

Adriana Cristina da Silva

Estudo da distribuição genotípica e de mutações no genoma do vírus da hepatite B, em pacientes co-infectados pelos vírus da hepatite B e HIV, na Casa da AIDS, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Programa de: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Prof(a). Dr(a): Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa

São Paulo

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Adriana Cristina da

Estudo da distribuição genotípica e de mutações no genoma do vírus da hepatite B, em pacientes co-infectados pelos vírus da hepatite B e HIV, na Casa da AIDS, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo / Adriana Cristina da Silva. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa..

Descritores: 1.Vírus da hepatite B 2.HIV 3.Co-infecção 4.Mutação
5.Genótipos

USP/FM/DBD-405/10

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais José e Lindinalva, sempre atentos, primeiros mestres da minha formação humana, por seu amor, carinho e principalmente pelo incentivo que deram em toda a minha vida.

À minha única irmã, Andréia, pela atenção, auxílio e apoio.

Ao meu marido, Bruno, pelo amor, paciência, compreensão e estímulo.

Ao meu filho, Cezar, minha estrelinha da manhã, motivo e incentivo principal para a realização e conclusão de todos os projetos iniciados.

E a todos os pacientes que contribuíram imensamente neste trabalho e que buscam um refúgio, uma esperança na Ciência.

Agradecimentos

À Prof^a. Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa, mestre e companheira que esteve sempre presente, auxiliando e orientando (incondicionalmente) e da melhor forma possível no decorrer deste estudo.

Às secretárias do Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Roseli e Vânia, que auxiliaram imensamente com as questões burocráticas e tiveram total atenção comigo e com o trabalho ora desenvolvido.

À equipe do Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz, Ângela Maria Miranda Spina, Isabel Takano Oba, Cláudia Patara Saraceni, Adriana Parise Compri, Patrícia Yoshie Nishimura, Regina Célia Moreira, Angela Ramos e Marcilio Figueiredo Lemos que auxiliaram de forma significativa na realização e interpretação dos ensaios moleculares.

Às amigas Mariana Cavalheiro Magri e Cristina Oliveira, pela transmissão de conhecimento, companheirismo, alegria e desabafos nos momentos de aperto.

Aos amigos da AUSTER, exemplos de humanidade e companheirismo, os quais tenho um imenso carinho.

Ào Prof. Dr. Aluísio Segurado, pela atenção e compreensão.

Ao Prof^o. Dr. José Eduardo Levi (Dudi), pela oportunidade de aprendizagem em torno da técnica de seqüenciamento, aplicadas na prática, juntamente com a Adriana Tateno, sendo que tiveram total paciência com minhas dúvidas e aos quais sou muito grata.

A equipe do SEAP HIV-AIDS, Solange, Enfermeira Camila Picone, Enfermeira Ana Paula, Enfermeira Paula, Rogério, Richard, Andréia, grupo de médicos, assistentes sociais e funcionários em geral. Pela solicitude e clima tão agradável para trabalhar. Época de muita saudade.

Ao Prof^o. Dr. João Renato Rebello Pinho, Roberta Sitnik, Michele Gomes Gouvêa e equipe por todo auxílio nas técnicas de genotipagem do vírus da hepatite B, pela disponibilidade, amizade e atenção para com o trabalho.

Aos pacientes, sem os quais este trabalho seria impossível.

A meus verdadeiros amigos, que hoje se alegram com minha conquista.

*“O mundo sempre surpreendeu com novas invenções e descobertas,
mas nada vai surpreender ou tocar os corações tão profundamente
como os filhos.”*

(Desconhecido)

PROJETO FINANCIADO PELA FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA
DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)

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*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O vírus da hepatite B (VHB).....	2
1.2	Epidemiologia	4
1.3	Formas clínicas da infecção pelo vírus da hepatite B	6
1.4	Diagnóstico Laboratorial da infecção pelo vírus da hepatite B	7
1.5	Marcadores sorológicos da infecção pelo vírus da hepatite B.....	7
1.6	Diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite B por métodos de biologia molecular	11
1.7	Genoma do VHB.....	12
1.8	Replicação do vírus da hepatite B.....	14
1.9	Genótipos, subgenótipos e subtipos do vírus da hepatite B.....	15
1.10	Mutações no genoma do vírus da hepatite B.....	18
1.10.1	Mutações da região do pré-core e mutações da região de promotores do core	19
1.10.2	Mutações da região P do genoma do VHB	20
1.11	A infecção pelo vírus da hepatite B em pacientes co-infectados pelo HIV	22
1.12	Justificativa	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Geral	28
2.2	Específicos.....	28

3	MÉTODOS	29
3.1	Casuística	30
3.2	O SEAP – HIV/AIDS – “Casa da AIDS”	30
3.3	Crêterios de Inclusão	31
3.4	Coleta de informa�es em banco de dados eletrônico e análise dos prontuários	31
3.5	Aspectos �ticos.....	32
3.6	Procedimentos de laboratório	33
3.7	Pesquisa dos marcadores sorológicos.....	33
3.8	Técnicas de Biologia Molecular	34
3.8.1	Quantifica�o do DNA do VHB.....	34
3.8.2	Extra�o do DNA do VHB com soluço de isotiocianato de guanidina e fenol (GT)	36
3.8.3	“Primers”	37
3.8.4	Prepara�o de Desoxinucleotídeos (dNTPs)	38
3.8.5	Metodologia de “Nested” PCR.....	38
3.8.5.1	Primeira PCR.....	38
3.8.5.2	Segunda PCR (“Nested”).....	40
3.8.5.3	Identifica�o do Produto Amplificado.....	40
3.9	Seqüenciamento	41
3.9.1	Rea�o de Seqüenciamento por “Cycle Sequencing”	41
3.9.2	Precipita�o das Amostras após “Cycle Sequencing”, Denatura�o e Aplica�o no Gel.....	42
3.10	Análise das Seq�ncias.....	43
3.10.1	Genotipagem.....	43
3.10.2	Identifica�o de muta�es.....	44
3.10.3	Filogenia.....	45
3.11	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Avalia�o dos marcadores sorológicos para a infec�o pelo vírus da hepatite B	47

4.2	Características Demográficas, Epidemiológicas, Clínicas e Laboratoriais de 59 pacientes AgHBs reagentes, co-infectados pelo HIV	50
4.3	Características relativas a variáveis à infecção pelo VHB de 59 pacientes AgHBs reagentes, co-infectados pelo HIV	51
4.3.1	Características de AgHBe e carga viral de VHB	51
4.3.2	Genótipos de VHB por análise filogenética da região S/P e análise da região do core/ BCP / pré-core	52
4.3.3	Mutações de VHB na região S/P	54
4.4	Associações entre genótipos de VHB e algumas variáveis selecionadas	54
4.5	Associação entre as mutações na região da polimerase do VHB e algumas variáveis selecionadas	55
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	69
7	ANEXOS.....	71
7.1	ANEXO A	72
7.2	ANEXO B	77
8	REFERÊNCIAS	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgHBc	antígeno do core do vírus da hepatite B
AgHBe	antígeno e do vírus da hepatite B
AgHBs	antígeno de superfície do vírus da hepatite B
AgHBx	antígeno X do vírus da hepatite B
ALT (TGP)	alanina amino transferase
Anti-HBc	anticorpo contra o antígeno do core do vírus da hepatite B
Anti-HBe	anticorpo contra o antígeno e do vírus da hepatite B
Anti-HBs	anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
AST (TGO)	aspartato amino transferase
BCP	promotor basal do core
bDNA	DNA ramificado
cccDNA	em inglês “circular covalent closed desorribonucleic acid”
CDC	em inglês “Center Diseases Control”
ddNTPs	trifosfatos de didesoxinucleotídeos
dNTPs	trifosfatos de desoxinucleotídeos
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNA	polimerase polimerase do ácido desoxirribonucléico
Eco R1	enzima endonuclease
Elisa	do inglês “enzyme-liked immunosorbent assay”
ENT	Entecavir
Fita L	fita longa do vírus da hepatite B
GT	Isotiocianato de Guanidina
HCl	ácido clorídrico

HIV	vírus da imunodeficiência humana
IC	intervalo de confiança
IFN	interferon
IgG	imunoglobulina da classe G
IgM	imunoglobulina da classe M
LAM	lamivudina
MgCL ₂	cloreto de magnésio
min	minuto
ml	militro
ng	nanograma
nick	corte na fita do ácido nucléico
nm	nanômetro
nt	nucleotídeo
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	precipitação de glicol polietilénico
pmol	picomol
Proteína L	proteína maior do envelope
Proteína M	proteína média do envelope
Proteína S	proteína menor do envelope
Região C	região de codificação das proteínas do core
Região P	região de codificação da polimerase do DNA
Região pré-S1	sequência entre o primeiro e o segundo códon de iniciação da região S
Região pré-S2	sequência entre o segundo e o terceiro códon de iniciação da região S

Região S	região de codificação das proteínas do envelope
Região X	região de codificação do antígeno X
Região YMDD	região da polimerase do DNA que codifica os aminoácidos tirosina-metionina-aspartato-aspartato
RNA	ácido ribonucléico
RT	transcriptase reversa
SEAP HIV AIDS	Serviço de Extensão e Atendimento à Pacientes com HIV AIDS
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-borato-EDTA
TEM	tenofovir
UI/L	unidades internacionais por litro
VHB	vírus da hepatite B
μL	microlitro
xg	força centrífuga

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do VHB (partícula de Dane)	2
Figura 2.	Representação esquemática dos componentes do VHB.....	3
Figura 3.	Prevalência mundial do AgHBs.....	5
Figura 4.	Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na Hepatite B aguda	10
Figura 5.	Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na Hepatite B crônica.....	10
Figura 6.	Vírus da Hepatite B e suas quatro regiões codificadoras: C, S, P, X.....	13
Figura 7.	Replicação viral do VHB	14
Figura 8.	Mutações de resistência aos medicamentos utilizados para o tratamento da hepatite B.....	21
Figura 9.	Árvore filogenética demonstrando a classificação dos genótipos do VHB nas amostras caracterizadas neste trabalho.....	59
Figura 10.	Seqüência de aminoácidos de parte da seqüência genômica do AgHBs de dois pacientes com genótipo G.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Infecção pelo VHB: Interpretação do Quadro Sorológico	11
Quadro 2. Resíduos de Aminoácidos	17
Quadro 3. Programa para amplificação da região S + POL do VHB	39
Quadro 4. Programa para amplificação da região Pré-core e core do VHB	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcadores Sorológicos Gerais.....	47
Tabela 2. Perfil Sorológico dos Pacientes com Sorologia Incompleta	48
Tabela 3. Características Demográficas, Epidemiológicas e Clínicas de 59 pacientes AgHBs reagentes, co-infectados pelo HIV	50
Tabela 4. Distribuição da viremia para VHB segundo soropositividade para AgHBe em pacientes co-infectados HIV-VHB.....	52
Tabela 5. Características relatadas na infecção pelo VHB em 22 pacientes com viremia positiva (VHB DNA)	56
Tabela 6. Distribuição das variáveis relativas a uso de medicamentos entre pacientes co-infectados HIV-VHB segundo genotipagem do vírus da hepatite B	57
Tabela 7. Distribuição das variáveis relativas a uso de medicamentos entre pacientes co-infectados HIV-VHB segundo presença ou ausência de mutação na região da polimerase do VHB	58

RESUMO

Silva AC. *Estudo da distribuição genotípica e de mutações no genoma do vírus da hepatite B, em pacientes co-infectados pelos vírus da hepatite B e HIV, na Casa da AIDS, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo: 2010. 90p.

O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição genotípica e mutações no genoma do vírus da hepatite B (VHB) em um grupo de pacientes co-infectados pelo VHB e vírus da imunodeficiência humana (HIV). Foram incluídos pacientes AgHBs +/-HIV+ , atendidos em um ambulatório de referência para pacientes infectados pelo HIV, na cidade de São Paulo. Para a detecção dos marcadores sorológicos para infecção pelo VHB utilizou-se técnica de ELISA através de kits comerciais. A detecção do DNA-VHB foi realizada através de nested-PCR e sua quantificação foi realizada por COBAS AMPLICOR. Os genótipos de VHB, as mutações na região do core, BCP, pré-core e na região da polimerase foram determinados por seqüenciamento. Cinquenta e nove pacientes foram incluídos neste estudo e cinquenta e seis pacientes relatavam uso prévio de lamivudina ou tenofovir. A presença do DNA-VHB foi detectada em 22 pacientes AgHBs positivos. A identificação dos genótipos foi realizada em 16 pacientes e a distribuição dos genótipos do VHB foi: A (12-75%); G (2-13%), D (1-6%) e F (1-6%). Em 10 dos pacientes com viremia presente para DNA-VHB, foram observadas mutações na região da polimerase (rtL180M + rtM204V, rtV173L + rtL180M + rtM204V) e no gene do envelope (sI195M, sW196L, sI195M/sE164D). Mutações na região do BCP (A1762T, G1764A) e do pré-core (G1896A) foram identificados em quatro pacientes. Em conclusão, entre os pacientes analisados observou-se uma alta prevalência de mutações associadas a resistência à lamivudina e associadas a resistência a anti-HBs. O genótipo G, raramente descrito em nosso meio, foi também observado nesse grupo de pacientes.

Descritores: 1.Vírus da hepatite B 2.HIV 3.Co-infecção 4.Mutação 5.Genótipos

SUMMARY

Silva AC. *Hepatitis B genotype distribution and frequency of resistance mutations in a group of patients co-infected with HIV and hepatitis B virus (HBV) at an AIDS Outpatient Clinic in Sao Paulo* [dissertation]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 90p.

The objective of this study was to evaluate the genotype distribution and genomic mutations of hepatitis B virus (HBV) among a group of HIV–HBV co-infected patients from an AIDS outpatient clinic in São Paulo. HBV serological markers were detected by commercially available enzyme immunoassay kits. HBV DNA was detected by using an in-house nested PCR and quantified by COBAS AMPLICOR. HBV genotypes, basal core promoter (BCP) / pre-core / core region and surface / polymerase genes mutations were determined by sequencing. Among the 59 patients included in this study, 56 reported previous use of lamivudine or tenofovir. HBV DNA was detected in 16/22 patients and the genotypes distribution was A (n=12, 75%); G (n=2, 13%); D (n=1, 6%), and F (n=1, 6%). In 10 patients with viremia, lamivudine-resistance mutations in the polymerase gene (rtL180M + rtM204V, rtV173L + rtL180M + rtM204V) were found, accompanied by changes in the envelope gene (sI195M, sW196L, and sI195M/sE164D). Mutations in the BCP and pre-core regions were identified in 4 patients. In conclusion, genotype G, rarely seen in Brazil, was observed in this group of patients. A high prevalence of mutations associated with lamivudine-resistance accompanied by mutations associated with anti-HBs resistance was also found among these patients.

Keywords: 1.Hepatitis B Virus 2.HIV 3.Coinfection 4.Mutation 5.Genotypes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus da hepatite B (VHB)

O VHB é um vírus DNA (ácido desoxirribonucléico), pequeno (42nm), esférico, contendo um envelope com o antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs) e um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica contendo o antígeno do core ou cerne (AgHBc) (Figura 1).

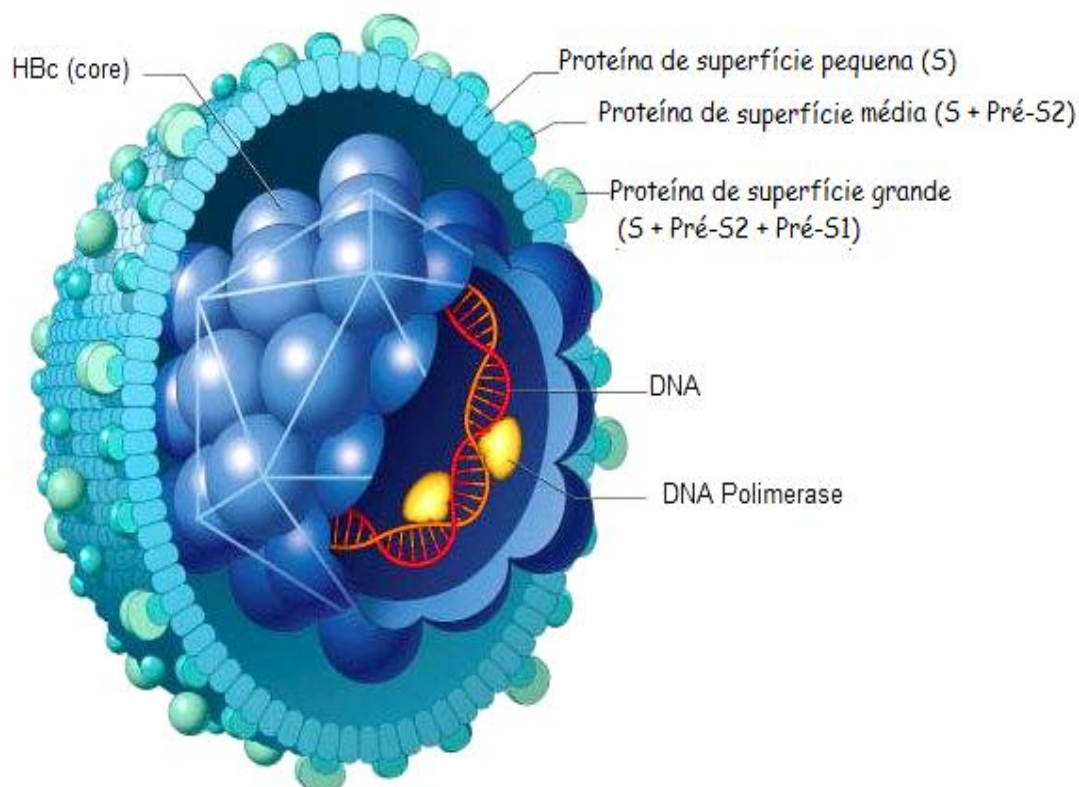


Figura 1. Estrutura do VHB (partícula de Dane)
(adaptado de ©2002 James A. Perkins apud Almeida 2007)

O VHB está atualmente classificado na família Hepadnaviridae, que compreende uma série de vírus hepatotrópicos que infectam outras espécies de mamíferos e aves, compartilhando características estruturais e funcionais, no gênero Orthohepadnavirus (Gust *et al.*, 1986; Clarke e Bloor, 2002). As características comuns aos hepadnavirus são: seu tropismo por células hepáticas, partículas virais envelopadas com diâmetro de 42 nm, genoma formado por DNA fita dupla parcial e replicação por intermediários RNA, via transcriptase reversa (Summers *et al.*, 1978; Kann e Gerlich, 1998).

Além da partícula de Dane, o VHB pode ser encontrado no soro de pacientes infectados sob outras duas formas: partículas filamentosas cilíndricas de tamanhos variados e partículas esféricas de 22nm de diâmetro constituídas apenas pelo envelope (Kann e Gerlich, 1998) (Figura 2).

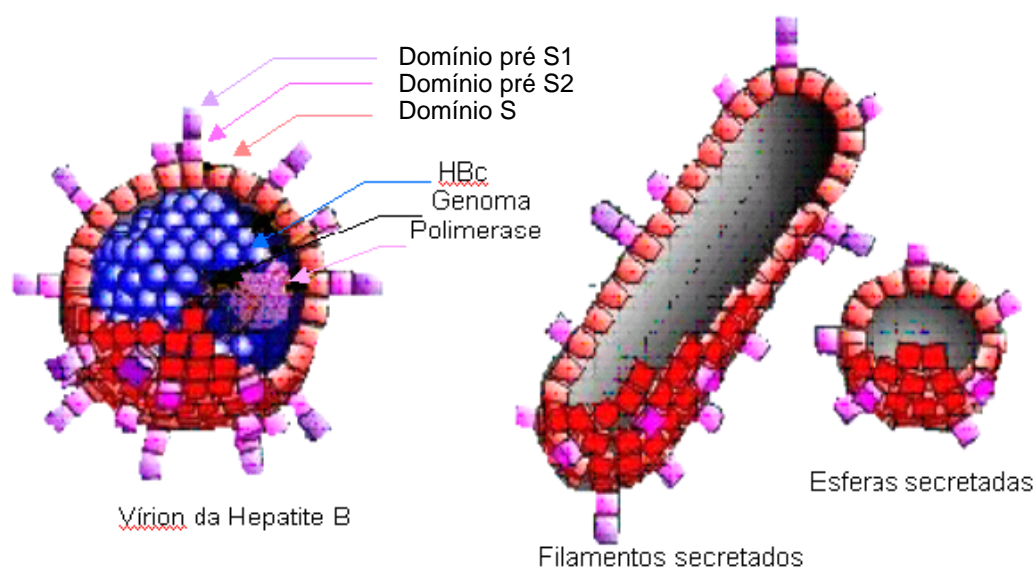


Figura 2. Representação esquemática dos componentes do VHB (Kann e Gerlich, 1998)

1.2 Epidemiologia

A infecção crônica pelo vírus da hepatite B constitui importante problema mundial de saúde pública. Acredita-se que cerca de 400 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas por esse vírus em todo o mundo (Shepard *et al.*, 2006). Estima-se que 50 milhões de novas infecções pelo VHB ocorram anualmente e que 1 a 2 milhões de mortes ao ano a ele sejam atribuídas (Te e Jensen, 2010).

A infecção crônica ocorre em 90% das crianças infectadas ao nascimento, 25 a 50% nas crianças infectadas entre 1 e 5 anos de idade, e entre 2 a 6% em pessoas infectadas na adolescência ou na faixa etária adulta.

Além da América do Norte, a Europa Ocidental, a Austrália, Nova Zelândia, México e a região Sul da América Latina são consideradas áreas de baixa prevalência para o VHB (menor que 2%). Prevalências intermediárias (2-7%) são observadas no Leste Europeu, Ásia Central, Japão, Israel e Rússia, e prevalências altas (8-15%) são encontradas no Sudeste Asiático, China, Filipinas, África, Bacia Amazônica e Oriente Médio (exceto Israel), como se observa na Figura 3.

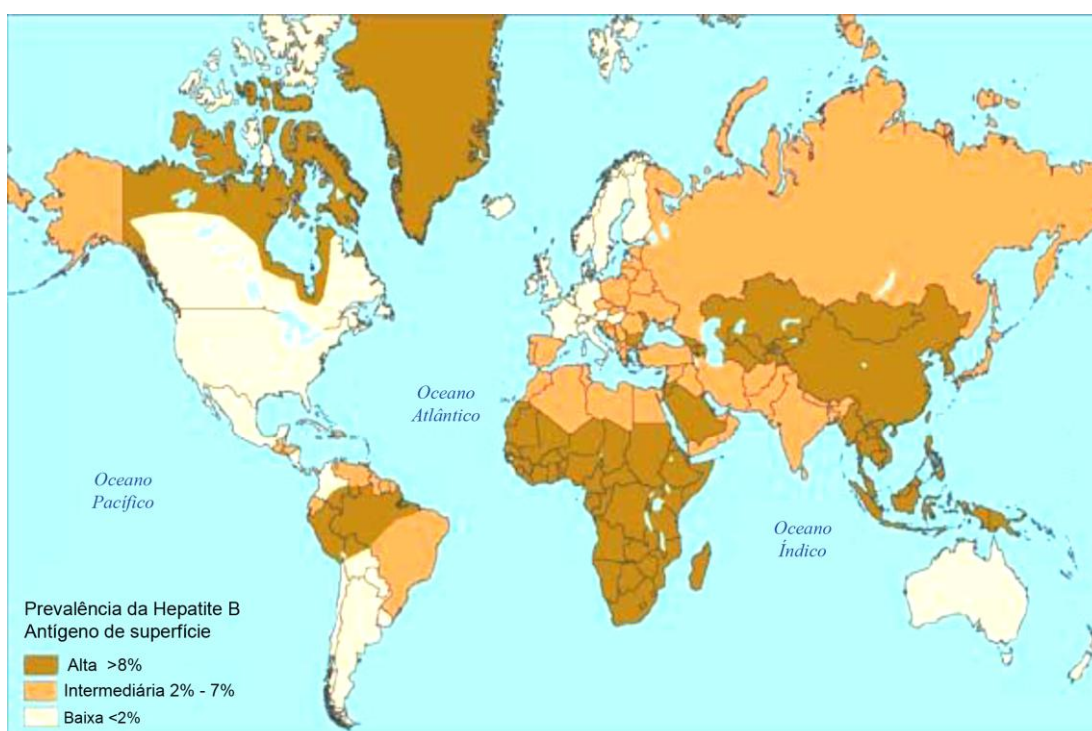


Figura 3. Prevalência mundial do AgHBs

Adaptado de CDC

<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/hepatitis-b.aspx>

No Brasil a prevalência de portadores de hepatite B é variável devido à larga extensão geográfica do país e à diversidade econômica e cultural.

Na cidade de São Paulo, (Focaccia *et al.*, 1998) encontraram 5,94% de soropositividade para marcadores sorológicos de hepatite B.

Em recente inquérito soro-epidemiológico no Brasil, avaliando a prevalência de AgHBs em capitais do nordeste, centro-oeste e Distrito Federal foi encontrada prevalência abaixo de 1% desse marcador, nas regiões analisadas (Pereira *et al.*, 2009).

Na região Amazônica Brasileira estima-se uma prevalência maior, alcançando de 3,3% a 9% da população, em certas populações específicas,

como certos grupos indígenas (Braga *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 2005; Tavares-Neto *et al.*, 2004).

Os principais mecanismos de transmissão desse vírus são: transmissão materno-fetal, transmissão parenteral e relacionamento sexual. É uma infecção freqüente em pessoas que receberam transfusão de sangue, em pacientes em regime de hemodiálise, em pacientes que estão em tratamento oncológico, em profissionais da área da saúde, usuários de drogas injetáveis e em pessoas com múltiplos parceiros sexuais.

Apesar dos significantes progressos no desenvolvimento de vacinas, a infecção pelo VHB ainda é uma das mais disseminadas e importantes doenças infecciosas que afetam o ser humano (Carey, 2009).

1.3 Formas clínicas da infecção pelo vírus da hepatite B

A maioria dos portadores crônicos de AgHBs são assintomáticos e apresentam formas leves de envolvimento hepático. Deve-se suspeitar de cronificação da infecção por esse vírus, quando o AgHBs e o AgHBe persistem por mais de seis meses após a infecção aguda.

A infecção pelo VHB pode ainda causar cirrose hepática e hepatocarcinoma. São diversos os fatores que podem determinar evolução mais agressiva da hepatopatia causada por esse vírus: sexo masculino, superinfecção por outros vírus hepatotrópicos, co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana ou uso de álcool (McMahon, 2009).

1.4 Diagnóstico Laboratorial da infecção pelo vírus da hepatite B

Pelo fato dos sintomas clínicos da infecção pelo VHB serem indistinguíveis das outras formas de hepatites virais, o diagnóstico definitivo é dependente dos testes sorológicos para a infecção (Rotman Y 2009). Tais técnicas revelam-se fundamentais não apenas para o diagnóstico, mas também se mostram muito úteis no seguimento da infecção viral, na avaliação do estado clínico do paciente e na monitorização da terapêutica específica (Hoofnagle e Di Bisciglie, 1991; Rotman *et al.*, 2009; McMahon, 2009).

A confirmação diagnóstica de infecção pelo VHB pode ser realizada pelos ensaios imunoenzimáticos que buscam identificar no soro os antígenos (AgHBs e AgHBe) e anticorpos (anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs) presentes nesta infecção e pelos testes moleculares (pesquisa qualitativa e quantitativa do DNA do VHB) (Hoofnagle e Di Bisciglie, 1991; Rotman *et al.*, 2009; McMahon, 2009).

1.5 Marcadores sorológicos da infecção pelo vírus da hepatite B

Após o período de incubação, que varia de 40 a 180 dias com média de 60 a 90 dias, e duas a seis semanas antes do aparecimento da icterícia, já podem ser detectados no soro os antígenos AgHBs e AgHBe que indicam a presença do VHB replicante e infectante. O AgHBs é o primeiro marcador

a aparecer e sua persistência por mais de seis meses é indicativo de hepatite crônica (Decker, 1998). Na hepatite aguda ele persiste de 3 a 4 meses após a infecção, desaparecendo nos casos de cura.

O AgHBe é o segundo a aparecer sendo considerado um marcador de replicação. Na doença aguda tem duração efêmera, de poucas semanas, desaparecendo a seguir; sua persistência por 8 ou 10 semanas após o surgimento dos sintomas pode ser indicativo de evolução para a cronicidade. Sua presença geralmente está associada com a positividade do DNA viral no soro e com alto risco de transmissão da infecção. Seu desaparecimento na fase aguda da doença, sucedido do desaparecimento do AgHBs, é sugestivo de evolução para a cura (Decker, 1998). O aparecimento do anti-HBe evidencia que o indivíduo está caminhando para a recuperação, pois o mesmo indica queda da replicação viral.

O anti-HBc IgM é o terceiro marcador a aparecer, em resposta ao antígeno do core do VHB. Representa o primeiro sinal de resposta imune após infecção pelo VHB, sendo o primeiro anticorpo a surgir no soro dos pacientes com infecção recente. Esta fração IgM também pode estar elevada em pacientes com infecção crônica que apresentam períodos de elevações de ALT durante os episódios de reativação da doença (Sjogren e Hoofnagle, 1985). Após 2 a 3 meses do seu surgimento, este marcador é substituído pela fração IgG. O anti-HBc IgG é um importante marcador de infecção passada. É o marcador presente na janela imunológica, período após a infecção em que não se detecta nem o AgHBs nem o anti-HBs.

O último marcador sorológico a aparecer é o anti-HBs. Seu surgimento varia entre 1 a 10 semanas após o desaparecimento do AgHBs. Este anticorpo está associado à cura e ao desenvolvimento de imunidade. Em indivíduos vacinados contra hepatite B, é encontrado isoladamente.

A dinâmica de aparecimento dos marcadores sorológicos varia de acordo com a fase evolutiva da infecção, e pode ser correlacionada com a ocorrência de sinais clínicos (icterícia) e com as elevações dos níveis das aminotransferases séricas (ALT e AST) (Figuras 4 e 5).

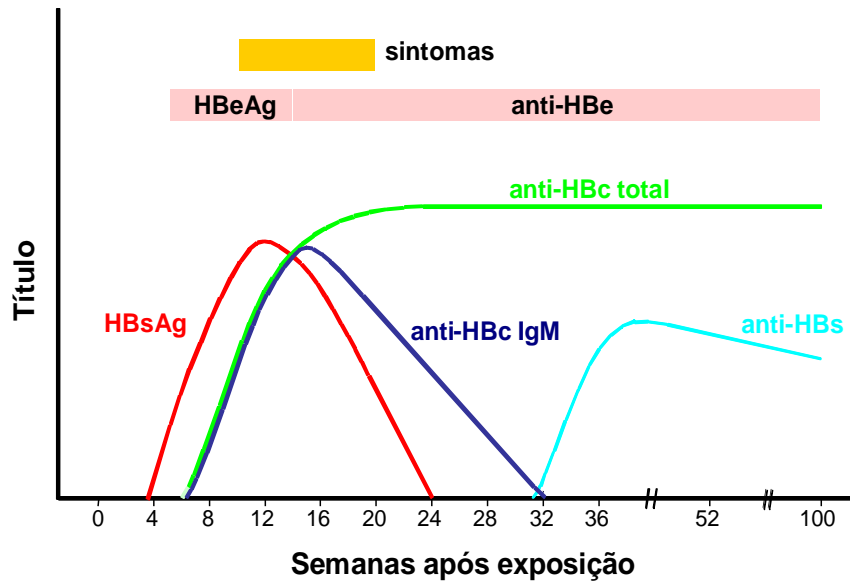


Figura 4. Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na Hepatite B aguda

Adaptado de: www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/figures/r708a1f1.gif

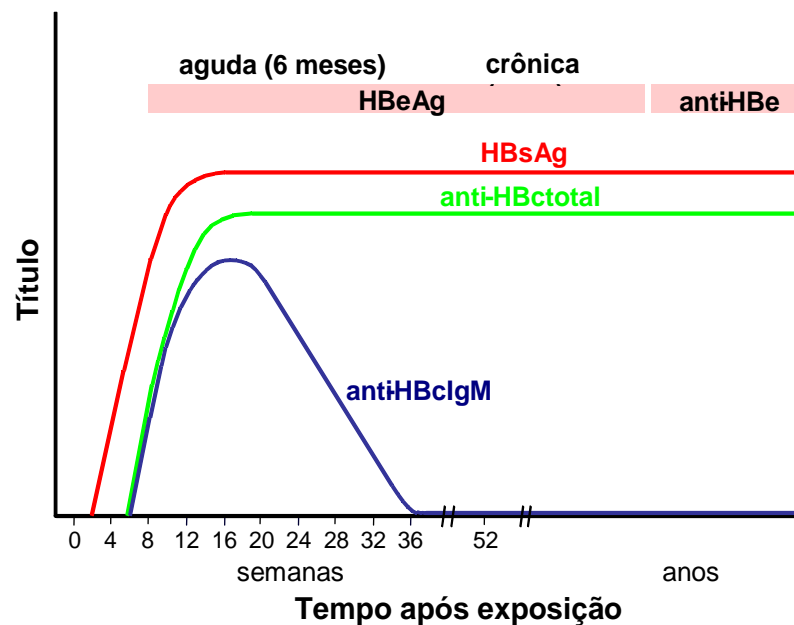


Figura 5. Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na Hepatite B crônica

Adaptado de : <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/figures/r708a1f2.gif>

O significado da presença dos diferentes marcadores sorológicos dos indivíduos com hepatite B está representado no Quadro 1.

Quadro 1. Infecção pelo VHB: Interpretação do Quadro Sorológico

INTERPRETAÇÃO	anti-HBc					
	AgHBs	anti-HBc	IgM	anti-HBs	anti-HBe	AgHBe
Fase de incubação	+	-	-	-	-	-
Fase aguda	+	+	+	-	-	+
	+	+	+	-	-	-
Final da fase aguda ou Hepatite crônica	+	+	-	-	-	+
	+	+	-	-	+	-
	+	+	-	-	-	-
Fase convalescente	-	+	+	-	-	-
Infecção passada	-	+	-	-	-	-
	-	+	-	-	+	-
	-	+	-	+	+	-
	-	+	-	+	-	-
Resposta vacinal	-	-	-	+	-	-

Fonte: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/figures/r708a1t1.gif>

1.6 Diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite B por métodos de biologia molecular

A detecção do DNA do VHB é útil na monitoração da infecção pelo VHB, na identificação de variantes do vírus e na avaliação da resposta ao tratamento da infecção crônica pelo VHB. Diversos testes baseados em hibridização de fase líquida, amplificação do alvo ("Polymerase Chain

Reaction”; amplificação por PCR em Tempo Real; amplificação mediada por transcrição) e amplificação do sinal (bDNA) tem sido empregados na detecção e quantificação do DNA do VHB (Pawlotsky, 2002). A sensibilidade analítica dos ensaios baseados na PCR é significativamente maior do que àquela dos ensaios de bDNA e captura híbrida (Chen *et al.*, 1995; Gerkenl *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000).

1.7 Genoma do VHB

O genoma do VHB consiste de uma molécula de DNA de cerca de 3.200 nucleotídeos (nt), sendo um dos menores genomas de DNA conhecido entre os vírus animais. Sua estrutura é peculiar: a molécula de DNA é circular, em parte fita dupla, mas com uma região de fita simples de extensão variável. A fita longa ou L (-) possui um corte ("nick") constante na posição 1818 (tomando-se como início do sítio único para Eco R1 como nucleotídeo 1), enquanto a fita curta ou S (+), cuja extensão varia entre 50 e 100% da fita longa, possui extremidade 5' fixa por volta da posição 1620 e extremidade 3' variável (Kann e Gerlich, 1998) (Figura 6).

A organização genética do VHB já foi determinada, identificando-se as diferentes seqüências de nucleotídeos dos diferentes subtipos de AgHBs (Okamoto *et al.*, 1998).

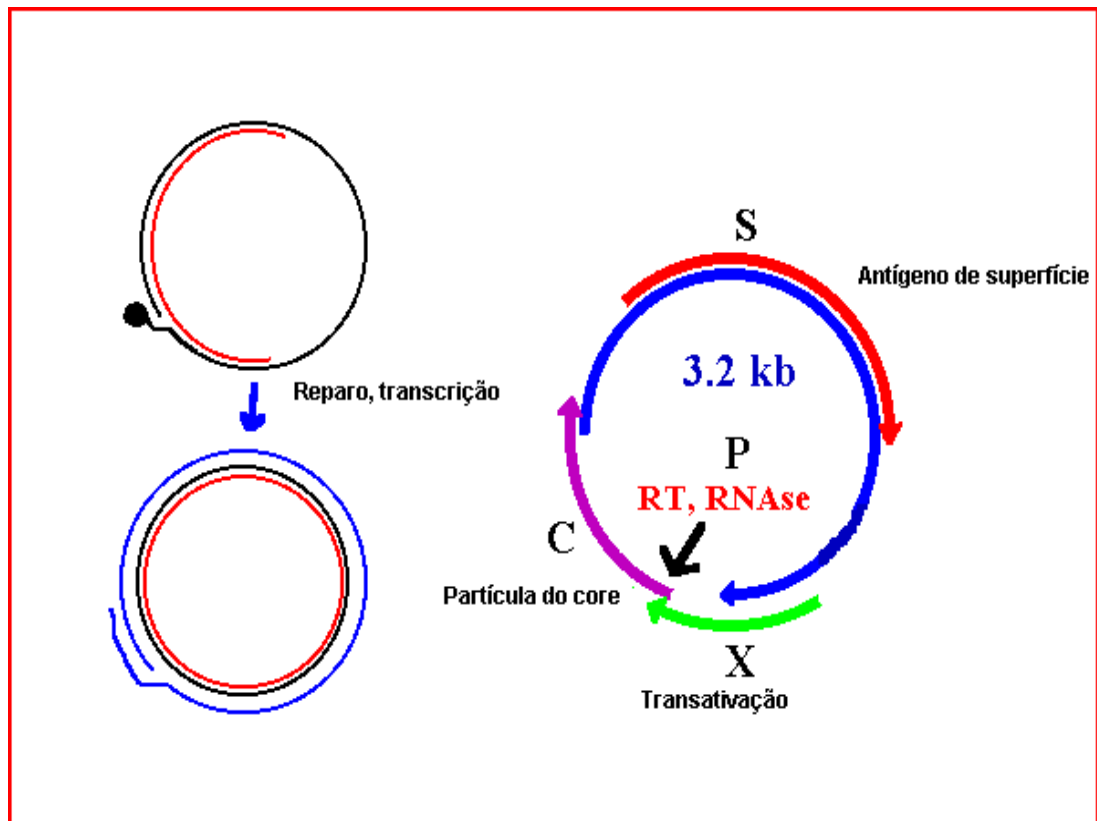


Figura 6. Vírus da Hepatite B e suas quatro regiões codificadoras: C, S, P, X (Kann, 1998)

A capacidade codificadora está restrita a fita L (-), na qual foram identificadas quatro fases de leitura aberta: S, C, P e X. A região S é dividida em S e pré-S, sendo esta responsável pela codificação da proteína principal do envelope, o AgHBs (Tiollais *et al.*, 1985). A região pré-S, na mesma fase de leitura, origina as proteínas L (pré-S1 + pré-S2 + S) e M (Pré-S2 + S) do envelope viral. A região C codifica a principal proteína do capsídeo viral. As regiões pré-C e C, quando traduzidas conjuntamente, relacionam-se com a expressão do AgHBe. A região P se estende por cerca de 80% do genoma viral e codifica a DNA-polimerase viral. Finalmente, a região X codifica o AgHBx (Kann e Gerlich, 1998; Summers e Mason, 1982).

1.8 Replicação do vírus da hepatite B

O ciclo de replicação do VHB inicia-se com a adesão do vírus à membrana do hepatócito conforme Figura 7. No núcleo do hepatócito, a síntese da molécula de DNA do VHB é finalizada e o genoma viral é convertido em uma molécula de DNA circular, covalente e fechada (cccDNA). O genoma do VHB se replica através da transcrição reversa, via RNA intermediário. A molécula de cccDNA produz novas cópias do vírus, inicialmente através de um RNA pré-genômico, que funciona tanto como modelo para a transcrição reversa quanto para o RNA mensageiro para a síntese posterior das proteínas do nucleocapsídeo e da polimerase (Ganem e Prince, 2004; Pawlotsky, 2005).

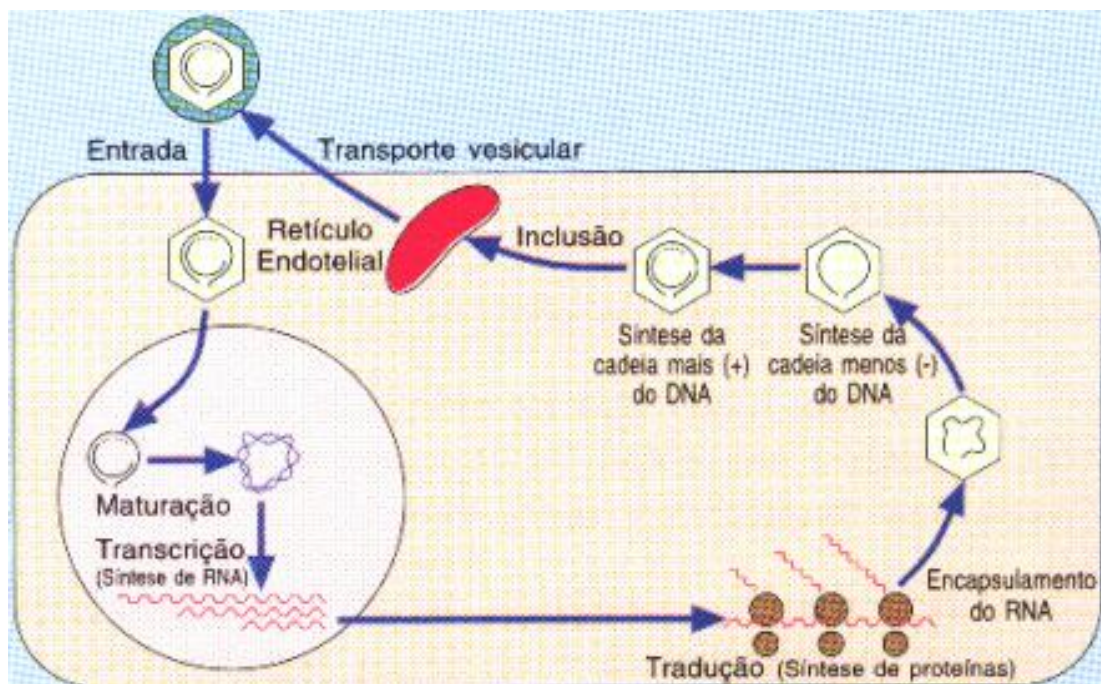


Figura 7. Replicação viral do VHB (Almeida, 2007)

1.9 Genótipos, subgenótipos e subtipos do vírus da hepatite B

Atualmente o VHB está classificado em 9 genótipos, os quais são identificados por letras maiúsculas do alfabeto (A, B, C, D, E, F, G, H e I) (Yu *et al.*, 2010). Existe também o conceito de subgrupos ou subgenótipos, denominados “clusters” ou clados, dividindo os genótipos A, B, C, D, e F. Apresentam uma diversidade maior que 4%, mas inferior a 8%, na seqüência de nucleotídeos do genoma completo do VHB.

A prevalência dos diferentes genótipos do VHB apresenta uma variação geográfica característica. Os genótipos A e D são freqüentemente observados na Europa, África e América do Norte enquanto B e C são mais freqüentes na Ásia; o genótipo E é exclusivo do oeste da África e o genótipo F é encontrado na África Central e do Sul. O genótipo G foi identificado na França, Alemanha e América do Norte; e mais recentemente o genótipo H foi descrito na América Central (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002).

Em um estudo envolvendo pacientes provenientes de diferentes regiões do Brasil, observou-se que o genótipo A era o mais freqüente, seguido dos genótipos D, C, F e B (Sitnik *et al.*, 2004). Outro estudo, em Ribeirão Preto, no Estado de São Paulo, revelou o genótipo D em 56.5%, A em 41.3%, e F em 2.2% dos casos (Rezende *et al.*, 2005).

Entre pacientes com hepatite B encaminhados a hospitais públicos de Belém, Pará, encontrou-se predomínio do genótipo A (89,1%), seguido dos genótipos F (8,7%) e D (2,2%) (Conde *et al.*, 2004).

Em Salvador, os seguintes genótipos foram encontrados em hepatites agudas: A (87,5%); D (12,5%) e F (2,5%) (Lyra *et al.*, 2005); enquanto que em hepatites crônicas foram encontrados os genótipos A (86,8%), F (11,8%) e B (1,6%) (Ribeiro *et al.*, 2006).

No estado de Santa Catarina, avaliando-se a presença dos genótipos do VHB entre pacientes hemodialisados, observou-se a seguinte distribuição de genótipos: A (30,6%), D (57,1%) e F (12,2%) (Carrilho *et al.*, 2004).

Baseando-se na heterogeneidade antigênica do AgHBs, foram identificados inicialmente: adw, adr, ayw e ayr. O determinante “a” é comum à maioria das cepas e é atribuído a um epítipo descontínuo, ao qual são dirigidos anticorpos neutralizantes (Kao, 2002). Este determinante faz parte da região hidrofóbica principal do domínio S. Mutações envolvendo as alças dessa região estão associadas com resistência à vacina ou à imunoglobulina. As substituições nos aminoácidos das posições 122 e 160 do AgHBs são responsáveis pela expressão das especificidades d/y e w/r respectivamente. O subtipo ad é comumente encontrado em indivíduos assintomáticos, uma vez que, em infecções agudas, os subtipos ay são os mais freqüentes (Zuckerman e Zuckerman, 2000).

Com a descrição de subdeterminantes adicionais do determinante “a”, o número de subtipos sorológicos aumentou para nove: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq⁺, adrq⁻. Várias diferenças de aminoácidos no AgHBs têm sido identificadas entre os diferentes subtipos sorológicos, como está ilustrado no quadro 2.

Quadro 2. Resíduos de Aminoácidos

Posição	Aminoácido	Especificidade
122	Lys(k)	d
	Arg (R)	y
127	Pro(P)	w1/w2
	Thr (T)	w3
	Leu (L)	w4
134	Tyr (y)	ayw2/ayw3
	Phe(F)	Ayw1/ayw4/adw2/adw4
160	Lys (k)	w
	Arg (R)	r

Fonte: Kramvis *et al.*, 2002

A importância clínica dos genótipos do VHB tem sido analisada por vários autores, porém apenas alguns parecem sugerir que os genótipos e os subgenótipos de VHB possam influenciar na evolução clínica, no prognóstico e na resposta ao tratamento da hepatite B (Cao, 2009)

Os genótipos não-A do VHB podem apresentar mutações na região do pré-core (mutante AgHBe negativo), muito disseminadas na área do Mediterrâneo e Japão. Alguns estudos encontraram esta mutação em diversas áreas geográficas e com frequência crescente na América do Norte. As variações geográficas na prevalência da hepatite crônica associadas a mutantes AgHBe negativo se devem à prevalência dos genótipos do VHB em cada área. A mutação mais comum no pré-core (G1896A) é exclusiva de pacientes infectados com os genótipos B, C, D, E que possuem Timina (T)

na posição 1858 do pré-core. No genótipo A o nucleotídeo 1858 é a citosina (C), impedindo a seleção da mutação G1896A.

Essa mutação G/A na posição 1896 da região pré-core conduz a uma parada no códon na leitura da seqüência da proteína AgHBe resultando na inibição da síntese da proteína e (AgHBe negativo).

1.10 Mutações no genoma do vírus da hepatite B

Mutações podem ocorrer em quaisquer dos genes do VHB. Causas relativas ao hospedeiro e características do próprio vírus determinam essas mutações, além das causas exógenas, como a utilização de medicamentos como análogos nucleosídeos (ou nucleotídeos) ou o uso de vacinas e imunoglobulinas específicas para o VHB (Chotiyaputta e Lok, 2009).

Entre as características próprias do VHB é importante lembrar as altas taxas de replicação viral, que eventualmente são encontradas nesta infecção e que poderão ser importantes na determinação dessas mutações (Nowak *et al.*, 1996).

Além disso, as RNA-polimerases (que estão envolvidas no ciclo de replicação do VHB) não possuem atividade de revisão e correção nucleotídica e cometem aproximadamente um erro a cada 10^4 nucleotídeos copiados para RNA (Chotiyaputta e Lok, 2009).

Assim altas cargas virais associadas a pouca "fidelidade" no sistema de replicação viral, acabam por resultar em mutações.

Algumas das mutações habitualmente encontradas têm especial relevância clínica: mutações da região do pré-core, mutação da região de promotores do core e mutações da região da polimerase do genoma do VHB (Chotiyaputta e Lok, 2009).

1.10.1 Mutações da região do pré-core e mutações da região de promotores do core

O AgHBe é secretado pelo hepatócito infectado por causa de uma seqüência de sinal secretório localizado no início da região pré-core. É um marcador da replicação do VHB. No passado, a ausência desse marcador era associada a pacientes com formas não replicativas da infecção pelo VHB. Os pacientes eram então denominados "portadores-sãos" do VHB. A identificação de mutações genômicas do VHB que se fizeram a seguir modificou essa conceituação clínica (Chotiyaputta e Lok, 2009).

No início da década de 80, foram observados pacientes da região do Mediterrâneo, que eram AgHBe negativos no soro e que apresentavam infecção ativa pelo VHB. Em 1989, foram identificadas mutações específicas no genoma do VHB que impedem a formação do AgHBe em pacientes com replicação ativa por esse vírus. A mutação mais comum, uma substituição do de G para A, no nucleotídeo 1896, na região do pré-core, resultava em um stop códon, impedindo a formação do AgHBe e foi chamada de mutação do pré-core (Ou *et al.*, 1986).

Uma segunda mutação, mutação do promotor do core, envolvendo duas substituições de nucleotídeos, (A₁₇₆₂ T e G₁₇₆₄ A), também leva a uma diminuição na produção do AgHBe (Chotiyaputta e Lok, 2009).

1.10.2 Mutações da região P do genoma do VHB

A caracterização da região do genoma do VHB responsável pela codificação do DNA da polimerase viral desse vírus está bem estabelecida, assim como a localização de seus domínios (Stuyer *et al.*, 2001). O primeiro domínio encontra-se na extremidade aminoterminal, região na qual se liga a extremidade 5' do DNA viral e é essencial para o início da síntese do DNA. O segundo domínio não tem nenhuma função específica, além de funcionar como um espaçador. O terceiro domínio é a DNA polimerase em si (domínio rt), com atividade de transcriptase reversa, e pode ser subdividido em diferentes “subdomínios”, nomeados de A a E. O domínio carboxiterminal é a RNase H que cliva RNA apresentado na forma de híbrido com DNA.

Atualmente cinco análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos são aprovados para o tratamento da hepatite B crônica: lamivudina, adefovir dipivoxil, entecavir, telbivudina e tenofovir. Esses medicamentos atuam basicamente inibindo a ação da transcriptase reversa do DNA-VHB. Durante o tratamento da hepatite B crônica com esses medicamentos, pode ocorrer uma seleção de mutantes resistentes a esses medicamentos. São vários os fatores associados ao surgimento dessas mutações.

O uso de lamivudina está particularmente associado a mutações de resistência, pois uma substituição única de metionina por valina ou isoleucina na posição 204 na região da transcriptase reversa da polimerase do VHB diminui a susceptibilidade de lamivudina de forma muito expressiva (Allen *et al.*, 1998; Seignères *et al.*, 2002).

De acordo com critérios atualmente aceitos, as mutações encontradas no domínio rt do VHB, associadas à resistência à lamivudina, são encontradas no aminoácido rtA181T (domínio B) e rtM204V/I/S (domínio C)

Mutações em outras localizações da região P têm sido encontradas após uso de outros análogos nucleosídeos/nucleotídeos conforme figura 8. A importância clínica desses achados, ainda carece de maior tempo de observação (Chotiyaputta e Lok, 2009).

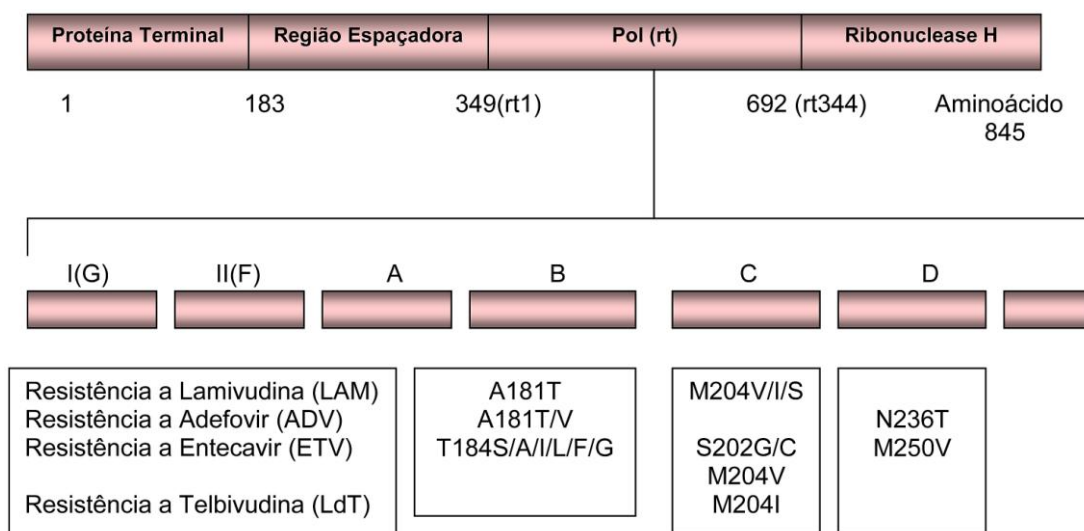


Figura 8. Mutações de resistência aos medicamentos utilizados para o tratamento da hepatite B. (Adaptado de Chotiyaputta e Lok, 2009)

1.11 A infecção pelo vírus da hepatite B em pacientes co-infectados pelo HIV

O VHB e HIV compartilham os mesmos mecanismos de transmissão. Dessa forma, a prevalência da co-infecção HIV-VHB varia em diferentes regiões geográficas do mundo e também de acordo com os fatores de risco envolvidos.

Entre 5 e 16,7% dos pacientes infectados pelo HIV apresentam-se cronicamente infectados pelo VHB em diferentes regiões do mundo. Até 90% desses pacientes podem apresentar-se com marcadores sorológicos de infecção prévia por esse vírus. Essa prevalência varia, dependendo da região geográfica do mundo onde ocorre e também dos fatores de risco envolvidos (Soriano *et al.*, 2008; Idoko *et al.*, 2009; Mendes-Corrêa e Nuñez, 2010).

No Brasil, entre pacientes co-infectados pelo HIV, a prevalência do VHB, varia de 1,6% a 8,5%, de acordo com diferentes estudos (Mendes-Correa *et al.*, 2000; Monteiro *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004; Tovo *et al.*, 2006; Zago *et al.*, 2007; Portelinha Filho *et al.*, 2009).

A co-infecção HIV-VHB, além de ser freqüente nos dias atuais, tem-se revelado como importante causa de morbidade e mortalidade na população de pacientes infectados pelo HIV.

A presença do HIV parece alterar a evolução natural da hepatite B. Acredita-se que a presença do HIV possa diminuir a chance de clearance viral do VHB após infecção aguda e possa aumentar o risco para cronicidade por esse vírus (Benhamou, 2007). Parece também determinar maior viremia

pelo VHB. A presença do HIV tem sido associada a formas graves de doença hepática, como cirrose e hepatocarcinoma (Bonacini *et al.*, 2004; Soriano *et al.*, 2008).

Informações sobre a distribuição ou influência dos genótipos do VHB na evolução clínica, ou na resposta terapêutica do VHB em pacientes co-infectados são raras e inconclusivas. É possível que, à semelhança do que ocorre em mono-infectados com VHB, as características genotípicas do VHB possam também interferir na evolução ou na resposta terapêutica a esse vírus.

De qualquer maneira, a co-infecção HIV-VHB contribui de forma inequívoca para uma piora da qualidade de vida desses pacientes e constitui tema de grande relevância na atualidade.

O medicamento mais utilizado para o tratamento da hepatite B nesse grupo de pacientes tem sido a lamivudina. Trata-se de droga que inibe a replicação do HIV e também do VHB. Apresenta boa tolerabilidade e comprovada eficácia como constituinte do esquema antiretroviral de alta potência. Por esses motivos, seu uso em pacientes co-infectados tem sido freqüente.

A lamivudina inibe a replicação viral do VHB em até 86% dos pacientes co-infectados HIV-VHB. Pode ainda levar à soroconversão para anti-HBe e determinar algum grau de melhora na histologia hepática em alguns desses pacientes. No entanto, pode determinar, após seu uso prolongado, o aparecimento de mutações no genoma do VHB, que conferem resistência a seu uso. Entre os fatores associados

ao aparecimento de resistência, encontram-se: carga viral elevada para VHB ao início de tratamento, supressão viral incompleta e tempo de uso do medicamento.

Em pacientes mono-infectados pelo VHB a resistência à lamivudina aumenta progressivamente durante o tratamento, a uma taxa anual de 14 a 32%.

Em pacientes co-infectados pelo HIV a velocidade para o surgimento de resistência é muito maior (Benhamou *et al.*, 1999). Dessa forma, após 4 anos de uso de lamivudina em pacientes co-infectados, a taxa de resistência pode ser observada em até 90% dos pacientes (Soriano *et al.*, 2009).

Sendo o desenvolvimento de resistência um fenômeno comum e preocupante nos pacientes co-infectados, algumas estratégias de tratamento têm sido propostas para esses pacientes. O uso combinado de medicamentos tem sido uma delas (Soriano *et al.*, 2009).

Diferentes autores têm apontado essa alternativa, como uma possibilidade para o manejo de pacientes co-infectados.

Dessa forma, atualmente seja no início de tratamento para hepatite B ou mesmo em pacientes já em uso de lamivudina, sem sucesso no controle da viremia por esse vírus, propõe-se o uso de terapia com múltiplos medicamentos. A eficácia desse procedimento a longo prazo, é desconhecida, embora estudos avaliando essa abordagem a curto prazo revelem que possam ser uma alternativa interessante.

1.12 Justificativa

O manejo clínico da infecção pelo VHB em pacientes co-infectados pelo HIV, representa hoje em dia um enorme desafio.

Trata-se de situação de significativa prevalência em nosso meio. Além disso, a situação de co-infecção com o HIV, parece acelerar a progressão da hepatopatia causada pelo VHB, piorando a qualidade de vida dos pacientes e determinando o surgimento de dificuldades terapêuticas nesse grupo de pacientes.

São escassas as informações clínicas e virológicas que sirvam de embasamento teórico para a definição de condutas terapêuticas específicas para essa população.

São escassos os estudos brasileiros que avaliaram a distribuição genotípica e as mutações associadas à resistência a lamivudina entre pacientes co-infectados pelo HIV-VHB no Brasil (Bottecchia *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2004; Sucupira *et al.*, 2006).

O SEAP HIV/AIDS (Serviço de Extensão ao Atendimento à Pacientes com HIV/AIDS) funciona como um ambulatório específico para o atendimento de pacientes infectados pelo HIV e de seus parceiros sexuais. Essa instituição atende atualmente a cerca de 3.400 (três mil e quatrocentos pacientes). Estudo anterior avaliou a prevalência de presença de AgHBs nessa população e identificou a presença desse marcador sorológico em 5,7% dos pacientes analisados (Mendes-Correa *et al.*, 2000).

O atendimento clínico a esses pacientes tem se limitado aos exames disponibilizados pelo atual modelo de atendimento público, que não contempla exames de quantificação, genotipagem ou testes de resistência para o VHB.

Com certeza a impossibilidade de realizar exames mais específicos e a ausência de casuísticas semelhantes dificulta o atendimento dessa população.

A falta de informações relativas ao tema dificulta também a definição de ações específicas nessa área de atendimento clínico.

O conhecimento ampliado das características clínicas, laboratoriais e virológicas relativas ao VHB desses pacientes auxiliou a estudar estratégias de manejo e tratamento mais efetivas e seguras. Em nossa opinião, a necessidade urgente de informações que auxiliassem na definição das intervenções clínicas e terapêuticas necessárias a esse grupo de pacientes, justificou a realização desse estudo.

Dessa forma, no sentido de contribuir com maiores informações sobre o tema, propusemos a realização do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a distribuição genotípica e mutações no genoma do vírus da hepatite B associadas à resistência a lamivudina em pacientes co-infectados pelo HIV e pelo vírus da hepatite B, atendidos no SEAP HIV/AIDS, em São Paulo.

2.2 Específicos

- Avaliar a presença do DNA do VHB e do AgHBe em pacientes AgHBs positivos;
- Avaliar a carga viral do VHB;
- Avaliar a distribuição genotípica do vírus da hepatite B nessa população;
- Verificar a presença de mutações no genoma do VHB associadas à resistência à lamivudina;

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

A população de estudo foi composta por pacientes co-infectados pelo HIV e VHB, selecionados entre aqueles 3374 matriculados e regularmente atendidos no “SEAP HIV/AIDS”, no período de maio de 2006 a maio de 2007.

3.2 O SEAP – HIV/AIDS – “Casa da AIDS”

O Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS, “SEAP HIV/AIDS”, da Divisão de Doenças Infecciosas e Parasitárias, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, funciona como um ambulatório específico para o atendimento de pacientes infectados pelo HIV.

Essa instituição atende a cerca de 3.400 (três mil e quatrocentos pacientes). Os pacientes atendidos são procedentes de encaminhamento dos diferentes institutos que compõem o complexo hospitalar do Hospital das Clínicas. Outro critério de seleção para atendimento de pacientes no “SEAP HIV/AIDS” é residir na região central da cidade de São Paulo, onde se localiza este ambulatório.

A pesquisa dos marcadores sorológicos da infecção pelo VHB faz parte da rotina de atendimento de todos os pacientes acompanhados.

3.3 Critérios de Inclusão

- 1- Pacientes matriculados na “SEAP HIV/AIDS” e atendidos no período compreendido entre maio de 2006 a maio de 2007;
- 2- Pacientes com diagnóstico de infecção pelo HIV realizado através da pesquisa de anticorpos anti-HIV pelo método imunoenzimático (ELISA) e confirmado pelo método de Western-Blot;
- 3- Pacientes com sorologia positiva para AgHBs;
- 4- Pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e informado.

3.4 Coleta de informações em banco de dados eletrônico e análise dos prontuários

A busca de informações relativas aos pacientes AgHBs reagentes iniciou-se pela consulta ao banco de dados eletrônico.

A análise do perfil sorológico relativo à hepatite B em todos os pacientes com seguimento regular no período estipulado entre maio de 2006 e maio de 2007 permitiu identificar o perfil sorológico desses pacientes e selecionar os pacientes AgHBs reagentes.

Foi identificada a evolução temporal desse perfil desde a primeira sorologia encontrada até a última registrada por esse banco de dados. Ainda no sentido de complementar essas informações, ocorreu a busca de dados complementares em prontuário de parte dos pacientes envolvidos.

Consideramos para inclusão no estudo, aqueles pacientes com dados sorológicos completos. Buscávamos a presença de pelo menos, AgHBs, Anti-HBs e Anti-HBc.

Identificados os pacientes AgHBs reagentes procedeu-se a uma busca de informações clínicas e laboratoriais relativas a esses pacientes.

As seguintes variáveis clínicas e laboratoriais foram consideradas para análise nesse estudo: sexo, idade, fatores de exposição para HIV ou VHB, dados relativos à adesão ao tratamento antiretroviral incluindo-se terapia para hepatite B, antecedente de uso de lamivudina, tenofovir, entecavir, interferon, tempo de exposição a esses medicamentos.

3.5 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina e pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz.

Os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo. Aqueles que aceitaram, assinaram o termo de consentimento (anexo I) e foram encaminhados à coleta de sangue no próprio SEAP HIV/AIDS, momento em que foi aplicado um questionário (Anexo II) para obtenção das informações referentes aos fatores de risco de exposição a HIV/VHB.

3.6 Procedimentos de laboratório

A coleta de sangue, utilizando tubos estéreis com gel e sem anticoagulantes, foi realizada no SEAP HIV/AIDS após as entrevistas individuais.

O sangue foi colhido em dois tubos e centrifugado. Um tubo foi imediatamente enviado ao Laboratório Central do Hospital das Clínicas para realização de sorologia completa para o VHB. O outro tubo encaminhado ao Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Adolfo Lutz para a realização das técnicas moleculares.

No Instituto Adolfo Lutz, o soro enviado foi armazenado em freezer - 20oC até o momento da realização das técnicas moleculares.

3.7 Pesquisa dos marcadores sorológicos

Para pesquisa dos marcadores sorológicos foi empregada a técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kits comerciais pela tecnologia de AxSYM. Os testes para pesquisa do AgHBs, anti-HBc total, anti-HBs, AgHBe e anti-HBe foram realizados pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.8 Técnicas de Biologia Molecular

As técnicas de biologia molecular foram realizadas pelo Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Adolfo Lutz e pelo Laboratório de Hepatites do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP.

3.8.1 Quantificação do DNA do VHB

Para a quantificação do DNA do VHB foi utilizado o teste de Cobas Amplicor da Roche.

O DNA do VHB foi isolado do soro por precipitação de glicol polietilénico (PEG) seguido de centrifugação. A partir da lise das partículas virais granuladas, o DNA do VHB foi recuperado através de solução alcalina. Imediatamente, adicionou-se um reagente de neutralização para proporcionar as condições necessárias e apropriadas de tamponamento. Um número conhecido de moléculas de DNA do padrão de quantificação do VHB era introduzido em cada amostra juntamente com o reagente de lise. Este padrão de quantificação foi processado através dos passos de preparação, amplificação, hibridização e detecção da amostra e foi utilizado para quantificação do DNA do VHB presente na amostra de teste.

A seleção da seqüência de DNA alvo do VHB depende da identificação de regiões dentro do genoma do VHB que apresentam uma conservação máxima de seqüência ao nível de DNA entre todos os genótipos. Conseqüentemente, a seleção adequada dos iniciadores e da

sonda é essencial para que o teste tenha capacidade de identificar os diferentes genótipos do VHB. A região do DNA circular de cadeia parcialmente única do genoma do VHB mostrou apresentar uma conservação máxima na seqüência de DNA entre os genótipos do VHB conhecidos.

O DNA foi amplificado utilizando um iniciador oligonucleotídico biotilado e um não-biotilado.

As amostras processadas foram adicionadas à mistura de amplificação em tubos de amplificação (tubos-A) nos quais ocorreu a amplificação por PCR. O termociclador aquece a mistura de reação para denaturar as duplas cadeias de DNA produzidas e expor as seqüências alvo do iniciador específico sobre o genoma do DNA circular do VHB. À medida que a mistura arrefece, os iniciadores ligam-se ao DNA alvo. A enzima recombinante termoestável da Polimerase do DNA *Thermus aquaticus* (Taq pol), na presença de magnésio e de trifosfatos de desoxinucleósidos em excesso (dNTPs), incluindo trifosfatos de deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxicitidina e deoxiuridina (em vez de deoxitimidina), prolonga os iniciadores ligados ao longo dos modelos alvo para produzir uma seqüência de 104 pares de base de cadeia dupla da molécula de DNA denominada amplicon. As amostras foram submetidas a vários ciclos de amplificação.

A quantificação ocorreu a partir da utilização de uma segunda seqüência alvo (Padrão de Quantificação do VHB) que será adicionada a cada amostra de teste numa concentração conhecida.

Dentro dos intervalos lineares do ensaio, a absorbância de 660 nm será proporcional à quantidade de amplicon do VHB ou de amplicon do Padrão de Quantificação do VHB. Será calculada a absorbância total do VHB e do Padrão de Quantificação do VHB multiplicando a absorbância pelo fator de diluição do amplicon e em seguida com absorbância total máxima. A absorbância total calculada é diretamente proporcional à quantidade de DNA do VHB ou de DNA do Padrão de Quantificação do VHB presente em cada reação de amplificação por PCR. A quantidade do DNA do VHB presente em cada amostra é calculada a partir da razão entre a absorbância total do VHB, a absorbância total do Padrão de Quantificação do VHB e o número de moléculas de DNA do Padrão de Quantificação do VHB.

3.8.2 Extração do DNA do VHB com solução de isotiocianato de guanidina e fenol (GT)

À 300uL de solução de GT foram adicionados 200uL de soro e, após agitação, foram adicionados 50uL de clorofórmio gelado, seguido de centrifugação a 12.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 300uL de isopropanol absoluto gelado, agitando-se e centrifugando-se a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. Foi retirado todo sobrenadante e adicionado 300uL de etanol absoluto gelado. O tubo foi centrifugado novamente a 12.000xg por 10 minutos a 4°C, o precipitado resultante foi seco com o auxílio de bomba de vácuo e, posteriormente, ressuspendido em 50uL de água MilliQ e armazenado em geladeira por 12 horas para completa eluição do DNA.

3.8.3 “Primers”

Os "primers" externos utilizados nas reações de amplificação da região S foram: HBS1F e HBS1R, e os internos: HBS2F e HBS2R (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil). Estes “primers” foram desenvolvidos por Sitnik, 2004 e geraram produtos de 450 pb.

Para a região Pré-core foram utilizados os "primers" externos EP1.1 e EP.1.2, e os "primers" internos EP2.1 e EP.2.2 (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil), os quais foram desenvolvidos por Takahashi, 1995 gerando produtos de 306 pb.

Para a amplificação do *locus* YMDD do gene da polimerase do VHB utilizamos os “primers” externos L840, L372 e os “primers” internos 5’LAMI5 E 3’LAMI2 (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil) (Da Silva *et al.*, 2001).

Todos os "primers" foram diluídos à concentração de 20 $\mu\text{Moles}/\mu\text{L}$. Abaixo estão descritas as seqüências de bases nitrogenadas dos "primers" mencionados.

Região S:

HBS1F: 5` - GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTC - 3`

HBS1R: 5` - AAA TKG CAC TAG TAA ACT GAG CCA - 3`

HBS2F: 5` - CGT GGT GGA CTT CTC TCA ATT TTC – 3`

HBS2R: 5` - GCC ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC – 3`

Região Pré-core:

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

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

EP1.2: 5' - GGAAAGAAGTCAGAAGGCAA – 3'

EP2.2: 5' – GGCAAAAAAGAGAGTAACTC – 3'

Região POL:

5` LAMI 5: 5' – TGCRYYTGTATTCCCATCCCATC – 3'

3` LAMI 2: 5' – GTTTTGTTAGGGTTTAAATG – 3'

L840: 5` : 5' - ACCCCATCTTTTTGTTTTGTTAAG – 3'

L372: 5` : 5' – TCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTAT – 3'

3.8.4 Preparação de Desoxinucleotídeos (dNTPs)

Foram utilizados dNTPs (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil) diluídos em água MilliQ, na concentração de 2,5mM de dATP, de dCTP, de dGTP e de dTTP.

3.8.5 Metodologia de “Nested” PCR**3.8.5.1 Primeira PCR**

A cada microtubo, contendo 10uL de DNA viral, obtido após extração com solução de GT, foram adicionados 90uL da mistura da PCR.

Essa mistura da PCR foi constituída por 67,5µL de água Milli Q, 10µL de Tampão 10X (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil), 6µL de dNTPs, 4µL de cloreto de magnésio (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil), 10µL de cada um dos “primers” HBS1F e L840 (S e P) ou EP1.1 e EP1.2 (Pré-core), 0,5µL de Taq DNA polimerase (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil). Após a adição da mistura da PCR, as amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura, em termociclador, com programa específico, os quais estão representados nos quadros 3 e 4:

Quadro 3. Programa para amplificação da região S + POL do VHB

REGIÃO S+POL (1^a e 2^a PCR)		
Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	1 minuto
35	94°C	1 minuto
	56°C	1 minuto
	72°C	1 minuto
1	72°C	7 minutos

Quadro 4. Programa para amplificação da região Pré-core e core do VHB

REGIÃO Pré-core (1^a e 2^a PCR)		
Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	30 segundos
30	94°C	30 segundos
	56°C	30 segundos
	72°C	40 segundos
1	72°C	5 minutos

3.8.5.2 Segunda PCR (“Nested”)

A 90 μ L da mistura da segunda PCR (“Nested”), constituída por: 67,7 μ L de água Milli Q, 10 μ L de Tampão 10X (INVITROGEN[®]), 6 μ L de dNTPs, 4 μ L de cloreto de magnésio (INVITROGEN[®]), 10 μ L de cada um dos “primers” HBS2F e 3”LAMI 2 (S e P) ou EP2.1 e EP 2.2 (Pré-core) e 0,3 μ L de Taq DNA polimerase (INVITROGEN[®]), foram adicionados 10 μ L do produto da primeira PCR. Os microtubos foram então levados ao termociclador utilizando programas específicos descritos no item anterior.

3.8.5.3 Identificação do Produto Amplificado

Após a amplificação, a identificação do produto obtido pela PCR, foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% preparado em tampão tris-borato EDTA (TBE 0,5 X) com 0,005% de brometo de etídio. Para isto, foram aplicados 10 μ L do produto final da PCR misturado com 2 μ L de tampão de corrida, constituído de blue juice 5%, glicerol 40% e azul de bromofenol 0,1%. Além do padrão de quantificação (Low DNA Mass Ladder - INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil), foram aplicados no gel controles positivos e negativos. As bandas foram observadas em transiluminador com luz ultravioleta e o gel foi fotografado em Sistema de Captura digital de Imagens (Imagem Acquisition and Analysis Software, UVP, INC. CA, USA). Uma cópia de cada gel foi impressa na impressora Digital Grafic Printer (UP-D890) para registro.

3.9 Seqüenciamento

A técnica de seqüenciamento derivada da metodologia de Sanger et al.¹¹⁴, utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o “kit” ABI Prism^R BigDyeTM Terminator (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), em Seqüenciador Automático ABI Prism^R 377 (PE Applied Biosystems), foi empregada na região S do VHB para determinação do genótipo do vírus, na região pré-core do vírus para pesquisa de mutações no promotor e pré-core na região da polimerase para a pesquisa de resistência a drogas.

3.9.1 Reação de Seqüenciamento por “Cycle Sequencing”

A 2µL do DNA purificado e quantificado (3 – 10 ng) foi adicionado 2µL de HBS2F e 3”LAMI 2 (S e P) ou EP2.1 e EP 2.2 (Pré-core) (1,6 pmol), 4µL da mistura de reação do “Kit” de seqüenciamento que contém ddNTPs marcados e as enzimas *Ampli Taq* DNA Polimerase FS e *rTth* pirofosfatase, 4µL de tampão Tris-HCl (pH 9,0) e MgCl₂ 5 X e 8,0µL 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 (25 ciclos de 96^oC por 30 segundos, 50^oC por 15 segundos e 60^oC por 4 minutos).

3.9.2 Precipitação das Amostras após “Cycle Sequencing”, Denaturação e Aplicação no Gel

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

Aos 20µL de reação, foram adicionados 80µL de isopropanol 75%. Os microtubos foram submetidos à forte agitação por 10 segundos e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 12.000xg à temperatura ambiente. Em seguida, foi removido o isopropanol e adicionado 1000µL de etanol 70% ao precipitado. As amostras foram novamente centrifugadas por 20 minutos a 12.000xg à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o etanol foi retirado e as amostras incubadas a 90⁰C por 3 minutos para a retirada total do etanol.

Às amostras, foram adicionados 5µL de tampão de amostra [5 partes de formamida (Amresco) e 1 parte de “blue dextran” (PE Applied Biosystems[®])], homogeneizadas várias vezes, submetidas à forte agitação por 10 segundos, centrifugadas a 12.000xg por 15 segundos e incubadas a 95⁰C por 5 minutos para denaturação. Imediatamente após a incubação, as amostras foram colocadas em gelo até a aplicação de 1,5µL no gel de poli(acrilamida).

O gel de seqüenciamento foi constituído por poli(acrilamida) 5% (Long Ranger[™] Gel Solution, FMC) com uréia 6M em tampão TBE 1X concentrado em placas de 36 cm com 0,5 mm de espessura. O tampão TBE 1X concentrado foi utilizado na eletroforese, realizada no Seqüenciador Automático ABI PrismR 377 (PE Applied Biosystems[®]).

3.10 Análise das Seqüências

Validação e montagem da seqüência consenso.

As seqüências obtidas foram analisadas inicialmente utilizando os programas Phred-Phrap-Consed para avaliação se sua qualidade (Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998). Posteriormente, foi montada uma seqüência consenso das fitas sense e antisense com o programa Consed.

As seqüências obtidas no presente estudo foram depositadas no GenBank com os seguintes números de acesso: GU968704 - GU968714 (região pré-core) e GU968715 - GU968730 (região S e polimerase).

3.10.1 Genotipagem

Para identificação do genótipo viral as seqüências consenso obtidas de cada caso foram inicialmente alinhadas, utilizando-se o programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) juntamente com seqüências dos diferentes genótipos do VHB (A-H) obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O programa BioEdit foi utilizado para edição do alinhamento.

A classificação dos genótipos foi feita por análise filogenética utilizando-se o programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 4 (Tamura *et al.*, 2007). As análises foram realizadas utilizando-se o método de “Neighbor-Joining” e o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros.

Para testar a confiabilidade das topologias obtidas foram realizadas as análises de “bootstrap” com 1000 replicações.

3.10.2 Identificação de mutações

Para identificação das mutações nas regiões do genoma viral que foram caracterizadas neste estudo, as seqüências obtidas foram alinhadas com uma seqüência de um isolado viral “selvagem”, ou seja, sem as mutações descritas abaixo na região BCP/Pré-core/core; sem as mutações que conferem resistência aos antivirais na região da polimerase e sem mutações que conferem escape dos anticorpos Anti-HBs na região S.

A presença da mutação de adenina para timidina na posição 1762 e de guanina para adenina na posição 1764 caracteriza mutação da região do promotor basal do core. Nas posições 1896 e 1899, a presença da seqüência “selvagem” foi denominada M0 (G1896 e G1899), a presença da mutação no nucleotídeo 1896 (G1896A) de M1, a presença de duas mutações (G1896A e G1899A) de M2 e a presença da mutação exclusiva do nucleotídeo 1899 de G1899A. Para identificação das mutações nas regiões S e Polimerase a seqüência de aminoácidos foi analisada.

A determinação das mutações foi realizada pela análise visual do alinhamento da seqüência do isolado “selvagem” contra as seqüências obtidas.

3.10.3 Filogenia

O genótipo do VHB foi reconfirmado e determinado por análises filogenéticas utilizando abordagem à distância (Neighbor Unir), executados pelo software (MEGA) Molecular Evolutionary Analysis Genetic (MEGA) versão 4.0 (<http://www.megasoftware.net/>) (Tamura *et al.*, 2007). A robustez dos grupos filogenéticos foi avaliada utilizando bootstrap de mil repetições. A mesma metodologia também foi usada para analisar as seqüências de aminoácidos. A identificação de mutações nas regiões da Polimerase e pré-S do VHB foram comparadas com uma seqüência de tipo selvagem do VHB. Dados da seqüência de nucleotídeos do presente estudo foram depositados no GenBank sob os números de adesão que segue: GU968715 GU968704 - GU968714 (região pré-core) e GU968715 - (S e região da polimerase).

3.11 Análise estatística

As possíveis associações entre os genótipos e as variáveis investigadas, e a presença de mutações relacionadas à resistência à lamivudina e as variáveis investigadas foram estudadas em duas etapas:

- análise univariada - o teste t de student e χ^2 .
- análise multivariada – regressão múltipla. Serão estudadas as variáveis que apresentaram $p < 0,20$, pela análise univariada.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos marcadores sorológicos para a infecção pelo vírus da hepatite B

Inicialmente foram identificados 3.374 pacientes matriculados e regularmente atendidos no “SEAP HIV/AIDS”, no período de maio de 2006 a maio de 2007.

A busca dos marcadores sorológicos para VHB nesses pacientes, em banco de dados eletrônico nos permitiu identificar pacientes com diferentes perfis sorológicos, detalhados na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Marcadores Sorológicos Gerais

Perfil Sorológico	Número de Pacientes
AgHBs reagente	120
AgHBs não reagente e:	
Anti-HBs- / Anti-HBc Total-	68
Anti-HBs- /Anti-HBc Total+	157
AntiHBs+/Anti-HBc T+	624
AntiHBs+/ Anti-HBc T-	344
Sorologia Indeterminada	312
Sorologia Não Encontrada †	242
Sorologia Não Encontrada ††	720
Sorologia Incompleta	787
Total de Pacientes	3374

† Dados não localizados em banco eletrônico

†† Dados não localizados em banco eletrônico e em busca a prontuários

Consideramos como “sorologia completa”, pacientes que apresentavam a presença de AgHBs, anti-HBs e anti-HBc na mesma data de coleta.

Desta forma identificamos 787 pacientes com sorologias incompletas, porém todos esses pacientes com sorologia considerada incompleta, eram AgHBs não reagentes, conforme Tabela 2 abaixo:

Tabela 2. Perfil Sorológico dos Pacientes com Sorologia Incompleta

Marcadores encontrados	Número de pacientes
AgHBs não reagente (dado isolado)	37
AgHBs não reagente e:	
Anti-HBs+	211
Anti-HBs-	161
Anti-HBc Total-	347
Anti-HBc Total+	15
AgHBs- / Anti-HBs (indeterminado)	16
TOTAL:	787 sorologias incompletas

Assim, entre os 3374 pacientes em atendimento na Casa da AIDS, excetuando-se 962 pacientes com sorologia não encontrada em banco de dados eletrônico e/ou prontuários, foram totalizados 2412 pacientes com resultados analisáveis em relação à presença do AgHBs.

Dos 2412 pacientes identificados, 120 (4,9%) apresentaram-se AgHBs reagentes em algum momento de seu seguimento clínico (Prevalência: 4,4 %; IC95%: 4,2 – 5,9). O tempo médio de seguimento desses pacientes foi de 5 anos e o número de avaliações sorológicas durante esse período variou de 1 a 5 coletas (em média 3 coletas distintas por paciente).

Dos 120 pacientes inicialmente AgHBs reagentes, observamos que 10 pacientes (8,3%) eram inicialmente AgHBs não-reagentes (quando iniciaram seguimento na Casa da AIDS) e tornaram-se AgHBs reagentes durante seu seguimento clínico.

Dos 120 pacientes inicialmente AgHBs reagentes (em algum momento do seguimento) 22 pacientes apresentaram completa soroconversão (AgHBs-/Anti-HBs) e 3 foram à óbito, quando avaliamos sorologias seqüenciais.

Identificamos então, em uma primeira etapa, 95 pacientes elegíveis para o estudo.

Dos 95 pacientes elegíveis, 74 pacientes compareceram para coleta de exames e questionário e foram incluídos em nosso estudo.

Após a inclusão em nosso estudo, observamos que entre os 74 pacientes, 59 permaneceram AgHBs reagentes.

Portanto, dos 120 pacientes inicialmente identificados, 3 foram a óbito, 37 (38,5%) soroconverteram para anti-HBs e 21 não compareceram quando convocados.

4.2 Características Demográficas, Epidemiológicas, Clínicas e Laboratoriais de 59 pacientes AgHBs reagentes, co-infectados pelo HIV

Em relação às características gerais demográficas, epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos 59 pacientes AgHBs reagentes de nossa casuística, seguem os resultados resumidos na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3. Características Demográficas, Epidemiológicas e Clínicas de 59 pacientes AgHBs reagentes, co-infectados pelo HIV

Variáveis Demográficas e Epidemiológicas	n	%
Sexo masculino	58	98,3%
Idade Média –(anos)	44,8	desvio padrão: 7,2 anos
Antecedente HSH	42	71,1%
Antecedente UDI	05	8,5%
Variáveis Clínicas		
Evidências de não adesão	05	8,5%
Antecedente uso ARV	59	100%
Antecedente uso lamivudina	56	95%
Antecedente uso tenofovir (TEN)	43	72,9%
Antecedente de uso de LAM ou TEN ou ENT ou IFN	56	95%
Antecedente uso de entecavir (ENT)	04	6,8%
Antecedente uso interferon (IFN)	09	15,2%
Variáveis Laboratoriais		
AgHBe reagente	31	Prevalência: 52,5%; IC95%: 39,1 – 65,7
Viremia VHB > ou = 60 UI/mL†	22	37,3%

† COBAS-AMPLICOR †† LSN-Limite Superior da Normalidade
HSH- Homens que fazem sexo com homens
UDI- Uso droga injetável ilícita

4.3 Características relativas a variáveis à infecção pelo VHB de 59 pacientes AgHBs reagentes, co-infectados pelo HIV

4.3.1 Características de AgHBe e carga viral de VHB

Entre os 59 pacientes AgHBs reagentes, 31 pacientes apresentaram-se AgHBe reagentes (Prevalência: 52,5%; IC95%: 39,1 – 65,7).

Entre os 59 pacientes AgHBs reagentes, o tempo de uso de lamivudina variou de 6 a 96 meses e o tempo de uso prévio de tenofovir variou de um a 34 meses.

Entre os 59 pacientes AgHBs reagentes, 22 (37,3%) apresentaram viremia positiva para DNA-VHB pelo método de nested PCR ou pelo método de COBAS AMPLICOR. Entre esses pacientes, 31 eram AgHBe reagentes (52,5%; CI95%: 39,1 – 65,7).

A maioria (86,4%) dos pacientes com viremia para DNA-VHB era AgHBe reagente, e somente 10,8% dos pacientes AgHBe não reagentes apresentaram viremia detectável para DNA-VHB. Observamos associação com significância estatística ($p < 0,001$) entre ser AgHBe reagente e apresentar viremia positiva para DNA-VHB (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição da viremia para VHB segundo soropositividade para AgHBe em pacientes co-infectados HIV-VHB

carga viral	AgHBe	
	negativo n°(%)	positivo n°(%)
<60	25 (89,3)	12 (38,7)
60 a 999	1 (3,6)	7 (22,6)
1.000 a 1999	1 (3,6)	1 (3,2)
2.000 a 19.999	1 (3,6)	1 (3,2)
20000	-	10 (32,3)
TOTAL	28 (100)	31 (100)

4.3.2 Genótipos de VHB por análise filogenética da região S/P e análise da região do core/ BCP / pré-core

Entre os 22 pacientes com viremia detectável para DNA-VHB, foi possível determinar o genótipo em 16 pacientes. A análise da árvore filogenética (Figura 9) demonstrou os seguintes genótipos: A – 12 (75%); D – 1 (6.25%); F – 1 (6.25%); G – 2 (12.50%).

A análise das seqüências de aminoácidos da região codificadora de AgHBs dos pacientes 6 e 14, classificados como VHB genótipo G, está mostrada na figura 10. Para o paciente 14, alguns sítios polimórficos foram identificados, sugerindo que esse paciente apresente uma população heterogênea de vírus.

No caso do paciente 14, não conseguimos obter uma seqüência de boa qualidade das regiões BCP / pré - core / core. Essa dificuldade de obtenção de uma seqüência de boa qualidade poderia ser explicada pelo fato de que esse paciente pudesse apresentar a presença concomitante dos genótipos A e G.

Uma seqüência de boa qualidade não foi obtida para o paciente 14 na região BCP/ pré-core/ core. Esta região do genoma viral apresenta características típicas do genótipo G: códons de parada de tradução nos aminoácidos 2 e 28 da região pré-core e uma inserção de 36 nucleotídeos (12 aminoácidos) na extremidade amino do HBcAg. A seqüência de baixa qualidade pode ser explicada pelo fato de que este paciente apresentava uma população viral mista, formada pelos genótipos A e G, em particular, devido à inserção característica do genótipo G presentes em alguns dos vírus circulantes

A análise do seqüenciamento das regiões BCP / pré - core / core é apresentada na Tabela 6. Esta reação mostrou a presença das seguintes mutações no BCP: A1762T / G1764A em dois pacientes e apenas G1764A em outros dois. Apenas um paciente apresentou a mutação G1896A na região pré - core. Esse foi o único caso de genótipo D em nossa casuística.

Para o paciente 6, a seqüência S / P foi claramente associada com outras seqüências de genótipo G na árvore filogenética, mas a região BCP/ pré - core/ core não mostrou nenhuma característica típica do genótipo G e era característico do genótipo de A.

4.3.3 Mutações de VHB na região S/P

As mutações identificadas nos genes codificadores da região S/P também se encontram na tabela 6. Mutações no códon 204 da transcriptase reversa do gene da polimerase do VHB foi observada: 9 pacientes apresentavam uma substituição de metionina para valina (rtM204V) e um deles apresentava uma substituição de metionina para isoleucina (rtM204I). Todos esses pacientes também apresentavam uma substituição de leucina para metionina na posição 180 (rtL180M). Associadas às mutações rtL180M e rtM204V, 3 pacientes também apresentavam uma substituição de leucina para valina (rtL80V) e 2 pacientes uma mutação com substituição de valina para leucina (rtV173L) no gene da polimerase.

Algumas mutações na região da polimerase do VHB levaram a alterações nos seguintes códons dos genes do AgHBs: sI195M (7 pacientes), sI195M/sE164D (2 pacientes), e sW196L (1 paciente).

4.4 Associações entre genótipos de VHB e algumas variáveis selecionadas

Para analisar as associações entre genótipos de VHB e algumas variáveis selecionadas, separamos os casos entre “genótipos A” e “genótipos não-A” devido ao pequeno número de casos envolvidos e pouca representatividade dos outros genótipos envolvidos. Não observamos

nenhuma associação significativa entre os genótipos analisados e as variáveis clínicas e epidemiológicas selecionadas (Tabela 7).

4.5 Associação entre as mutações na região da polimerase do VHB e algumas variáveis selecionadas

A única associação com significância estatística observada ocorreu entre a presença de mutações de VHB e uso de lamivudina ($p=0.04$). No entanto, não observamos outras associações com significância estatística quando a presença ou ausência de mutações na região da polimerase foi comparada com outras variáveis clínicas e epidemiológicas selecionadas (Tabela 5).

Tabela 5. Características relatadas na infecção pelo VHB em 22 pacientes com viremia positiva (VHB DNA)

Pt. nº	AgH Be	Carga Viral (IU/ml) [†]	Genótipo e subtipo VHB	Mutações de resistência à LAM no gene da Polimerase	Mutações no gene AgHBs	Mutações no BCP, pré-core e core	Uso LAM/TF
1	R	82	ND	ND	ND	ND	sim-sim
2	NR	131	ND	ND	ND	ND	sim-sim
3	R	>38,000	A (adw2)	rtL180M e rtM204V	sI195M	ND	sim-sim
4	R	>38,000	A (adw2)	rtL180M e rtM204V	sI195M	G1764A	sim-não
5	NR	11,100	A (adw2)	ausente	ausente	ausente	sim-não
6	R	>38,000	A-G (adw2)	ausente	ausente	ausente	sim-sim
7	R	>38,000	A (adw2)	ausente	ausente	A1762T e G1764A	sim-não
8	R	>38,000	D (ayw3)	ausente	ausente	A1762T, G1764A e G1896A	sim-sim
9	R	79	ND	ND	ND	ND	sim-sim
10	NR	1350	ND	ND	ND	ND	sim-não
11	R	238	ND	ND	ND	ND	sim-sim
12	R	>38,000	A (adw2)	rtL80V, rtL180M and rtM204V	sI195M	G1764A	sim-sim
13	R	>38,000	F (adw4)	absent	ausente	ausente	não-não
14	R	17,400	A - G (adw2)	rtV173L, rtL180M and rtM204V	sI195M/s E164D	ND	sim-sim
15	NR	265	A (adw2)	rtL180M and rtM204I	sW196L	ND	sim-não
16	R	38,000	A (adw2)	rtL80V, rtL180M and rtM204V	sI195M	ausente	sim-não
17	R	>38,000	A (adw2)	rtV173L, rtL180M and rtM204V	sI195M/s E164D	ausente	sim-sim
18	R	75	ND	ND	ND	ND	sim-sim
19	R	1,130	A (adw2)	rtL180M and rtM204V	sI195M	ND	sim-sim
20	R	>38,000	A (adw2)	ND	ND	ND	sim-sim
21	R	164	A (adw2)	rtL180M and rtM204V	sI195M	ND	sim-sim
22	R	905	A (adw2)	rtL80V, rtL180M and rtM204V	I195M	ausente	sim-sim

ND-Genótipo não determinado

R-Reagente

MNI-Mutação não identificada

NR-Não Reagente

† COBAS-AMPLICOR-VHB Quantitativo--UI/mL

†† nested PCR

Tabela 6. Distribuição das variáveis relativas a uso de medicamentos entre pacientes co-infectados HIV-VHB segundo genotipagem do vírus da hepatite B

variável	genótipo (n=16)		valor de p#
	A n°(%)	não A n°(%)	
uso prévio de lamivudina			0,19
não	-	1 (33,3)	
sim	13 (100)	2 (66,7)	
uso atual de lamivudina*			0,08
não	1 (8,3)	2 (66,7)	
sim	11 (91,7)	1 (33,3)	
uso de lamivudina 12 meses			0,19
não	-	1 (33,3)	
sim	13 (100)	2 (66,7)	
uso de tenofovir			>0,99
não	5 (38,5)	1 (33,3)	
sim	8 (61,5)	2 (66,7)	
uso de tenofovir 12 meses			>0,99
não	9 (69,2)	2 (66,7)	
sim	4 (36,4)	1 (33,3)	
uso de tenofovir 24 meses			0,19
não	13 (100)	2 (66,7)	
sim	-	1 (33,3)	
uso de entecavir			>0,99
não	11 (84,6)	3 (100)	
sim	2 (15,4)	-	
uso atual de entecavir			>0,99
não	12 (92,3)	3 (100)	
sim	1 (7,7)	-	
uso de IFN			>0,99
não	12 (92,3)	3 (100)	
sim	1 (7,7)	-	
uso atual de ARV			0,35
não	1 (7,7)	1 (33,3)	
sim	12 (92,3)	2 (66,7)	

dados ignorados: (*)1

#: teste exato de Fisher

Tabela 7. Distribuição das variáveis relativas a uso de medicamentos entre pacientes co-infectados HIV-VHB segundo presença ou ausência de mutação na região da polimerase do VHB

variável	mutação (n=16)		valor de p#
	não n°(%)	sim n°(%)	
uso prévio de lamivudina			0,38
não	1 (16,7)	-	
sim	5 (83,3)	10(100)	
uso atual de lamivudina*			0,04
não	3 (50,0)	-	
sim	3 (50,0)	9 (100)	
uso de lamivudina 12 meses			0,38
não	1 (16,7)	-	
sim	5 (83,3)	10(100)	
uso de tenofovir			0,61
não	3 (50,0)	3 (30,0)	
sim	3 (50,0)	7 (70,0)	
uso de tenofovir 12 meses			0,59
não	5 (83,3)	6 (60,0)	
sim	1 (16,7)	4 (40,0)	
uso de tenofovir 24 meses			>0,99
não	6 (100)	9 (90,0)	
sim	-	1 (10,0)	
uso de entecavir			0,50
não	6 (100)	8 (80,0)	
sim	-	2 (20,0)	
uso atual de entecavir			>0,99
não	6 (100)	9 (90,0)	
sim	-	1 (10,0)	
uso de IFN			>0,99
não	6 (100)	9 (90,0)	
sim	-	1 (10,0)	
uso atual de ARV			0,13
não	2 (33,3)	-	
sim	4 (66,7)	10 (100)	

dados ignorados: (*)1

#: teste exato de Fisher

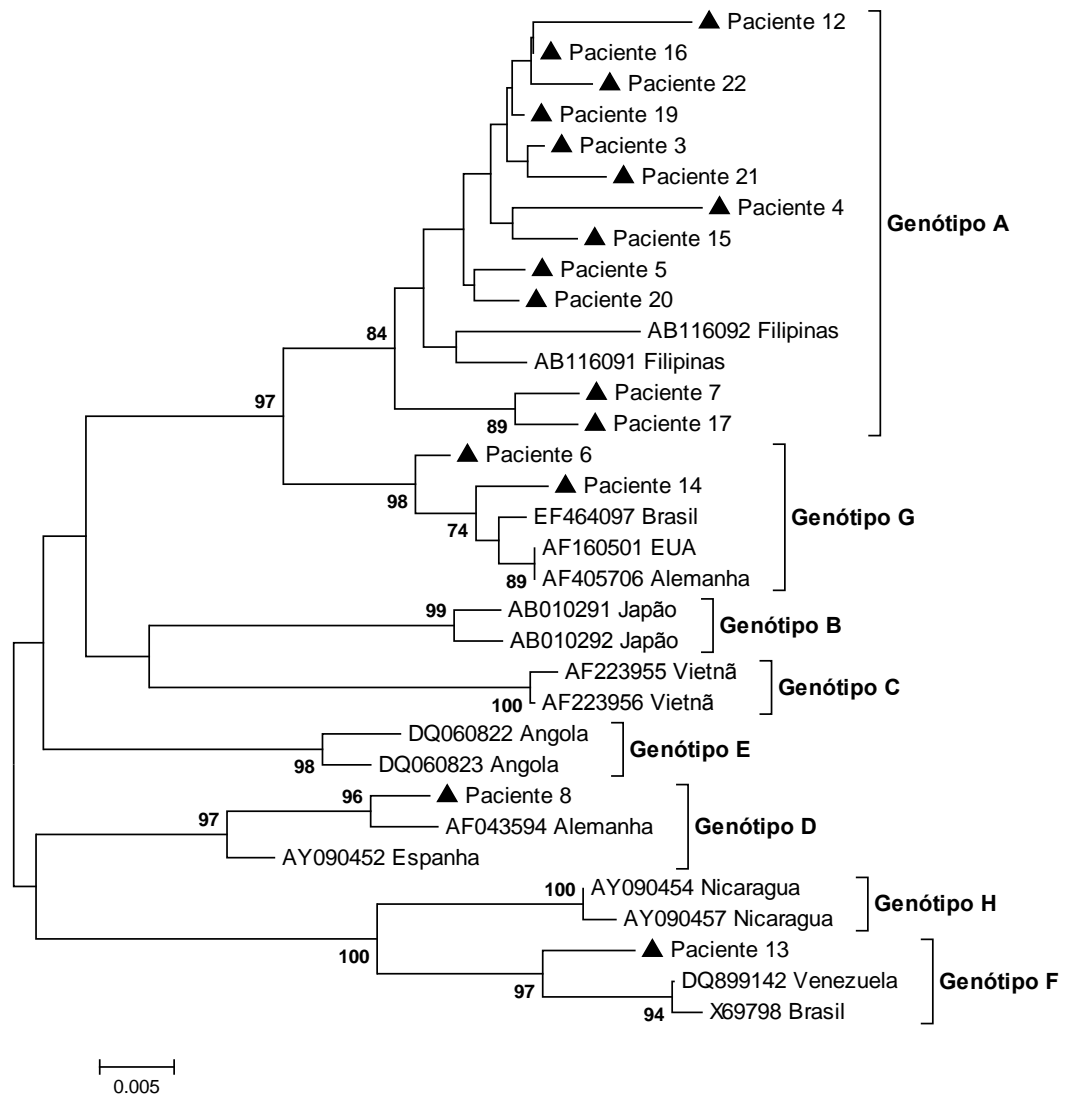


Figura 9. Árvore filogenética demonstrando a classificação dos genótipos do VHB nas amostras caracterizadas neste trabalho. A topologia foi obtida com 33 seqüências parciais dos genes S e Polimerase do VHB (17 de diferentes genótipos obtidas no “GenBank” que são apresentadas com o número de acesso seguido pelo país de origem e 16 caracterizadas neste estudo que estão destacadas com um triângulo). A análise foi realizada utilizando o programa MEGA4 com o método “Neighbor-Joining” e o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros. Os valores em porcentagem apresentados no ramos representam os valores de “bootstrap” obtidos com 1000 replicações.

	53	63	73	83	93	103	113	123			
G_AB056513_USA	SQSPTS	NHSP	ISCPPTCPGY	RWMC	LRRFII	FLFILL	LCLI	FLLVLLDYQG	MLPVCPLIPG	SSTTSTGPCK	TCTTPAQGNS
G_AB056515_USA
G_AB064313_USA
G_AF405706_Germany
G_AP007264_Japan
G_DQ207798_Germany
G_EF464097_Brazil
G_EF464098_Brazil
G_EF464099_Brazil	T.....	I.....
Patient_6
Patient_14
A_AB116092_Philippines	T.....	I.....T.....
A_AB116091_Philippines	T.....	I.....T.....	T.R.....

	133	143	153	163	173	183	193	203				
G_AB056513_USA	MYPSCCCTKP	SDGNCTCIPI	PSSWAF	AKYL	WEWASV	RFSW	LSLLV	PFVQW	FVGLSPTVWL	SAIWM	MYWG	PNLYNILSP
G_AB056515_USA	I.....	E.....
G_AB064313_USA
G_AF405706_Germany
G_AP007264_Japan
G_DQ207798_Germany
G_EF464097_Brazil
G_EF464098_Brazil	M.....
G_EF464099_Brazil	M.....
Patient_6	S.....
Patient_14	S.....
A1_AB116092_Philippines	.F.....	T.....	G...F.	C.....	L.....	S.....
A1_AB116091_Philippines	.F.....	T.....	S.....

Figura 10. Seqüência de aminoácidos de parte da seqüência genômica do AgHBs de dois pacientes com genótipo G

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de resistência aos medicamentos antivirais é um enorme desafio para o tratamento da hepatite B. Em nosso estudo, a presença de mutações no genoma do VHB associadas à resistência ao uso da lamivudina foi freqüente. Observamos essas mutações entre 10 dos 22 pacientes com viremia detectável. Entre estes, todos estavam usando lamivudina e sete estavam usando tenofovir. A duração de utilização de tenofovir variou de 1 a 34 meses, enquanto a utilização da lamivudina variou de 6 a 96 meses.

Tenofovir e lamivudina são medicamentos extremamente eficientes na redução da viremia do VHB em pacientes mono-infectados pelo VHB (Marcelin *et al.*, 2008) e em pacientes co-infectados pelo HIV (Matthews *et al.*, 2008). No entanto, em pacientes com antecedente de uso prévio de lamivudina, o uso de tenofovir pode eventualmente levar a uma menor velocidade na queda da viremia do VHB. Em alguns casos, a negatividade de viremia nesses pacientes pode ocorrer tardiamente, depois de até 24 meses de tratamento contínuo com ambos os medicamentos (Lada *et al.*, 2008; Tuma *et al.*, 2008; Lacombe *et al.*, 2009). Este fato provavelmente explica a presença de viremia do VHB detectável em pacientes em uso de lamivudina e tenofovir observada em nossa casuística, pois todos os pacientes em uso de tenofovir tinham antecedente de uso prévio e prolongado da lamivudina, em monoterapia.

Outra explicação para a presença de viremia do VHB nesta população é possível não-adesão à medicação prescrita. A análise dos dados desses pacientes mostrou que cinco entre os 59 pacientes incluídos relatavam falhas eventuais no uso da medicação antiretroviral.

Considerando-se as mutações observadas na região da transcriptase reversa do gene da polimerase, a mutação rtM204V foi observada em nove pacientes enquanto que a mutação rtM204I foi observada em apenas um paciente. O único paciente que apresentou a mutação rtM204I também apresentou a mutação rtL180M e a mutação sW196L na região do envelope.

Em relação às mutações observadas na região da transcriptase reversa do gene da polimerase, foram identificados três padrões: rtL180M + rtM204V (1 paciente), rtL180M + rtT184S/L + rtM204V (3 pacientes), rtL80V + rtL180M + rtM204V (3 pacientes) e rtV173L + rtL180M + rtM204V (2 pacientes).

Sabe-se que o padrão de mutação rtV173L + rtL180M + rtM204V, visto em dois de nossos pacientes, pode estar associado à presença das mutações sI195M e sE164D, na região codificadora do AgHBs (Torresi, 2002). Cepas de VHB que apresentam essas mutações na região do envelope podem apresentar uma capacidade reduzida de ligação ao anti-HBs in vitro. Esta é uma característica semelhante à observada na cepa de VHB associada a escape vacinal e que apresenta a mutação sG145R.

Foi também interessante observar em nosso estudo que os dois pacientes com a tripla combinação de mutações no gene da polimerase: rtV173L + rtL180M + rtM204V também apresentaram as mutações sE164D e sI195M na região do envelope do VHB.

Na verdade, não sabemos ao certo se as cepas de VHB que apresentam essas mutações e antigenicidade diminuída de anti-HBs poderiam realmente neutralizar a ação dos anticorpos anti-HBs e causar infecção em indivíduos previamente vacinados para VHB (Matthews *et al.*, 2006; Torresi, 2002).

Diferentes estudos, em diferentes regiões do mundo, têm avaliado a presença e a importância clínica destas mutações em populações de pacientes co-infectados HIV-VHB (Matthews *et al.*, 2006; Soriano *et al.*, 2008). No Brasil até o momento, poucos estudos avaliaram esta questão (Santos *et al.*, 2004; Sucupira *et al.*, 2006; Bottecchia *et al.*, 2008; Mendes-Correa *et al.*, 2008). Caso a presença dessas mutações esteja de fato associada a um comportamento de “escape vacinal”, elas poderiam representar um enorme desafio e ameaça à saúde pública. Na verdade, são necessários estudos em larga escala avaliando a presença dessas mutações e sua capacidade de disseminação na população. Essa avaliação seria especialmente importante nas populações de maior risco de exposição ou de maior risco de complicações, como o grupo dos pacientes com imunossupressão, entre eles os infectados pelo HIV.

Também observamos em nossa casuística quatro pacientes que apresentavam mutações na região pré-core e/ou promotora do core. Dois pacientes apresentaram as mutações A1762T e G1764A e dois pacientes apresentaram somente a mutação G1764A. Somente um paciente apresentou a mutação G1896A na região pré-core. Esse padrão de mutação nas regiões do pré-core e/ou promotora do core, são normalmente

observadas em pacientes não reagentes para AgHBe. No entanto, todos esses pacientes eram AgHBe reagentes. Uma possível explicação para esse fato talvez fosse a presença concomitante de diferentes populações de vírus nesses pacientes, onde menores populações virais, que não apresentavam essas mutações, pudessem manter a reatividade para AgHBe nas amostras analisadas.

Em nossa casuística observamos que, a maioria dos pacientes com viremia detectável para DNA-VHB (86.4%) era reagente para AgHBe. A maioria deles era do sexo masculino, relatando manter múltiplas relações sexuais, com parceiros do mesmo sexo e habitualmente sem proteção.

Nossos dados também mostraram associação entre a reatividade para AgHBe e viremia detectável por VHB acima de 20.000 UI / mL ($p < 0,001$). Essa associação já era conhecida em pacientes mono-infectados pelo VHB (Lok e McMahon 2009). Poucos autores avaliaram essa questão entre os pacientes co-infectados pelo HIV (Soriano *et al.*, 2008 Matthews *et al.*, 2009). Esse achado tem significativa importância clínica, principalmente em locais onde a determinação da carga viral para VHB não seja disponível.

Fomos capazes de determinar os genótipos em 16 dos pacientes com viremia detectável para VHB. Entre estes, 12 apresentavam o genótipo A (75%). Também identificamos dois casos de genótipo G (13%), um caso de genótipo D e um caso de genótipo F.

Em relação aos genótipos identificados, é importante ressaltar que o predomínio do genótipo A nessa população devem ser analisado com cautela. Na realidade, não sabemos os genótipos da maioria dos pacientes,

pois apenas 22 apresentaram viremia detectável, entre os 59 pacientes analisados. Mesmo assim, só foi possível analisar o genótipo em 16 pacientes. Podemos concluir apenas que entre os pacientes com viremia detectável, o genótipo A foi predominante. É possível que outros genótipos predominem entre os pacientes com os genótipos não-identificados.

No Brasil, a presença do genótipo G tem sido raramente descrita (Bottecchia *et al.*, 2008; Mendes-Correa *et al.*, 2008; Lobato *et al.*, 2006). Bottecchia *et al.* identificaram este genótipo em um paciente mono-infectado pelo VHB e em dois pacientes co-infectados pelo HIV. Nosso estudo é o segundo a identificá-lo entre os pacientes co-infectados no Brasil. A presença de VHB-G tem sido associado por alguns autores, com o antecedente de relacionamento sexual entre homens (homens que fazem sexo com homens) (Sanchez *et al.*, 2007). Os dois pacientes em nosso estudo portadores deste genótipo eram do sexo masculino e relatavam praticar sexo com outros homens. Este achado pode reforçar a hipótese de que a transmissão do VHB-G possa estar associada com este comportamento sexual. Estudos adicionais, com amostras populacionais maiores, são necessários para comprovar esse tipo de associação.

O genótipo G tem sido associado com a presença de dois códons de parada de tradução na região pré-core do VHB, que parecem impedir a síntese do AgHBe (Kato *et al.*, 2002). Em nossa amostra, os dois pacientes com este genótipo eram reagentes para AgHBe. Uma possível explicação para esse fato é que esses pacientes apresentam infecção por mais de uma cepa viral. Essa hipótese parece reforçada pelo fato de que os resultados

observados no seqüenciamento dessas amostras sugerem co-infecção com genótipo A. Outra explicação alternativa é a presença de infecção com um vírus recombinante entre os genótipos A e G nos dois pacientes identificados inicialmente apenas como infectados pelo genótipo G (pacientes 6 e 14). No caso do paciente 6, o seqüenciamento de S/P sugeria genótipo G na árvore filogenética, mas o seqüenciamento das regiões BCP/pré core/core era característico de genótipo A e não revelava qualquer característica de genótipo G.

No caso do paciente de número 14, observamos a presença de dois picos em algumas posições no cromatograma, o que significa que dois nucleotídeos diferentes foram identificados. Neste paciente, essas ambigüidades fortemente sugerem a presença de co-infecção pelos genótipos A e G, mas para esclarecer definitivamente este fato é necessária a clonagem de produtos de PCR e seu posterior seqüenciamento visando à observação de seqüências de alta qualidade representando os diferentes genótipos nos diferentes clones. Outras opções para resolver esta questão são o seqüenciamento de produtos de PCR obtidos por diluição terminal ou a realização de PCR específico para cada um dos genótipos do VHB.

No entanto, nosso estudo apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, este foi um estudo transversal, que não permitiu uma análise seqüencial das amostras e a demonstração da emergência evolutiva de mutações. Em segundo lugar, não foi possível avaliar a presença dessas mutações, mesmo antes do uso da terapia antiviral. Também não conseguimos observar nenhuma associação significativa entre os genótipos

ou mutações observadas e as variáveis clínicas analisadas. Este fato é provavelmente devido ao pequeno número de pacientes estudados. É possível que se tivéssemos incluídos um maior número de pacientes, pudéssemos ter observado alguma associação mais significativa.

Em resumo, entre os pacientes co-infectados com HIV e VHB foi observada uma alta prevalência de mutações associadas à resistência à lamivudina.

Observamos também uma associação entre a presença de AgHBe e a presença de carga viral elevada para VHB. O genótipo G, raramente descritos em nosso meio, também foi observado em nosso estudo.

6 CONCLUSÕES

- 1 - Entre os pacientes co-infectados pelo HIV-VHB incluídos em nosso estudo e em uso de terapia antiretroviral, houve uma alta prevalência de mutações associadas à resistência à lamivudina

- 2 - O genótipo G, raramente descrito em nosso meio, foi observado no grupo de pacientes analisado.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A

HOSPITAL DAS CLINICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE:

DOC. DE IDENTIDADE No

ENDEREÇO

BAIRRO

CEP:

SEXO:

DATA NASC:

No.

APTO

CIDADE:

TELEFONE:

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA: (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOC. DE IDENTIDADE:

ENDEREÇO

BAIRRO

CEP:

SEXO: DATA NASC:

No.

APTO

CIDADE:

TELEFONE:

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CLINICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Estudo da distribuição genotípica e de mutações no genoma do vírus da hepatite B em pacientes co-infectados pelos vírus da hepatite B e HIV, na Casa da AIDS, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2. PESQUISADOR: Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente

INSC. CONS. REGIONAL No **52275**

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias - Casa da AIDS

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

SEM RISCO: RISCO MÍNIMO: RISCO MÉDIO: RISCO MAIOR:

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: Seis meses para coleta dos dados

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. Justificativa e Objetivos da pesquisa

Estudar a frequência dos diferentes “tipos” de vírus da hepatite B em pacientes que tenham as duas infecções: hepatite B e HIV. Estudar a relação que existe entre esses tipos de vírus e a gravidade da doença no fígado causada por eles. Estudar se existe resistência desse vírus a um tipo de medicamento utilizado para tratar a hepatite B.

2. Procedimentos

Para poder participar deste estudo, você precisa ser um adulto portador de hepatite crônica B e do vírus da imunodeficiência humana (HIV), e preencher todas as características exigidas pelo protocolo. O seu médico irá avaliar se você tem essas

características, e após a explicação de todos os procedimentos, você poderá decidir se quer ou não participar.

Caso você deseje participar do estudo, uma amostra de seu sangue será coletada para que alguns exames relativos à sua infecção pelo vírus da hepatite B sejam realizados.

Esses exames são a genotipagem e quantificação do seu VHB. Isso significa que será realizada uma contagem da quantidade de vírus da hepatite B e também se procurará conhecer o tipo de vírus B que você carrega.

Será também realizado exame para se tentar verificar, se o vírus da hepatite B que você tem, apresenta mutações que determinam resistência a um dos medicamentos usados para o tratamento da hepatite B.

Esses exames não são realizados de forma rotineira no tratamento de pessoas com seu problema. Em alguns lugares do mundo esses exames já são realizados para todos os pacientes, pois eles podem fornecer informações que podem ajudar no seu atendimento e na escolha de medicamentos para sua hepatite B.

Os riscos envolvidos na coleta de sangue são: hematoma no local da punção e dor. Sua participação no estudo é voluntária.

Caso você não deseje participar do estudo, não haverá qualquer modificação no seu atendimento médico na Casa da AIDS.

3. Benefícios

As informações obtidas através desse estudo podem ser importantes para o seu atendimento médico e também você poderá estar ajudando futuros pacientes pela possibilidade de proporcionar informações importantes para o seguimento e tratamento da hepatite B crônica em pacientes co-infectados com o HIV.

4. Desconforto e Riscos

Coleta de Sangue: a coleta de sangue é levemente dolorosa e pode causar hematomas e, muito raramente, desmaio, coágulos sangüíneos ou uma infecção no local da injeção

5. Alternativas.

Não há nenhum outro meio de obtermos as informações para o seu seguimento ou tratamento além das medidas que esse estudo propõe.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Você terá garantia, a qualquer tempo, que receberá as informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecimentos de qualquer dúvida.
2. Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Você pode recusar a participar do estudo ou poderá descontinuar sua participação do mesmo, a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou perda dos benefícios aos quais de outra forma faria jus. A Dra. Maria Cássia Corrêa irá prontamente aconselhá-lo sobre as opções alternativas de seguimento que sejam consideradas apropriadas e o melhor meio de interromper sua participação. Sua participação neste estudo será mantida em caráter confidencial e seu nome não será revelado a ninguém que não seja do estudo. Entretanto, autoridades governamentais nacionais responsáveis pela segurança e conduta ética dos estudos com seres humanos, poderão revisar os registros do estudo, e os registros poderão ser submetidos à divulgação decorrente de outras ordens ou requisitos governamentais. Caso os resultados deste estudo sejam publicados na literatura médica, você não será identificado nominalmente, sendo sua confidencialidade garantida em todas as ocasiões. O comitê de ética poderá ter acesso direto ao seu prontuário médico para verificação dos procedimentos de finalização de sua participação no estudo possam ser iniciados..
3. Você compreende que a Dra. Maria Cássia Corrêa tem o direito de interromper sua participação neste estudo, caso você não siga as instruções do mesmo, ou se considerar que esta interrupção seria de maior benefício para você. Caso seja descoberta qualquer nova informação significativa sobre sua doença enquanto este estudo estiver sendo desenvolvido, você será imediatamente informado e poderá decidir continuar ou interromper sua participação.

Caso você venha apresentar indicação de internação hospitalar, durante o período de estudo, ela será feita preferencialmente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Você será incentivado a fazer perguntas, em qualquer ocasião durante o estudo. Caso você tenha perguntas sobre o estudo ou sobre seus direitos como paciente, por entre em contato com a Dra. Maria Cássia Jacintho M. Corrêa, ou Dra. Maria Cristina Guastini ou Dra. Maria Luiza Paes Brussi no telefone (11) 3120-5290.

VI OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

NENHUMA

VII CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO:

Eu li este Termo de Consentimento Livre e esclarecido e tive a oportunidade de discuti-lo com um dos membros da pesquisa. Todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu fui informado sobre os riscos e benefícios e concordo de livre e espontânea vontade em participar deste estudo.

Eu entendo que posso sair do estudo a qualquer momento e que isso não afetará meu tratamento futuro.

São Paulo, de _____ de _____

Data ____/____/____

Assinatura do paciente ou seu representante legal

Data ____/____/____

Assinatura do Investigador que obteve o Consentimento, sob carimbo

Data ____/____/____

7.2 ANEXO B

Data da entrevista: __/__/__

Nome: _____

R.G. HC-FMUSP: _____

Sexo 1-Masculino 2-Feminino

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: anos

Cor:

1-Branca 2-Negra 3-Amarela

1-O (a) Sr.(a) já recebeu transfusão de sangue ou derivados (plasma, imunoglobulina, plaquetas, etc) ?

1. sim 2. não 3. não sabe

2-O (a) Sr.(a) já precisou fazer diálise?

1. sim 2. não

3-O (a) Sr.(a) já fez acupuntura?

1. sim 2.não

4-O (a) Sr.(a) já fez tatuagem ?

1. sim 2.não

5-O (a) Sr.(a) tem *piercing*?

1. sim 2.não

6-O (a) Sr.(a) já manipulou ou teve contato com sangue humano ?

1. sim 2.não

7-O (a) Sr. (a) já usou drogas ilícitas?

1. Sim 2. Não Se não passe para o ítem 9

Quais os tipos de drogas o (a) Sr. (a) já usou?

1- Maconha 1. Sim 2. Não

2-Inalatória 1. Sim 2. Não

3-Crack 1. Sim 2. Não

4-Injetável 1. Sim 2. Não

Outras.....

8-O(a) Sr. (a) usa/usou drogas em grupo, compartilhou seringas ou “canudos”?

1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

9-O (a) Sr. (a) já teve relacionamento sexual:

1.Sim 2.Não

10-Em relação aos seus hábitos sexuais como o(a) Sr.(a) se considera:

1. Heterossexual 2.Homossexual 3.Bissexual

11-O(a) Sr. (a) já teve algum parceiro sexual infectado pelo HIV?

1. Sim 2. Não 3. Não Sabe

12-O (a) Sr.(a) já teve relacionamento homossexual?

1. Sim 2. Não

8 REFERÊNCIAS

Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology*. 1998 Jun;27(6):1670-7.

Almeida EM. Aspectos bioquímicos da infecção pelo vírus da hepatite B. 2007. In: www.cienceduc.com/servicos-online/.../51-monografia-hepatite-b.html.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*. 2002;83:2059–2073.

Benhamou Y, Bochet M, Thibaut V. Long-term incidence of hepatitis B virus resistance to lamivudine in human immunodeficiency virus-infected patients. *Hepatology*, 1999 Nov;30(5):1302-6.

Benhamou Y. Hepatitis B in the HIV-coinfected patient. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;1:S57-65.

Bonacini M, Louie S, Bzowej N, Wohl AR. Survival in patients with HIV infection and viral hepatitis B or C: a cohort study. *AIDS*. 2004;18:2 039-45.

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

Braga WS, Brasil LM, de Souza RA, Castilho Mda C, da Fonseca JC. The occurrence of hepatitis B and delta virus infection within seven Amerindian ethnic groups in the Brazilian western Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001 Jul-Aug;34(4):349-55.

Braga WS, Silva EB, Souza RA, Tosta CE.. Seroprevalence of hepatitis B and malaria infection in Labrea, Brazilian western Amazon: estimates of coinfection rates. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005 May-Jun;38(3):218-23.

Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol.* 2009;15(46):5761-5769.

Carey WD. The prevalence and natural history of hepatitis B in the 21st century. *Cleve Clin J Med.* 2009 May;76 Suppl 3:S2-5.

Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JRR, Mello IM, Bertolini DA, Lemos MF, Moreira RC, Bassit LC, Cardoso RA, Santos GR, da Silva LC. Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health.* 2004 Apr 27;4:13.

Chen CH, Wang JT, Lee CZ, Sheu JC, Wang TH, Chen DS. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in human sera by branched-DNA signal amplification. *J Virol Methods.* 1995; 53: 131-7.

Chen T, Luk JM, Cheung ST, Yu WC, Fan ST. Evaluation of quantitative PCR and branched-chain DNA assay for detection of hepatitis B virus DNA in sera from hepatocellular carcinoma and liver transplant patients. *J Clin Microbiol.* 2000; 37: 68-73.

Chotiyaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009 Aug;6(8):453-62.

Clarke B, Bloor S. Molecular Genotyping of Hepatitis B Virus. *J.Clinl Virol.* 2002; 25:S41-S45.

Conde SR, Mória Lde J, Barbosa MS, Amaral Ido S, Miranda EC, Soares Mdo C, Brito EM, Souza Odo S, de Araújo MT, Demachki S, Rebello JR, Mesquita MG, Denis AB, Ishak R. Prevalence of hepatitis B virus genotypes and the occurrence of precore mutation A-1896 and to correlate them with the clinical presentation of chronic hepatitis, in a population group of the Eastern Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37 Suppl 2:33-9.

da Silva LC, Pinho JR, Sitnik R, da Fonseca LE, Carrilho FJ. Efficacy and tolerability of long-term therapy using high lamivudine doses for the treatment of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol.* 2001;36:476-486.

Decker RH. Diagnosis of acute and chronic hepatitis B. In: ZUCKERMAN AJ, THOMAS HC, editors. *Viral hepatitis: Scientific basis and clinical management.* 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998. p. 201-15.

Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998; 8:175-185

Focaccia R, da Conceição OJ, Sette H Jr, Sabino E, Bassit L, Nitri DR, Lomar AV, Lorengo R, Vieira de Souza F, Kiffer CR, Santos EB, Gonzales MP, Sáez-Alquézar A, Riscal JR, Fischer D. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *Braz J Infect Dis.* 1998 Dec;2(6):269-284.).

Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection – Natural history and clinical consequences. *The New England Journal of Medicine.* 2004;350:1118-1129.

Gerken G, Gomes J, Lampertico P, Colombo M, Rothaar T, Trippler M, Colucci G. Clinical evaluation and applications of the amplicor HBV monitor test, a quantitative VHB DNA PCR assay. *J Virol Methods* 1998; 74: 155-65.

Gordon D, Abajian C, Green P. Consed. A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Research*. 1998; 8:195-202

Gust ID, Burrell CJ, Coulepis AG, Robinson WS, Zuckerman AJ. Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology*. 1986;25(1):14-29.

Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis*. 1991;11:73-83.

Idoko J, Meloni S, Muazu M, Nimzing L, Badung B, Hawkins C, Sankalé JL, Ekong E, Murphy R, Kanki P, Thio CL. Impact of hepatitis B virus infection on human immunodeficiency virus response to antiretroviral therapy in Nigeria. *Clin Infect Dis*. 2009 Oct 15;49(8):1268-73

Kann M, Gerlich W. Hepadnaviridae. Structure and molecular virology. **In:** Zuckerman AJ, Thomas HC. *Viral Hepatitis 2nd Ed*. London, Churchill Livingstone, 1998, pp.77-105.

Kao Jia-Horng. Hepatitis B viral genotypes; Clinical relevance and molecular characteristics. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2010; 17:643-650.

Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J Virol*. 2002;76:6131-6137.

Kramvis A, Weitzmann L, Owirendu WK, Kew MC. Analysis of the complete genome of subgroups hepatitis B virus isolates from South Afric. *J Gen Virol*. 2002;80:835-9.

Lacombe K, Gozlan J, Boyd A, Bonhard P, Molina JM, Mialhes P, Lascoux-Combe, Cizoulim F, Pacanowiski J, Girardi PM. HBV Blippers and Rebounders under Treatment with Tenofovir in HIV/VHB Co-infection. *Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections*. 2009. Abstract 100.

Lada O, Gervais A, Branger M. Combination Therapy of Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF) Plus Lamivudine (LAM) or TDF Plus Emtricitabine (FTC) Is Associated With Early Virologic Response in HIV/HBV Co-Infected Patients. *Hepatology*. 2008;48:720A.

Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treat, and current and emerging and control measures. *Journal of Viral hepatitis*. 2004;11:97-107.

Lobato C, Tavares-Neto J, Rios-Leite M, Trepo C, Vitvitski L, Parvaz P, Zoulim F, D'Oliveira A Jr, Paraná R. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21:863-868.

LOK ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007;45:507-539.

Lyra AC, Pinho JR, Mello IM, de M Malta F, Gomes MM, Di Bisceglie AM, Lyra LG, Carrilho FJ, da Silva LC. Distribution of hepatitis B virus (VHB) genotypes among patients with acute viral hepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2005 Jan;39(1):81-2.

Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, Gane E, de Man RA, Krastev Z, Germanidis G, Lee SS, Flisiak R, Kaita K, Manns M, Kotzev I, Tchernev K, Buggisch P, Weilert F, Kurdas OO, Shiffman ML, Trinh H, Washington MK, Sorbel J, Anderson J, Snow-Lampart A, Mondou E, Quinn J, Rousseau F. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. 2008;359:2442-2455.

Matthews GV, Bartholomeusz A, Locarnini S, Ayres A, Sasaduesz J, Seaberg E, Cooper DA, Lewin S, Dore GJ, Thio CL. Characteristics of drug resistant VHB in an international collaborative study of HIV-HBV-infected individuals on extended lamivudine therapy. *AIDS*. 2006;20:863-870.

Matthews GV, Avinhigsanon A, Lewin SR, Amin J, Reknimitr R, Petharapirat P, Marks P, Sasadeuzs J, Cooper DA, Bowden S, Locarnini S, Ruxrunghtan K, Dore GJ. A randomized trial of combination hepatitis B therapy in HIV/HBV coinfecting antiretroviral naïve individuals in Thailand. *Hepatology*. 2008;48:1062-1069.

McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2009 May;49(5 Suppl):S45-55.

Mendes-Correa MC, Barone AA, Cavaleiro NP, Tengan FM, Guastini C. Prevalence of hepatitis B and C in the sera of patients with HIV infection in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42:81-5.

Mendes-Correa MC, Pinho JR, Leite OHM, Gonzaga-Filho L, Leite AG, Silva MH, Sitnik R, Uip DE. Hepatitis B Genotype distribution and high frequency of lamivudine resistance mutations in Brazilian HIV/Hepatitis B virus infected patients. *Hepatology* 2008;48:538A.

Mendes-Corrêa MC, Núñez M. Management of HIV and hepatitis virus co-infection. *Expert Opin Pharmacother*. 2010 Jul 14.

Monteiro MR, do Nascimento MM, Passos AD, Figueiredo JF. Seroepidemiological survey of hepatitis B virus among HIV/AIDS patients in Belém. Pará-Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37:27-32.

Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:4398-402.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1998; 69:2575-2583

Ou, JH, Laub, O, Rutter, WJ. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc.Natl Acad. Sci. USA.* 1986;83:1578-1582.

Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology.* 2002;122(6):1554-1568.

Pawlotsky JM. Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets. *J Hepatol.* 2006;44(1 Suppl):S10-3.

Pereira LM, Martelli CM, Merchán-Hamman E, Montarroyos UR, Braga MC, De Lima ML, Cardoso MR, Turchi MD, Costa MA, De Alencar LC, Moreira RC, Figueiredo GM, Ximenes RA. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:240-247.

Portelinha Filho AM, do Nascimento CU, Tannouri TN, Troiani C, Ascêncio EL, Bonfim R, D'Andrea LA, Prestes-Carneiro LE. Seroprevalence of HBV, HCV and HIV co-infection in selected individuals from state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:960-3

Rezende RE, Fonseca BAL, Ramalho LNZ, Zucoloto S, Pinho JRR, Bertolini DA, Martinelli ALC. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis. *J Clin Virol.* 2005 Jan;32(1):53-9.

Ribeiro NR, Campos GS, Angelo AL, Braga EL, Santana N, Gomes MM, Pinho JR, De Carvalho WA, Lyra LG, Lyra AC. *Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. Liver Int.* 2006 Aug;26(6):636-42

Rotman Y, Brown TA, Hoofnagle JH. Evaluation of the patient with hepatitis B. *Hepatology.* 2009 May;49(5 Suppl):S22-7

Sanchez LV, Tanaka Y, Maldonado M, Mizokami M, Panduro A. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of mexican patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G. *Intervirol.* 2007;50: 9–15.

Santos EA, Sucupira MV, Arabe J, Gomes J, Gomes SA. Hepatitis B virus variants in an HIV-HBV co-infected patient at different periods of antiretroviral treatment with and without lamivudine. *BMC Infect Dis.* 2004;31:4-29.

Seignères B, Pichoud C, Martin P, Furman P, Trépo C, Zoulim F. Inhibitory activity of dioxolane purine analogs on wild-type and lamivudine-resistant mutants of hepadnaviruses. *Hepatology.* 2002 Sep;36(3):710-22.

Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Ver.* 2006;28:112-125.

Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, Silva LCS, Carrilho FJ. Hepatitis B vírus genotypes and precore and core mutants in brazilian patients. *J.Clin.Microbiol* 2004;42:2455-2460.

Sjogren M, Hoofnagle JH. Immunoglobulin M antibody to hepatitis B core antigen in patients with chronic type B hepatitis. *Gastroenterology.* 1985;89:252-8.

Soriano V, Puoti M, Peters M, Benhamou Y, Sulkowski M, Zoulim F, Rockstrom J. Care of HIV patients with chronic hepatitis B: updated recommendations from the HIV-Hepatitis B Virus International Panel. *AIDS*. 2008;22:1399-1410.

Soriano V, Tuma P, Vispo E, Labarga P, Fernández JV, Medrano J, Barreiro P. Hepatitis B in HIV patients: what is the current treatment and what are the challenges? *J HIV Ther*. 2009;14:13-8.

Souza MG, Passos AD, Machado AA, Figueiredo JF, Esmeraldino LE. HIV and hepatitis B virus co-infection: prevalence and risk factors. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37:391-395.

Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology*, 2001 Mar;33(3):751-7

Sucupira MV, Mello FC, Santos EA, Niel C, Rolla VC, Arabe J, Gomes SA. Patterns of hepatitis B virus infection in Brazilian human immunodeficiency virus infected patients: high prevalence of occult infection and low frequency of lamivudine resistant mutations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:655-60.

Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978 Sep;75(9):4533-7

Summers J, Mason WS. Replication of the genome of hepatitis B – like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*. 1982; 29(2): 403-15.

Tavares-Neto J, Almeida D, Soares MC, Uchoa R, Viana S, Darub R, Farias E, Rocha G, Vitvitski L, Paraná R. Seroprevalence of hepatitis B and C in the

Western Brazilian Amazon region (Rio Branco, Acre): a pilot study carried out during a hepatitis B vaccination program. *Braz J Infect Dis.* 2004 Apr;8(2):133-9.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mole Biol Evol.* 2007; 24:1596-9

Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis.* 2010 Feb;14(1):1-21, vii. Review.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:4876-82

Tiollais P, Vyas G, Charnay P. Biology of hepatitis B virus. *Science.* 1985; 213:406-411.

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

Tovo CV, Dos Santos DE, de Mattos AZ, de Almeida PR, de Mattos AA, Santos BR. Ambulatorial prevalence of hepatitis B and C markers in patients with human immunodeficiency virus infection in a general hospital. *Arq Gastroenterol.* 2006;43:73-76.

Tuma P, Bottecchia M, Sheldon J. Prior Lamivudine (LAM) Failure May Delay Time to Complete HBV-DNA Suppression in HIV Patients Treated with Tenofovir plus LAM. *Hepatology.* 2008;48:740A.

Yu H, Yuan Q, Ge SX, Wang HY, Zhang YL, Chen QR, Zhang J, Chen PJ, Xia NS Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One*. 2010 Feb 19;5(2):e9297

Zago AM, Machado TF, Cazarim FL, Miranda AE. Prevalence and risk factors for chronic hepatitis B in HIV patients attended at a sexually-transmitted disease clinic in Vitoria, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2007;11:475-478.

Zuckerman J, Zuckerman AJ. Hepatitis viruses and TT vírus. In: Leindingan JGG, waisel DDA. *Consice Oxford textbook of medicine*. New York: Oxford Press; 2000.p.1553-55.

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](#)