e Claudete, pelo amor, apoio e incentivo
incondicionais em todos os projetos da minha vida.

Ofereço...
Ao meu marido, Cláudio, pelo seu amor sempre tão presente.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que tudo seja realizado em minha vida.

Ao meu orientador Dr. João Renato Rebello Pinho, por ter apostado neste projeto desde o início, por ter acreditado no meu trabalho, dando-me oportunidades e condições para continuar.

À equipe do Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Adolfo Lutz que colaborou neste trabalho, em especial à Dra. Regina Célia Moreira, que permitiu que as amostras fossem utilizadas para este estudo.

À Isabel Maria Vicente de Carvalho Mello, pela sua amizade e seu enorme potencial profissional, que tanto me ajudou. Bela, obrigada, por tudo.

Ao Professor Raimundo Azevedo, por ter aceitado trabalhar conosco nas análises estatísticas, sempre com muita simpatia e dedicação.

À Micheli Mesquita Soares Gomes, minha companheira de pós-graduação, sempre presente em todos os momentos deste longo trabalho.

À Márcia Saldanha Kubrusly, que permitiu que seu espaço na Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo fosse invadido por mim para concluir este trabalho. Obrigada pela sua ajuda e bom humor constantes.

Aos professores que fizeram parte da banca de qualificação deste trabalho: Dr. Venâncio Avancine Ferreira Alves, Dra. Julia Maria Fellipe e Dr. Celso Francisco Hernandez Granato. Obrigada pelas valiosas críticas e sugestões, que contribuíram para o meu aprendizado e maior clareza na apresentação deste trabalho.

À Dra. Fátima Pires, coordenadora do Programa de Pós-Graduação e à Dra. Adriana Vicentini, coordenadora da área de concentração de Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública, cujo trabalho e esforço tornaram possível a minha formação e de outros colegas.

À Secretaria da Pós-graduação, Tirces, Claydes e Liliam pela colaboração e apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro concedido.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente, estiveram envolvidos neste trabalho, possibilitando sua conclusão e cujos nomes involuntariamente não figuram nesta lista, meus agradecimentos.

Esta Dissertação está de acordo com:

Referências: Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de biblioteca e documentação; 2004.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 O Vírus da Hepatite B	
2.2 Estrutura do Vírus da Hepatite B	
2.3 Genoma do Vírus da Hepatite B	
2.4 Replicação viral	
2.5 Diversidade viral	
2.5.1 Heterogeneidade do HBV - Subtipos e Genótipos	
2.5.2 Mutações no genoma do HBV - Implicações clínicas	
3. OBJETIVO	
4. MÉTODOS	
5. RESULTADOS	
6. DISCUSSÃO	
7. CONCLUSÕES	
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
9. ANEXOS	

Lista de figuras

- Figura 1. Representação da partícula viral do Vírus da Hepatite B com seus principais componentes.....
- Figura 2. Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na hepatite B aguda.....
- Figura 3. Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na hepatite B crônica.....
- Figura 4. mapa de distribuição geográfica da prevalência do AgHBs.....

Lista de tabelas

Tabela 1.	Variabilidade no número de amostras dos pacientes estudados..
Tabela 2.	Número de pacientes envolvidos no estudo por centro de diálise
Tabela 3.	Número de pacientes em cada centro de diálise que informaram ter sido vacinado contra a hepatite B.....
Tabela 4.	Frequência do marcador AgHBs em cada um dos centros estudados.....
Tabela 5.	Frequência do marcador Anti-HBc total em cada um dos centros estudados.....
Tabela 6.	Frequência do marcador Anti-HBs em cada um dos centros estudados.....
Tabela 7.	Resultado do PCR Core em cada um dos centros estudados.....
Tabela 8	Genótipos do VHB encontrados nos dois centros de diálise.....

Lista de Quadros

Quadro 1	Programa para amplificação da região C do VHB
Quadro 2	Programa para amplificação da região S do VHB.....
Quadro 3	Programa para amplificação da região Pré-core/C do VHB.....
Quadro 4	Programa para reação de seqüenciamento.....

RESUMO

A hepatite B é uma infecção de grande importância nas unidades de diálise. A transmissão da infecção pode ser controlada pela vacinação, mas alguns pacientes submetidos à tratamento por diálise não respondem eficientemente a vacinação. Neste estudo, nós analisamos pacientes submetidos a tratamento por hemodiálise de dois centros de diálise da região leste da cidade de São Paulo. Os nossos objetivos foram determinar a incidência e prevalência da hepatite B, determinar o genótipo e analisar a presença de mutação na região pré-core e do promotor do core (BCP) nessa população. Foram analisados durante um ano, 276 pacientes. Todas as amostras foram analisadas para os marcadores sorológicos Anti-HBc e AgHBs. O Anti-HBs foi analisado nas amostras AgHBs negativas. O AgHBe em amostras AgHBs positivas e o Anti-HBe em amostras AgHBe negativas. Para os testes sorológicos foram utilizados kits comerciais de ELISA. Para a reação de PCR, foram utilizados primers específicos das regiões C, S e pré-core do vírus B. A prevalência encontrada foi de 27,9% e a incidência foi zero. O VHB DNA foi encontrado em 28/276 (10,1%). Depois da amplificação da região S, o genótipo D foi encontrado em 21 amostras. Na região do core e da região do promotor foram encontradas mutações em 14 amostras. Em conclusão, foi observada uma alta prevalência da hepatite B, nos centros de diálise na cidade de São Paulo. Além disso, evidências de contaminação dentro dos centros de diálise foram encontradas, como todos os pacientes apresentarem o mesmo genótipo D, não sendo o genótipo mais freqüente encontrado no estado de São Paulo, onde o genótipo A é mais predominante.

ABSTRACT

Hepatitis B Virus (HBV) infection is a major problem in renal dialysis units. Blocking the transmission of this infection can be accomplished by vaccination, but most patients submitted to renal dialysis did not reach protective anti-HBs levels even after receiving several doses of vaccine. In this study, we have analyzed patients under renal dialysis treatment in two centers from the east region of São Paulo Metropolitan Area. The aims of this study were: 1) to determine the incidence and prevalence of HBV in this population; 2) to determine the HBV genotypes found in this population; 3) to analyze the presence of pre-core and basal core promoter (BCP) mutants found in this population. Monthly samples were collected from 276 patients followed in these two dialysis centers for one year. All the samples were assayed for Anti-HBc and HBsAg. Anti-HBs was assayed in all anti-HBc positive and HBsAg negative samples. HBeAg and anti-HBe were assayed in all HBsAg positive samples. Serological assays were carried out using commercial available ELISA kits. PCR amplifications were carried out with primers covering the C, S and preC/C genes. The prevalence of anti-HBc was 27,9% and don't have incidence. HBV DNA was found in 28/276 (10,1%) samples, all of them HBsAg positive. After amplifying and sequencing a fragment of the S gene, genotype D was identified in all 21 samples with detectable HBV DNA. No pre-core or BCP mutations have been identified in 14 analyzed samples. In conclusion, a high prevalence of HBV infection was observed in renal dialysis units in São Paulo metropolitan area. Furthermore, evidences for intra dialysis units contamination were found, as all the patients were contaminated with the genotype D, that is not the most frequent in São Paulo State, where genotype A was reported to be predominant.

INTRODUÇÃO

Hepatite viral é um termo geral, utilizado para indicar a infecção do fígado causada por vírus hepatotrópicos, em particular, os vírus das hepatites A - E. O sinal mais característico desta doença é um aumento no nível sérico das enzimas hepáticas, em especial, da alanina amino transferase (ALT). Muitas vezes esta doença é acompanhada de icterícia, uma coloração amarelo-alaranjada na pele e mucosas, causada pela elevação dos níveis de bilirrubina no sangue, resultado da má excreção do pigmento biliar feita pelos hepatócitos infectados (Hollinger *et al.*, 1996).

As primeiras descrições desta doença foram feitas na Grécia antiga, sendo a mesma posteriormente relacionada a fenômenos obstrutivos e à necrose hepatocelular difusa encontrada em necropsias (Aach *et al.*, 1981; Da Silva, 1995). Somente a partir de 1939, com o advento das biópsias hepáticas, as hepatites virais foram definitivamente associadas a alterações inflamatórias dos hepatócitos (Mendes *et al.*, 1984).

Em relação à hepatite transmitida por soro, a primeira descrição clara da existência de uma hepatite de transmissão parenteral foi documentada por Luman em 1885, que relatou a presença de icterícia em 15% de 1.289 trabalhadores alemães de um estaleiro, 8 meses depois de serem vacinados contra varíola (Aach *et al.*, 1981). A ocorrência destas icterícias relacionadas

ao uso de plasma humano em soros e vacinas propiciou evidências de que o soro humano pudesse ser o veículo do agente transmissor, o que foi reforçado com a observação de casos de icterícia em receptores de sangue ou derivados (Beenson *et al.*, 1943).

Nos anos 40, foram realizados estudos em voluntários, que desenvolveram icterícia após ingestão de fluido duodenal e inoculação de sangue proveniente de doentes com sintomas de hepatite aguda (MacCallum e Bauer, 1944; Havens *et al.*, 1948).

Sabia-se que o vírus da hepatite soro-homóloga, chamado então de vírus SH, estava presente em plasma de convalescentes de caxumba e em lotes de vacina contra febre amarela e era capaz de produzir hepatites agudas em voluntários, no período de 60 a 130 dias após a inoculação (Neef *et al.*, 1946; Aach *et al.*, 1981).

Nos anos 50, foram observados casos de hepatites soro-homólogas em usuários de drogas injetáveis e em receptores de unidades de sangue provenientes de doadores sadios, sendo estes rotulados como portadores sãos de hepatite soro-homóloga (Steigmann *et al.*, 1950; Appelbaum *et al.*, 1951; Murray *et al.*, 1954; Neef *et al.*, 1954; Stokes *et al.*, 1954).

Em 1965, Blumberg *et al.* publicaram o que viria a ser uma das mais importantes revelações sobre hepatites; a observação de um antígeno no soro de um aborígene australiano, que foi denominado de antígeno Austrália e inicialmente associado às leucemias. Em 1967, Krugman *et al.* trabalhando em Nova York com deficientes mentais, observaram que havia dois tipos de hepatites virais com características clínicas, epidemiológicas e imunológicas

distintas, a hepatite infecciosa, chamada de vírus MS-1, e a hepatite soro-homóloga ou hepatite MS-2. Os quadros de MS-1 associavam-se a curtos períodos de incubação (entre 30 a 38 dias), e os quadros de hepatite MS-2 a longos períodos de incubação (entre 41 a 108 dias). Os estudos também demonstraram que não havia imunidade cruzada entre ambas.

Okochi e Murakami (1968), no Japão, relacionaram a presença do antígeno Austrália em doadores de sangue com o desenvolvimento de hepatites pós-tranfusionais (HPT) nos receptores de unidades transfusionais positivas para este antígeno. Finalmente, em 1969 Blumberg *et al.* associaram o antígeno Austrália as hepatites agudas e crônicas, ressaltando a necessidade de pesquisa rotineira na triagem de doadores de sangue, principalmente nas áreas onde o antígeno era altamente prevalente.

Portanto, no início da década de 70, estavam estabelecidas as relações etiológicas entre a hepatite soro-homóloga, ou hepatite MS-2, e o antígeno Austrália.

Os estudos de Dane *et al.* (1970) demonstraram a natureza complexa do antígeno AgHBc. O anti-HBc, anticorpo dirigido contra o componente viral do core do VHB foi descrito por Almeida *et al.* em 1971. Em 1972, Magnius e Espmark descreveram o antígeno “e” (AgHBe). A partir desta data, os estudos intensificaram-se, ficando cada vez mais clara a relação entre este agente e hepatites agudas e crônicas.

Em 1973, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs que o termo hepatite por soro homólogo, pós-transfusional, MS-2, sérica, com

incubação prolongada ou decorrente do antígeno Austrália tivesse o seu nome substituído por hepatite B.

Estrutura do VHB

O VHB pertence à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*, o qual é constituído por vírus descrito em humanos, macacos e roedores. Vírus semelhantes ao VHB foram encontrados na marmota *monax* (WHV - Woodchuck Hepatitis Virus) (Summers *et al.*, 1978), no esquilo *Spermophilus beecheyi* (GSHV - Ground Squirrel Hepatitis Virus) (Marion *et al.* 1980), no esquilo do ártico *Callosciurus erythracus* (ASGHV - Arctic Ground squirrel hepatitis virus) (Testut *et al.*, 1996) e no macaco barrigudo *Lagothrix lagotricia* – WMHBV Woolly Monkey Hepatitis B (Virus) (Lanford *et al.*, 1998). Este gênero compreende também vírus muito semelhantes ao humano, mas filogeneticamente distintos, encontrados em macacos antropóides como gibões *Hylobates lar* (Mimms *et al.*, 1993), chimpanzés *Pan troglodytes verus* (MacDonald *et al.*, 2000), orangotangos *Pongo pygmaeus* (Warren *et al.*, 1999) e gorilas *Gorilla gorilla* (Grethe *et al.*, 2000).

Todos estes vírus são hepatotrópicos e têm como características gerais o fato de serem partículas virais envelopadas com nucleocapsídeo icosaédrico, genoma composto por DNA com fita parcialmente dupla e replicação através de RNA intermediários por meio de uma DNA polimerase com atividade de transcriptase reversa (Lee *et al.*, 1997).

O VHB pode ser encontrado no soro de pacientes infectados sob duas formas: 1- Partículas esféricas, com 22nm de diâmetro e cilíndricas, com até

200 nm de comprimento, que são constituídas apenas pelas proteínas do envelope viral envoltas pelo seu envoltório lipídico. Estas partículas não são infecciosas e são produzidas em grande quantidade durante a infecção viral (Tiollais *et al.*, 1985); 2- Partículas de Dane, que são esféricas com 42 nm de diâmetro e constituem o virion completo, sendo compostas por um envoltório lipídico contendo as proteínas do envelope viral e um núcleo central denso (nucleocapsídeo) (Dane *et al.*, 1970).

O núcleo central possui uma proteína interna do core (AgHBc), que induz a formação de anticorpos específicos (anti-HBc) pelos indivíduos infectados. O AgHBc não é encontrado habitualmente livre no soro, onde só pode ser detectado como componente interno das partículas de Dane. Porém, ele pode estar presente no núcleo do hepatócito ou expresso na superfície dessa célula, por isso é muito difícil sua detecção no sangue circulante, diferentemente do que ocorre no fígado onde é muito abundante e pode ser detectado por imunohistoquímica. Um outro antígeno, denominado antígeno "e" (AgHBe), é secretado e, diferentemente do AgHBc, pode ser facilmente detectado no sangue em pacientes que apresentam replicação viral ativa (Zuckermam e Thomas, 1998). Este antígeno está associado à replicação e infectividade viral e induz a formação de anticorpos específicos (anti-HBe), que normalmente estão relacionadas com a diminuição da replicação viral, exceto naqueles pacientes portadores de cepas com mutações na região pré core, que não produzem o AgHBe (Brunetto *et al.*, 1990).

Na região central da partícula de Dane observa-se ainda a presença do ácido nucléico viral, que é constituído por uma molécula de DNA, e de uma DNA polimerase envolvida no processo de replicação viral (Figura 1) (Zuckermam e Thomas, 1998).

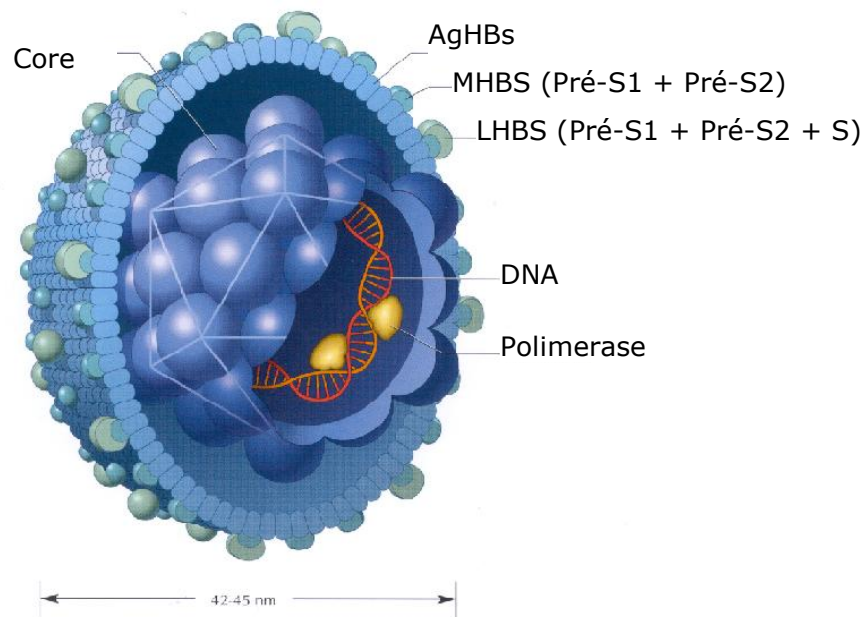


Figura 1 - Representação da partícula viral do Vírus da Hepatite B com seus principais componentes. Fonte: Perkins, 2002, modificado.

Genoma do VHB

O genoma do VHB apresenta uma estrutura peculiar, sendo constituído por uma molécula de DNA circular, com uma fita parcialmente dupla apresentando uma região de fita simples com tamanho variável. A fita longa de polaridade negativa ou L (-) possui um tamanho fixo com cerca de 3200 nucleotídeos, já a fita curta de polaridade positiva ou S (+) pode variar entre

1700 e 2800 nucleotídeos nas diferentes moléculas (Marion e Robinson, 1983; Tiollais *et al.*, 1985).

A capacidade codificadora está restrita à fita L (-), na qual foram identificadas quatro regiões codificadoras de proteínas: S, C, P e X. A região S é dividida em S e pré-S, sendo aquela responsável pela codificação da proteína principal do envelope, o AgHBs. A região pré-S, na mesma fase de leitura, codifica para as proteínas L (pré-S1 + pré-S2 + S) e M (pré-S2+ S) do envelope viral (Tiollais *et al.*, 1985). A região C codifica a proteína AgHBc, que constitui a principal proteína do “core” viral. As regiões pré-C e C, quando traduzidas conjuntamente, relacionam-se com a expressão do AgHBe. A região P estende-se por cerca de 80% do genoma viral e codifica a DNA-polimerase viral. Finalmente, a região X codifica o AgHBx (Murray, 1987).

Marcadores Sorológicos do VHB

Como os sintomas clínicos da hepatite B são praticamente indistinguíveis das outras hepatites virais, o diagnóstico definitivo é dependente dos testes sorológicos para a infecção (Mahoney, 1999).

O período de incubação da hepatite B varia de 60 a 180 dias, quando então ocorre a fase aguda da doença (Ferreira, 2000).

Durante o curso da infecção pelo VHB, o AgHBs é o primeiro marcador a aparecer, sendo que na hepatite aguda ele persiste por 3 a 4 meses após a infecção e desaparece com posterior aparecimento do anti-HBs nos casos

que evoluem para cura. Por outro lado, a presença do AgHBs por mais de seis meses é indicativa de hepatite crônica (Decker, 1998; Mahoney, 1999).

O anti-HBs é, em geral, o último marcador sorológico a aparecer, na maioria das vezes entre 1 a 10 semanas após o desaparecimento do seu respectivo antígeno (AgHBs), constituindo o marcador indicativo da resolução da infecção. O período após a infecção, no qual não se detecta nenhum dos dois marcadores é conhecido como janela imunológica. Embora o anti-HBs seja dirigido apenas contra o envelope do VHB, em geral, confere imunidade ao indivíduo. Este anticorpo é também encontrado em indivíduos vacinados (Da Silva e Granato, 1995).

O AgHBe é o segundo marcador a aparecer e indica intensa replicação viral. A persistência deste marcador por 8 ou 10 semanas, após o surgimento dos sintomas, pode ser um indicativo de evolução para infecção crônica. Este antígeno só é encontrado na presença do AgHBs associando-se com o período de maior infecciosidade. Quando o desaparecimento do AgHBe ocorre durante a fase aguda sendo sucedido pelo desaparecimento do AgHBs, é sugestivo de evolução para a cura. O aparecimento do anti-HBe é, em regra geral, um fator de bom prognóstico, pois indica redução da replicação viral (Decker, 1998).

O período de janela imunológica no sistema HBe não é uniforme, isto é, há pacientes em que se detecta o anticorpo imediatamente após a negativação do AgHBe, enquanto em outros há uma lacuna no tempo entre o desaparecimento do AgHBe e o aparecimento do anti-HBe (Da Silva e Granato, 1995).

No início dos sintomas, em resposta ao antígeno do capsídeo do vírus B, predominam os anticorpos da classe IgM (anti-HBc-IgM), que persistem por dois a três meses, diminuindo ou desaparecendo após esse período. O anti-HBc total apresenta títulos progressivamente crescentes na fase aguda permanecendo detectável pelo resto da vida na maioria dos indivíduos infectados. Portanto, enquanto o anti-HBc IgM representa importante auxílio diagnóstico na fase aguda da infecção, o anti-HBc total é o principal marcador clínico-epidemiológico desta infecção, por ser o mais sensível marcador de contato prévio com o VHB (Figura 2) (Da Silva e Granato, 1995).

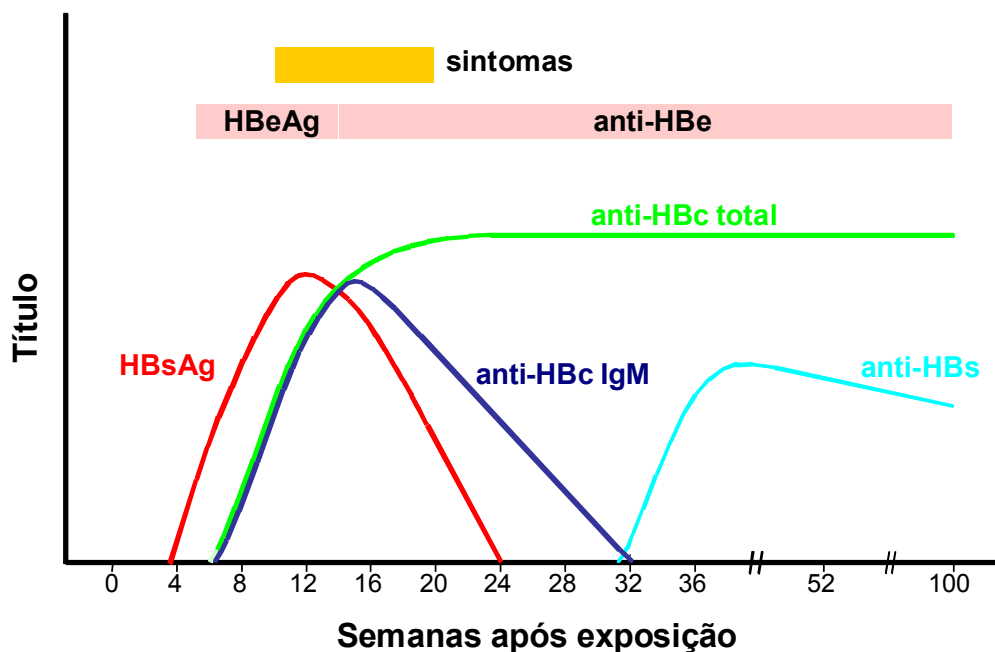
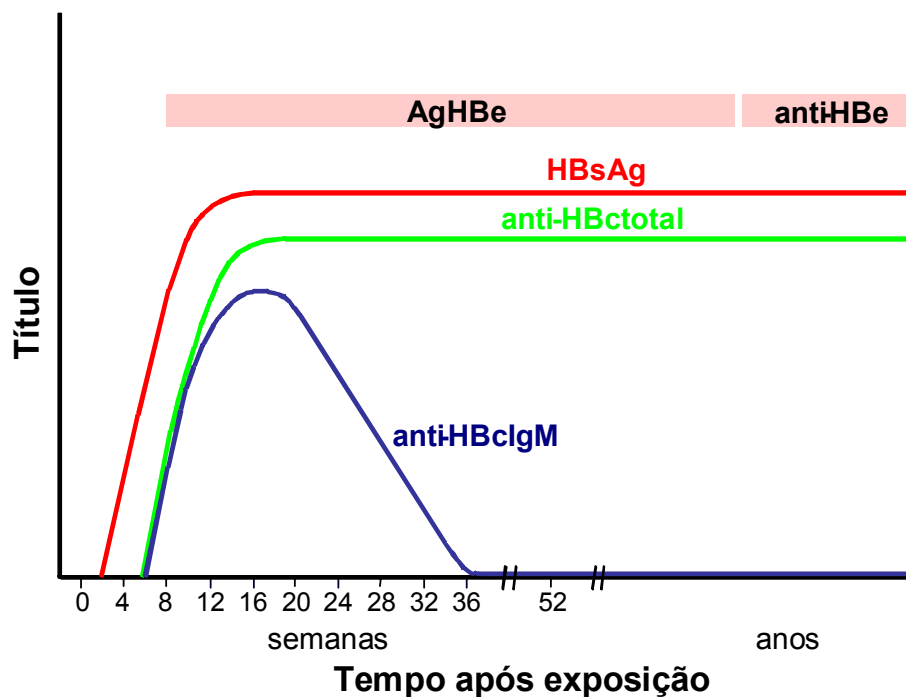


Figura 2- Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na hepatite B aguda. Fonte CDC 1995, modificado.

No período de janela imunológica, ou seja, período da infecção em que não se detecta no soro nem o AgHBs nem seu respectivo anticorpo anti-HBs, os marcadores sorológicos que estão presentes no soro são o anti-HBc IgM e total, que garantem o diagnóstico perante os resultados clínico-



laboratoriais (Figura 3).

Figura 3- Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na hepatite B crônica. Fonte CDC 1995, modificado.

Diversidade Viral

Subtipos e Genótipos

Utilizando-se anticorpos específicos contra o AgHBs, nove diferentes subtipos sorológicos foram definidos, refletindo a variedade genética do VHB: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq+* e *adrq-*. Todos os

subtipos conhecidos do VHB apresentam um determinante comum “a”, contra o qual são dirigidos os anticorpos neutralizantes anti-HBs, e cada um dos determinantes mutuamente exclusivos (*d* ou *y*, e *w* ou *r*) (Zuckerman e Thomas, 1998).

Alguns estudos demonstraram que a subtipagem não refletia a verdadeira variabilidade genética do VHB, uma vez que a diversidade genética era a mesma entre o mesmo subtipo e diferentes subtipos. Portanto, foi proposta uma outra forma de classificação com base em uma diversidade de 8% ou mais na sequência de nucleotídeos do genoma completo entre os diferentes subtipos, o que permitiu a separação do VHB em grupos denominados genótipos. Este grau de divergência tornou-se então a definição para classificar diferentes genótipos do VHB (Okamoto *et al.*, 1988). Posteriormente comprovou-se que a classificação dos diferentes genótipos com base no seqüenciamento parcial do gene S é possível, apresentando resultados consistentes com aqueles baseados na sequência do genoma completo, sendo que uma divergência na sequência de nucleotídeos de 4% é usada para classificar os genótipos com base no gene S (Norder *et al.*, 1992).

Atualmente o VHB está classificado em 8 genótipos (A, B, C, D, E, F, G e H), sendo que os genótipos F e H são os mais divergentes. (Okamoto *et al.*, 1988; Norder *et al.*, 1992; Stuyver *et al.*, 2000; Arauz-Ruiz *et al.*, 2002).

Várias metodologias têm sido usadas para a genotipagem do VHB incluindo o seqüenciamento direto, a análise do Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP-“Restriction Fragment Length

Polymorphism” – Lindh *et al.*, 1997), Lipa (“Line probe assay” – Teles *et al.*, 1999), “primers” específicos (Naito *et al.*, 2001) e enzima imunoensaio (Chu e Lok, 2002).

Distribuição dos Genótipos do VHB

Os diferentes genótipos do VHB apresentam uma distribuição geográfica característica, dessa forma a genotipagem do VHB constitui uma importante ferramenta para o entendimento da epidemiologia molecular deste vírus.

O genótipo A é principalmente encontrado no Norte da Europa, Estados Unidos e África abaixo do Saara. Genótipos B e C são característicos do Sudeste da Ásia e do Extremo Oriente. Genótipo D é encontrado mundialmente, mas é o genótipo dominante na área do Mediterrâneo, sendo encontrado também no Sul da Ásia e nos Estados Unidos. Cepas do genótipo E têm sido relatadas somente na África abaixo do Saara. Há indicações de que o genótipo F represente a cepa do VHB mais prevalente na população de índios do Novo Mundo. O genótipo G foi encontrado nos Estados Unidos e na França. E o mais recente genótipo H foi encontrado nos Estados Unidos e na América Central (Locarnini, 2002).

No Brasil, foram encontrados os genótipos A, D e F no Rio de Janeiro, muitas vezes com mutações na região pré S (Moraes *et al.*, 1996). Os mesmos genótipos foram também encontrados em pacientes submetidos à

hemodiálise em Goiânia (Teles *et al.*, 1999) e em Santa Catarina (Moraes *et al.*, 1998). Entre pacientes com hepatites crônicas B acompanhados em São Paulo, foram encontrados os genótipos A, B, C, D e F, com predomínio do genótipo A (47%). Entre 28 pacientes de origem asiática, 27 (96%) tinham genótipos B e C, enquanto que os genótipos A, D e F eram praticamente exclusivos dos pacientes de ascendência ocidental (Sitnik *et al.*, 2000).

Na região norte do país, em alguns estudos que não envolveram populações ameríndias, observa-se maior prevalência do genótipo A, seguido do genótipo F. De acordo com Sitnik *et al.* (2004), 77,8% das amostras de pacientes de vários estados da região norte apresentaram genótipo A e 22,2% do genótipo F. Bertolini *et al.* (2000), estudando 27 amostras de soros de população indígena da Amazônia, observaram 77,3% de prevalência do genótipo F, seguido pelo genótipo A (22,7%). Em estudo feito numa população de pacientes hemodialisados em São Paulo e Assunção no Paraguai, o genótipo A foi mais prevalente em São Paulo; e o genótipo D, em Assunção, Paraguai (Giret *et al.*, 2003).

Mutação na Região Pré-Core

Devido à replicação via transcrição reversa de um RNA intermediário, utilizando uma polimerase que não possui atividade revisora, o VHB possui um elevado potencial para o desenvolvimento de mutações (Raymond e Koff, 1993). Destas, a mutação G1896A na região pré-core do DNA do VHB, que gera um códon de terminação abortando a síntese do AgHBe, apresenta grande importância clínica (Carman *et al.*, 1989).

A mutação G1896A foi descrita inicialmente na Itália envolvendo casos negativos para AgHBe, mas positivos para AgHBs, anti-HBc, anti-HBe, DNA viral e AgHBc no fígado (Brunetto *et al.*, 1990). Posteriormente, vários trabalhos descreveram a presença de vírus mutantes, incapazes de sintetizar o AgHBe, infectando indivíduos anti-HBe reagentes que, paradoxalmente apresentavam altos níveis séricos de DNA-VHB (Brunetto *et al.*, 1990; Okamoto *et al.*, 1990).

Nas regiões do Mediterrâneo e Extremo Oriente, há uma grande frequência de cepas do VHB que apresentam mutações pontuais G1896A e G1899A na região pré-core. A presença da seqüência “selvagem” foi denominada MO, a presença da mutação no nucleotídeo 1896 de M1 e a presença das duas mutações (1896 e 1899) de M2 (Akahane *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1990).

Esta mutação associa-se ao desenvolvimento de hepatites fulminantes e ao agravamento de hepatites crônicas produzidas pelo VHB, gerando maiores índices de morbi-mortalidade, que aqueles observados nas infecções pelos vírus B selvagens (Liang *et al.* 1991; Omata *et al.*, 1991; Raymond e Koff, 1993).

O padrão de AgHBs, anti-HBe e DNA viral positivos também pode estar relacionado às mutações A1762T e G1764A, que afetam o promotor basal do core (BCP) (Sitnik *et al.*, 2004). Vírus com estas mutações geralmente apresentam um aumento no nível de replicação viral quando comparados com cepas selvagens do VHB, sugerindo que substituições na região do

BCP e na região pré-core não só alteram a síntese do AgHBe, mas também afetam o nível da replicação viral (Scaglioni *et al.*, 1997).

Epidemiologia da Hepatite B

Estima-se que mais de dois bilhões de pessoas já foram infectadas pelo VHB em alguma época de suas vidas. Ocorre por ano cerca de um milhão de óbitos relacionados às complicações da hepatite crônica, tais como: cirrose e hepatocarcinoma (Kiffer *et al.*, 2003).

O indivíduo, uma vez infectado, pode evoluir para três principais formas: hepatite fulminante, forma de elevada gravidade e letalidade; recuperação completa com desenvolvimento de imunidade, após infecção aguda sintomática ou assintomática; ou estado de portador crônico, com diversas formas de acometimento clínico (Kiffer *et al.*, 2003).

O VHB é transmitido principalmente através de exposição percutânea ou de mucosas aos fluidos corpóreos ou sangue contaminado. As maiores concentrações de vírus são verificadas no sangue e secreções serosas, diminuindo consideravelmente no sêmen, fluido vaginal e saliva. As principais formas de contágio são: transmissão perinatal, relações sexuais, transfusão de sangue ou derivados, uso de drogas intravenosas, transplante de órgãos ou tecidos, lesões de pele ou acidentes com agulhas, principalmente entre profissionais da área de saúde. A saliva pode ser

veículo de transmissão em caso de mordidas, porém não foram documentados casos de transmissão por beijo ou outros tipos de exposição à saliva (Kiffer *et al.*, 2003).

A prevalência do VHB é classificada conforme os níveis de seus marcadores sorológicos em uma determinada população. A prevalência determinada utilizando apenas antígeno de superfície do VHB (AgHBs) corresponde àqueles indivíduos que estão com a infecção aguda ou são portadores crônicos. Também pode ser determinada pesquisando-se os indivíduos que já foram expostos ao VHB, onde são incluídos tanto indivíduos na vigência da infecção (presença do AgHBs) quanto indivíduos com sinais de infecção passada (ausência de AgHBs com presença de anticorpos anti-HBc) (Souto *et al.*, 1999).

A prevalência do VHB e os padrões de transmissão variam enormemente nas diferentes partes do mundo, dependendo da taxa de infecção crônica, da proporção de pessoas com o vírus em replicação ativa e da via predominante de transmissão em cada região (Triki *et al.*, 1997; Mahoney, 1999). Em função dessas características, as regiões do mundo são divididas, de acordo com a prevalência do antígeno de superfície do VHB em áreas de alta (8%), intermediária (2 a 8%) e baixa (<2%) endemicidade, conforme demonstrado na figura 4 (Margolis *et al.*, 1991; Evans e London, 1998; Mahoney, 1999).

O Brasil é considerado um país de prevalência intermediária, porém quando as diferentes regiões são estudadas observa-se uma crescente prevalência na direção sul-norte do país. A região Sul é classificada como

área de baixa endemicidade, já as regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste são de endemicidade intermediária. A Amazônia Legal, Cachoeira de Itapemirim no Estado do Espírito Santo e a região oeste do Estado de Santa Catarina são consideradas regiões de alta endemicidade (Souto *et al.*, 1999).

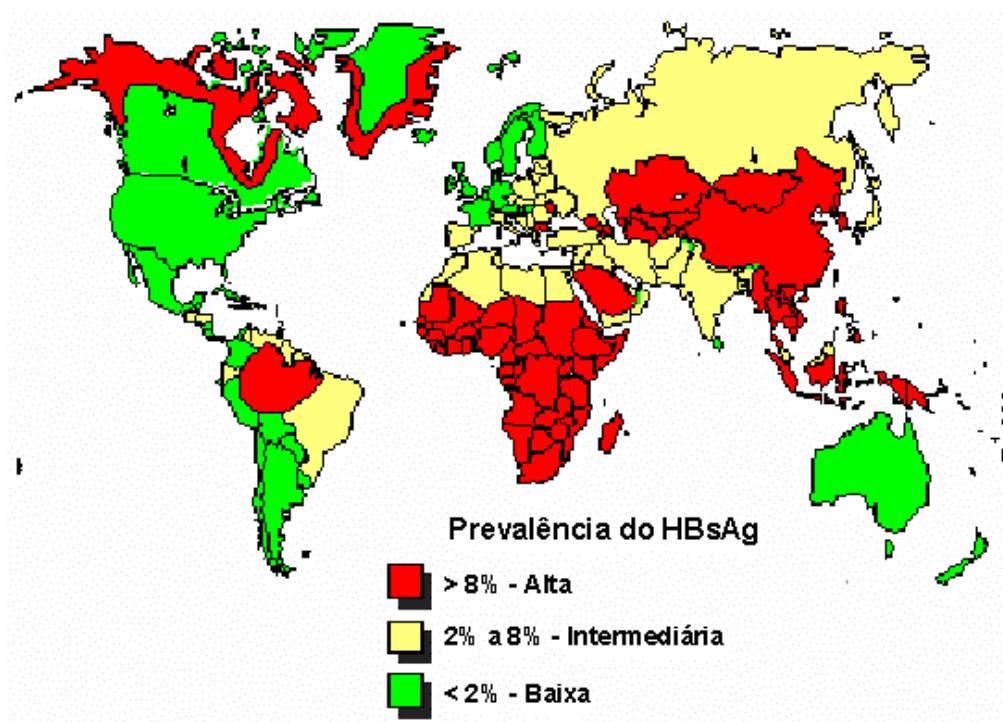


Figura 4- Mapa de distribuição geográfica da prevalência do AgHBs.

Fonte: Organização Mundial da Saúde/WHO, 2002.

Hemodiálise

A hemodiálise é um procedimento que filtra o sangue com a ajuda de um dialisador (capilar ou filtro) com o objetivo de remover substâncias como a uréia, potássio, sódio e água, que quando em excesso trazem prejuízos ao organismo.

A hemodiálise envolve dois sistemas interconectados: circulação extracorpórea de sangue e dialisador. O funcionamento do sistema consiste dos seguintes procedimentos: parte do sangue do paciente é retirada e direcionada para o dialisador através da linha de circulação extracorpórea. No dialisador o sangue é filtrado através de uma membrana de diálise, geralmente de celulose, disposta de forma que, uma superfície entra em contato com o sangue e a outra com o líquido de diálise. Posteriormente o sangue filtrado retorna ao paciente pela linha venosa.

A hemodiálise constitui um importante mecanismo de disseminação de infecções, pois contaminações podem ocorrer nas várias etapas do procedimento, entre as quais podemos citar:

- nos pontos de conexão do sistema de circulação extracorpórea;
- nos recipientes das máquinas de diálise como bombas e tubos de drenagem, que poderiam ser contaminados pela passagem de sangue para o líquido de diálise por qualquer solução de continuidade na membrana do dialisador;
- no medidor da pressão venosa do equipamento ou na sua linha de conexão podendo ocorrer a contaminação com sangue do paciente por refluxo;
- pela introdução de vírus na circulação extracorpórea, através de injeções, coleta de sangue ou procedimentos similares (Moraes, 1998).

Quando há elevadas prevalências de infecção viral em unidades de diálise, uma hipótese a ser levantada é que a disseminação possa ter

ocorrido através dos equipamentos utilizados no procedimento (Marmion e Tonkin, 1972).

Pacientes com comprometimento renal por diversas causas são freqüentemente submetidos a tratamento por hemodiálise. Nesta população a prevalência dos marcadores das hepatites virais é bastante elevada (Mosconi *et al.*, 1992, Carletti *et al.*, 1992, Zuckerman e Thomas, 1998; CDC, 2001).

A hepatite B representa uma infecção de grande importância nas unidades de hemodiálise, tanto para os pacientes como para os profissionais de saúde (Petrosillo, 1993).

Os elevados títulos de vírus circulantes observados nos indivíduos infectados pelo VHB e a estabilidade do vírus constituem fatores que tornam o VHB um importante agente de infecção nos centros de hemodiálise. As partículas infecciosas do VHB podem ser encontradas em superfícies do meio ambiente em concentrações de 10^2 a 10^3 partículas/ml e podem permanecer viáveis por pelo menos 7 dias em temperatura ambiente (Froio *et al.*, 2003).

A prevalência desta infecção em pacientes hemodialisados pode chegar a 80% quando todos os marcadores sorológicos são analisados (CDC, 2001) e o percentual de portadores crônicos desta infecção pode chegar até 7,0% nesta população (Carletti *et al.*, 1992). Os profissionais dos centros de diálise, também constituem grupos de risco, pois podem se infectar com o VHB através de acidentes com materiais perfurocortantes contaminados (Froio *et al.*, 2003).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) começou um programa de vigilância das hepatites em hemodialisados em 1972. Os dados indicavam que a incidência da hepatite B nos centros de hemodiálise nos Estados Unidos em 1976 era de 6,2% chegando a 30% em alguns centros. A adoção de uma série de medidas (uso de equipamentos próprios, equipes especializadas para pacientes infectados, avaliações sorológicas constantes para o antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs) e medidas de prevenção, como o uso de vacina contra o vírus) levou a um declínio na incidência da hepatite B (Saab *et al.*, 2002). Em 1980, a incidência da hepatite B em pacientes hemodialisados nos Estados Unidos diminuiu para 1% (Alter *et al.*, 1983), em 1989, para 0,1% (Alter *et al.*, 1991); e em 1999 para 0,06% (Tokars *et al.*, 2000).

No Brasil, Ruzany *et al.* (1980), encontraram incidência anual da hepatite B de 13,6% e prevalência de soropositividade para AgHBs de 9% em hemodialisados.

No final da década de 90, a prevalência de infecção pelo VHB entre pacientes submetidos à diálise nos serviços avaliados pelo Conselho Regional de Medicina de São Paulo (CREMESP) era de 6,97%, ainda bem acima da população geral da mesma região, que era de 0,3% a 2,1% (CREMESP, 1998). O CREMESP assinalava, contudo, que estas taxas encontravam-se em queda, já que os valores de dez anos anteriores eram de 20% de positividade para AgHBs (CREMESP, 1998).

Cendoroglo-Neto *et al.* (1995), em trabalho realizado com amostras de soros de 185 pacientes submetidos à hemodiálise e 124 em tratamento

por diálise peritoneal ambulatorial contínua, observaram diferença significativa na prevalência da infecção pelos vírus das hepatites B e C entre os dois grupos estudados. Estes autores demonstraram que o tempo de duração do tratamento por hemodiálise, o número de transfusões e o meio ambiente são os principais fatores de transmissão dos vírus B e C, explicando a alta prevalência da infecção nos pacientes em hemodiálise em relação aos que fazem a diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Os pacientes submetidos ao tratamento por hemodiálise não respondem eficientemente à vacinação contra a hepatite B, sendo necessário número maior de doses da vacina, quando comparado à população imunocompetente (Carletti *et al.*, 1992; Zuckermam e Thomas, 1998) e, como esta é a medida mais eficaz para a prevenção da hepatite B, a baixa resposta vacinal compromete o controle da disseminação deste agente entre os pacientes em hemodiálise (Cheng *et al.*, 1997; Propst *et al.*, 1998; Kellerman e Alter, 1999; CDC, 2001).

A vacinação ativa contra a hepatite B foi desenvolvida no final dos anos 70. Depois de um grande sucesso em pacientes com função renal normal, o primeiro estudo com uma grande população de pacientes hemodialisados foi decepcionante. A vacinação levou a uma proteção eficaz em apenas 50 a 60% dos pacientes hemodialisados, enquanto que em pessoas saudáveis esta taxa foi de 95% (Girndt e Kohler, 2002).

Em 1982, a vacina contra a hepatite B foi recomendada para todos os profissionais e pacientes susceptíveis nas unidades de diálise (Kellerman e Alter, 1999).

A recomendação de imunização para pacientes hemodialisados consiste em três a quatro doses de 40µg, ao contrário da população saudável, na qual se recomendam três doses de 20µg. Contudo, somente 60% dos pacientes hemodialisados desenvolvem proteção (Ayli *et al.*, 2000) depois de um mês da aplicação deste esquema vacinal, enquanto 90% da população saudável desenvolve resposta (Ly *et al.*, 2002).

Nos pacientes hemodialisados, a duração da proteção e os níveis de anticorpos declinam rapidamente depois de 12 meses, pois em 50 a 100% dos pacientes vacinados não se detecta ou se observa um nível muito baixo do anticorpo contra o antígeno de superfície da hepatite B (Anti-HBs). Pacientes hemodialisados com nível baixo ou indetectável de Anti-HBs são susceptíveis de infectarem-se com o VHB e deveriam ser revacinados. É prioridade na vacinação desta população investigar a presença do Anti-HBs. Esta abordagem requer avaliações sorológicas freqüentes e revacinações dos pacientes susceptíveis. Este esforço tem se tornado progressivamente difícil e o número de pacientes hemodialisados continua crescendo (Saab *et al.*, 2002).

JUSTIFICATIVA

O início da terapia por hemodiálise no Brasil ocorreu em 1950 com a implementação de serviços de diálise, seguida da realização do primeiro transplante renal (Noronha, 1997).

Em 1996, o Ministério da Saúde do Brasil publicou uma portaria estabelecendo normas para o funcionamento dos serviços de terapia renal substitutiva, ressaltando a necessidade de se definir padrões de qualidade e segurança, visando à redução das taxas de morbi-mortalidade. Esta portaria determina que as sorologias para as hepatites B e C e avaliações bioquímicas, como a dosagem de ALT, sejam realizadas mensalmente (Ministério da Saúde, 1996).

A Portaria nº 82 de 3 de janeiro de 2000, publicada em 8 de fevereiro de 2000, confirma a necessidade destes exames como medida preventiva da disseminação dos vírus das hepatites B e C (Ministério da Saúde, 2000).

Mesmo com a implantação das normas e dos cuidados de biossegurança, a prevalência da infecção pelo VHB em pacientes submetidos a tratamento por hemodiálise continua elevada. Diminuir este índice, conhecer a dinâmica de disseminação deste vírus nas unidades de diálise e, conseqüentemente, reduzir as taxas de incidência da infecção são metas a serem cumpridas por profissionais envolvidos no estudo das hepatites virais em todo mundo.

O presente estudo tem como objetivo principal contribuir com o entendimento destas questões, assim como fornecer subsídios para o

controle da infecção pelo vírus B nos pacientes que necessitam realizar tratamento pela hemodiálise.

OBJETIVOS

Estudar a infecção causada pelo vírus da hepatite B em dois centros de hemodiálise da região leste da Grande São Paulo, com os seguintes objetivos específicos:

1. Conhecer a prevalência e incidência da hepatite B nos pacientes submetidos a tratamento por hemodiálise.
2. Conhecer as características genéticas dos vírus presentes nestas unidades de diálise; em particular, quanto aos genótipos virais e a presença de mutantes na região pré-core/ core.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Amostragem

Para a realização deste trabalho, as amostras de soro de pacientes que realizavam hemodiálise em dois centros de diálise na região leste de São Paulo foram cedidas pela Dra. Regina Célia Moreira do Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Adolfo Lutz, a qual realizou pesquisa de hepatite C nos referidos centros em sua tese de doutorado em 2000.

Foram tomadas as providências para garantir a integridade física e moral de todos os pacientes envolvidos neste trabalho. Para isso, foi elaborado um termo de consentimento livre e esclarecido, submetendo-o previamente à avaliação e à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

O termo do consentimento foi elaborado de forma clara e suscita, com a preocupação com o bem estar dos pacientes, assim como as garantias de confidencialidade dos resultados, da utilização dos soros unicamente para os objetivos propostos no trabalho e em não causar nenhum prejuízo ao paciente em relação ao tratamento, caso não houvesse concordância ou a desistência de sua participação no decorrer do estudo.

Foram colhidas mensalmente, durante um ano, no período de março de 1997 a abril de 1998, amostras de soros obtidas de 276 pacientes submetidos a tratamento por hemodiálise. Houve uma variabilidade no

número de amostras obtidas de cada paciente, pois não eram todos que contavam com 12 amostras, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1: Variabilidade no número de amostras dos pacientes estudados

n.º Amostras	n.º Pacientes
1	56
2	10
3	7
4	7
5	11
6	9
7	3
8	7
9	7
10	21
11	21
12	117

Estes pacientes realizavam a terapia renal substitutiva em duas unidades de diálise diferentes, aqui designadas de unidades A e B. Cada um dos dois centros conta com aproximadamente 140 pacientes, entre fixos e flutuantes, sendo que foram analisadas amostras de pacientes que realizaram pelo menos uma sessão de hemodiálise em qualquer um dos centros (Tabela 2).

Tabela 2- Número de pacientes envolvidos no estudo por centro de diálise

CENTRO	PACIENTES
A	131 (47,46%)
B	145 (52,54%)
Total	276

Nos referidos centros, os pacientes estão divididos em salas e/ou máquinas conforme estejam ou não infectados pelas hepatites B e C. Sendo assim, os centros são organizados em salas brancas, que são destinadas aos pacientes que não possuem nenhum marcador sorológico das hepatites e outras duas salas, uma para os pacientes portadores de hepatite C (VHC) e outra para os pacientes positivos para marcadores do vírus da hepatite B (salas amarelas).

Além das salas para a hemodiálise, as salas de reutilização dos filtros também são separadas, ou seja, os filtros de cada um dos pacientes são lavados e desinfetados com ácido peracético a 5,0%, em suas respectivas salas.

A equipe médica responsável preencheu, para cada paciente estudado, fichas com dados pessoais, como nome, idade, resultados de exames laboratoriais (como dosagem de ALT e resultados das sorologias para as hepatites B e C) e alguns dados clínicos, como o tipo de doença renal, a ocorrência de icterícia, febre e alterações gastrointestinais, além do número de transfusões sangüíneas realizadas pelo paciente até o momento do preenchimento das fichas, que foi, em sua maioria, no envio da primeira amostra de sangue.

Referente aos dados de vacina contra a hepatite B, dos 276 pacientes estudados apenas 108 tinham a informação que foram vacinados, desses, não foi possível contabilizar o número de doses (Tabela 3).

Tabela 3- Número de pacientes em cada centro de diálise que informaram ter sido vacinados contra a hepatite B

CENTRO	VACINADOS
A	56 (51,8%)
B	52 (48,1%)
Total	108

Foram colhidos por punção venosa 10 mL de sangue, utilizando-se tubos secos com vácuo. Este procedimento ocorreu antes da sessão de hemodiálise, não sendo utilizado, nenhum tipo de anticoagulante. Após a colheita, os materiais foram enviados no mesmo dia ao Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz para separação e armazenamento dos soros.

Após a retração do coágulo, os tubos com sangue foram centrifugados a 1.100 x g por 15 minutos e os soros foram separados em três alíquotas de 1,0 mL cada, utilizando-se frascos de polipropileno com tampa de pressão, sendo que duas delas foram armazenadas em freezer - 20°C, e outra alíquota foi armazenada em geladeira a 4°C. Os tubos de polipropileno foram identificados com o número do registro do laboratório, de acordo com a ordem de chegada dos materiais, sendo descongelados ou retirados da geladeira imediatamente antes da realização dos testes.

A amostra estocada a 4°C foi utilizada para a realização do ensaio imunoenzimático; uma das amostras estocadas a -20°C foi utilizada para pesquisa do VHB DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR),

enquanto a outra alíquota, também estocada a -20°C, foi utilizada apenas na realização de testes confirmatórios, quando necessários.

As amostras foram obtidas após a adesão de cada um dos pacientes, através do consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

A análise estatística deste trabalho foi feita pelo programa Mini-Tab v 13.0 INC USA.

Avaliação Sorológica

Os ensaios sorológicos foram realizados com testes imunoenzimáticos pela técnica ELISA (do inglês, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Os marcadores sorológicos AgHBs e anti-HBc total foram pesquisados em todos os soros dos pacientes. Naqueles que apresentavam AgHBs positivo, foi pesquisado AgHBe, e, nas amostras negativas para este marcador, foi pesquisado o anti-HBe. Se o AgHBs não fosse detectado, se pesquisava o anticorpo correspondente, o anti-HBs.

Avaliação Molecular

Na primeira e última amostra de todos os pacientes foi pesquisada a presença do VHB DNA através da técnica de PCR utilizando “primers” correspondentes à região do gene C.

Caso esta reação fosse positiva, realizava-se a amplificação e seqüenciamento de regiões do gene S para genotipagem do VHB e do pré-

core para pesquisa das mutações (A1762T, G1764A, G1896A e G1899A) relacionadas à negatividade do AgHBe.

PCR para as regiões Core (C), S, Pré-core e C (preC/C)

Os “primers” utilizados nas reações de amplificação para a região C foram 1763 e 2032R (externos), e 1778-E e 2017R-B (internos) (Kaneko *et al.*, 1998).

Para a região S, utilizaram-se os “primers” externos HBS1F e HBS1R, e os “primers” internos HBS2F e HBS2R (Sitnik *et al.*, 2004).

Para a região Pré-core/C, os “primers” externos utilizados foram 2017R-B e EP2.1 e os internos foram 2032R e EP1.1 (Kaneko *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1995).

Os “primers” foram diluídos à concentração de 20 pMoles/μL. Todos os “primers” foram sintetizados pela empresa INVITROGEN™ Life Technologies. A seguir, descrevem-se as seqüências de bases nitrogenadas dos “primers” utilizados.

1763: 5` - GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA CCC GTA TAA - 3`

2032R: 5` - CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT - 3`

1778-E: 5` - GAC GAA TTC CAT TGA CCC GTA TAA AGA ATT - 3`

2017R-B: 5` - ATG GGA TCC CTG GAT GCT GGG TCT TCC AAA - 3`

HBS1 F: 5` - GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTC - 3`

HBS1 R: 5` - AAA TKG CAC TAG TAA ACT GAG CCA - 3`

HBS2 F: 5` - CGT GGT GGA CTT CTC TCA ATT TTC - 3`

HBS2 R: 5' - GCC ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC – 3'

EP1.1: 5' - TCA TGG AGA CCA CCG TGA AG - 3'

EP2.1: 5' - CAT AAG AGG ACT CTT GGA CT - 3'

Extração do DNA do VHB

A 300µL de solução de isotiocianato de guanidina e fenol (GT), foram adicionados 100µL de soro, a amostra foi agitada e 50µL de clorofórmio gelado foram adicionados. O tubo foi agitado e centrifugado a 12.300 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 300µL de isopropanol absoluto gelado, foi agitado fortemente por 1 minuto, e centrifugado a 12.300 x g por 15 minutos a 4 °C, todo o sobrenadante foi retirado e 300µL de etanol absoluto gelado foram adicionados. O tubo foi centrifugado a 12.300 x g por 10 minutos a 4 °C, o precipitado foi seco com bomba de vácuo e posteriormente ressuspendido em 50µL de água MilliQ e guardado por 24 horas em geladeira para completa solubilização (Chomczynski e Sacchi, 1987).

Metodologia da PCR

Primeira PCR

A cada microtubo, contendo 10µL de DNA viral extraído, foram adicionados 90µL da mistura da PCR. A mistura da PCR é constituída por 67,5µL de água Milli Q, 10µL de Tampão 10X (INVITROGEN™ Life

Technologies), 6µL de dNTPs (INVITROGEN™ Life Technologies), 4µL de cloreto de magnésio 25mM (INVITROGEN™ Life Technologies), 10µL de cada um dos “primers” [1763 e 2032R (C) ou HBS1F e HBS1R (S) ou 2032R e EP1.1 (Pré-core/C)], 0,5µL de Taq DNA polimerase (INVITROGEN™ Life Technologies). Após a adição da mistura da PCR, as amostras foram colocadas em termociclador.

Segunda PCR (“Nested”)

A 90µL da mistura da segunda PCR [constituída por: 67,5µL de água Milli Q, 10µL de Tampão 10X (INVITROGEN™ Life Technologies), 6µL de dNTPs, 4µL de cloreto de magnésio 25mM (INVITROGEN™ Life Technologies), 10µL de cada um dos “primers” [1778-E e 2017R-B (C) HBS2F e HBS2R (S) ou 2017R-B e EP2. 1 (Pré-core e C)] e 0,5µL de Taq DNA polimerase (INVITROGEN™ Life Technologies), foram adicionados 10µL do produto da primeira PCR. Os microtubos foram então levados ao termociclador. Os programas específicos utilizados para as reações estão descritos a seguir (Quadros 1 a 3).

Quadro 1: Programa para amplificação da região C do VHB

REGIÃO C, 1^a e 2^a PCR		
Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94 °C	60 segundos
30	94 °C	60 segundos
	45 °C	60 segundos
	72 °C	90 segundos
1	72 °C	7 minutos

Quadro 2: Programa para amplificação da região S do VHB

REGIÃO S, 1^a e 2^a PCR		
Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94 °C	30 segundos
30	94 °C	20 segundos
	56 °C	20 segundos
	72 °C	30 segundos
1	72 °C	7 minutos

Quadro 3: Programa para amplificação da região Pré-core/C do VHB

REGIÃO PRÉ-CORE/C, 1^a e 2^a PCR		
Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94 °C	60 segundos
35	94 °C	60 segundos
	45 °C	60 segundos
	72 °C	90 segundos
1	72 °C	7 minutos

Identificação e Quantificação do Produto Amplificado

Após a amplificação, a identificação e a quantificação do produto obtido pela PCR foram realizadas por eletroforese em gel de agarose. Para isto, foram aplicados 4µL do produto final da PCR misturado com 1µL de Blue Dextran (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) em gel de agarose 2% preparado em tampão tris-borato EDTA (TBE 0,5 X) com 0,005% de brometo de etídio. Foram também aplicados no gel o controle positivo e os controles negativos, além de um padrão para quantificação Low Mass ladder (INVITROGEN™ Life Technologies). As bandas foram observadas em transiluminador com luz ultravioleta e o gel foi fotografado em sistema tipo “Gel Doc”. (Programa Lab Works, Sistema de Captura de Imagens –Image Acquisition and Analysis Software, UVP, IMC. CA, USA).

Seqüenciamento

Foi utilizada a técnica de seqüenciamento por PCR, derivada da metodologia de Sanger *et al.*, (1977), utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o “Kit” ABI Prism® BigDye™ Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A 2µL do DNA purificado e quantificado (3 -10 ng, conforme o tamanho do fragmento), foram adicionados 3µL de “primers”, a uma concentração de 1,6pmol/µL, HBS2F ou HBS2R (S) ou 2017R-B ou EP2.1 (Pré-Core/C), 2µL da mistura de reação do “Kit” de seqüenciamento que contém ddNTPs marcados e as enzimas AmpliTaq DNA Polimerase FS e

rTth pirofosfatase, 6µL de tampão Tris-HCl (pH 9,0) e MgCl₂ 5 X e 7,0µL de água Milli Q, para um volume final de 20µL. Em seguida, as amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura, em termociclador, com programa específico para a síntese da fita complementar e incorporação dos ddNTPs marcados (Quadro 4).

Quadro 4: Programa para reação de seqüenciamento

Ciclos	Temperatura	Tempo
25	96 °C	30 segundos
	50 °C	15 segundos
	60 °C	4 minutos

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas com isopropanol para a retirada dos ddNTPs marcados não incorporados.

Aos 20µL de reação de seqüenciamento, foram adicionados 80µL de isopropanol 75%, preparado no momento do uso, e a totalidade da mistura foi transferida para um microtubo de 1,5 ml. Os microtubos foram submetidos a forte agitação por 10 segundos, e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 16.060xg à temperatura ambiente. Em seguida, foi removido o isopropanol e adicionado ao precipitado 1ml de etanol 70%, preparado no momento do uso. As amostras foram novamente centrifugadas por 20 minutos a 16.060 x g à temperatura ambiente. Após a centrifugação,

o etanol foi retirado e o precipitado foi centrifugado por 10 minutos a 16.060 x g, e as amostras foram incubadas a 90°C por 3 minutos para a evaporação dos resíduos de etanol.

Às amostras, foram adicionados 5µL de tampão de amostra [5 partes de formamida (Amresco) e 1 parte de “blue dextran” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)], homogeneizadas várias vezes, submetidas a forte agitação por 10 segundos, centrifugadas a 16.060xg por 15 segundos e incubadas a 95°C por 5 minutos para desnaturação. Imediatamente após a incubação, as amostras foram colocadas no gelo até a aplicação de 1,5µL no gel de poliacrilamida.

O gel de seqüenciamento consistia de um gel de poliacrilamida 5% (Long Ranger™ Gel Solution, FMC) com uréia 6M em tampão TBE 1 X em placas de 36 cm com 0,5 mm de espessura. O tampão TBE 1X foi utilizado na eletroforese, realizado no Seqüenciador Automático ABI Prism® 377 (Applied Biosystems Foster City, CA, EUA).

Análise das Seqüências

Para análise das seqüências foram utilizados os programas EditSeq e Megalign do pacote DNASTar (Lasergene Inc., Madison, WI, EUA). A classificação dos genótipos foi realizada através da comparação das seqüências obtidas com seqüências já conhecidas dos diferentes genótipos de VHB (A, B, C, D, E, F, G e H) obtidas do “Genbank”.

A presença da mutação na posição A1762T e na posição G1764A caracteriza mutação da região do BCP (Takahashi *et al.*, 1995).

As mutações G1896A e G1899A caracterizam mutação na região pré-core (Akahane *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1990).

RESULTADOS

Marcadores Sorológicos

O marcador AgHBs foi mais freqüente no centro A do que no centro B, conforme demonstrado na tabela 4. A freqüência deste marcador praticamente não se alterou quando se compararam os resultados obtidos na primeira e última amostra de cada paciente.

Tabela 4- Freqüência do marcador **AgHBs** em cada um dos centros estudados

Amostra	Centro	Reagente	Não-Reagente	Total	p
Primeira	A	29 (22,2%)	102 (77,8%)	131	0,001
	B	6 (4,2%)	139 (95,8%)	145	
	Total	35(12,6%)	241 (87,3%)	276	
Última	A	16 (14,5%)	94 (85,5%)	110	0,012
	B	5 (4,5%)	105 (95,5%)	110	
	Total	21 (9,5%)	199 (90,5%)	220	

Em relação ao marcador anti-HBc total, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois centros, apesar de ser mais freqüente no centro A. Levando-se em consideração esse marcador, a

prevalência da infecção pelo VHB encontrada variou entre 27,9%, na primeira amostra colhida, para 32,2%, na última amostra (Tabela 5).

Tabela 5- Frequência do marcador **Anti-HBc total** em cada um dos centros estudados

Amostra	Centro	Reagente	Não-Reagente	Total	p
Primeira	A	43 (32,9%)	88 (67,1%)	131	0,083
	B	34 (23,4%)	111 (76,6%)	145	
	Total	77 (27,9%)	199 (72,1%)	276	
Última	A	39 (35,5%)	71 (64,5%)	110	0,313
	B	32 (29,1%)	78 (70,9%)	110	
	Total	71 (32,2%)	149 (67,7%)	220	

A distribuição do marcador anti-HBs nos dois centros estudados está mostrada na Tabela 6. Como se pode observar, este marcador também foi mais freqüente no centro A, mas sem significância estatística. A freqüência deste marcador aumentou nos dois centros entre a primeira e a última amostra.

A presença do Anti-HBs isolado resultante de resposta vacinal foi encontrada em 23 (41%) dos 56 pacientes vacinados do centro A e em 27 (51,9%) dos 52 pacientes vacinados do centro B.

Tabela 6- Frequência do marcador **Anti-HBs** em cada um dos centros estudados

Amostra	Centro	Reagente	Não-Reagente	Total	P
Primeira	A	31 (30,4%)	71 (69,6%)	102	0,198
	B	32 (23,0%)	107 (77,0%)	139	
	Total	63 (26,1%)	178 (73,9%)	241	
Última	A	39 (41,5%)	55 (58,5%)	94	0,953
	B	44 (42,0%)	61 (58,0%)	105	
	Total	83 (41,7%)	116 (58,2%)	199	

Para calcularmos a incidência da infecção pelo VHB na população estudada, consideramos apenas os pacientes para os quais foram colhidos 12 amostras mensais no período de um ano e que eram inicialmente negativos para qualquer marcador na primeira amostra, totalizando 54 pacientes. Sendo assim, 13 (24%) pacientes apresentaram uma soroconversão somente para o marcador anti-HBs isolado, tal resultado indica uma resposta vacinal. Portanto, não houve incidência na população estudada.

Marcadores Moleculares

A detecção do VHB DNA foi mais freqüente entre os pacientes do centro A do que no centro B, considerando-se a análise da primeira e última amostra de cada paciente (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultado do **PCR Core** em cada um dos centros estudados

Amostra	Centro	Reagente	Não-Reagente	Total	P
Primeira	A	15 (11,5%)	116 (88,5%)	131	<0,001
	B	1 (0,7%)	144 (99,3%)	145	
	Total	16 (5,8%)	260 (94,2%)	276	
Última	A	10 (9,3%)	98 (90,7%)	108	0,016
	B	2 (1,8%)	108 (98,2%)	110	
	Total	12 (5,5%)	206 (94,5%)	218	

Das 28 amostras com resultados positivos para o gene core, 22 apresentaram resultado positivo para o gene S; 20 pertencentes ao centro A e 2 ao centro B.

A distribuição dos genótipos virais encontrados nos dois centros está mostrada na Tabela 8. Como se pode observar, o genótipo D foi encontrado nos dois centros: nos dois casos do centro B e em 19 (95%) dos 20 casos do centro A.

Tabela 8- Genótipos do VHB encontrados nos dois centros de diálise

Centro	Genótipo A	Genótipo D	Total
A	1 (5%)	19 (95%)	20
B	0	2 (100%)	2
Total	1 (4,5%)	21 (95,4%)	22

A região pré-core foi amplificada em 14 das 22 amostras que tiveram o genótipo do VHB caracterizado, sendo que todas pertenciam ao genótipo D. Dentre essas 14 amostras, oito apresentaram a mutação G1899A na região pré-core e seis a mutação G1764A na região do BCP. Destas, 10 (71,4%) possuíam o marcador AgHBe positivo, sendo cinco delas com a mutação G1899A e cinco com G1764A.

DISCUSSÃO

Desde sua introdução em 1960, a hemodiálise propiciou a melhoria do prognóstico e da qualidade de vida para os pacientes que sofriam de doença renal terminal. Entretanto, pacientes submetidos a esse tratamento são reconhecidos como pacientes que tem baixa resposta imune, aumentando assim o risco de contraírem infecções virais, bem como outras doenças.

A hepatite B tem sido uma infecção comum em centros de hemodiálise, afetando não só os pacientes submetidos ao tratamento, mas também os profissionais envolvidos nesse sistema.

Os pacientes hemodialisados estão mais susceptíveis a adquirir a infecção pelo VHB pelo fato de estarem expostos ao procedimento de diálise. Além disso, esses pacientes possuem um grande risco de se tornarem portadores crônicos, após adquirirem a infecção pelo VHB.

Em muitos países, a transmissão da hepatite B tem sido controlada nos centros de hemodiálise pela adoção de práticas de controle e prevenção, assim como a utilização da vacinação em pacientes susceptíveis. No Brasil estudos demonstram uma realidade diferente dentro dos centros de hemodiálise, onde é possível observar em algumas cidades como São Paulo e Rio de Janeiro altos níveis de infecção pelo VHB (Teles *et al.*, 1998).

No presente estudo, analisamos a prevalência e incidência da infecção pelo VHB em duas unidades de diálise na região metropolitana da

cidade de São Paulo. A prevalência da infecção foi avaliada pela presença do marcador anti-HBc total, que caracteriza um contato prévio com vírus e permanece detectável por toda a vida nos indivíduos infectados, permitindo determinar quais pacientes entraram em contato ou não com o VHB. A prevalência encontrada variou entre 27,9% e 33,2%, o que indica uma alta frequência da infecção viral nestes indivíduos.

No Brasil, a prevalência da infecção pelo VHB nos centros de hemodiálise varia entre 7,5 e 28,0% (Carrilho *et al.*, 1998). Em diferentes regiões brasileiras, vários grupos analisaram os dados de prevalência utilizando-se de todos os marcadores de infecção pelo VHB, ou somente o AgHBs e ou o anti-HBc total. Cendoroglo *et al.* (1995), encontrou prevalência de 15,1% analisando o marcador AgHBs em hemodialisados da cidade de São Paulo, já Busek *et al.* (2002), em Belo Horizonte, mostrou prevalência variando entre 4,3 e 5,9%.

Teles *et al.* (1998), analisando todos os marcadores em pacientes da região central do Brasil encontrou prevalência de 56,7%, enquanto Souza *et al.* (2003) encontrou 45% no Estado do Tocantins.

Carrilho *et al.* (2004), em Santa Catarina encontrou prevalência de 32,2% da infecção pelo vírus B analisando o marcador anti-HBc total.

A variação dos dados de prevalência entre os autores citados, bem como em nosso estudo, pode estar relacionada a fatores como o fato das regiões analisadas serem diferentes, o que está diretamente associado à prevalência local do VHB; a pesquisa de um ou mais marcadores sorológicos, o que pode aumentar o dado de prevalência; o perfil de cada

centro estudado, em especial como cada centro de diálise se comporta em relação aos pacientes, aos funcionários e aos métodos de biossegurança.

Possíveis causas para a disseminação do VHB entre os hemodialisados têm sido descritas, entre elas a falha na identificação e isolamento dos pacientes infectados pelo vírus, compartilhar o mesmo equipamento; atendimento dos pacientes pela mesma equipe; bem como a não administração da vacina contra a hepatite B entre os pacientes susceptíveis (CDC, 2001; Jungers *et al.*, 1982).

Para avaliar a incidência da infecção pelo VHB nos dois centros estudados, foram analisados somente pacientes acompanhados durante todo o tempo do estudo (doze meses), com 12 amostras coletadas, e que estavam negativos para qualquer marcador na primeira amostra, totalizando 54 pacientes. Mas o que foi observado é que desses, 13 (24%) pacientes apresentaram uma soroconversão somente para o marcador anti-HBs isolado, o que indica uma resposta vacinal. Portanto, não houve incidência da infecção pelo VHB nos pacientes estudados durante o período estudado (12 meses).

Este resultado sugere que a não ocorrência de casos novos no período do estudo (12 meses), provavelmente seja devido ao controle da infecção pelas práticas de controle e prevenção, como a vacinação e as medidas de biossegurança adotadas pelos centros.

A avaliação do diagnóstico molecular melhora o entendimento das manifestações clínicas e da história natural da hepatite B entre os pacientes hemodialisados (Fabrizi *et al.*, 2001). A PCR é um método que amplifica o

genoma viral de forma altamente específica e sensível (Kocabas *et al.*, 2002).

Apesar ser uma técnica extremamente sensível, a pesquisa do VHB-DNA nos pacientes hemodialisados estudados no presente trabalho foi positiva em um menor número de casos do que a pesquisa do antígeno de superfície do VHB, o que pode estar relacionado com a estratégia do VHB escapar do sistema imunológico liberando na circulação partículas ocas, constituídas apenas pelo envelope viral.

Resultados semelhantes foram descritos por Fabrizi *et al.* (2001), que analisando um grupo de pacientes hemodialisados portadores de hepatite B crônica observaram em vários casos a presença do AgHBs sem VHB-DNA detectável no soro.

Em nosso estudo, não foram encontrados pacientes com o DNA viral detectado, mas soronegativos para AgHBs. Resultados diferentes foram descritos por outros autores. Por exemplo, analisando pacientes hemodialisados sem clínica ou doença no fígado e sem o marcador AgHBs da hepatite B, Oesterreicher, (1995), encontrou o VHB-DNA através da técnica de PCR. Os autores concluíram que a infecção nesses pacientes foi identificada apenas pela técnica de PCR. Já Cabrerizo (1996), estudando tanto os pacientes hemodialisados, como os profissionais de saúde que eram negativos para o marcador AgHBs, encontrou uma alta frequência de 58% do VHB-DNA.

Portanto, os resultados da frequência da presença da infecção oculta pelo VHB (pacientes com AgHBs negativos, mas com DNA viral detectável)

entre pacientes hemodialisados são extremamente variáveis e devem ser interpretados com cautela.

A detecção do VHB-DNA por PCR é uma técnica extremamente sensível, e, por isso mesmo, uma técnica que pode originar resultados falsos positivos muito facilmente devido à contaminação cruzada entre amostras. Além disso, variações geográficas na frequência da infecção oculta pelo VHB e diferenças na especificidade e sensibilidade das metodologias aplicadas devem explicar os resultados obtidos.

Em um outro estudo prévio realizado com a mesma metodologia; mas estudando pacientes com hepatites crônicas não A-E e C, não encontramos nenhum caso com VHB-DNA detectado (Souza *et al.*, 2004). Com a aplicação da PCR em tempo real, será possível o desenvolvimento de metodologias mais sensíveis e menos propensas a contaminação que auxilia na identificação de casos de hepatite B oculta.

Os genótipos do VHB e, em menor extensão, os subtipos, têm uma distribuição geográfica característica (Couroucé-Pauty *et al.*, 1983; Norder *et al.*, 1993; Arauz-Ruiz *et al.*, 1997), auxiliando no entendimento da epidemiologia do VHB.

Em relação à distribuição dos genótipos do VHB na população estudada nossos resultados indicaram uma maior frequência (95,4%) do genótipo D. No centro A, foram identificados 19 casos infectados com o genótipo D e apenas 1 com o genótipo A, já no centro B, no qual a prevalência do AgHBs era menor, foram encontrados 2 casos infectados com o genótipo D.

Poucos dados foram publicados a respeito da pesquisa de genótipos da hepatite B em unidades de diálise no Brasil.

Teles *et al.* (1999), estudando 282 pacientes hemodialisados em Goiânia, encontrou uma frequência maior dos genótipos A e D (50,0% e 46,2%, respectivamente), enquanto que o genótipo F foi encontrado em 3,8% nesta população. Resultados semelhantes foram descritos pelo mesmo grupo analisando 30 casos de infecção pelo VHB em unidades de diálise da região Central do Brasil, nas quais encontram maior frequência do genótipo D (66,7%), seguido pelos genótipos A (30%) e F (3,3%) (Teles *et al.*, 2002).

Carrilho *et al.* (2004), encontraram as seguintes frequências em pacientes hemodialisados do estado de Santa Catarina: genótipos A (30,6%), D (57,1%) e F(12,2%).

Sitnik *et al.* (2004) analisando a distribuição dos genótipos do VHB em diversas regiões do Brasil encontraram os genótipos A (49,5%); B (2,9%); C(13,6%); D(24,3%) e F(9,7%) circulando em nossa população. Sendo que na cidade de São Paulo o genótipo A foi o mais frequente (41,7%), seguido pelos genótipos C (29,9%); D (18,8%); F (5,5%) e B (3,1%).

A distribuição dos genótipos do VHB dentro das unidades de hemodiálise analisadas foi bem diferente daquela descrita na população em geral do Estado de São Paulo. O fato de encontrarmos maior frequência de infecção pelo genótipo D sugere que a contaminação ocorreu dentro das unidades de diálise.

Vírus com a mutação G1896A na região pré-core são encontrados mais frequentemente em pacientes infectados com o genótipo D e com uma

freqüência muito baixa no genótipo A e no genótipo F (Zhang *et al.*, 1996). Esta mutação origina um códon de terminação, abortando a síntese do AgHBe (Akahane *et al.*, 1990).

Outra mutação associada à negatividade do AgHBe em que também há uma substituição de G por A foi descrita na posição 1899, podendo ocorrer isoladamente, em associação com a G1896A ou com outras mutações (Kramvis *et al.*, 1997). A associação das mutações G1899A e G1896A ainda é desconhecida, não se sabe porque em alguns casos que apresentam a mutação G1899A isoladamente não se observa a presença do AgHBe, já que esta mutação não leva a um stop códon abortando a síntese do AgHBe (Lok *et al.*, 1994).

O padrão de AgHBs, anti-HBe e DNA viral positivos também pode estar relacionado a mutações nas posições A1762T e G1764A, que afetam o promotor basal do core (BCP) (Sitnik *et al.*, 2004). Entretanto, essas mutações foram encontradas isoladamente em alguns pacientes crônicos que apresentavam a presença do AgHBe, tal resultado ainda requer mais estudos (Chan *et al.*, 1999).

Em nossos pacientes, foram encontradas as mutações G1899A e G1764A, porém todos apresentaram positividade para o AgHBe. Tal resultado sugere que as mutações observadas não alteraram a produção da proteína HBe.

O fato dos pacientes apresentarem um perfil de infecção na primeira amostra estudada representa um indício de ter ocorrido a infecção pelo vírus B no centro de diálise em um período anterior a este estudo, o que também

é sugerido pelos resultados de genotipagem e o perfil de mutações observados na população estudada.

Os resultados que não indicam casos novos nas unidades de diálise estudadas sugerem boas práticas adotadas, como os cuidados com a biossegurança e a utilização da vacinação.

A infecção observada no período anterior ao do estudo, sugere uma contaminação dentro do centro de diálise demonstrando que essas unidades representam um ambiente que propicia a transmissão viral. Portanto, sugerimos que medidas rigorosas sejam adotadas como: triagem dos pacientes antes de entrarem nas unidades de diálise, realizando a avaliação sorológica e, se necessária a vacinação; cuidados com o equipamento utilizado e com o material reaproveitado efetuando uma rigorosa desinfecção dos mesmos.

CONCLUSÕES

A prevalência da infecção pelo VHB encontrada na população estudada foi alta, durante o período estudado (doze meses) a incidência foi zero.

O genótipo circulante predominante foi o genótipo D, sendo apenas um caso de genótipo A encontrado. Portanto, a elevada frequência do genótipo D encontrada na população indica a presença de contaminação dentro dos serviços de diálise, o que é reforçado pela similaridade do padrão das mutações encontradas nas regiões pré-core.

REFERÊNCIAS

Aach RD Viral hepatitis. In: Feigin RD, Cherry, J.D. (ed). *Textbook of pediatric infections diseases*. Philadelphia, W.B. Saunders Co., V.1, pp 513-532, 1981.

Akahane Y, Yamanaka T, Suzuki H, Sugai Y, Tsuda F, Yotsumoto S, Omi S, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. 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*. 1990; 99:1113-9.

Almeida JD, Rubenstein D. et al. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet*. 1971; 1225-7.

Alter MJ, Favero MS, Moyer LA, Bland LA. National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States, 1989. *Asaio Trans*, 1991; 37(2): 97-109.

Appelbaum E, Kalkstein M. Artificial transmission of viral hepatitis among intravenous diacetylmorphine addicts. *JAMA*. 1951; 147:222-4.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson, BH, Magnus LO. Genotype H: A new amerindian genotype of hepatitis b virus revealed in central America. *Journal of General Virology*. 2002; 83:2059-73.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Visoná KA, Magnius, LO. Genotype F prevails in HBV infect patients of hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. *Journal of Medical Virology*. 1997; 51: 305-12.

Ayli MD, Ensari C, Ayli M, Mandiroglu F, Mut S. Effect of oral levamisole supplementation to hepatitis B vaccination on the rate of immune response in chronic hemodialysis patients. *Nephron*. 2000; 84:291-2.

Beenson PB. Jaudice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma. Report of seven cases. *JAMA*. 1943,121: 1332-4.

Bertolini DA, Moreira RC, Soares MCP, Bensabath G, Lemos MF, Mello IMVGC, Pinho JRR. Genotyping of hepatitis B in virus in indigenous populations from Amazon region, Brasil (abstract). *Virus: Reviews and Research* 2000, 05(2) (Suppl 1):101 (Presented at 11th National meeting of Virology and 3rd Mercosul Meeting of Virology. 2000; November 25-9; São Lorenzo, MG, Brasil.

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "new"antigen in leukemia sera. *JAMA*. 1965; 191: 541-6.

Blumberg BS, Sutnick, AI, London WT. Australian antigen and hepatitis. *JAMA*.1969; 207:1895-6.

Brunetto MR, Stemler M, Bonino F. et al. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology*. 1990;10: 258-61.

Busek SU, Babá EH, Filho HAT, Pimenta L, Salomão A, Correa-Oliveira R, Oliveira GC. Hepatitis C and hepatitis B infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2002; 97(6): 775-78.

Cabrerizo M, Bartolomé J, De Sequera P, Caramelo C, Carreño V. Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients and staff . *Journal of the American Society of Nephrology* 1996, 1443-7.

Carletti P, Bibiano L, Boggi R, Bordoni E, Ricciatti AM, Della Bella S, Pauri P, Salvoni G, Mioli VA. HBV Infection in hemodialysis patients: monitoring and prevention. *Nephron*. 1992; 61: 269-70.

Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*. 1989; 2:588-91.

Carrilho FJ, Corrêa MCJM. Magnitude of hepatitis B and C in Latin America. In: Schinazi RF, Sommadossi J-P, Thomas HC. Therapies for Viral Hepatitis. International Medical Press, 1998. p. 25-34.

Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JRR, Mello IMVGC, Bertolini, DA et al. Hepatitis B virus infection in hemodialysis centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health*. 2004; 4:13.

Cendoroglo-Neto M, Manzano RSI, Caziani ME, Silva AEB, Cirenza MLF, Sesso RC, Ajzen H, Draibe SA. Environmental transmission of hepatitis B and hepatitis C viruses within the hemodialysis unit. *Art. Organs*. 1995;19:251-5.

Center for disease control and prevention. Recommendations for Preventing Transmission of Infections Among Chronic Hemodialysis Patients. *MMWR* 2001, 50 (RR-5), 1-36.

Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis Branch Slides Set [online] last rev. 1995. Disponível em: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset>.

Chan HLY, Hussain M, Lok ASF. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology* 1999, 29(3): 976-84.

Cheng C-H, Huang C-C, Leu M-L, Chiang C-Y F, Wu M-S, Lai P-C. Hepatitis B vaccine in hemodialysis patients with hepatitis C viral infection. *Vaccine*. 1997;15: 1353-7.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol- chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162(1): 156-9.

Chu C-J, Lok ASF. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes (editorial). *Hepatology.* 2002; 35 (5): 1274-6.

Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo. Avaliação dos Serviços de Nefrologia no Estado de São Paulo, 1998.

Couroucé-Pauty AM, Plançon A, Soulier JP. Distribution of HbsAg subtypes in the world. *Vox Sang.* 1983; 44:197-211.

Da Silva LC, Granato CFH. Importância clínica dos marcadores virais. In: Da Silva LC. *Hepatites agudas e crônicas*. 2ª edição. São Paulo: Savier, 1995.

Da Silva LC. Conceito, tipos de hepatites por vírus e evolução dos conhecimentos. In: Da Silva LC. *Hepatites agudas e crônicas*. 2ª edição. São Paulo: Savier, 1995.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1970; 1:695-8.

Decker RH. Diagnosis of acute and chronic hepatitis B. In: Zuckerman AJ, Thomas HC, editors. *Viral hepatitis: Scientific bases and clinical management*. 2nd edi. London: Churchill Livingstone. 1998; 201-15.

Evans AA, London WT. Epidemiology of hepatitis B. In: Zuckerman A. *Viral hepatitis: Scientific basis and clinical management*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone. 1998; 107-14.

Fabrizi F, Lunghi G, Finazzi S et al. Dynamics of HBV viral load in patients on maintenance dialysis: a prospective study. Abstracts EDTA-ERA. 2001; Vienna June 24-27.

Ferreira MS. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33(4): 389-400.

Froio N, Nicastrì E, Comandini UV, Cherubini C, Felicioni R, Solmone M, Di Giulio S, Petrosillo N. Contamination by hepatitis B and C viruses in the dialysis setting. *Am J of Kidney Dis*. 2003; (42):3, 546-50.

Giret MTM. Descrição dos genótipos do vírus da hepatite B em grupos selecionados de indivíduos de Assunção-Paraguai e São Paulo-Brasil [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, 2003.

Girndt M, Kohler H. Hepatitis B virus infection in hemodialysis patients. *Seminars in Nephrology*. 2002; 22(4): 340-50.

Grethe S, Heckel JO, Rietschel W, Hufert FT. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol*. 2000; 74:5377-81.

Havens WPJR. Infections hepatitis. *Medicine*. 1948; 27: 279-326.

Hollinger BF. *Hepatitis B Virus* In: Fields Virology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996; 86(2), 2739.

Jungers P, Delagneau JF, Prunet P, Crosnier J. Vaccination against hepatitis B in hemodialysis centre. *Advances in Nephrology*. 1982; 303-27.

Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol*. 1998; 27:1930-3.

Kellerman S, Alter MJ. Preventing hepatitis B and hepatitis C Virus infections in end-stage renal disease patients: back to basics. *Hepatology*. 1999; 29: 291-3.

Kiffer CRV, Viana GB, Cheinquer H. *Epidemiologia*. In: Focaccia R. Tratado de Hepatites Virais. Ed. Atheneu. São Paulo p.127, 2003.

Kocabas E, Seyrek N, Paydas S, Köksal, F et al. Detection of hepatitis B and C infection by polymerase chain reaction among hemodialysis patients. *Nephron*. 2002; 91:178-80.

Kramvis A, Bukofzer S, Kew MC, Song E. Nucleic acid sequence analysis of the precore region of the hepatitis B virus from sera of southern African black adult carriers of the virus. *Hepatology*. 1997; 25:235-40.

Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infections hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA*. 1967; 200:365-73.

Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB 3rd, Rico-Hesse, R.. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 5757-61.

Lee WM. Hepatitis B virus infection. *NEJM*. 1997; 337:1733-45.

Li JS, Tong S, Vitvitski L, Zoulim F, Treppe C. Rapid detection and further characterization of infection with hepatitis B virus variants containing a stop codon in the distal pre-c region. *J Gen Virol*. 1990; 71: 1993-8.

Liang TJ, Hasegawa K, Rimmon N et al. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med*. 1991; 324:1705-9.

Lindh M, Anderson A-S, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis*. 1997; 175: 1285-93.

Locarnini SA. Clinical relevance of viral dynamics and genotypes in Hepatitis B virus. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2002; 17: S322-8.

Lok ASF, Akarca U, Greene S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl. Acad Sci USA*. 1994, 91:4077-81.

Ly D, Yee HFJr, Brezina M, Martin P, Gitnick G, Saab S. Hepatitis B surface antigenemia in chronic hemodialysis patients: effect of hepatitis B immunization. *The American Journal of Gastroenterology*. 2002; (97): 1, 138-141.

MacCallum FO, Bauer DJ. Homologous serum jaundice. Transmission experiments with human volunteers. *Lancet*. 1944;1:622-7.

MacDonald DM, Holmes EC, Lewis JC, Simmonds P. Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. *J Virol*. 2000; 74: 4253-7.

Magnius LO, Esparmak JA. Specificities in Australia antigen positive sera distinct from the LeBowvier deter-minnants. *J Immunol*. 1972; 109: 1017-21.

Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol*. 1999; 12(2): 351-66.

Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. *Semin Liver Dis*. 1991; 11(2): 84-92.

Marion PL and Robinson. Hepadna Viruses: Hepatitis B and related viruses. *Current topics in microbiology and immunology*. 1983; 105:99-121.

Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC et al. A virus in beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 2941-5.

Marmion BP, Tonkin RW. Control of hepatitis in dialysis units. *Br Med Bull*. 1972; 28(2): 169-79.

Mendes TF Um século de vírus B. *Moderna Hepatologia*. 1984 9: 16.

Mimms LT, Solomon LR, Ebert JW, Fields H. Unique preS sequence in a gibbon-derived hepatitis B virus variant. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 195:186-91.

Ministério da Saúde. Portaria n° 82, de 3 de Janeiro de 2000. Diário Oficial da União, 27, Seção I 1415-1537, 8 de fevereiro de 2000.

Ministério da Saúde. Portaria nº 2042, de 11 de outubro de 1996. Diário Oficial da União, 199, seção I 20792-8, 14 de outubro de 1996.

Moraes CR. Estudo soropidemiológico caso-controle da infecção do vírus da hepatite C em pacientes e funcionários das unidades de diálises do Estado de Santa Catarina. [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1998.

Moraes MT, Gomes S A, Niel C. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brazil. *Arch Virol*. 1996; 141:1767-73.

Moreira RC. A infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes submetidos a tratamento por hemodiálise: análise dos parâmetros sorológicos e virológicos. [tese]. São Paulo. Universidade de São Paulo;2000.

Mosconi G, Campieri C, Miniero R, Coli L, Orsi C, La Manna G, De Sanctis LB, Stefoni S, Sprovieri G, Bonomini V. Epidemiology of hepatitis C in a population of hemodialysis patients. *Nephron*. 1992; 61: 298- 9.

Murray K. A molecular biologist's view of viral hepatitis (The Leuwenhook Lectura, 1985). *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1987; 230(1259):107-46.

Murray R, Diefenbach WCL, Ratner F et al. Confirmation of carrier state by transmission experiments in volunteers. *JAMA*. 1954; 154: 1072-4.

Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(1):362-4.

Neef JR, Gellis SS, Stokes JJ. Homologous serum hepatitis and infections (epidemic) hepatitis. Studies in volunteers bearing on immunological and other characteristics of the etiological agents. *American Journal Medicine*. 1946; 1: 3-22.

Neef JR, Norris RF, Reinhold JG et al. Carriers of hepatitis virus in the blood and viral hepatitis in whole blood recipients. *JAMA*. 1954; 154:1066-71.

Norder H, Hammas B, Lee S-D, Bile K., Couroucé A-M, Mushahawar IK, Magnus LO. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol.* 1993; 74:1341-8.

Norder H, Hammas B, Lodfdhal S, Couroucé AM, Magnus LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis b surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis b virus strains. *J Gen Virol.* 1992; 73:1201-8.

Noronha IL, Schor N, Coelho SN et al. Nephrology, dialysis and transplantation in Brazil. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12: 2234-43.

Oesterreicher c, Hammer J, Koch U et al. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis. *Kidney Int.* 1995, 48:1967-71.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Satrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y et al. Typing hepatitis b virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1988; 69:2575-83.

Okamoto HS, Gotsumoto S, Akahane Y et al. Hepatitis B viruses with pre core region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against antigen. *J Virol.* 1990; 64:1298-303.

Okochi K, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang.* 1968; 15:374-85.

Omata M, Ehata T, Yokosuka O et al. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med.* 1991; 324:1699-704.

Organização Mundial de Saúde/OMS. Hepatitis Viricas. Informe de um grupo científico de la OMS. *Informes técnicos.* 1973; 512:7-33.

Pao CC, Yang W-L, Huang C-C, Hsu J-J, Lin S-S et al. Hepatitis type B virus DNA in patients receiving hemodialysis: correlation with other HBV serological markers. *Nephron* 1987; 46:155-160.

Perkins JA. 2002. www.rit.edu/~japfaa/infectious.html.

Petrosillo N. Prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus among dialysis patients. *Nephron.* 1993; 64:636-9.

Propst T, Propst A, Lhotta K, Vogel W, König P. Reinforced intradermal hepatitis B vaccination in hemodialysis patients is superior in antibody response to intramuscular or subcutaneous vaccination. *Am J Kidney Dis.* 1998; 32: 1041-5.

Raymond S, Koff MD. Hepatitis B today: clinical and diagnostic overview. *The Pediatric infectious disease journal.* 1993; 5:428-32.

Saab S, Weston SR, Ly D, Brezina M, Yee HFJ, Han SHB, Gitnick G. Comparison of the cost and effectiveness of two strategies for maintaining hepatitis B immunity in hemodialysis patients. *Vaccine*. 2002; 20: 3230-5.

Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(12): 5463-7.

Scaglioni, PP; Melegari, M; Wands, JR. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology*. 1997; 233:374-81.

Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, da Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B Virus Genotypes And Precore/Core Mutants In Brazilian Patients. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(6): 2455-60.

Sitnik, R, Pinho JRR, Silva LC, Fonseca LEP, Carrilho FJ, Bernardini, AP. Hepatitis virus genotypes and precore mutants in chronic hepatitis B patients from São Paulo City, Brazil. *Hepatology*. 2000; 32; (4 Pt.2).

Souto FJD. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *GED*. 1999; 18(4): 143-50.

Souza KP, Luz JA, Teles AS, Carneiro MA et al. Hepatitis B and C in the hemodialysis unit of Tocantis, Brazil: serological and molecular profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98(5): 599-603.

Souza LO, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC. Absence of hepatitis B virus DNA in patients with hepatitis C and non-A-E hepatitis in the State of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004; 37(11) 1665-8.

Steigman F, Hyman S, Goldbloom R. Infections hepatitis (homologous serum type) in drug addicts. *Gastroenterology*. 1950;15: 642-6.

Stokes JJ, Berk, JE, Malamut, LL et al. The carrier state in viral hepatitis. *JAMA*. 1954; 54:1059-65.

Stuyver L, Gendet SD, Geyt CV, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis b virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2000; 81:67-74.

Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75: 4533-7.

Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, Yoshizawa H, Mishiro S. The pre core/core promoter mutant (T1762A1764) of Hepatitis B Virus: clinical significance and easy method for detection. *J Gen Virol*. 1995; 76:3159-64.

Teles AS, Martins RM, Gomes AS, Gaspar AM. et al. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: serological and molecular follow-up. *Journal of Medical Virology*. 2002; 68(1): 41-9.

Teles AS, Martins RM, Vanderborght B, Stuyver L, Gaspar AM, Yoshida CF. Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. *Artif Organs*. 1999; 23:1074-8.

Teles S A, Martins RMB, Silva AS et al. Hepatitis B vírus infection prolife in central Brazilian hemodialysis population. *Rev Ins Med Tropical São Paulo*. 1998; 40(5): 281-6.

Testut P, Renard CA, Terradillos O, et al. A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol*. 1996; 70: 4210-9.

Tiollais P, Charnay P, Vyas GN. Biology of hepatitis B virus. *Science*. 1985; 213:406-11.

Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States. *Semin Dial*. 2000; 13(2):75-85.

Triki H, Said N, Salah AB, Arrouji A, Ahmed FB, Bouguerra A, Hmida S et al. Seroepidemiology of hepatitis B, C and delta viruses in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997; 91: 11-4.

Warren KS, Heeney JL., Swan RA, Verschoor EJ. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol.* 1999; 73: 7860-5.

World Health Organization. Hepatitis B. Geneva: WHO; 2002.

Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F 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.* 1996; 48:8-16.

Zuckerman T, Thomas H (eds.). *Viral Hepatitis- Scientific Basis and Clinical Management*, Churchill Living Stone, UK, 1998.

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](#)