



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA
REDE BIONORTE

DÉBORA DINELLY DE SOUSA

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO, MOLECULAR E FILOGENÉTICO DO VÍRUS DA
HEPATITE B CIRCULANTES NO ESTADO DE RORAIMA**

BOA VISTA, RR

2018

DÉBORA DINELLY DE SOUSA

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO, MOLECULAR E FILOGENÉTICO DO VÍRUS DA
HEPATITE B CIRCULANTES NO ESTADO DE RORAIMA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia. Área de concentração: Biodiversidade e Conservação. Linha de Pesquisa: Conhecimento da Biodiversidade.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Granja

BOA VISTA, RR

2018

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

S729p Sousa, Débora Dinelly de.

Perfil epidemiológico, molecular e filogenético do vírus da hepatite B circulantes no Estado de Roraima / Débora Dinelly de Sousa – Boa Vista, 2018.

112 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Granja.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal.

1 – Hepatite B. 2 – Epidemiologia. 3 – Caracterização molecular. 4 – Gene CCR5. 5 – Roraima. I – Título. II – Granja, Fabiana (orientadora).

CDU – 616.36-002(811.4)

Ficha Catalográfica elaborada pela: Bibliotecária/Documentalista:
Marcilene Feio Lima - CRB-11/507-AM

DÉBORA DINELLY DE SOUSA

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO, MOLECULAR E FILOGENÉTICO DO VÍRUS DA
HEPATITE B CIRCULANTES NO ESTADO DE RORAIMA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia, pela Universidade Federal de Roraima. Área de concentração: Biodiversidade e Conservação. Linha de Pesquisa: Conhecimento da Biodiversidade. Defendida em 22 de Agosto de 2018 e avaliada pela seguinte banca examinadora:



Profa. Dra. Fabiana Granja

Orientadora- Presidente da banca




Dr. Mário Maciel de Lima Junior

Membro - Curso de Medicina - UERR



Prof. Dr. Umberto Zottich Pereira

Membro - Curso de Medicina - UFRR



Profa. Dra. Elaine Cristina Morari

Membro - Curso de Ciências Biológicas - UERR



Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital

Membro - Centro de Estudos da Biodiversidade - UFRR

*Dedico à minha família, meu porto seguro,
Meu bem mais precioso.*

AGRADECIMENTOS

À Deus e Maria, que SEMPRE me iluminaram nessa caminhada e me permitiram a graça de continuar acreditando, e ter sempre forças para seguir em frente, mesmo quando tudo parecia perdido.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte – PPG - BIONORTE.

Aos professores do BIONORTE, pelos conhecimentos proporcionados.

Ao CNPQ, pelo financiamento das pesquisas.

À minha querida orientadora e amiga, Profa. Dra. Fabiana Granja, por ter acreditado no meu trabalho, ter aceito esse desafio, de mãos dadas, pronta para o que ocorresse. Me fez mergulhar no mundo da Hepatite B e me ensinou a amar esse trabalho, e ainda me mostrou tantas coisas maravilhosas, para o meu crescimento científico, profissional e pessoal, com seu exemplo, dedicação; sendo dura quando necessário, mas tudo foi muito importante para que pudesse chegar até aqui. Você é um exemplo para mim.

Ao eterno Prof. Dr. Pablo Oscar Amezaga Acosta (in memoriam). Nunca esquecerei dos ensinamentos, palavras de incentivo, dedicação a tudo que fazia. Infelizmente você não permaneceu por aqui, para me ver chegar até o fim dessa jornada, mas sei que estava sempre olhando por mim.

Ao CpLMD – FIOCRUZ/AM, pela parceria com o Laboratório de Biologia Molecular, o que permitiu o sequenciamento de parte das amostras.

Ao Dr. Felipe Gomes Naveca, pela paciência, parceria, dedicação à minha pesquisa, por ter me proporcionado a oportunidade de aprender sempre mais sobre a maravilhosa filogenia molecular, por ter sido sempre tão solícito, muito obrigado mesmo.

À querida Raquel, minha parceira durante estes árduos anos. Você foi muito importante para que pudéssemos chegar até aqui. Fomos parceiras de verdade, nos momentos felizes e tristes (principalmente de experimentos fracassados), de broncas e elogios, de vitórias, conquistas, crescimento. Você foi show! Te gosto para sempre.

Aos pacientes envolvidos neste estudo. Sempre com a disponibilidade e boa vontade em ajudar a ciência, sempre sendo solícitos e atenciosos. Todos foram essenciais para chegarmos aos resultados alcançados.

Aos meus amados pais, Rige e Souza, que sempre me apoiaram quando precisei, esse momento de vitória é para vocês também, por estarem sempre me amando e me incentivando quando queria esmorecer. Amo vocês mais que tudo nesse mundo.

Aos meus filhos, William, Maria Luiza e Rafael (filho do coração), tudo isso que passei foi por vocês. Minha razão de viver. Amo muito.

Ao meu marido Tony, que eu amo muito, por ter ficado ao meu lado, escutando as minhas angústias, minhas lamentações, meus momentos de alegria, raiva, depressão, e por ter vivido junto comigo, este momento tão importante para nossas vidas.

Aos meus irmãos, Denis, Dayse e Lizandra, pelo incentivo.

À toda minha família, por ter sempre torcido por mim.

Aos meus queridos amigos do LaBMol: Ismael, pela ajuda com os experimentos de sequenciamento, pelas conversas de apoio e pelos momentos de besteiro dentro do Lab também (importante para desestressar); Enayra, Kemeson, Glaci, Mayara, Miguel, Rafael, Mila. Derlano, que estava sempre disposto à ajudar. E todos que passaram pelo LabMol durante minha jornada, nós somos uma família. Tenho orgulho de fazer parte.

Ao Wilson Júnior e Jacqueline Barros, que deram início à este lindo trabalho; Wilson sempre ajudando nos experimentos, nos trabalhos científicos, obrigada. Jacqueline foi essencial nos dados de Hepatite, a fera da epidemiologia.

À turma do Doutorado, pela união, dedicação, e por termos dividido momentos de angústias, descontração, lamentações, desespero, alegrias, enfim, foi tudo muito especial.

Às amigas e companheiras de Doutorado, Márcia e Raissa, pela força que sempre demos umas as outras. Amo vocês amigas.

À TODOS, que de uma forma ou de outra, permitiram que eu pudesse trilhar este caminho e que este momento tão especial na minha vida, acontecesse.

RESUMO

A infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) é um sério problema de saúde pública global, e Roraima apresenta altas taxas de prevalência. É transmitido basicamente pelas vias parenteral e sexual. Seu genoma é constituído por um DNA circular parcialmente dupla fita, com cerca de 3,2 kb. O HBV apresenta um alto grau de diversidade genética. Os genótipos do HBV tem um papel importante na relação vírus-hospedeiro. Os mecanismos para a persistência da infecção pelo HBV envolvem vários aspectos, entre eles, vários fatores imunogenéticos do hospedeiro. O objetivo do estudo foi realizar a caracterização epidemiológica dos portadores de HBV e a identificação molecular das cepas de HBV circulantes, a partir do sequenciamento parcial do gene S, permitindo a detecção dos genótipos, possíveis alterações no padrão genético das cepas e polimorfismos do gene CCR5 nos portadores, relacionando ao curso clínico, de susceptibilidade ou proteção contra a infecção. A população do estudo foi constituída por pacientes portadores de HBV e indivíduos controle. A extração do DNA viral e genômico foi realizada com a utilização de kits comerciais. A amplificação do gene S e do polimorfismo (gene CCR5) foi realizada por Reação em cadeia da Polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos. Os fragmentos positivos do gene S foram sequenciados, genotipados e utilizados no estudo filogenético baseado no método Bayesiano. A maioria dos pacientes HBV eram do sexo masculino (56,25%), apresentavam entre 31-50 anos (54,29%), a raça parda foi a prevalente em 45,31%, 29,68% apresentavam ensino fundamental incompleto, 44,53% eram casados e 66,40% eram residentes na capital Boa Vista. Em relação à provável fonte/mecanismo de infecção, a transmissão sexual ocorreu em 26,97% dos casos. Em 28,12% dos envolvidos, a vacinação foi informada como ignorada, e entre os que apresentaram a informação, o esquema vacinal completo representou 25%. Quanto ao contato com portador de HBV, 51,56% não apresentavam nenhum contato, e entre os que apresentavam, 53,12% indicaram contato ocupacional. A carga viral detectável <2000 UI/mL foi encontrada em 57,81% dos pacientes, 51,13% estava em tratamento e, entre os medicamentos, o mais referido foi Tenofovir, com 56,04%. Quarenta sequências foram genotipadas e a árvore de Máxima Confiabilidade dos Clados (MCC) confirmou a presença dos genótipos A, D e F, com uma prevalência para o genótipo A (70%), $p < 0,0001$. Os subgenótipos encontrados foram, A1, A2, D2, D3, D4, F2a e F3, sendo que este último, foi detectado pela primeira vez no Brasil. Quanto ao gene CCR5, para as frequências alélicas e genotípicas dos grupos analisados, a população HBV não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,0139$). Não foi observada diferença na frequência (2,6%) do alelo $\Delta 32$ entre os grupos ($p=0,9626$). A frequência da mutação $\Delta 32/\Delta 32$ foi de 0,53% no grupo HBV e de 0% no grupo controle. O estudo da diversidade molecular e epidemiologia do HBV, além dos padrões genéticos da população em geral, pode contribuir para um melhor entendimento da doença em nível local e permitir a adoção de medidas de prevenção e controle da infecção.

Palavras-chave: Hepatite B. Epidemiologia. Caracterização Molecular. Gene CCR5. Roraima.

ABSTRACT

The infection through Hepatitis B virus (HBV) is a serious global public health issue, presenting in Roraima high prevalence rates. It is parenterally and sexually transmitted primarily. Its genome consists of a circular and partially double-stranded DNA, with about 3.2 kb. HBV has a high degree of genetic diversity. HBV genotypes play an important role in the virus-host relationship. Mechanisms for the persistence of HBV infection involve several aspects, including immunogenic factors. The objective of the study was to perform the epidemiological characterization of HBV patients and genetics of circulating HBV strains from the partial sequencing of the S gene, allowing the detection of genotypes, possible changes in the genetic pattern of the strains and polymorphisms in a human gene (CCR5), relating to the clinical course, susceptibility or protection against infection. The study population consisted of patients with HBV and control subjects. Extraction of viral and genomic DNA was performed using commercial kits. The amplification of the S gene and polymorphism (CCR5 gene) was performed through the Polymerase Chain Reaction (PCR), using specific initiators. The positive fragments of the S gene were sequenced, genotyped and used in the phylogenetic study based on the Bayesian method. Most of the HBV patients were male (56.25%), aged between 31-50 years (54.29%). The brown race was prevalent in 45.31%, 29.68% had incomplete primary education, 44.53% were married and 66.40% were residents of the capital Boa Vista. Regarding the probable source/mechanism of infection, sexual transmission occurred in 26.97% of the cases. Vaccination was reported as ignored in 28.12% of those involved in the study, and among those who reported the information, the complete vaccination schedule represented 25%. Regarding the contact with HBV patients, 51.56% had no contact, and among those who had contact, 53.12% reported occupational contact. The detectable viral load <math><2000\text{ IU/mL}</math> was found in 57.81% of patients, 51.13% were on treatment, and, among the drugs, the most frequent was Tenofovir, with 56.04%. Forty sequences were genotyped and the Maximum Clades Reliability (MCC) tree confirmed the presence of the A, D and F genotypes, with a prevalence for the A genotype (70%), $p < 0.0001$. The sub genotypes found were A1, A2, D2, D3, D4, F2a and F3, the latter being detected for the first time in Brazil. As for the CCR5 gene, for the allelic and genotype frequencies of the analyzed groups, the HBV population was not in the Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.0139$). No difference was observed in the frequency (2.6%) of the $\Delta 32$ allele between the groups ($p = 0.9626$). The frequency of the $\Delta 32/\Delta 32$ mutation was 0.53% in the HBV group and 0% in the control group. The study of HBV molecular diversity and epidemiology, in addition to the genetic standards of the general population, can contribute to a better understanding of the disease at a local level and allow the adoption of measures to prevent and control infection.

Keywords: Hepatitis B. Epidemiology. Molecular Characterization. CCR5 Gen. Roraima

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do vírus da Hepatite B.....	15
Figura 2 - Estrutura e organização do genoma do vírus da Hepatite B.....	16
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da hepatite B.....	20
Figura 1 (Capítulo II) - Localização geográfica do estado de Roraima, Brasil.....	66
Figura 2 (Capítulo II) - Análise filogenética das cepas de HBV isoladas em Roraima...	69
Figura 1 (Capítulo III) - Produtos da PCR visualizados em gel de agarose 2,5% referentes aos três genótipos do gene CCR5 encontrados no grupo de pacientes portadores de Hepatite B.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 (Capítulo I) - Distribuição dos casos de hepatite B em Roraima por nível de escolaridade.....	49
Gráfico 2 (Capítulo I) - Distribuição dos casos de Hepatite B em Roraima por município de residência.....	51
Gráfico 3 (Capítulo I) - Distribuição dos casos de Hepatite B por provável fonte/mecanismo de infecção.....	51
Gráfico 4 (Capítulo I) - Distribuição da frequência quanto à situação vacinal dos pacientes analisados no estudo.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Capítulo I) - Distribuição dos casos de Hepatite B em Roraima segundo o gênero.....	45
Tabela 2 (Capítulo I) - Distribuição dos casos de Hepatite B em Roraima segundo faixa etária.....	47
Tabela 3 (Capítulo I) - Distribuição dos casos de Hepatite B em Roraima segundo raça/cor.....	48
Tabela 4 (Capítulo I) - Distribuição dos casos de Hepatite B em Roraima segundo estado civil.....	50
Tabela 5 (Capítulo I) - Distribuição da carga viral presente nas amostras de sangue dos pacientes do estudo.....	55
Tabela 6 (Capítulo I) - Distribuição dos pacientes com carga viral detectável e indetectável e o tratamento.....	56
Tabela 1 (Capítulo II) - Characteristics of the 40 chronic hepatitis B patients included in this study.....	68
Tabela 1 (Capítulo III) - Características demográficas e informações clínicas dos pacientes infectados pela Hepatite B e da população controle.....	79
Tabela 2 (Capítulo III) - Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do gene CCR5 entre os pacientes infectados com HBV e grupo controle.....	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	O VÍRUS DA HEPATITE B (HBV)	14
2.1.1	O genoma viral	15
2.1.2	Replicação viral	19
2.1.3	Variabilidade genética, origem e evolução do HBV	21
2.2	EPIDEMIOLOGIA	24
2.3	ASPECTOS CLÍNICOS	26
2.3.1	Hepatite B aguda	29
2.3.2	Hepatite B crônica	30
2.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E SOROLOGIA	32
2.5	TRATAMENTO E PREVENÇÃO	34
2.6	FATORES IMUNOGENÉTICOS E INFECÇÃO PELO HBV	35
2.6.1	O gene CCR5	37
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	RESULTADOS	41
4.1	CAPÍTULO I - CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE PACIENTES INFECTADOS COM O VÍRUS DA HEPATITE B NO ESTADO DE RORAIMA, BRASIL.....	41
4.2	CAPÍTULO II - PHYLOGENETIC ANALYSIS AND GENOTYPES DISTRIBUTION OF HEPATITIS B VIRUS (HBV) IN RORAIMA, BRAZIL.....	64
4.3	CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE CCR5 EM PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE B CRÔNICOS, EM RORAIMA, REGIÃO NORTE DO BRASIL.....	74
5	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

A história das hepatites virais remonta vários milênios. Surto de icterícia foram relatados na Babilônia há mais de 2.500 anos (FREITAS, 2003), porém, somente no século XVIII foi introduzido pela primeira vez o termo *hepatite*, por J. B. Bianchi, em um trabalho científico, publicado em 1725 (REUBEN, 2002).

O termo hepatite é definido como um processo inflamatório acentuado nas células hepáticas, que pode evoluir para fibrose progressiva, em resposta a agentes químicos, físicos e biológicos (FOCCACIA; VERONESI, 2005), e dentro dos agentes biológicos, os vírus englobam a classe mais importante de patógenos associados a quadros clínicos de hepatite. Vários estudos foram feitos com o objetivo de descobrir e caracterizar estes agentes hepatotrópicos, levando a identificação e descrição de cinco agentes infecciosos: vírus da hepatite A - HAV (FEINSTONE et al., 1973), vírus da hepatite B - HBV (DANE et al., 1970), vírus da hepatite C - HCV (CHOO et al., 1989), vírus da hepatite Delta - HDV (RIZZETO et al., 1977) e vírus da hepatite E - HEV (BALAYAN et al., 1983). Para fins de vigilância epidemiológica, as hepatites podem ser agrupadas de acordo com a maneira preferencial de transmissão, em fecal-oral (vírus A e E) e parenteral (vírus B, C e D).

Na primeira Guerra Mundial, casos de hepatite, que foram ocasionados provavelmente pelo vírus da hepatite A, acometeram milhares de soldados (FREITAS, 2003). No Brasil, os registros datam de 1940, após um surto pós-vacinação, com registro de diversos óbitos, cuja fonte de infecção primária, foram lotes de vacina preparados com soro humano (FRANCO, 1969). Fonseca (2010) supôs que na região Amazônica brasileira o emprego em massa da vacina contra a febre amarela nas décadas de quarenta e cinquenta, utilizando ainda vacinas derivadas de plasma humano e seringas e agulhas não descartáveis, tenha sido um dos veículos responsáveis pela disseminação e propagação da infecção pelo vírus das hepatites B, C e D em sua população; outro provável veículo de transmissão seria o uso de lancetas não descartáveis para fins de punção digital no diagnóstico da malária.

A infecção pelo HBV é um importante problema de saúde pública global, com 2 bilhões de pessoas infectadas mundialmente, e destas, 350 milhões sofrem de infecção por hepatite B crônica. O HBV é transmitido, principalmente, por via parenteral e sexual. A infecção resulta em uma complexa interação hospedeiro-vírus, que pode resultar em uma doença aguda sintomática ou assintomática. Pessoas infectadas podem se tornar imunotolerantes ao vírus ou desenvolver um estado de portador crônico, que dependendo do

grau e da intensidade da doença, pode evoluir para cirrose e/ou carcinoma hepatocelular (HCC). O tratamento com antivirais pode ser efetivo, em aproximadamente, um terço dos pacientes e a medida mais efetiva contra infecções pelo HBV é a vacinação (OMS, 2013; PYRSOPOULOS, 2011; REHERMANN; NASCIMBENI, 2005).

Dentre os avanços quanto à prevenção e ao controle das hepatites virais, podemos elencar, a identificação dos agentes virais, o desenvolvimento de testes laboratoriais específicos, o rastreamento dos indivíduos infectados e o surgimento de vacinas protetoras (FERREIRA; DA SILVEIRA, 2004), que juntamente com a epidemiologia molecular, se destaca como uma importante ferramenta para o entendimento dos padrões epidemiológicos de disseminação viral.

Estudos sobre a epidemiologia e filogenia molecular do HBV no Brasil permitiram identificar os diferentes genótipos que circulam no país, sendo que, os mais frequentes são o A, D e F (BARROS et al., 2014a; CRISPIM et al., 2014; DIAS et al., 2012; LAMPE et al., 2017; SANTOS et al., 2010a). Conhecer os genótipos do HBV é importante para esclarecer a rota e os graus de patogenicidade do vírus e analisar a diversidade entre os diferentes isolados, uma vez que as variantes devem diferir em seus padrões de patogenicidade, virulência, reatividade sorológica e resposta ao tratamento (NAITO; HAYASHI; ABE, 2001). Além disso, também podemos destacar a importância dos fatores genéticos do hospedeiro, com uma série de polimorfismos em diferentes genes, que vem sendo associados com a persistência do HBV ou conclusão da doença (ZENG, 2014). O mecanismo para persistência da infecção pelo HBV não é totalmente entendido, contudo, sabe-se que o aspecto genético tem importante participação nesse processo. Atualmente, existem vastas evidências da associação entre os polimorfismos de genes que codificam citocinas/moléculas reguladoras. Neste estudo, o gene de interesse é o CCR5 e seu alelo mutante CCR5 Δ 32, e como esse polimorfismo pode influenciar no curso clínico da infecção pelo HBV, relacionado à persistência ou cura da infecção.

Roraima se destaca como um estado com elevadas taxas de infecção por hepatite B (BRASIL, 2017; DVE, 2017), porém, ainda são poucos os estudos relacionados à identificação dos padrões epidemiológicos, genótipos circulantes, caracterização molecular e filogenética do vírus HBV no estado, o que é de grande importância para a vigilância epidemiológica molecular deste vírus em nível local. Apenas poucos estudos investigando o vírus HBV foram registrados até o momento. Um deles identificou as características epidemiológicas da população HBV crônica do estado de Roraima e os genótipos circulantes nessa população, ao longo do ano de 2013 (BARROS, 2014b). Um outro estudo realizado por Granja (2014) identificou e caracterizou as cepas de HBV circulantes em nível filogenético. Por fim, uma pesquisa

realizada em todo o Brasil por Lampe e colaboradores (2017), relacionado à genotipagem do HBV, envolveu 22 amostras de Roraima, cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública (Lacen – RR), e identificou os genótipos circulantes. Dados apontam que entre os anos de 1999-2016, Roraima registrou 1370 casos confirmados da doença, o que, a princípio, parece pouco. Porém, se levarmos em consideração o tamanho da população, a taxa de detecção ao longo desses anos variou entre 18-27 por 100 mil habitantes, levando à uma alta prevalência (BRASIL, 2017; DVE, 2017). Diante do exposto, este estudo visa realizar a caracterização epidemiológica, molecular e filogenética das cepas de HBV circulantes no estado de Roraima, relacionar essas características virais com a epidemiologia da doença, com os aspectos genéticos do hospedeiro, e padrões de endemicidade e dispersão viral. Desta forma, será possível entender a biologia, a genética e a ecologia do vírus, e alguns dos aspectos que influenciam no curso clínico da doença, cujos desdobramentos poderão ser: persistência viral ou desfecho da infecção. Em conjunto, esses dados permitirão a adoção de melhores estratégias de controle e prevenção desta doença no estado de Roraima.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

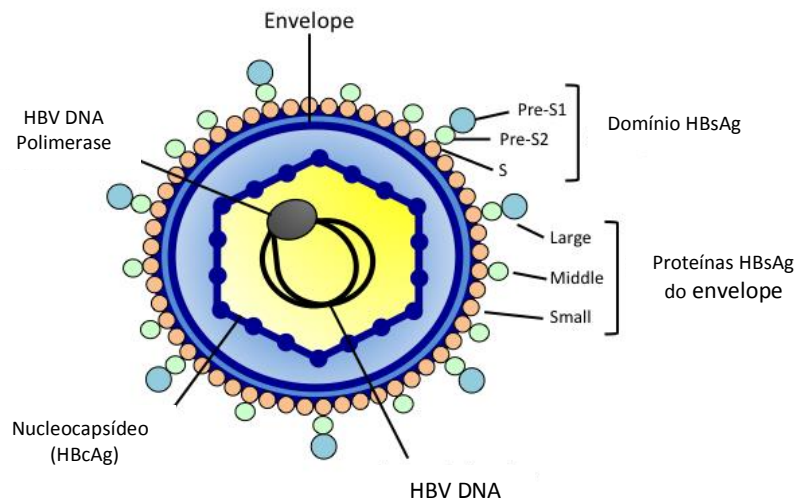
2.1 O vírus da Hepatite B (HBV)

O vírus da hepatite B (HBV) foi descoberto em 1965 (BLUMBERG et al., 1965). Um novo anticorpo foi detectado no soro de um paciente hemofílico que recebeu múltiplas transfusões, hoje chamado de anti-HBs. Esse anticorpo foi testado em grupo de 24 amostras de soro e reagiu apenas com o soro de um aborígine australiano e, por isso, foi conhecido na época, como antígeno Austrália (AuAg), que foi subsequentemente, reconhecido como o agente etiológico da Hepatite tipo B, e atualmente denominado como antígeno de superfície HBsAg. Poucos anos depois, em 1971, o pacote viral completo do vírus da hepatite B foi caracterizado, sendo chamado de partícula de Dane (CROAGH; LUBEL, 2014; LOPES; SCHINONI, 2011; PURCELL, 1993).

O vírus da Hepatite B (HBV) é um dos mais comuns agentes infecciosos no mundo. O HBV é um vírus que pertence à família *Hepadnaviridae* e ao gênero *Orthohepadnavirus*, possuindo tropismo por células hepáticas (THOMAS; LEMON; ZUCKERMAN, 2005). O vírus (Figura 1) é formado por uma partícula esférica de 42 nm de diâmetro, envolta por um envelope composto por uma dupla camada de lipídios e três proteínas de envelope: L (*large*),

M (*meddle*) e S (*small*), esta última contendo o antígeno de superfície - HBsAg. No interior da partícula se encontra um núcleocapsídeo icosaédrico, que contém o antígeno *core* (HBcAg), o DNA viral, uma proteína com atividade DNA polimerase e proteínas do hospedeiro. Apresenta ainda, um antígeno viral denominado antígeno “e” (HBeAg), que não forma parte da estrutura viral do HBV, porém é sintetizado a partir de um gene que codifica a proteína do *core*. A partícula viral do HBV é encontrada no sangue de pacientes infectados, juntamente com outras formas virais, formadas pelas proteínas do envelope viral e produzidas em excesso durante a replicação, que podem ser esféricas (não-infecciosas) ou filamentosas (DANE, 1970; GANEM; PRINCE, 2004; HU; TOFT; SEEGER, 1997; YANG; KUO; TING, 2006).

Figura 1 – Representação esquemática do vírus da Hepatite B



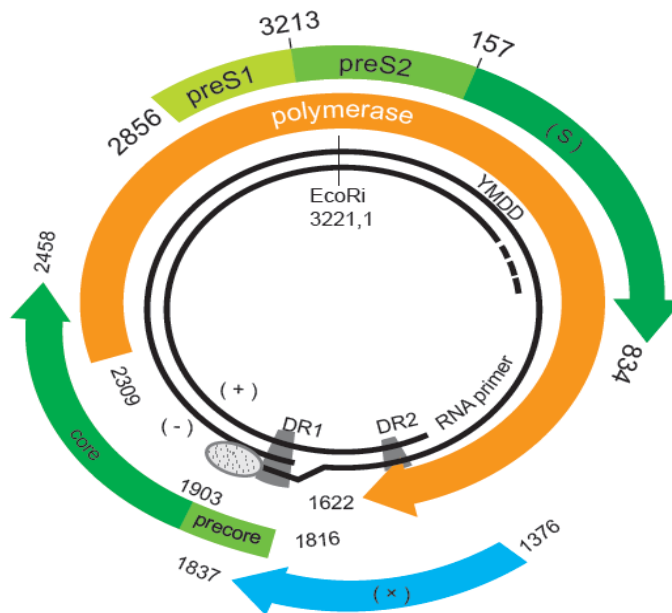
Fonte: www.antimicrobe.org (Adaptado)

2.1.1 O genoma viral

O genoma viral (Figura 2) apresenta uma organização genética altamente compacta, apresentando o menor genoma entre os vírus de DNA. Dentro da partícula, adota uma conformação circular, apesar de não estar fechado covalentemente, devido a uma pequena região coesiva, que sobrepõe a região situada entre os extremos 5' de ambas as cadeias (GANEM; PRINCE, 2004; POLLICINO et al., 2014; RODRÍGUEZ-FRIAS; JARDI, 2008). É formado por uma molécula de DNA relaxadamente circular parcialmente dupla fita (RC DNA), de aproximadamente 3200 bases, mas com uma extensão de fita simples variável. A fita mais longa (fita L ou negativa) é completa e ainda apresenta uma pequena redundância terminal com

a polimerase viral, covalentemente ligada à região 5'. A outra fita (fita S ou positiva) é incompleta, abrangendo cerca de 50-70% da fita L. A extremidade 5' é fixa e inicia com um pequeno oligorribonucleotídeo e a extremidade 3' é variável. A fita positiva se sobrepõe às extremidades 5' e 3' da fita negativa, assegurando assim, a circularidade do RC-DNA (KAY; ZOULIM, 2007). As extremidades 5' de ambas as fitas incorporam repetições diretas (DRs), regiões de curtas sequências repetidas (aproximadamente 11 nucleotídeos de comprimento), que são cruciais na iniciação da replicação viral (HAINES; LOEB, 2007).

Figura 2 – Estrutura e organização do genoma do vírus da Hepatite B



Fonte: Kao (2011)

O genoma do HBV apresenta quatro ORFs (do inglês- *Open Reading Frame* – região aberta de leitura), fortemente sobrepostas, codificando o gene Polimerase (P), gene C (precore/core), gene S (PreS1/PreS2/S), e gene X, que se transcrevem em cinco RNAs mensageiros (RNA pre-core, RNACore, RNAPre-S1, RNAPreS2/S, RNAX) e codificam as sete proteínas virais: pre-core, C, P, preS1, preS2, S e proteína X. A ORF preS/S está contida completamente dentro da ORF P, mas é traduzida em uma região de leitura diferente. As ORfs C e X se sobrepõe a ORF P em cerca de 1/4 e 1/3 respectivamente, aos comprimentos de suas sequências (GAO; DUAN, COFFIN, 2015; MILLER et al., 1989). Devido ao genoma do HBV ser totalmente codificado, todos os sinais regulatórios, como: promotores (preS1, preS2/S, promotor X, promotor de core basal), elementos *enhancer* (enhancer I/II), sítios de iniciação da

transcrição e sinal de poliadenilização estão incorporados dentro das regiões codificantes (RODRIGUEZ-FRIAS et al., 2013; SEEGER; MASON, 2000).

A ORF S é composta de três formas de genes de superfície: domínio preS1, preS2 e S. O domínio preS é o sítio de ligação essencial aos receptores dos hepatócitos e contém vários epítomos para células T e B. (SHEN; YAN, 2014). A região S codifica três diferentes proteínas de envelope, estruturalmente relacionadas, que são sintetizadas a partir de códons de iniciação alternativos (posições 2854, 3211 e 155), denominadas proteínas Large (L), Middle (M) e Small (S). A proteína S (antígeno de superfície *HbSAg*) consiste de 226 aminoácidos (aa), é o principal componente da proteína do envelope, principal marcador sorológico para diagnosticar a infecção pelo HBV, e está envolvida na liberação da partícula, a proteína M tem uma extensão extra N-terminal de 55 aa, enquanto a proteína L tem uma extensão N-terminal de 108 ou 119 aa, dependendo do genótipo. Os três antígenos de superfície compartilham uma região comum, contendo o principal loop antigênico, que inclui os aminoácidos 124 a 147, chamado de região determinante “a”. Essa região é o principal epítomo para induzir a resposta imune protetiva, sendo o principal alvo para os anticorpos neutralizantes anti-HbS (RODRÍGUEZ-FRIAS; JARDI, 2008; SAYINER; OZCAN; SENGONUL, 2008; SEEGER; MASON, 2000).

A ORF P cobre cerca de 3/4 do genoma e se sobrepõe à porção carboxi-terminal do gene C, à totalidade do gene S e à porção amino-terminal do gene X. Codifica uma proteína multifuncional, a polimerase viral (proteína Pol), que é traduzida do pgRNA a partir de um códon de iniciação interno. A proteína P apresenta diferentes domínios: o domínio N-terminal denominado domínio TP (Proteína Terminal), que age na iniciação da síntese da fita negativa e também tem um papel crucial no empacotamento do pgRNA; o domínio polimerase tem atividade DNA polimerase e Transcriptase Reversa (RT), crucial para a replicação do genoma; e um domínio tendo atividade *RNase H*, que é essencialmente requerido durante a replicação do genoma. O centro catalítico da RT está localizado no domínio C e é definido por quatro aminoácidos mapeados nas posições 203-206: o Tirosina (Y) – Metionina (M) – Aspartato (D) – Aspartato (D) *motif* (₂₀₃YMDD₂₀₆). O YMDD é altamente conservado entre as polimerases virais/ transcriptases reversas (GANEM; SCHNEIDER, 2001; RODRÍGUEZ-FRIAS; JARDI, 2008; RODRIGUEZ-FRIAS et al., 2013).

A ORF C apresenta sua porção 3' sobreposta à ORF P. Este gene é dividido em duas regiões que codificam duas proteínas, de acordo com a posição em relação à dois códons de iniciação (ATG): a região entre esses códons é chamada de região pre-C (nt 1814-1901 – 29 aa) e a região restante após o segundo códon é chamada de gene core (nt 1901-2452 – 133 aa). As duas proteínas traduzidas codificam o antígeno *e* (HbeAg) e o antígeno *core* (HBcAg), dois

indicadores de atividade de replicação viral. A proteína core (HBcAg) é um potente estimulador imune, tendo o papel de estimular uma forte neutralização da resposta imune. O HBeAg não é necessário para a replicação viral, mas é secretado no sangue, atuando como um imunogênico e tolerogênico, tendo um profundo efeito sobre a história natural e patogênese da infecção pelo HBV. A região N-terminal da ORF core é essencial para o sua própria montagem, enquanto a região C-terminal é importante para a formação do capsídeo, interação com o complexo pgRNA/transcriptase reserva e o empacotamento desse complexo dentro do capsídeo. A formação do capsídeo é ocasionado pelo arranjo dos homodímeros da proteína do core e sua estabilização através dos resíduos de cisteína, resultando na formação do capsídeo icosaédrico (RODRÍGUEZ-FRIAS; JARDI, 2008; RODRIGUEZ-FRIAS et al., 2013; ROSEMAN et al., 2012; SHEN; YAN, 2014; TONG et al., 1991; YANG; KUO; TING, 2006).

A ORF X (nt 1374- 1838) codifica o HBx, uma proteína de 154 aa. Um importante elemento localizado na sequência do gene X é o *Enhancer II* (ENH II), que regula os promotores de transcrição do RNAm viral. O HBx é uma proteína multifuncional que modula a transcrição, a transdução de sinal, progressão do ciclo celular, vias de degradação de proteínas, apoptose, a estabilidade genética pela interação com uma variedade de fatores e proteínas alvo do hospedeiro, reparo de DNA, inibição do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e do Fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) induzindo apoptose. A proteína HBx está fortemente associada com a patogênese das doenças relacionadas ao HBV, especialmente ao desenvolvimento de HCC (Hepatocarcinoma) em pacientes crônicos. Essas diferentes atividades da proteína, podem explicar a contribuição do HBx no desenvolvimento do HCC, pela alteração das várias vias sinalizantes, por diferentes mecanismos. O HBxAg promove carcinogênese pela interação com proteínas celulares e resultando na desregulação de múltiplas vias sinalizantes envolvidas na progressão do ciclo celular, crescimento celular e apoptose. Deleção do promotor de core basal (BPC) causa um deslocamento do quadro de leitura no gene X, levando a produção de uma proteína X truncada. O truncamento da proteína X é frequentemente detectado em HCC. Estudos de Ma et al. (2008) revelaram que o HBx truncado perde a atividade pro-apoptótica, e portanto, adquire uma atividade de transformação celular mais forte *in vitro* e promoção da atividade tumoral *in vivo* (BENN; SCHNEIDER, 1994; BOUCHARD et al., 2001; CHUNG; LEE, KIM, 2004; PANG; TSE; POON, 2006; RODRIGUEZ-FRIAS et al., 2013; SHEN; YAN, 2014; TANG et al., 2006).

2.1.2 Replicação viral

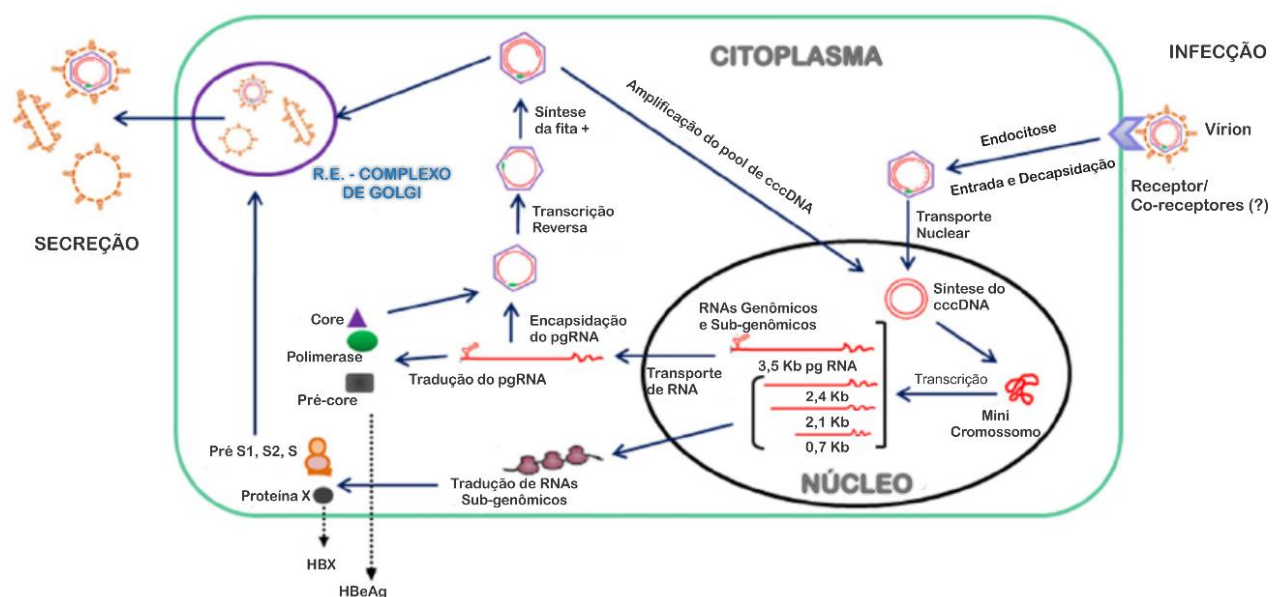
O HBV é um vírus não citopático e sua replicação ocorre preferencialmente nos hepatócitos, entretanto, estudos evidenciam que o sistema imune (linfoide) também é um importante sítio de persistência viral, tendo sido detectado em células mononucleares do sangue periférico e tecidos extra-hepáticos como: células de medula óssea, baço e células de linhagem linfoblástica. Os determinantes virais ou receptores celulares que direcionam o vírus para o interior dos hepatócitos, ainda não são claramente conhecidos. Entretanto, sabe-se que a ligação ao receptor celular e entrada, são mediadas por ligantes específicos da região N-terminal do envelope viral, mais especificamente da proteína pre-S1, abrangendo os aminoácidos 21-47. Uma variedade de proteínas celulares humanas tem sido relacionada à receptores de ligação do envelope do HBV, entre elas estão: apolipoproteína H sérica (apo H), albumina sérica humana polimerizada (pHSA), interleucina-6 (IL6), e o mais recente, taurocolato de sódio cotransportando polipeptídeo (DASH; RAO; PANDA, 1992; LEPÈRE-DOUARD et al., 2009; PONTISSO et al., 1989; PONTISSO et al., 2008; SCHIECK et al., 2013; STOLL-BECKER et al., 1997; YAN et al., 2012).

Depois da ligação ao receptor celular, a entrada do vírus na célula ocorre por endocitose (Figura 03). Após a entrada do vírus, a partícula viral perde o revestimento do nucleocapsídeo e o genoma do HBV (RC-DNA) é liberado no citoplasma e transportado para dentro do núcleo, onde é reparado (complementação da cadeia positiva) pela ação da polimerase viral e outras enzimas da própria célula hospedeira, e convertido em uma molécula de DNA circular covalentemente fechado (cccDNA), que serve como molde para a transcrição dos RNAs virais genômico e subgenômicos. Essa molécula permanece no núcleo dos hepatócitos infectados como um microcromossomo até a morte da célula e sua formação é a indicação do estabelecimento da infecção (BECK; NASSAL, 2007; BELLONI et al., 2009; LOCARNINI; ZOULIM, 2010). O cccDNA é transcrito em uma molécula de RNA pregenômico (pgRNA) com tamanho de 3.5 kb, apresentando uma estrutura em forma de alça, localizada na região 5' terminal, denominada *epsilon* (ϵ), e em três RNAs subgenômicos, com tamanhos de 2.4 kb, 2.1 kb e 0.7 kb de comprimento, onde são transportados para o citoplasma e traduzidos. O pgRNA traduz as proteínas Precore, Core e Polimerase, os três RNAs subgenômicos são traduzidos respectivamente em proteína preS1, proteínas preS2 e S (antígeno de superfície - HBsAg) e a proteína X.

A replicação do HBV começa com a encapsidação do genoma. No citoplasma o pgRNA se liga a polimerase viral pela estrutura *epsilon* sinal, que dá início à encapsidação, e em conjunto com a proteína core, forma o nucleocapsídeo. Dentro da partícula, o pgRNA serve como molde para a síntese da fita negativa de DNA, por transcrição reversa, mediada pela polimerase viral, sendo degradado pela atividade RNase H da proteína polimerase. Por sua vez, a fita negativa serve como molde para a síntese da fita positiva de DNA, que é incompleta, e um RC-DNA parcialmente dupla fita é gerado. Em seguida, a montagem da partícula ocorre, quando o nucleocapsídeo interage com a proteína do envelope dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE), e do RE, a partícula envelopada é transportada para o complexo de Golgi, sendo finalmente secretado da célula hospedeira. Alternativamente, capsídeos maduros podem reciclar o RC-DNA no núcleo para reposição do *pool* de cccDNA nuclear (BARTENSCHLAGER; SCHALLER, 1992; DATTA et al., 2012; GANEM; SCHNEIDER, 2001; GAO; DUAN; COFFIN, 2015; LEVRERO et al., 2009; LOCARNINI; ZOULIM, 2010; POLLACK; GANEM, 1993; WANG; SEEGER, 1993).

As partículas virais são liberadas para a corrente sanguínea ou tecido hepático. Um excesso de HBsAg é produzido durante o processo de replicação e também é liberado das células infectadas como partículas vazias, esféricas ou filamentosas. As partículas de HBsAg podem ser detectadas no soro, como um marcador diagnóstico de replicação ativa do HBV (HORVART, 2011).

Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da hepatite B



Fonte: Adaptado de Datta et al. (2012)

2.1.3 Variabilidade genética, origem e evolução do HBV

A variabilidade genética do HBV pode acontecer através de mutação espontânea ou por recombinação. Devido à transcrição reversa viral ter uma elevada taxa de erro (~1 por 100 bases) combinado a uma alta taxa de replicação viral (aproximadamente 10^{12} vírus/dia), o genoma do HBV evolui rapidamente ao longo do tempo, apresentando uma elevada taxa de mutação, estimada em uma taxa de substituição de nucleotídeos de aproximadamente $1.4-3.2 \times 10^{-5}$ /sítio por ano, que é 10 vezes mais alta que em outros vírus de DNA (COLEMAN, 2006; DÈNY; ZOULIM, 2010; LAU; WRIGHT, 1993; YUEN; LAI, 2007). A estratégia de replicação utilizada pelo HBV é responsável pela maioria das mutações, deleções e inserções observadas no genoma viral, tendo como resultado, a existência de vários genótipos, subgenótipos, mutantes, recombinantes, e ainda, quasispécies (KAO, 2002). Mutações e variações que ocorrem naturalmente ou durante terapias antivirais desempenham um papel importante na latência viral, na patogênese das doenças do fígado, escape imune e resistência a terapias com antivirais (YANO; AZUMA, HAYASHI, 2015).

A população do HBV é altamente heterogênea e compreende genomas que são proximamente relacionados, mas não idênticos, sendo considerados quasispécies virais, termo comumente associado aos vírus de RNA. Uma das possíveis explicações para a natureza quasispecies do vírus, seria o seu complexo ciclo de replicação viral, mais especificamente no momento da retro-transcrição, uma vez que a enzima não apresenta correção de erros de leitura e os novos genomas são altamente propensos a acumular erros. Além disso, a taxa de replicação extremamente alta resulta em uma população viral extraordinariamente heterogênea, capaz de se adaptar rapidamente a pressão de seleção endógena (resposta imune do hospedeiro) e exógena (tratamentos com antivirais) (BANG; KIM, 2014; HOLLINGER, 2007; MURRAY; PURCELL; WIELAND, 2006; RODRIGUEZ-FRIAS et al., 2013). Porém, a variabilidade quasispécies algumas vezes é limitada pelo alto grau de sobreposição das regiões codificantes do HBV, que é de cerca de 67% (KIDD-LJUNGGREN; MIYAKAWA; KIDD, 2002).

As primeiras indicações da heterogeneidade das sequências do HBV se basearam na presença de diferentes subtipos do antígeno de superfície HBsAg. (COUROUCÉ-PAUTY; PLANCON; SOULIER, 1983). O sequenciamento do genoma viral completo ou parcial, tem sido a principal estratégia utilizada para identificar os genótipos do HBV, além de possíveis mutações ocorrendo em seus genomas. Outras metodologias de identificação molecular foram descritas posteriormente, entre elas, por exemplo: o polimorfismo do tamanho dos fragmentos

de restrição (FRLP) de DNA amplificado por PCR; PCR com *primers* específicos para os diferentes genótipos e PCR em tempo real (LINDH; ANDERSSON; GUSDAL, 1997; KIRSCHBERG et al., 2004; RONCATO; BALLARDIN; LUNGE, 2008; WERLE et al., 2004).

O HBV é diferenciado em muitos genótipos, de acordo com a sequência genômica do gene de superfície (S). Atualmente, oito genótipos (A-H) são bem definidos para o HBV, entretanto, dois novos genótipos foram identificados (I e J). Alguns genótipos do HBV também são classificados em sub-genótipos. Sequências de HBV que apresentam menos que 8% de divergência nucleotídica são agrupados em um mesmo genótipo, e menos de 4-8% de divergência nucleotídica, para mesmo sub-genótipo. Muitos estudos demonstram que os genótipos/sub-genótipos estão relacionados com a progressão clínica da doença, resposta ao tratamento com antivirais e prognóstico. A maioria dos genótipos é dividida dentro de sub-genótipos com propriedades virológicas e epidemiológicas distintas (SANTOS et al., 2010a). Os genótipos A (A1-A7), B (B1-B7), C (C1-C5), D (D1-D5) e o genótipo F (F1-F4), são divididos em sub-genótipos (KURBANOV; TANAKA; MIZOKAMI, 2010). Os genótipos E, G, H, I e J, por sua vez, não são subdivididos em sub-genótipos (KAO, 2011). O tamanho do genoma varia nos diferentes genótipos do HBV. Os genótipos B, C, F e H têm 3215 nucleotídeos de comprimento. O genótipo D tem uma deleção de 33 nucleotídeos na região preS1 e tem somente 3182 nucleotídeos. O genótipo A varia de outros genótipos por uma inserção de seis nucleotídeos na região terminal da proteína do gene polimerase e a sobreposição do gene core (BARTHOLOMEUSZ; SCHAEFER, 2004).

O genótipo A está distribuído mundialmente, e é o principal genótipo encontrado na Europa, América do Norte, África e Índia. Os genótipos B e C são predominantes no Leste e Sudeste da Ásia (MAHTAB et al., 2008). O genótipo D é encontrado principalmente no Oriente Médio e países do Mediterrâneo, porém tem sido registrado mundialmente. O genótipo E é predominante na África Subsariana, e não é encontrado fora dessa região (KRAMVIS et al., 2005), com exceção para registros recentes desse genótipo em uma comunidade específica na Colômbia (ALVARADO MORA et al., 2010) e no Norte da Índia (SINGH et al., 2009). O genótipo G é encontrado nos Estados Unidos, México e França. Os genótipos F e H são encontrados quase que exclusivamente nas Américas Central e do Sul (KAO; CHEN, 2006). Recentemente o genótipo I foi descrito no Vietnã e Laos (THUY et al., 2010; YU et al., 2010) e o genótipo J foi identificado no Japão (TATEMATSU et al., 2009). As recombinações entre genótipos também podem ocorrer, desempenhando um papel importante na história evolutiva do HBV, além disso, estudos sugerem que alguns genótipos de HBV devem ter se originado através de recombinação, que são favorecidas em determinadas regiões geográficas. Por

exemplo, recombinates B/C são mais prevalentes no Sudeste e Leste da Ásia, assim como outros recombinates A/D, A/E, C/D, C/A e G/C que tem sido encontrados em diferentes regiões geográficas (SHI et al., 2012b; SUGAUCHI et al., 2002; YANG et al., 2006).

Estudos têm mostrado uma variabilidade na prevalência do HBV em diferentes regiões brasileiras, onde os genótipos A, D e F são os mais prevalentes na população infectada (ARAÚJO et al., 2004). A Bacia Amazônica apresenta uma das taxas mais altas de infecção pelo vírus da Hepatite B, no mundo. O genótipo A tem sido o mais comumente encontrado, seguido do D e F. Entretanto, o genótipo F é o mais prevalente em comunidades indígenas (BLITZ et al., 1998; MELLO et al., 2007; PARANÁ; ALMEIDA, 2005; TE; JENSEN, 2010). Em Roraima, um estudo (GRANJA et al., 2014) realizado para detectar os genótipos de HBV circulantes, identificou a circulação dos genótipos A e D, com prevalência para o genótipo A. Foram relatados também os subgenótipos A1, A2 e D2. Um outro estudo recente, realizado por Lampe e seus colaboradores (2017), também mostrou a circulação dos genótipos A, seguidos de F e D, com a prevalência do genótipo A (59,1%).

A origem do HBV ainda permanece incerta, devido à ausência de consenso sobre as taxas evolutivas estimadas para o HBV e à inconsistência entre esses dados e as evidências arqueológicas. Além disso, o tamanho reduzido do genoma do HBV, juntamente com o alto grau de sobreposição das regiões de leitura, têm dificultado o esclarecimento sobre o quadro evolutivo do vírus. Dependendo do modelo usado para a análise filogenética, são propostas uma origem Asiática ou uma origem Americana para o vírus (BOLLYKY; HOLMES, 1999; BOUCKAERT; ALVARADO-MORA; PINHO, 2013; SIMMONDS, 2001).

Estima-se que a diversificação entre os diferentes genótipos deve ter ocorrido 33.000 anos atrás. Então, ligando esse fato à hipótese de que o HBV tenha vindo da África, é plausível, já que o ancestral comum mais recente (MRCA) de todos os genótipos do HBV viajou junto com os seres humanos da África até a chegada em Beringia, uma região de terra firme, de cerca de 1600 quilômetros, que juntou o Alasca e a Sibéria, durante as glaciações (ROMAN et al., 2014; WANG et al., 2007). Da África para a América do Sul, o ser humano foi exposto à diversos climas, altitudes geográficas, diferentes alimentos e patógenos. Conseqüentemente, devido à interação ambiente-hospedeiro, os habitantes podem ter sofrido adaptação genotípica e fenotípica, específicas da região, o que teria lhes permitido sobreviver. Com base nessas características, é provável que cada novo estabelecimento humano carregava uma cepa de HBV com seu próprio MRCA, o qual pode ter desenvolvido adaptações específicas para o seu hospedeiro, permitindo que ele sobrevivesse e se disseminasse de forma eficiente por sua população autóctone. Essas alterações se refletiram ao nível genômico, dando origem ao que

hoje conhecemos como genótipos. Estima-se que o primeiro genótipo a se diversificar foi o C, seguido do B, D, A, F, E, H e G (HANCOCK et al., 2010; PARASKEVIS et al., 2013; ROMAN et al., 2014).

A partir do exposto acima, o HBV deve ter acompanhado os seres humanos, desde a sua origem até a sua chegada na América do Sul, desenvolvendo graus variáveis de adaptação mútua, dependendo do grau de endemicidade, do genótipo do HBV, extensão da exposição e bagagem genética da população humana. Assim, as manifestações clínicas e resultados da infecção pelo HBV, devem refletir o grau de adaptação entre o hospedeiro humano e seu genótipo viral específico (ROMAN et al., 2014).

2.2 Epidemiologia da Hepatite B

A hepatite B permanece como um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Embora uma vacina segura e eficaz contra o vírus já esteja disponível a mais de duas décadas, estima-se que mais de 360 milhões de indivíduos em todo o mundo sejam cronicamente afetados ou em risco de complicações graves relacionadas ao HBV, além disso, a infecção pelo HBV resulta em 600.000 a 1 milhão de mortes por ano em todo o mundo. O HBV é endêmico na Ásia e Ilhas do Pacífico, Sul da Europa e América Latina. A prevalência do antígeno HBs nessas populações varia de 2 a 20% (ASSIS et al., 2004; KAO; CHEN, 2002; LIAW; CHU, 2009).

China, Sudeste da Ásia, a maioria da África e das Ilhas do Pacífico, partes do Oriente Médio e a Bacia Amazônica, são indicadas como áreas de alta prevalência de infecção (8-15%), com cerca de 45% dos indivíduos infectados vivendo nessas áreas, onde o risco de infecção permanente é maior que 60%, tipicamente ocorrendo na infância ou na primeira infância, especialmente devido a transmissão de mãe para filho (durante a gravidez ou no nascimento), horizontal (de uma criança infectada para uma criança não infectada – lesões na pele, escabiose, impetigo) ou intrafamiliar (contato com membros da família infectados). Muitos estudos mostram que um membro da família infectado aumenta significativamente o risco de transmissão pelo HBV. Nessas áreas de alta prevalência, os indivíduos infectados tem um maior risco de cronicidade, o qual aumenta o risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma e complicações de cirrose. Regiões centro-sul e sudoeste da Ásia, partes da Europa, Rússia e Américas Central e do Sul, são consideradas de prevalência intermediária (2-7%), com 43% dos indivíduos vivendo nessas áreas, onde o risco permanente de infecção é de 20% a 60%,

tipicamente ocorrendo em todos os grupos etários. Regiões de baixa prevalência (menor que 2%) incluem os Estados Unidos, Europa Ocidental e Austrália, onde são encontrados cerca de 12% dos indivíduos infectados, e o risco permanente de infecção é menos que 20%, ocorrendo na idade adulta (CDC, 2008; LI; HOU; CAO, 2015; OMS, 2004; 2016).

Nas Américas Central e do Sul, estima-se que a soroprevalência do HBsAg esteja entre 0,5 a 3%, com um número total de portadores se aproximando de 11 milhões (CUSTER, 2004). Na América do Sul, a Bacia Amazônica Ocidental, que inclui Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela, é considerada uma região de alta prevalência. Estimativas para essa região apontam que 140.000 infecções agudas pelo HBV ocorram a cada ano, com cerca de 8.000 a 15.000 portadores crônicos do HBsAg. Acima de 60.000 casos de cirrose e 3.000 casos de Carcinoma hepatocelular (HCC) estão ligados as infecções pelo HBV nessa região (TE; JENSEN, 2010; TORRES, 1996).

No Brasil, alguns estudos do final da década de 80 e início de 90 sugeriram uma tendência crescente do HBV em direção à Região Sul e à Região Norte. Assim, considerava-se que ocorriam três padrões de distribuição da hepatite B: alta endemicidade, com prevalência superior a 7% de HBsAg, presentes na região Amazônica, alguns locais do Espírito Santo e Oeste de Santa Catarina; endemicidade intermediária, com prevalência entre 2 e 7% de HBsAg, nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste e baixa endemicidade, com prevalência abaixo de 2% de HBsAg na região Sul do país (AQUINO et al., 2008; BRASIL, 2008a ; PARANÁ; VITVITSKI; PEREIRA; 2008; TOLEDO Jr. et al., 2005).

Entre 1999 e 2011 foram registrados no Brasil 120.343 casos de Hepatite B. Nesse período, tanto o país quanto as regiões apresentaram crescimento das taxas de incidência. No Brasil, a taxa passou de 0,3% em 1999 para 6,9 % em 2010. A região Sul e Norte registraram os maiores índices desde 2002, com respectivamente, 14,3 e 11,0 por 100 mil habitantes em 2009 (BRASIL, 2012a). Segundo o último Estudo de Prevalência de Base Populacional das infecções pelos vírus das Hepatites A, B e C, realizado entre 2005 a 2009 em todas as 26 capitais e no Distrito Federal, a prevalência de infecção pela hepatite B, na faixa etária entre 10 e 69 anos, foi de 7,4%, classificando o conjunto das capitais brasileiras, mais uma vez, como de baixa endemicidade. Na região Norte a prevalência para o marcador de exposição ao HBV (anti-HBc) foi de 10,9% e para o marcador HBsAg foi de 0,63% (BRASIL, 2012b). Quando considerada somente esta região, a distribuição espacial é bastante heterogênea, sendo mais prevalente na Amazônia Ocidental, sobretudo numa faixa que abrange os estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Roraima (BRASIL et al., 1991). No período de 1999-2016 foram notificados 212.031 casos confirmados de hepatite B no Brasil. Desses, a maioria está

concentrada na região Sudeste (35,4%), seguida das regiões Sul (31,6%), Norte (14,2%), Nordeste (9,4%) e Centro-Oeste (9,3%). Em 2016, a taxa de detecção de Hepatite B no Brasil, atingiu 6,9 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2017).

No estado de Roraima, a hepatite B ocupa o segundo lugar entre as hepatites virais. Os casos confirmados de Hepatite B totalizaram 684 no período de 1999 a 2010 (BRASIL, 2011), enquanto que no período de 2010 a 2015, totalizaram 475 casos. Os municípios de Boa Vista, Mucajaí, Uiramutã e Caracaraí concentraram os maiores números de casos da Hepatite B no Estado entre 2010 a 2015. Segundo Brasil (2012a), no ano de 2010, dentre os estados da região Norte, Roraima foi um dos que apresentou as maiores taxas de detecção da infecção pelo HBV (20 por 100.000 habitantes). No ano de 2016, Roraima registrou um total de 111 casos confirmados de Hepatite B, representando uma taxa de incidência de 21,6 casos para cada 100 mil habitantes. Além disso, a capital de Roraima, Boa Vista, estava entre as cinco capitais com maiores taxas de incidência (BRASIL, 2017). A taxa de detecção começa a aumentar a partir dos 15 anos de idade e tem maior concentração entre os 30-39 anos (DVE, 2017). Estudos mostram incidências maiores de casos de hepatite B a partir dos 15 anos de idade, relacionando as ocorrências nesta faixa etária, principalmente ao estilo de vida, e ao comportamento de risco, como o uso de drogas injetáveis e relação sexual sem uso de preservativos (ZATTI et al., 2013). Mesmo com a alta prevalência dessa infecção no Estado, ainda são poucos, os estudos que caracterizem e determinem os genótipos e subgenótipos circulantes na população

2.3 Aspectos clínicos da Hepatite B

A infecção pelo HBV leva a um amplo espectro de doenças do fígado, variando desde hepatite aguda a um estado de portador assintomático (baixa viremia) ou para hepatite crônica progressiva, que pode levar a cirrose e carcinoma hepatocelular (VILLENUEVE, 2005). Essas manifestações clínicas devem variar, dependendo da idade do portador da infecção. Menos de 10% das crianças abaixo de cinco anos apresentam sintomas, enquanto 30-50% das infecções em adultos são sintomáticas (MACMAHON et al., 1985). A maioria das infecções ocorre durante o nascimento e mais de 90% dessas, se tornam crônicas, enquanto que se a infecção for durante a infância, o risco de cronicidade cai para cerca de 20%. Somente menos de 5% dos pacientes que adquirem a infecção na fase adulta se tornam portadores, contudo, mais de 30% dos pacientes adultos, desenvolvem alguma doença crônica progressiva do fígado (ROBERTS; GORES, 2005).

A progressão de uma infecção aguda de HBV para crônica e subsequente potencial infeccioso é um resultado de um complexo efeito recíproco entre o modo de transmissão e a interação vírus-hospedeiro, da qual o genótipo do HBV é um fator importante (TANWAR; DUSHEIKO; 2012). Além disso, a resposta imunológica do hospedeiro desempenha um papel chave na história natural do HBV, tanto no momento da infecção aguda e durante a infecção crônica, onde o dano ao fígado é causado principalmente pela célula imune do hospedeiro, do que diretamente pelo efeito citopático viral (CROAGH; LUBEL, 2014; YIM; LOK, 2006). Assim, a persistência viral e os resultados clínicos que seguem a infecção pelo HBV dependem dos fatores virais e dos fatores do hospedeiro, incluindo fatores genéticos que determinam os mecanismos imunes do hospedeiro (ZINKERNAGEL, 1996).

Na infecção pelo HBV, as respostas iniciais (após a primeira semana da infecção) não são específicas (imunidade inata), sendo mediadas pelas células imunes que reconhecem as células infectadas e respondem com a produção de interferon tipo I (IFN α/β) e tipo II (IFN γ), que interferem na síntese viral por indução de diversas proteínas. Além disso, IFN α/β e IFN γ recrutam e ativam macrófagos (incluindo as células de Kupffer), que secretam diversas citocinas como TNF e IL-12, e esta última ativa células *natural killer* (NK), que também são ativadas após reconhecerem que o complexo de histocompatibilidade classe I (MHC-I) está expresso fracamente (ou não está expresso) e irão agir destruindo as células infectadas diretamente (através de lise celular) ou mediada pela produção de TNF e IFN γ . As células de Kupffer são importantes na inibição da replicação do HBV através da produção de IFN α/β , TNF, e IFN γ , além do recrutamento de linfócitos T e células NK (BARONE; VISO, 2006; LOPES; SCHINONI, 2011).

A resposta celular contra o HBV é mediada por linfócitos T, que são responsáveis pela lesão hepática tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. A resposta imune adaptativa ao HBV é detectada muitas semanas depois da inoculação e é iniciada com um aumento da replicação viral, podendo, nesse período, serem detectados linfócitos T específicos, tanto CD4+ como CD8+ (também chamados de linfócitos citotóxicos). Estudos sugerem que os hepatócitos requerem altas doses de antígenos do HBV para induzir a produção de IFN γ por linfócitos T CD8+ ativados, já que na presença de pequenas quantidades de antígenos AgHBs ou AgHBe, os hepatócitos preferencialmente estimulam a degranulação dos linfócitos CD8+ e há pouca expansão clonal e pouca apoptose. Linfócitos T CD4+ reconhecem os antígenos peptídicos exógenos através de moléculas de MHC-II de células apresentadoras de antígeno (APC). Por outro lado, são linfócitos T CD8+ que reconhecem e direcionam as células novas

que exibem antígenos virais sintetizados endogenamente apresentados por moléculas de MHC-I (BARONE; VISO, 2006; CHANG, 2010; LOPES; SCHINONI, 2011).

A infectividade do vírus da Hepatite B é de 50 a 100 vezes maior do que a do HIV. O vírus pode sobreviver fora do corpo por pelo menos 7 dias. Durante esse tempo o vírus ainda pode causar infecção se entrar no corpo de uma pessoa que não é protegida por vacina (OMS, 2013).

A contaminação ocorre por via parenteral e, sobretudo, pela via sexual, sendo considerada uma infecção sexualmente transmissível. Dessa forma, a hepatite B pode ser transmitida por solução de continuidade (pele e mucosa), relações sexuais desprotegidas e por via parenteral (compartilhamento de agulhas e seringas, tatuagens, piercings, procedimentos odontológicos ou cirúrgicos). Outros líquidos orgânicos, como sêmen, secreção vaginal e leite materno, também podem conter o vírus e constituir-se fonte de infecção. A transmissão vertical/perinatal (de mãe para filho) também é causa frequente de disseminação em regiões de alta endemicidade (BRASIL, 2008b), enquanto que em regiões de baixa endemicidade, a transmissão sexual e o abuso de drogas são modos comuns de infecção (CUSTER et al., 2004).

A infecção perinatal (vertical – de mãe para filho) ocorre frequentemente se a mãe com HBV é HBeAg-positivo e tem um alto nível de HBV-DNA no soro. A infecção de mãe pra filho tem sido considerada como responsável por mais da metade das infecções crônicas em áreas endêmicas. Se a criança nascida de mãe HBsAg-positivo não receber a vacina de Hepatite B e imunoglobulinas, a taxa de infecção pode variar de 70% - 90%. Em contraste, quando a vacina e a imunoglobulina são administradas no prazo de 24 horas após o nascimento, 90% das crianças mostram o efeito preventivo. Embora uma quantidade muito pequena de HBV seja detectado no leite da mãe, não existem evidências de que a hepatite B seja transmitida pelo leite materno (KOW; LEE, 2011; LI; HOU; CAO, 2015).

A transmissão horizontal também é uma importante rota de disseminação da infecção pelo HBV entre os membros da família. A presença de um indivíduo HBeAg+ na família facilita a transmissão, uma vez que o HBV DNA foi documentado na saliva, suor e urina de pessoas infectadas, mostra a possibilidade de transmissão do vírus por contato pessoal e/ou objetos contaminados, como por exemplo, o compartilhamento de mesma toalha, escova de dentes, lâminas de barbear, utensílios domésticos. Esta forma de transmissão ocorre frequentemente em áreas endêmicas (DOGANCI et al., 2005; HATAMI et al., 2013; LOBATO et al., 2006).

2.3.1 Hepatite B Aguda

A infecção por hepatite B aguda leva a um espectro de manifestações que vai desde uma infecção assintomática a hepatite auto-limitada, até hepatite fulminante, fato que depende de vários fatores virais e do hospedeiro (LAVANCHY, 2004). Cerca de dois terços dos pacientes desenvolvem uma doença leve, assintomática e subclínica, frequentemente indetectável, e aproximadamente um terço desenvolvem sintomas clínicos e sinais de hepatite, variando de sintomas leves, como náusea e fadiga, até sintomas mais acentuados, como icterícia, urina escura e, raramente, insuficiência hepática aguda (LIANG, 2009)

A infecção aguda sintomática é rara em neonatos (menos de 1%) e ocorre em cerca de 10% das crianças de 1-5 anos, e muitas vezes resulta em infecção crônica (LAVANCHY, 2004), enquanto que, em adultos, ocorre em cerca de um terço dos infectados. No entanto, uma minoria (menos de 1%) evolui para hepatite fulminante, com uma mortalidade de 70%. Hepatite fulminante é definida como desenvolvimento de encefalopatia e coagulopatia até 8 semanas após o início dos sintomas. É tipicamente marcada pelo aparecimento súbito de febre, dor abdominal, vômitos e icterícia, seguido de desorientação, confusão e coma. Está relacionada com uma intensificação da resposta imunológica, com rápido clareamento viral, o que significa que o HBsAg e o DNA HBV não devem ser detectáveis no soro, no momento do quadro clínico, e o diagnóstico baseia-se somente pela presença do antiHBc IgM no soro (FERREIRA, 2000; HOOFNAGLE et al., 1995; LIAW; CHU, 2009; MENDONÇA; VIGANI, 2006).

Os primeiros marcadores sorológicos que se tornam detectáveis na pessoa com hepatite aguda são o HBsAg e os anticorpos para o antígeno core. O período de incubação é em média, de dois a três meses (média – 60 a 150 dias), e pode chegar de 1 a 6 meses depois da exposição. Durante este período ocorre a fase pré-ictérica, seguida de sintomas como febre, fadiga, náuseas, emagrecimento e dores no corpo, mudança na cor dos olhos, hepatomegalia e esplenomegalia, além disso, sobem os níveis de alaninaminotransferase (ALT) no soro e uma alta taxa de HBsAg e HBV DNA são detectáveis. O surgimento da icterícia, hipocolia fecal e colúria caracterizam o período ictérico, porém somente 20% dos pacientes desenvolvem icterícia clinicamente reconhecida (MENDONÇA; VIGANI, 2006).

Após a fase aguda, que dura em média 1-2 semanas, a partir da resposta imunológica do hospedeiro ocorre progressivo decréscimo da replicação viral e redução dos títulos de HBeAg e HBV DNA, seguido do aparecimento do anti-HBeAg, em geral, até o 3º mês da doença. Cessando a replicação viral, ocorre o clareamento do HBsAg, pelo

desaparecimento do HBV DNA detectável no soro, e surge o anti-HBsAg, anticorpo neutralizante e indicativo de cura da infecção. Na maioria dos casos, o HBsAg desaparece dentro de 6 meses e as funções do fígado são recuperadas (DÉNY; ZOULIM, 2010; LIANG, 2009; MENDONÇA; VIGANI, 2006). A eliminação do HBV na infecção aguda está associada a uma resposta vigorosa, policlonal e multiespecífica dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ aos epítomos do HBV. Na resposta aguda autolimitada, a maior parte dos vírions do HBV são eliminados na fase de incubação, sem a destruição de células hepáticas, devido a ação de citocinas antivirais TNF e IFN γ , produzidas pela resposta inata e adaptativa, por mecanismo não citolítico mediado por células não T (BARONE; VISO, 2006; LOPES; SCHINONI, 2011).

2.3.2 Hepatite B Crônica

A hepatite B crônica tem um curso variável e dinâmico. A infecção se dá quando o portador apresenta uma positividade para o HBsAg, detectável no soro por mais de seis meses. Nas fases iniciais do período crônico HBeAg, HBsAg e DNA HBV, estão presentes em altos títulos, e há ligeira a moderada elevação nos níveis de aminotransferases séricas (LIANG, 2009). As manifestações clínicas da infecção crônica variam desde formas onde a doença praticamente inexistente até formas que progridem para cirrose, carcinoma hepatocelular, transplante e morte associadas ao fígado (ALVARIZ, 2006; NIEDERAU, 2014). Em condições normais, a replicação viral não é citopática, e é a resposta imune do hospedeiro, geralmente ineficaz e inadequada, que provoca grande parte dos danos associados a hepatite crônica (DANDRI; LOCARNINI, 2012).

O risco de cronicidade está intimamente relacionado com a idade do paciente no momento da infecção. A infecção persiste em cerca de 90% dos recém-nascidos infectados ao nascer, 20-30% das crianças infectadas entre 1-5 anos, 6% entre as crianças de 5-15 anos e somente 1-5% dos pacientes infectados quando adultos (LEVANCHY, 2004). Uma possível explicação para a alta cronicidade em recém-nascidos é que o feto desenvolve tolerância ao vírus no útero, após a passagem transplacentária de proteínas virais (MILICH; LIANG, 2003). A maioria dos pacientes com HBV crônica é assintomático ou tem sintomas inespecíficos (astenia e desconforto no quadrante superior direito). Pacientes com doença mais grave ou cirrose podem apresentar sintomas como: icterícia, telangiectasias, eritema palmar, esplenomegalia, ascite, encefalopatia, sangramento gastrointestinal. A taxa de complicação da hepatite B crônica está associada com o grau de replicação viral, inflamação e fibrose. O risco

de cirrose também é aumentada na presença de fibrose, doença de longa duração, gênero masculino, co-morbidades como o consumo de álcool, diabetes mellitus tipo 2, e co-infecção, em particular, com HDV ou HIV (ILOEJE et al., 2006; LIAW et al., 1998; NIEDERAU, 2014). Manifestações extra-hepáticas podem ocorrer, como: poliarterite nodosa e doença glomerular (ALVARIZ, 2006; LIANG, 2009).

O prognóstico de pacientes com hepatite crônica está diretamente relacionado com a severidade da doença. Para os portadores de hepatite crônica grave e cirrose, a taxa de sobrevivência de 5 anos é cerca de 50% (DE JONGH et al., 1992). Alguns fatores, incluindo idade avançada, replicação viral persistente e longos períodos de necroinflamação hepática influenciam a taxa de progressão para cirrose. O hepatocarcinoma ocorre aproximadamente após 30 a 50 anos da infecção pelo HBV. A incidência anual de hepatocarcinoma entre pacientes com infecção pelo HBV e ausência de cirrose é de aproximadamente 0,5%, já naqueles com cirrose varia entre 2-6% (MENDONÇA; VIGANI, 2006). Fatores de risco para hepatocarcinoma em portadores de hepatite B crônica incluem: gênero masculino, idade avançada, história familiar de hepatocarcinoma, consumo crônico de álcool, presença de cirrose e co-infecção com HCV (ALVARIZ, 2006).

A história natural da hepatite B crônica é determinada pela interação entre o estado da replicação viral e a resposta imune do hospedeiro (KWON; LEE, 2011), e pode ser dividida em três fases: 1) *fase imunotolerante* – é a mais comumente vista em crianças que adquiriram o vírus perinatalmente ou nos primeiros anos de vida. É caracterizada pela positividade do HBsAg e do HBeAg, altos níveis de carga viral (HBV-DNA), níveis normais ou pouco elevados de aminotransferases (ALT/AST), atividade necroinflamatória discreta e curso assintomático; 2) *fase imunoativa* – o HBeAg pode ser identificado no soro e ocorre um declínio dos níveis séricos de carga viral, ALT/AST em níveis aumentados e presença de atividade necroinflamatória no fígado. Esta fase dura cerca de três a quatro semanas em portadores de infecção aguda e em portadores de infecção crônica pode levar 10 anos ou mais, podendo resultar em cirrose ou hepatocarcinoma; 3) *fase não replicativa* – ocorre a presença de HBsAg no soro, anti-HBe, títulos baixos ou indetectáveis de carga viral, aminotransferases normais, mínima lesão no fígado e curso assintomático (BARONE, 2008; FERREIRA; BORGES, 2007; FONSECA, 2007; PYRSOPOULUS, 2011).

A composição de subpopulações de linfócitos T em sangue periférico é diferente entre os diferentes estágios clínicos da hepatite B crônica, indicando que pacientes na fase imunotolerante apresentaram um maior número de células T CD8+ e um menor número de células T CD4+, quando comparados com pacientes nas outras duas fases. Durante a infecção

crônica há uma diminuição no equilíbrio das subpopulações de linfócitos T, fato que está relacionado com um aumento da proporção de linfócitos T CD8+ e um decréscimo da proporção de linfócitos T CD4+. Também foi demonstrado que a insuficiência de células T está significativamente associada ao nível de replicação do vírus, indicando que a carga viral é um forte fator preditivo para subpopulações de linfócitos T. Os pacientes cronicamente infectados que adquirem HBV na idade adulta geralmente apresentam um defeito na resposta específica dos linfócitos T. A ativação prolongada de linfócitos T causada por altos níveis de antígenos virais pode resultar no esgotamento de células T e até mesmo deleção clonal. A extensão dessas vias imunes inibitórias pode definir o curso da hepatite crônica de estado imunotolerante a imunoativo e estado de portador sadio à cirrose. A persistência do HBV tem sido associada com a indução de células T regulatórias que podem suprimir células T efetoras específicas para HBV. A frequência de células T regulatórias mostra-se aumentada no sangue periférico e no fígado de pacientes infectados com HBV e a frequência de células T regulatórias circulantes correlacionou-se com altos títulos de carga viral. Em paciente com hepatocarcinoma associado ao HBV, a frequência de células T regulatórias circulantes também foram correlacionadas com a progressão da doença e mortalidade (BARONE; VISO, 2006; CHANG, 2010; LOPES; SCHINONI, 2011; YOU et al., 2009).

Ao longo do tempo, foi possível desenvolver uma maior compreensão sobre a relação entre os genótipos do HBV, progressão da doença e resultados clínicos. Para a infecção por HBV crônica, os resultados são variáveis. Muitos fatores virais e do hospedeiro, genótipos do HBV, mutação viral específica, carga viral e níveis quantitativos de HBsAg são importantes para sua predição (LIU; KAO, 2013).

2.4 Diagnóstico Laboratorial e Sorologia

O diagnóstico da infecção pelo HBV e o tipo da doença associada baseia-se em um conjunto de resultados clínicos, bioquímicos, sorológicos e histológicos (LIANG, 2009). Os primeiros testes para o diagnóstico são feitos através da detecção dos constituintes do vírus, nas diferentes fases evolutivas da infecção, através de testes sorológicos (pesquisa de antígenos e anticorpos) e moleculares (pesquisa quantitativa e qualitativa do DNA viral). Várias técnicas são empregadas no diagnóstico sorológico, entretanto, as mais utilizadas são os ensaios imunoenzimáticos (ELIZA), quimiluminescência, e ainda, pela imunohistoquímica. Para o diagnóstico molecular, utiliza-se técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), envolvendo

desde a técnica convencional até a em tempo real. O diagnóstico molecular é um componente crucial na avaliação de pacientes com infecção crônica e na avaliação da eficácia do tratamento viral (GONÇALVES; CAVALHEIRO, 2006; LOCK; MACMAHON, 2007; LOPES; SCHINONI; 2011; PARANÁ; SCHINONI; OLIVEIRA, 2008).

Um número de antígenos virais e seus respectivos anticorpos podem ser detectados no soro depois da infecção com o HBV (LIANG, 2009). Entre os marcadores para as infecções pelo HBV estão: 1) *HBsAg* - é o primeiro e mais importante marcador no diagnóstico das infecções aguda e crônica, e frequentemente é detectável de 6-10 semanas após a infecção. Sua presença indica que o indivíduo pode transmitir o vírus e sua persistência por mais de 24 semanas é indicativo de hepatite crônica; 2) *HBeAg* - é produzido nos hepatócitos durante a replicação viral, sendo assim, sua presença indica replicação viral ativa ou alta infecciosidade. Pode persistir até 10 semanas na fase aguda e em pacientes crônicos este marcador é associado a um mau prognóstico, que reflete na manutenção da infecção viral e maior taxa de infecção; 3) *HBcAg* - é um antígeno intracelular que não pode ser detectado no soro; 4) *anti-HBs* - é um anticorpo protetor que confere imunidade ao HBV. Está presente no soro após o desaparecimento do *HBsAg*, sendo indicador de cura e imunidade. Está presente isoladamente em pessoas vacinadas; 5) *anti-Hbe* - é detectado após o desaparecimento do *HBeAg*, muitas vezes no auge da doença clínica e é um marcador sorológico favorável durante a hepatite B aguda, indicando o início da recuperação; 6) *anti - HBc IgM* - sua presença indica infecção aguda ou recente, sendo encontrado no soro até 32 semanas após a infecção; 7) *anti - HBc IgG* - é um marcador de longa duração de exposição ao HBV, presente nas infecções agudas e crônicas. Os anticorpos *anti-HBc IgM* surgem no início dos sintomas, até 30 dias após o aparecimento do *AgHBs* e em geral são detectáveis por cerca de seis meses, enquanto o *anti-HBc IgG* permanece detectável por muitos anos, em geral, por toda vida, e sua presença marca uma exposição ao HBV no presente ou no passado (BRASIL, 2008b; CDC, 2011; GONÇALVES; CAVALHEIRO, 2006; LIANG, 2009; LOPES; SCHINONI, 2011; RODRÍGUEZ-FRIAS; JARDI, 2008; VAZ; TAKEI; BUENO, 2007).

2.5 Tratamento e Prevenção

O principal objetivo do tratamento é suprimir a replicação viral para o nível mais baixo possível, e assim evitar o desenvolvimento de insuficiência hepática, devido à hepatite

aguda fulminante ou hepatite B crônica com subsequente cirrose hepática, a emergência de carcinoma hepatocelular e a transmissão do HBV (TILLMANN, 2007).

Atualmente as drogas disponíveis para o tratamento são divididas em dois principais grupos: imunomoduladores – que incluem Interferon alfa (IFN – com duas formulações: IFN e PEG-IFN) e análogos de nucleotídeos/nucleosídeos – Lamivudina (LMV), Adefovir (ADV), Entecavir (ETV), Telbivudina (LdT) e Tenofovir (TDF). A resposta ao tratamento é avaliada baseada na diminuição dos níveis de HBV-DNA no soro, perda de HBeAg com ou sem soroconversão para antiHBe, perda do HBsAg com ou sem soroconversão para antiHBs, normalização dos níveis de ALT no soro e uma diminuição da inflamação hepática (VAN BOMMEL et al, 2010; YUEN; LAI, 2011).

A eficácia terapêutica também é relacionada ao tipo de genótipo do HBV. Os genótipos C, D e F são, em média, mais patogênicos que os outros genótipos e os genótipos A e B têm melhor resposta a INF (Interferon) que os genótipos C e D (GERLICH, 2013). Um amplo estudo revelou que a resposta a INF, incluindo soroconversão do HBeAg, eliminação do HBe e do HBV DNA é melhor no genótipo A, comparado com o D, e a resposta do genótipo B é melhor do que em C (WIEGAND; HASENCLEVER; TILLMANN, 2008). Outro estudo apontou que a taxa de soroconversão do HBeAg após um ano de tratamento com INF foi respectivamente, genótipo A (47%), genótipo B (44%), genótipo C (28%) e genótipo D (25%). A taxa de clareamento do HBsAg foi de 14% para o genótipo A, 9% genótipo B, 3% genótipo C e 2% para o genótipo D (BUSTER et al., 2008). Outros estudos registram que a taxa de soroconversão é mais alta para o genótipo A do que para os outros genótipos, e que o genótipo E tem uma pior resposta ao INF do que os outros genótipos (BOGLIONE et al., 2014; CHEN; LI; ZHANG, 2013). Outro estudo mostra que diferentes resultados sorológicos e virológicos foram obtidos para os diferentes tipos de genótipos. Durante tratamento com IFN, a diminuição mais rápida dos níveis de HBsAg foi observada nos genótipos A e B, além da melhor resposta sorológica depois da interrupção do tratamento. Em adição, foi indicado que, no tratamento com IFN, o genótipo C atingiu mais cedo a negatividade para o DNA HBV. Ainda no mesmo estudo, observou-se que o genótipo E apresentou maior dificuldade e o persistiu um maior período de tempo quanto ao tratamento (BOGLIONE et al., 2014).

Quanto à prevenção da doença, além de obedecer à estrita higiene com todos os procedimentos invasivos, como à exposição de sangue e fluídos corporais, a vacinação é a forma mais importante para a prevenção contra infecções pelo HBV (GERLICH, 2013). A imunização contra a hepatite B é realizada em três doses, com um intervalo de um mês entre a primeira e a segunda dose e de seis meses entre a primeira e a terceira dose (0, 1 e 6 meses). A

vacinação, após administração do esquema completo, induz imunidade em 90% a 95% dos casos (BRASIL, 2008b).

Mesmo que a vacinação seja a medida mais efetiva para reduzir a incidência global de hepatite B, o caminho para a erradicação apresenta alguns obstáculos, entre eles, pode-se exemplificar, a cobertura vacinal. Dados mostram que globalmente, a cobertura vacinal é de 69%, com a seguinte distribuição regional: 67% na região da África, 67% na região Europeia, 87% na região do Mediterrâneo Oriental, 88% nas Américas, 89% na região do Pacífico Ocidental e 49% no Sudeste Asiático (FRANCO et al., 2012). Estudos mostram que a prevalência do anticorpo anti-HBs diminui com o aumento da idade. Registros na China indicaram que a prevalência do anticorpo anti-HBs foi de 71,2% de 1-4 anos, de 55,5% e 57,5% de 5-9 anos e 10-14, respectivamente (LIANG, 2009). Resultados similares foram registrados na África, onde a prevalência do anti-HBs foi de 76,1% de 1-5 anos, 50% de 6-10 e 46,3% de 11-16 anos (AMPONSAH-DACOSTA et al., 2014). Outro fator relevante é a presença de HBV mutantes que tem sido detectados em indivíduos vacinados. Esses vírus apresentam uma alteração (mutação) no HBsAg, resultando em uma infecção que escapa da imunidade induzida por vacina. Adicionalmente, alguns indivíduos tem um HBsAg que são indetectáveis pelas técnicas atuais de detecção de HBsAg. Essas cepas são conhecidas como HBV “mutantes de escape” (KAJIWARA et al., 2008; OSIOWY, 2006).

2.6 Fatores imunogenéticos e Infecção pelo HBV

Citocinas são proteínas de peso molecular relativamente baixo, sendo, geralmente, constituídas de uma única cadeia polipeptídica. As citocinas representam uma ampla família de moléculas (*Fator de Necrose Tumoral* – TNF; *Interleucinas* – IL; *Interferon* – IFN), que desempenham um papel importante na iniciação e regulação da resposta imune. Algumas citocinas são também fatores quimiotáticos para tipos celulares específicos e recebem a denominação de quimiocinas (ABBAS; ANDREW, 2005; TUNÇBILEK, 2014).

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular (8-12kDa), com aproximadamente 70 a 80 aminoácidos de comprimento. São classificadas em quatro subfamílias (CXC, CC, CX3C e C). Essas proteínas direcionam o movimento das células mononucleares pelo corpo para contribuir com o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa e a patogênese da inflamação. As quimiocinas induzem a migração celular e ativação

ligando-se à receptores específicos nas células-alvo, denominados receptores de quimiocina (CHARO; RANSOHOFF; 2006).

Os receptores de quimiocina pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, e estão presentes na membrana celular da célula alvo; são compostos por cerca de 350 aminoácidos e possuem um peso molecular de cerca de 40kDa. Ainda que reconheçam mais de uma quimiocina, os receptores estão frequentemente restritos a uma única subfamília. Assim, os receptores podem ser designados como: CXCR1 a CXCR6 (ligação às quimiocinas CXC), CCR1 a CCR10 (ligação às quimiocinas CC), CX3CR1 (liga-se à fractalcina), XCR1 (liga-se a linfotactina) (ALLEN; CROWN, HANDEL, 2007; GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011; MURDOCH; FINNI, 2000; MURPHY et al., 2000).

O fígado é constantemente exposto à agentes microbianos do trato gastrintestinal, e portanto, parece ter adquirido um mecanismo especializado que previne uma superativação do sistema imune inato e adaptativo, induzindo um ambiente bastante tolerogênico. Isto envolve células imunes que podem ser encontradas apenas ou quase que exclusivamente, no fígado, incluindo células de Kupffer (KC), macrófagos residentes do fígado, células Natural Killer (NK) e células T Natural Killer (NKT). Além disso, as células estreladas hepáticas (CSH), hepatócitos, células dendríticas (DC) e KCs podem agir como células apresentadoras de antígenos. Este ambiente especial também impacta o recrutamento ativado por quimiocinas das células imunes no fígado, sob condições inflamatórias (TIEGS; LOHSE, 2010; WASMUTH; TACKE; TRAUTWEIN, 2010).

A interação quimiocina x receptores de quimiocina são provavelmente importantes na hepatite viral crônica, onde as células T são recrutadas para o parênquima hepático, afim de mediar o clareamento de hepatócitos infectados com o vírus da hepatite (AHN et al., 2006). A atração das células T para o fígado é controlada por quimiocinas, que são secretadas pelas células infectadas e interagem com seus receptores, como o CCR5, expresso nas células T recrutadas.

A resposta imune inicial contra o HBV promove a morte das células infectadas pelo vírus e a secreção de citocinas antivirais pelas células da imunidade inata. Entretanto, o controle da infecção não é alcançado nesse estágio de resposta ao HBV. A resposta imune mediada pelas células T é apontada como fundamental para a eliminação do vírus e a resolução da doença. Uma resposta bem sucedida ao HBV é o resultado da atividade específica antiviral das células T citotóxicas, que eliminam as células infectadas, e mecanismos não-citolíticos exercidos pelas citocinas liberadas pelas células T e não-T infiltradas. As citocinas são capazes de suprimir a expressão e a replicação viral, mediando o controle da infecção sem causar a morte das células

infectadas. A evolução da infecção para cronicidade está associada a uma resposta imune humoral fraca ou indetectável (FERRARI et al., 2003; GUIDOTTI et al., 1999; RIBEIRO; VISENTAINER; MOLITERNO, 2007).

Alguns estudos têm avaliado a influencia dos fatores genéticos na produção de citocinas por células do sistema imune (RIBEIRO; VISENTAINER; MOLITERNO, 2007; ROUHOU et al., 2011). Vários polimorfismos nas quimiocinas e receptores de quimiocinas tem se mostrado importante na patogênese da infecção viral, seja modulando a resposta virológica ou influenciando a gravidade da lesão hepática (CHARO; RANSOHOFF; 2006; PROMRAT; LIANG, 2003; WALD et al., 2007). Estudos sobre os polimorfismos nos genes de citocinas apontam para o papel dessas mutações na evolução da infecção pelo HBV, variando desde a patogênese de hepatite fulminante (LEIFELD et al., 2002) até sua ação na inibição da replicação viral (CHEN et al., 2005).

2.6.1 – O gene CCR5

O CCR5 é uma receptor de quimiocina CC acoplado à proteína G, que tem como ligantes CC, o CCL3, CCL4 e CCL5. Esse receptor é expressado por linfócitos CD8⁺, células NK, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, células dendríticas imaturas, granulócitos e linfócitos Th1, tendo papel na migração e ativação dessas células para o local de infecção, inflamação ou lesão (ARABABADI et al., 2010c; BALISTRERI et al., 2007; WU et al., 1997). Sabe-se que o CCR5 desempenha um importante papel na ativação da imunidade celular e migração em resposta à infecções, incluindo hepatite B (ARABABADI et al., 2010a).

O gene que codifica o CCR5 está localizado na região p21.3 do cromossomo 3 humano e consiste de uma única região aberta de leitura produzindo um único transcrito. Uma deleção de 32 pares de bases (CCR5 Δ 32) nesse gene leva a um alelo funcionalmente nulo. Investigações prévias mostraram que esta deleção é polimórfica em diferentes populações étnicas e geográficas, e que a mutação resulta em uma proteína disfuncional e com sua expressão diminuída. Indivíduos heterozigotos para a deleção (CCR5 Δ 32/+) tem níveis substancialmente reduzidos de CCR5 na superfície celular comparados com aqueles que são homozigotos para o alelo CCR5 normal (+/+). Estudos anteriores indicaram que a deleção CCR5 Δ 32 foi identificada em 10-15% de caucasianos (ABOUSAIDI et al., 2011; AL-ABDULHADI; AL-RABIA; WO, 2010; LIU et al., 1996; WU et al., 1997).

O CCR5 tem importante papel nas infecções virais. Tem sido documentado que o CCR5 é co-receptor do HIV e facilita a entrada do vírus nos linfócitos T CD4. A mutação CCR5 Δ 32 também tem uma correlação negativa com o desenvolvimento da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), portanto, o CCR5 parece desenvolver um papel importante no desenvolvimento da AIDS em pacientes infectados pelo HIV. Em contrário, o CCR5 tem papel protetivo contra outros vírus como Influenza, citomegalovírus e hepatite C (COENEN; NATTERMANN, 2010; DAWSON et al., 2000; LAI, 2012; SHEPPARD et al., 2002; VOMASKE et al., 2012). Alguns estudos têm focado na investigação do papel dos polimorfismos do gene CCR5 no curso da infecção pelo HBV e existem relatos que registram a presença de uma associação entre o receptor CCR5 e a persistência da infecção pelo HBV (AHMADABADI et al., 2013; SANCHOOLI et al., 2014). Em contraste, tem sido proposto que o CCR5 não funcional (CCR5 Δ 32) está associado à recuperação da infecção aguda pelo HBV devido ao desenvolvimento de uma resposta vigorosa das células T (REHERMANN et al., 1996).

Estudos apontam que, as células NK, o principal tipo de célula imune envolvida contra o HBV, tem sua atividade ótima quando mediada pelo ligante CCL5, e conseqüentemente, pelo receptor CCR5. Junto com as citocinas, CCL induz proliferação e ativação das células NK para a forma de células NK ativadas por quimiocinas, que destroem os hepatócitos (AJUEBOR; CAREY; SWAIN, 2006; FISICARO et al., 2009; YANG et al., 2009).

Tem sido mostrado que as células T CD4 positivas tem a expressão de CCR5 aumentada na hepatite B aguda quando comparada com a forma crônica (TREHANPATI et al., 2009). Achados anteriores indicam que os níveis de expressão do CCR5 pelas células NK e pelos linfócitos T citotóxicos foram diminuídos em pacientes infectados com HBV oculta (ARABABADI et al., 2010a, 2010b), portanto, o estado de expressão do CCR5 nessas células podem influenciar na resposta imune durante uma infecção. É provável que o CCR5 seja um regulador chave da resposta imune ao HBV e que sua expressão parece ser deficiente em pacientes infectados (SANCHOOLI et al., 2014). A frequência de heterozigose do gene CCR5 Δ 32 é mais alta em pacientes com hepatite B crônica que em controles, que mostra a relação desse polimorfismo com a suscetibilidade a desenvolvimento de doença hepática relacionadas ao HBV. A frequência do alelo CCR5 +/- (heterozigoto) é mais alta em pacientes com HBV crônica do que em sujeitos saudáveis, enquanto o alelo CCR5 +/+ é mais comum em pacientes com doença hepática grave do que em casos leves (SUNEETHA et al., 2006; TUNÇBILEK, 2014).

Nos diferentes registros, existem dados controversos sobre a associação dos polimorfismos do receptor CCR5, entre eles o Delta32, com a história natural, gravidade da doença e resposta ao tratamento antiviral (KHORRAMDELAZAD et al., 2013; GOEL et al., 2013). Ganzcac e colaboradores (2008) registraram que esta mutação não é prevalente em pacientes com infecção hepática crônica. Registros de Li e colaboradores (2011) indicam que a mutação também não foi associada com a reinfeção pelo HBV em pacientes pós-transplantados. Um estudo na população da Coreia revelou que a mutação CCR5 Δ 32 não está associada nem a persistência nem a cura da infecção pelo HBV (AHN et al., 2006). Contrariando estes resultados, dois estudos feitos na população dos Estados Unidos, mostraram que a mutação está correlacionada com uma redução no risco de desenvolvimento de HBV crônica (THIO et al., 2007, 2008). Outro estudo de pacientes indianos revelou que a mutação no gene CCR5 está fortemente associada com a infecção crônica pelo HBV (SUNEETHA et al., 2006). Estas discrepâncias nos estudos citados acima devem refletir as diferenças na população avaliada em termos de padrão genético, bem como fatores epigenéticos (SANCHOOLI et al., 2014).

\

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer o perfil epidemiológico, molecular e filogenético dos vírus da Hepatite B circulantes e o papel do polimorfismo do gene CCR5, em pacientes no estado de Roraima.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Realizar o sequenciamento parcial (gene S) para a análise dos genótipos e subgenótipos circulante na população HBV crônica (2013-2016);
- b) Caracterizar filogeneticamente as cepas do HBV circulantes (2013-2016), procurando inferir prováveis origens evolutivas e padrões de dispersão viral;
- c) Descrever o perfil epidemiológico dos portadores de Hepatite B crônica na população estudada, no período de 2013-2017;
- d) Detectar a frequência dos polimorfismos do gene CCR5 (CCR5 Δ 32), na população HBV crônica analisada e população controle.

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo I - Características clínicas e epidemiológicas de pacientes infectados com o vírus da hepatite B no estado de Roraima, Brasil.

O **artigo 1** refere-se ao objetivo específico c) desta tese. Este artigo encontra-se em fase de organização para submissão à publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Características epidemiológicas de pacientes infectados com o vírus da hepatite B no estado de Roraima, Brasil.

Resumo

A hepatite B é uma doença de distribuição universal e representa um importante problema de saúde pública na região Amazônica, que é considerada como área hiperendêmica. No estado de Roraima, a hepatite B ocupa o segundo lugar entre as hepatites virais, mas há uma escassez de estudos epidemiológicos em nível local. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil epidemiológico dos pacientes portadores de HBV do estado de Roraima, entre os anos de 2013-2017. Os participantes foram abordados no momento em que realizavam a coleta de sangue para verificação da carga viral e responderam à um questionário epidemiológico. As informações foram armazenadas em um banco de dados e as análises estatísticas realizadas pelo programa Biostat 5.0. Foram estudados 256 pacientes; observou-se uma maior frequência de casos do sexo masculino (56,25%), a faixa etária predominante foi de 31-50 anos (54,29%), 45,31% eram da raça parda, 29,68% apresentavam ensino fundamental incompleto, 44,53% eram casados e 66,40% eram residentes na capital Boa Vista. Em relação à provável fonte/mecanismo de infecção, a transmissão sexual ocorreu em 26,97% dos casos. Em 28,12% dos envolvidos, a vacinação foi informada como ignorada, e entre os que apresentaram a informação, o esquema vacinal completo representou 25%. Quanto ao contato com portador de HBV, 51,56% não apresentavam nenhum contato, e entre os que apresentavam, 53,12% indicaram contato ocupacional. A carga viral detectável <2000 UI/mL foi encontrada em 57,81% dos pacientes, 51,13% estava em tratamento e, entre os medicamentos, o mais frequente foi Tenofovir, com 56,04%. O perfil epidemiológico dos portadores de HBV representa uma importante ferramenta de vigilância e permite um melhor entendimento dos mecanismos que possam estar permitindo a disseminação da doença na população.

Palavras-chave: Epidemiologia; vírus Hepatite B; Roraima.

Introdução

A Hepatite B é uma doença viral infecciosa responsável por uma significativa morbidade e mortalidade humana, em todo o mundo (SOUTO, 2016). Globalmente, estima-se que 257 milhões de pessoas estejam infectadas com o vírus da Hepatite B. Em 2015, a hepatite B foi responsável por 887.000 mortes, a maioria por complicações, incluindo cirrose e hepatocarcinoma (OMS, 2018). O vírus da Hepatite B (HBV) pode ser transmitido através de contato com sangue, exudatos, e outros fluidos corporais, como sêmen e secreção vaginal. As rotas naturais de transmissão são as principais responsáveis pela alta prevalência da doença, incluindo transmissão sexual, vertical (perinatal, de mãe para recém-nascido) e horizontal através da exposição ambiental em casa, prisões e outras instituições de confinamento (Souto, 2016). A vacinação é a maneira mais eficiente de prevenção da hepatite B, entretanto, a taxa de infecção pode ser reduzida através de uma modificação do comportamento e melhorando a educação individual (ALAVIAN; FALLAHIAN; LANKARANI, 2010). Em 2015, a cobertura global com a terceira dose da vacina contra hepatite B atingiu 84%, e a cobertura global da vacina contra hepatite B no momento do nascimento foi de 39% (OMS, 2018). De 1999 a 2017, foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 587.821 casos confirmados de hepatites virais no Brasil. Destes, 218.257 (37,1%) são referentes aos casos de Hepatite B, que representa a segunda maior causa de óbitos por Hepatites Virais no país (BRASIL, 2018). No final do século 20, o Brasil foi classificado como uma região de endemidade moderada. No entanto, análises detalhadas mostraram uma distribuição altamente heterogênea da doença no Brasil, no qual a prevalência da Hepatite B aumentava das regiões Sul para o Norte do país. Entre os estados da região Norte, Acre, Amazonas, Roraima, Rondônia e Pará, tem a mais alta endemidade do país (SOUTO, 2016). De 2013 à 2015, as taxas de incidência da doença foram de, 18,4, 22,7 e 17,6, respectivamente. No ano de 2016, o estado de Roraima registrou um total de 118 casos confirmados de Hepatite B, representando uma taxa de incidência de 22,9 casos para cada 100 mil habitantes. Além disso, a capital de Roraima, Boa Vista, estava entre as cinco capitais com maiores taxas de incidência. Já no ano de 2017, o número de casos confirmados caiu para 74, representando uma taxa de incidência de 14,4 por 100 mil habitantes (BRASIL, 2017; 2018). O objetivo deste estudo foi determinar as características epidemiológicas de pacientes diagnosticados com Hepatite B e acompanhados pelo sistema público de saúde no estado de Roraima.

Material e Métodos

Este trabalho foi conduzido como um estudo epidemiológico descritivo, envolvendo pacientes com sorologia positiva para o HBV, que realizaram a coleta de sangue para carga viral no ambulatório do Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima (LACEN/RR), órgão estadual de referência para vários agravos de interesse em saúde pública, entre elas as Hepatites Virais, cabendo ao laboratório de estudo de Hepatites Virais, receber as solicitações de exames confirmatórios e realizar as coletas de sangue dos pacientes oriundos de todos os 15 municípios, incluindo a capital Boa Vista, onde 63,53% da população do estado está concentrada (IBGE, 2018). Os pacientes foram acompanhados de Janeiro de 2013 à Dezembro de 2017, totalizando 390 amostras. Os critérios de inclusão foram: paciente com sorologia positiva para HBV; portadores de Hepatite B crônica em tratamento ou não; ter idade superior a 18 anos. Os critérios de exclusão foram: ter idade inferior a 18 anos; ser portador de HCV, HDV e HIV. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Roraima (protocolos 121005/12 e 1.134.336 /2015)

Os indivíduos foram convidados a participar do estudo, onde inicialmente foi dada uma informação prévia sobre os objetivos e metodologia da pesquisa. Após o aceite, cada voluntário leu e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em que o mesmo permitia que o pesquisador aplicasse um questionário de abordagem e realizasse a coleta de sangue, de forma confidencial. No TCLE, constavam informações como: objetivo da pesquisa, esclarecimentos sobre como serão realizados os procedimentos de coleta, assim como os benefícios gerados pela sua participação. Após assinar o TCLE os pacientes responderam a um questionário, que apresentava questões relacionadas ao indivíduo (sexo, idade, estado civil, naturalidade), características socioeconômicas (nível de escolaridade, ocupação), possíveis fatores relacionados à transmissão da hepatite B (procedimento médico e cirúrgico, hábitos de higiene, uso de drogas e comportamento sexual) e fatores relacionados à doença (ano do diagnóstico, presença dos sintomas, tipo de tratamento, biópsia). A partir dos prontuários, quando possível e dependendo das informações que eram registradas pelos médicos especialistas, foram obtidas informações sobre os resultados sorológicos, carga viral, dados clínicos de tratamento, resultados das biópsias hepáticas e pesquisa do anti-HVC, anti-HDV e anti-HIV.

No momento da entrevista, para a coleta de dados do questionário, alguns pacientes se recusaram a responder o questionário, mesmo realizando a coleta e autorizando a busca de dados nos prontuários. Nesses casos, todas as informações foram dadas como ignoradas.

As informações coletadas foram armazenadas em um banco de dados usando o software Excel 2003 (Microsoft Office). Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2008). Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva ou pelos testes Exato de Fisher, Mann-Whitney, Qui-Quadrado de aderência e tabela de contingência (2x3 ou 2x4). Para os dados paramétricos, o teste t foi utilizado para comparar valores de médias entre dois grupos. A associação entre variáveis qualitativas foi determinada usando Odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%). Os resultados com valor $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados e Discussão

A população do estudo foi composta por 390 amostras positivas para o HbSAg, agudos ou portadores crônicos. Deste quantitativo, foram excluídas 134 amostras duplicadas que representavam diferentes coletas de um mesmo paciente ao longo do acompanhamento das coletas de sangue, o que resultou em 256 pacientes. Destes (tabela 1), 144 (56,25%) eram homens e 112 (43,75%) eram mulheres, sendo observado uma diferença entre os dois grupos, indicando que a doença afetou mais aos homens do que as mulheres, durante o período estudado ($X^2 = 4,00$; $p = 0,0455$).

Tabela 1 – Distribuição dos casos de Hepatite B em Roraima segundo o gênero

Sexo	Feminino	%	Masculino	%	Total	p^*
	112	43,75	144	56,25	256	0,0455

* Teste X^2 de Aderência

Resultados similares foram encontrados por Cruz e colaboradores (2009), que realizaram um estudo epidemiológico em um serviço de saúde pública do estado de São Paulo, e analisaram um grupo de 112 portadores de hepatite B, encontrando uma predominância dos casos entre os indivíduos do sexo masculino, correspondendo a 62,5% dos casos, indicando uma diferença estatística em relação ao sexo ($p < 0,01$). Um estudo investigando 60 pacientes infectados por HBV, provenientes do Hospital Universitário da Universidade Federal de Pernambuco, indicou que 39 (65%) eram homens e 21 (35%) eram mulheres (MOURA et al., 2013). Um outro estudo realizado na cidade de Manaus (AM) também indicou uma alta

freqüência de casos de hepatite B em homens (70,2%), enquanto que em mulheres a ocorrência dos casos representou 29,8% (ARAÚJO, 2004). Também no estado do Amazonas, Crispim e colaboradores (2014) analisaram grupos de indivíduos HBsAg positivos de dois municípios distintos (Manaus e Eirunepe) e encontraram duas distribuições diferentes nos grupos estudados. Os homens prevaleceram na cidade de Manaus, enquanto as mulheres predominaram entre os participantes de Eirunepe ($p < 0,0001$). A análise de 529 pacientes recrutados no Hospital Universitário de Ribeirão Preto registrou 65% de indivíduos do sexo masculino. Ainda relataram que 51/65 (78%) pacientes que apresentaram cirrose eram homens ($p = 0,0001$), demonstrando a associação entre o sexo masculino e esta forma de doença hepática (CHACHÁ et al., 2011). Ainda corroborando com nossos dados, Justino e colaboradores (2014), descreveram o perfil epidemiológico de 125 pacientes portadores de HBV da cidade de Natal – RN, observando uma prevalência maior de casos entre o sexo masculino (77,85). No Brasil, do total de casos de Hepatite B notificados de 1999 a 2017, 118.820 (54,4%) ocorreram entre homens (BRASIL, 2018). Diferindo dos resultados desta pesquisa, Gusatti e colaboradores (2015), que investigaram 202 pacientes atendidos no ambulatório de hepatites virais, na cidade de Chapecó, Santa Catarina, encontraram a taxa de homens e mulheres quase idênticas (54,5-45,5%). Outro estudo realizado por Nicolau e colaboradores (2017) investigou a situação epidemiológica da hepatite B em Recife, e indicou que entre os 988 casos confirmados, as mulheres foram mais acometidas que os homens, com uma incidência de 591 (59,8%) casos, contra 397 (40,2%). Dados recentes demonstram que no Brasil, o sexo feminino apresenta uma exposição mais precoce ao vírus, porém, o período máximo de exposição é menor que nos homens, o que resulta em um menor número total de casos entre as mulheres. Na região Norte, assim como o restante do país, o sexo feminino também apresenta uma exposição mais precoce ao vírus, porém, diferente do restante do país, com menor diferença quanto ao período de risco máximo em relação ao sexo masculino. Assim, na região Norte, o sexo feminino concentrou a maioria dos casos no período de 2004-2014 (BRASIL, 2015).

Em relação a idade, a média \pm DP da população estudada foi de 43 \pm 11,5 anos. A faixa etária (tabela 2) predominante foi a de 31-50 anos, representando 54,29% do total ($X^2 = 135,969$; $p < 0,0001$), seguida da faixa etária de 51 anos ou mais (25%) e a menos prevalente foi a faixa etária de 18-30 anos, que englobou 14,84% dos indivíduos. Essa prevalência também foi observada quando se considerou as faixas de idade por sexo, nas mulheres representou 50% ($X^2 = 46,00$; $p < 0,0001$) e nos homens 57,63% ($X^2 = 95,16$; $p < 0,0001$).

Tabela 2 – Distribuição dos casos de Hepatite B em Roraima segundo faixa etária

Idade	Feminino	%	p*	Masculino	%	p*	Total	%	p*
18 - 30	24	21,42		14	9,72		38	14,84	
31 - 50	56	50	<0,00001	83	57,63	<0,00001	139	54,29	<0,00001
51 - +	26	23,2		38	26,38		64	25	
Ignorado	6	5,35		9	6,25		15	5,85	
Total	112			144			256		

*Teste X² de Aderência

Nossos resultados estão de acordo com a maioria dos estudos de outras regiões do país, que também mostraram que grande parte dos indivíduos se encontravam nesta faixa etária (ANASTÁCIO et al., 2008). A média de idade dos casos de infecção por hepatite B no país em 2015, foi de 35,54 anos (BRASIL, 2015). No ano de 2017, o maior percentual de casos notificados se concentrou entre indivíduos de 30 a 44 anos (36,8% dos casos). No entanto, quando consideramos a faixa etária por sexo, encontramos dados diferentes de nossos resultados, uma vez que os casos detectados em indivíduos do sexo masculino concentraram-se em indivíduos de 60 anos ou mais (14,2%) e entre os 35 e 39 anos (13,8%). Já entre as mulheres, a maioria dos casos detectados concentraram-se entre aquelas de 25 a 34 anos de idade (26,7%) (Brasil, 2018). Dados do Ministério da Saúde (2012) indicaram que no Brasil, a taxa de detecção de casos de hepatite B é maior no sexo feminino entre os 15 e 29 anos de idade, e no sexo masculino em menores de 10 anos e maiores de 30 anos. No Brasil, em 2010, observou-se uma maior taxa de detecção por 1000.000 habitantes, na faixa etária de 35-49 anos (11,4), em 2017, as maiores taxas de detecção foram observadas em indivíduos entre 35 e 59 anos, cerca de 11 casos para cada 100.000 habitantes (BRASIL, 2012; 2018). Esses resultados se devem provavelmente aos programas nacionais de imunização. Entre 1990 e 1992, nos diversos estados que compreende a região Amazônica, a vacina contra o HBV foi integrada no programa Nacional de Imunização (PNI). A partir de 1990, a vacina passou a ser oferecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Desde 1998, o PNI recomenda que crianças a partir do seu nascimento, sejam vacinadas contra a Hepatite B. Em 2001, a faixa etária de imunização foi ampliada para 19 anos de idade, em 2011 para 24 anos e em 2012, foi estendida para 29 anos (FONSECA, 2007; PIMENTEL; SCHINIONI; FREIRE, 2012; BRASIL, 2012). Em Roraima, a cobertura vacinal da vacina hepatite B acumulada no período de 1994-2011 atingiram 90,2% da população de 1 a 29 anos de idade. No grupo etário de 1 a 19 anos ficou em 100,3%,

decrecendo para 58,97% no grupo de 20 a 24 anos e 31,66% no grupo de 25 a 29 anos (BRASIL, 2011).

Quanto a raça (tabela 3), verificou-se que a raça parda representada por 45,31% do total de pacientes do estudo, prevaleceu em relação a outros grupos étnicos ($X^2=189,35$; $p<0,0001$), fato também observado quando analisamos os sexos separadamente, a raça parda nas mulheres representou 52,67% ($X^2=114,5$; $p<0,0001$) e nos homens 39,58% ($X^2=85,75$; $p<0,0001$). Nossos resultados corroboram com estudos prévios, que indicaram para a região Norte, um maior número de casos notificados entre pardos (73,8%) (BRASIL, 2012). Similar aos nossos resultados, Barros e colaboradores (2014) analisaram 133 pacientes com hepatite B crônica no estado do Maranhão e 66% pertenciam a raça parda. Diferente de nossos resultados, Cruz e colaboradores (2009) encontraram em seus estudos epidemiológicos na região Sudeste do país uma distribuição de 75,7% de pacientes HBV pertencentes a raça branca ($p = 0,06$) e apenas 9,7% pardos ($p=0,18$). Ademais, em 2017, o país registrou maior concentração entre as pessoas de raça/cor branca (46,5%), seguida da parda (41,2%), preta (10,1%), amarela (1,5%) e indígena (0,7%) (BRASIL, 2018). No Brasil, existe uma população altamente miscigenada e em Roraima, esse padrão não é diferente do restante do país. Com relação a etnia, na América Latina, a infecção pelo HBV tem sido mais frequente em brancos e pardos (TANNO; FAY, 2005).

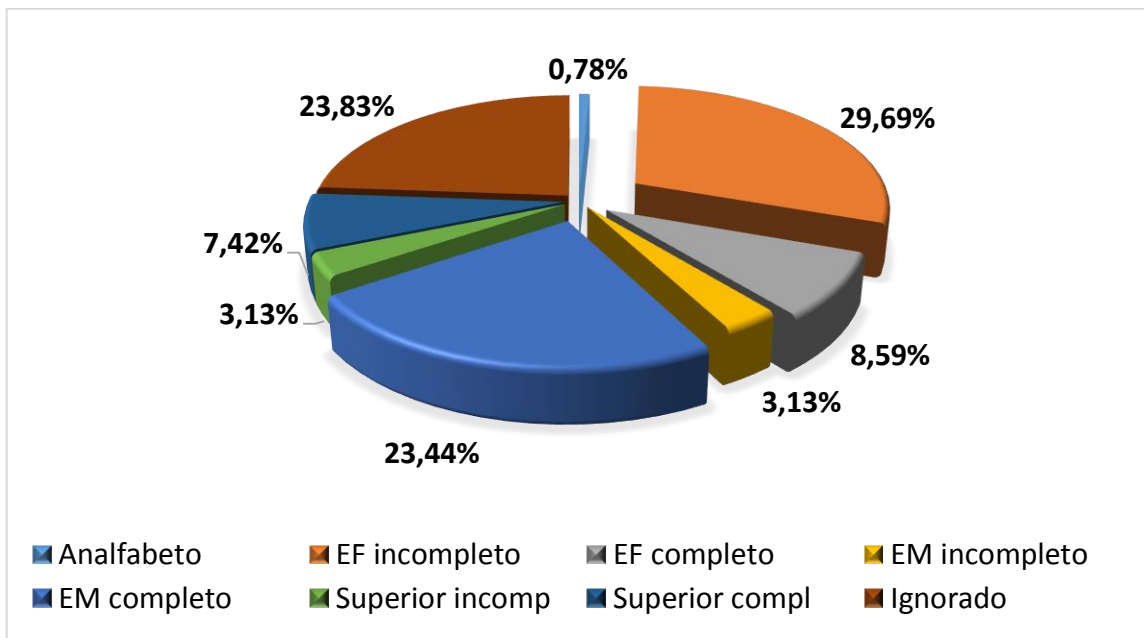
Tabela 3 - Distribuição dos casos de Hepatite B em Roraima segundo raça/cor

Raça	Feminino	%	<i>p</i> *	Masculino	%	<i>p</i> *	Total	%	<i>p</i> *
Branca	17	15,17		24	16,66		41	16,01	
Parda	59	52,67	<0,0001	57	39,58	<0,0001	116	45,31	<0,0001
Preta	9	8,03		22	15,27		31	12,10	
Indígena	7	6,25		7	4,86		14	5,46	
Amarela	2	1,78		0	0		2	0,78	
Ignorado	18	16,07		34	23,61		52	20,31	
Total	112			144			256		

*Teste X^2 de Aderência

Os resultados relacionados ao nível de instrução (gráfico 1) mostraram que a maior parte (29,68%) dos pacientes envolvidos, tinham ensino fundamental incompleto ($X^2= 183,81$; $p<0,0001$), em oposição aos indivíduos que declararam ser analfabetos ou, ainda, ter ensino médio incompleto ou superior incompleto, os quais, nos três casos, apresentaram o menor percentual, respectivamente, 0,78%, 3,12% e 3,12%. Dados similares foram encontrados por Santos e Moraes (2017), quando definiram o perfil epidemiológico e sociodemográfico de 90 indivíduos infectados com hepatite B no município de Vitória da Conquista – BA, e observaram que 35,96% da população analisada apresentavam ensino fundamental incompleto. Dados do país, entre os anos de 2007-2017 indicaram que a maioria dos casos ocorreram em pessoas que tinham entre a 5ª e 8ª série incompletas (17,5%) e o menor percentual entre aquelas com superior incompleto (1,8%) (BRASIL, 2018). O nível socioeconômico e cultural da população influencia diretamente na sua percepção do processo saúde-doença, e conseqüentemente sua qualidade de vida. A baixa escolaridade é um fator importante pois através da falta de conhecimento sobre as ISTs (Infecções Sexualmente Transmissíveis) e suas formas de prevenção, o indivíduo pode contrair a infecção (CARLO et al., 2008; SANTOS; MORAIS, 2017).

Gráfico 1 – Distribuição dos casos de hepatite B em Roraima por nível de escolaridade



Em relação ao estado civil (tabela 4), houve uma predominância de casos entre os pacientes casados, representando 44,53% do total ($X^2= 219,82$; $p<0,0001$). Essa prevalência também foi observada quando se considerou o estado civil por sexo, entre os homens

representou 45,13% ($X^2= 139,08$; $p<0,0001$) e entre as mulheres 43,75% ($X^2= 83,10$; $p<0,0001$). Resultados similares foram encontrados por Prestes-Carneiro e colaboradores (2016), quando determinaram as características clínicas, demográficas e epidemiológicas de uma coorte de 75 pacientes infectados com HBV em um hospital público de Presidente Prudente - SP e verificaram que a maioria, 41/75 (54,7%) dos pacientes, eram casados. Outro estudo realizado na cidade de Natal-RN, investigou 125 pacientes infectados com HBV e indicou que em relação a distribuição do estado civil houve uma predominância dos casados (53,63%), seguidos de solteiros (31,18%) (JUSTINO et al., 2014).

Tabela 4 – Distribuição dos casos de Hepatite B em Roraima segundo estado civil

Estado Civil	Feminino	%	<i>p</i>*	Masculino	%	<i>p</i>*	Total	%	<i>p</i>*
Solteiro	22	19,64		26	18,05		48	18,75	
Casado	49	43,75	<0,0001	65	45,13	<0,0001	114	44,53	<0,0001
Amigado	7	6,25		6	4,16		13	5,07	
Divorciado	4	3,57		2	1,38		6	2,34	
Viúvo	4	3,57		2	1,38		6	2,34	
Ignorado	26	23,21		43	29,86		69	26,95	
Total	112			144			256		

*Teste X^2 de Aderência

Com relação ao município de residência (gráfico 2), foi observado uma predominância (66, 40%) de indivíduos que moravam na capital Boa Vista ($X^2= 1385,39$; $p<0,0001$), no entanto, cabe destacar que a proporção sem informação foi de 8,98%, seguido de 6,25% para o município de Caracará e 5,46% para o município de Mucajaí. Dados do Departamento de Vigilância Epidemiológica de Roraima (DVE-RR) para o primeiro quadrimestre de 2016, registraram que a maioria dos casos ocorreram no município de Boa Vista, seguidos de Caracará e Mucajaí, na mesma proporção.

Quanto à provável fonte ou mecanismo de infecção (gráfico 3), observou-se que a maioria dos relatos de transmissão (26,97%), ocorreram por transmissão sexual ($X^2= 347,405$; $p<0,0001$), seguida de tratamento odontológico (13,48%), compartilhamento de escova de dente/lâmina de barbear/ material de manicure/pedicure (12,21%) e tratamento cirúrgico (11,95%). Nesta categoria, destaca-se o fato de que 11,45% entre os pacientes investigados essa informação foi registrada como “ignorado”. Este dado é preocupante, pois torna a informação de provável fonte/mecanismo de infecção subnotificada, dificultando o conhecimento de como

os novos casos podem ser evitados, podemos inferir também o desconhecimento de possíveis fontes de transmissão do vírus da hepatite B, ressaltando a necessidade de mais sensibilização da população sobre essa doença. Outro dado da pesquisa, aponta que a maioria dos pacientes do estudo (51,95%) relataram não ter mantido contato sexual com parceiro portador de hepatite B ($X^2= 99,71$; $p<0,0001$). Entretanto, a segunda maior frequência de respostas para esse quesito, foi a informação “ignorado”, abrangendo 43,75% dos casos, novamente podemos inferir o possível desconhecimento até mesmo do parceiro quanto a ser portador da doença.

Gráfico 2 – Distribuição dos casos de Hepatite B em Roraima por município de residência

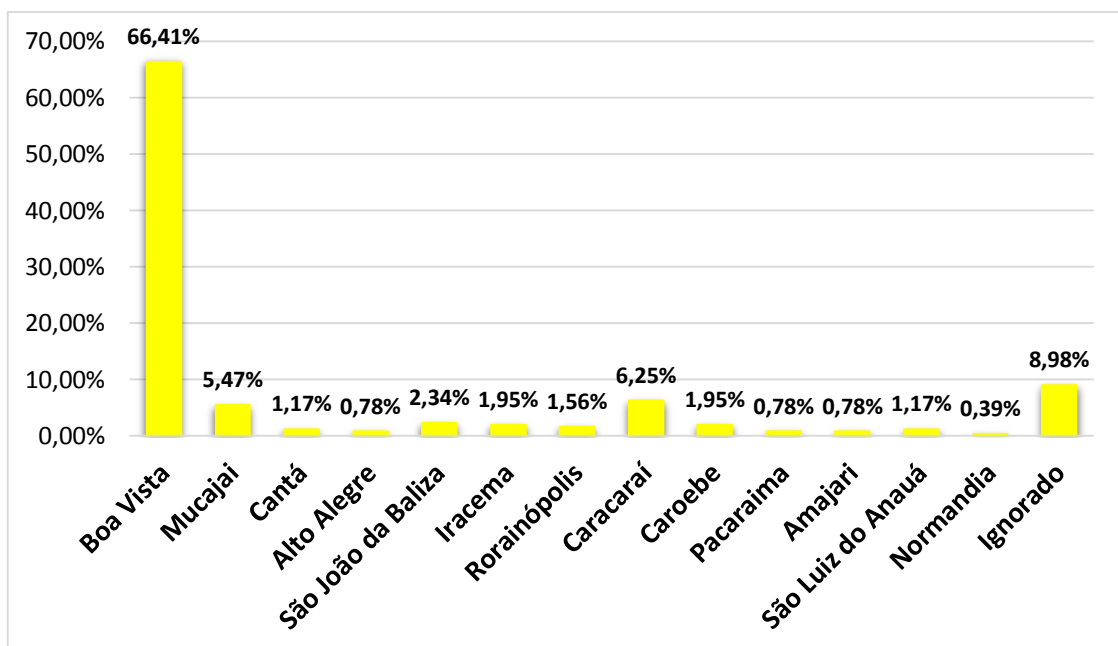
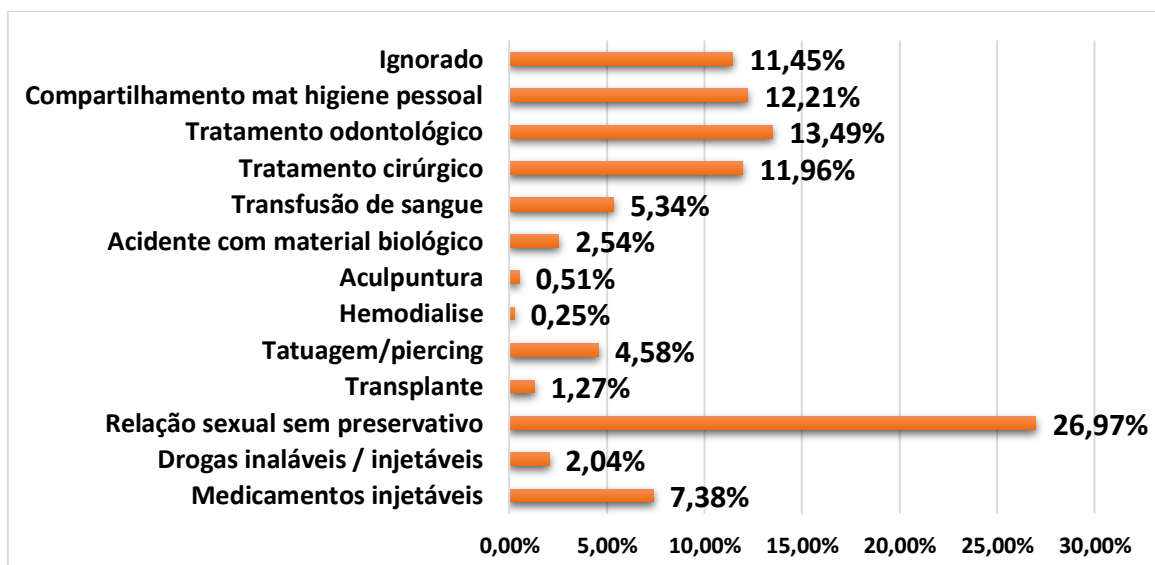


Gráfico 3 - Distribuição dos casos de Hepatite B por provável fonte/mecanismo de infecção



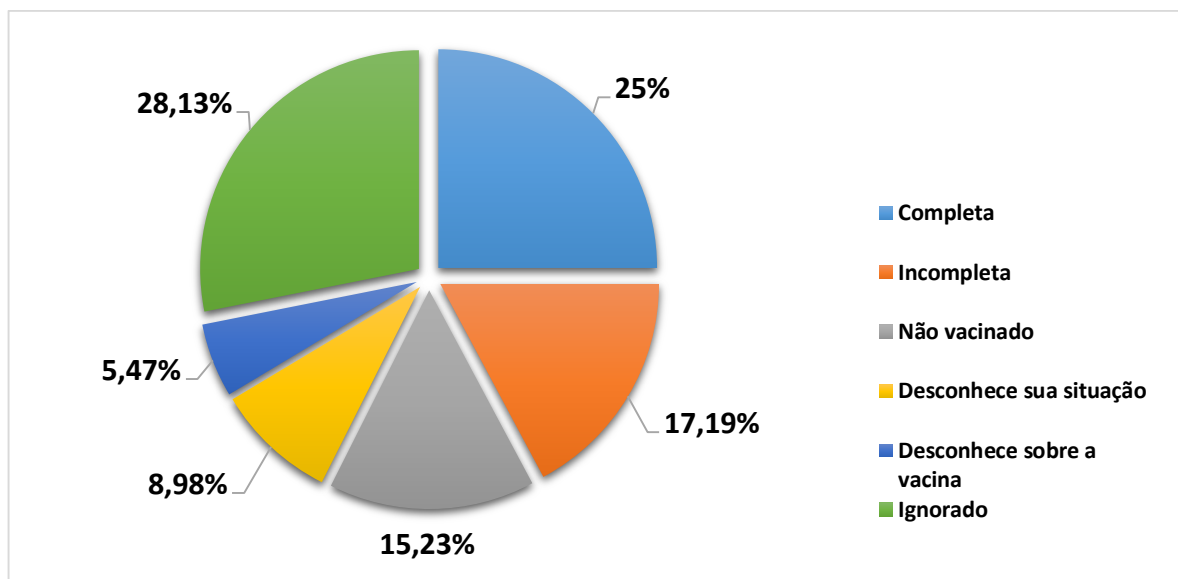
Concordando com o resultado encontrado neste estudo, Santos e Morais (2017) verificaram que entre os pacientes portadores de Hepatite B analisados em um município Baiano, a via sexual foi a provável fonte de infecção (64,45%), seguido de tratamento dentário e cirúrgico (7,78%). Prestes-Carneiro e colaboradores (2016) determinaram que a maior parte dos pacientes investigados em seu estudo apresentaram como provável fator de infecção, tratamento dentário (41,3%). Duas ou três décadas atrás, a esterilização de materiais médicos e dentários, não atendia aos padrões internacionais, especialmente nos países em desenvolvimento, permitindo a propagação do HBV. Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, incluindo a Região Amazônica, procedimentos de saúde e nosocomial, como injeções intravenosas, ataduras e pequenas cirurgias ainda são uma importante fonte de infecção pelo HBV (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; DANZMANN et al., 2013; PRESTES-CARNEIRO et al., 2016). Outro estudo de Abreu e colaboradores (2013) também indicou que entre os casos de Hepatite B do Piauí (2007-2010) a via sexual foi a maior fonte de infecção, seguida de tratamento dentário. Assim também, Nicolau e Colaboradores (2017) identificaram a transmissão sexual como sendo a mais prevalente entre os pacientes portadores de HBV analisados. Dados relacionados à provável fonte/mecanismo de infecção relacionada ao Brasil, o Boletim Epidemiológico de hepatite virais aponta que, em 2017, observou-se em mais da metade dos casos notificados no país (58,5%) a informação registrada como “ignorada”. No entanto, entre os casos onde era conhecido o provável mecanismo/fonte de infecção, a maioria ocorreu por via sexual (21,2%). Práticas com múltiplos parceiros, elevam o risco de infecção pelo HBV. Indivíduos com história de atividade sexual com mais de um parceiro em seis meses apresentam alto risco para exposição ao vírus (OLIVEIRA et al., 2007). Esses resultados também podem indicar práticas sexuais inseguras.

Em relação à forma como cada paciente ficou sabendo da infecção pelo HBV, os resultados demonstraram que a maior frequência (31,64%) foi a triagem sorológica ($X^2= 87,78$; $p<0,0001$), relacionada aos testes rápidos, que tem o objetivo de pesquisar por marcadores da infecção, principalmente quando o paciente apresentava indicação da doença em parceiro sexual ou em algum membro da família, ou por estar realizando exames para doação de sangue. Nesta categoria a informação “ignorado” apresentou a segunda maior frequência 23,82%. A prevalência média do HBV no Brasil é em torno de 8% e na Região Amazônica é de 21,4% (BARROS et al., 2008; DIOGO et al., 2012). Uma das medidas profiláticas no controle da progressão da hepatite B é o controle sorológico. Outro dado analisado foi quanto à forma clínica da doença, demonstrando que a maior parte dos pacientes (66,40%) apresentaram algum tipo de sintoma relacionado à infecção ($X^2= 130,60$; $p<0,0001$). Esse resultado concorda com

os achados de Santos e Morais (2017) que relataram 76,67% de pacientes apresentando sintomas. No entanto, difere de Moschetta e Peres (2007), que analisando a epidemiologia do HBV em indivíduos de Chapecó- SC relataram que 91,2% eram portadores assintomáticos. Dois terços dos indivíduos infectados apresentam formas assintomáticas e evolui para cura, um terço tem manifestações clínicas e desses, apenas 10% tornam-se portadores crônicos do vírus (BARONE, 2008; LOPES E SCHINONI, 2011).

Quanto à vacinação contra Hepatite B (gráfico 4), observou-se que entre a maioria (28,12%) ($X^2= 59,51$; $p<0,0001$) dos indivíduos infectados essa informação foi registrada como “ignorado”, dificultando melhores avaliações sobre a cobertura vacinal da população estudada. No entanto, entre aqueles onde a situação vacinal era conhecida, 25% apresentaram sistema vacinal completo, e 15,23% não eram vacinados.

Gráfico 4 – Distribuição da frequência quanto à situação vacinal dos pacientes analisados no estudo



Diferentes fatores constituem barreiras para a vacinação: receio quanto aos efeitos colaterais, falta de percepção do risco de infecção, ausência de informação sobre a transmissão, pressão no trabalho e dificuldades de acesso (ASSUNÇÃO, 2012). De acordo com o que encontramos, Santos e Morais (2017) verificaram que em 42,2% dos pacientes portadores de HBV analisados em seu estudo, a informação sobre situação vacinal foi registrada como “ignorada”, 11,11% apresentaram vacinação completa e 40% não eram vacinados. Por outro lado, divergente do que encontramos, Abreu e colaboradores (2013) registraram que apenas 11,4% dos pacientes envolvidos na pesquisa realizada no Piauí exibiram cobertura completa,

24,1% ignorado, e a maior frequência, 49,5%, não apresentavam nenhuma cobertura vacinal contra a doença. A medida mais eficaz contra a Hepatite B é a imunização ativa da população, com o emprego das vacinas atualmente disponíveis, altamente eficientes e seguras (OSTI; MARCONDES-MACHADO, 2010; ABREU et al., 2013). A vacinação constitui uma das intervenções de Saúde Pública mais relevantes, dado seu caráter coletivo. Esta estratégia tem sido muito importante na redução da morbidade e da mortalidade por doenças preveníveis por imunização, como é o caso da hepatite B, mas é fundamental que as coberturas sejam altas e homogêneas para quebrar a cadeia de transmissão (BRASIL, 2001). No Brasil, a vacina contra hepatite B foi inicialmente disponibilizada para a população da área endêmica da região da Amazônia ocidental brasileira, a partir de uma campanha de vacinação, em 1989. Atualmente, a vacina contra hepatite B é disponibilizada gratuitamente para todos os indivíduos menores de 50 anos, e está indicada em qualquer faixa de idade para gestantes ou indivíduos em situação de vulnerabilidade: profissionais de saúde, coletores de lixo, comunicantes de portadores de HBV, homens que fazem sexo com homens, mulheres que fazem sexo com mulheres, lésbicas, gays, bissexuais, manicures, pedicuros, profissionais do sexo, dentre outros (BRASIL, 2013). Em Roraima, por ser área endêmica para este agravo e ter população pequena, a vacina está disponível para todas as faixas etárias, mesmo as que estejam acima da recomendada pelo Ministério da Saúde (BARROS, 2013).

Quanto ao fato de os pacientes analisados possuírem contato com portador de Hepatite B, a maioria 51,56%, relatou não apresentar nenhum contato ($X^2= 191,61$; $p < 0,0001$), seguido de 25% representando aqueles que apresentavam algum contato (sexual, ocupacional ou familiar/domiciliar) e em 23,43% essa informação estava como “ignorado”. Dentre os pacientes que apresentavam algum tipo de contato com portador de Hepatite B, observou-se uma predominância (53,12%) da forma ocupacional, seguida de 42,18% para a forma domiciliar/familiar e 4,68% para a forma sexual ($X^2= 24,78$; $p < 0,0001$). Vários são os tipos de exposições que podem trazer risco de transmissão ocupacional do vírus da hepatite B; dentre eles podemos citar: exposições cutâneas e percutâneas, lesões provocadas por instrumentos perfurocortantes, contato com pele não-íntegra, exposição em mucosas, respingos nos olhos, nariz, boca e mordeduras humanas quando envolvem a presença de sangue (VIEIRA et al., 2009). A análise dos riscos ocupacionais exige conhecimento prévio do processo de trabalho. Esse reconhecimento do contexto laboral possibilita a adoção de medidas prévias de prevenção a acidente de trabalho. A maioria dos profissionais desconhece as formas de transmissão do vírus da hepatite B, bem como o número de doses necessárias da vacina para conferir imunidade (PINHEIRO; ZEITOUNE, 2008). Muitos estudos mostraram que um membro da família

infectado aumenta significativamente o risco de transmissão do HBV (ALAVIAN et al., 2004). Na Região Amazônica, uma gama de estudos demonstram a importância da transmissão familiar ou horizontal, caracterizada por contato doméstico, incluindo indivíduos morando na mesma residência ou em área peridomiciliar. Um desses estudos realizados por Lobato et al. (2006) demonstrou que em relação aos fatores de risco para a infecção pelo HBV, o uso compartilhado de escovas de dentes entre os portadores de HBV e seus familiares foi de 72,7%; a presença de pelo menos um portador de HBV entre os membros da família (pai, mãe, irmãos) foi de 75%; além disso, 73,7% dos parceiros dos indivíduos analisados foram positivos para o anti-HBc e 10,4% dos descendentes do grupo analisado foi positivo para o HBsAg. Vários fatores estão relacionados ao risco de transmissão intrafamiliar do HBV. Incluindo a exposição aos fluidos corporais de uma pessoa com feridas na pele e uso compartilhado de itens de higiene pessoal como escova de dentes, toalhas, tesouras para unhas e barbeadores (EROL et al., 2003).

Quando analisamos a carga viral (tabela 5) dos indivíduos envolvidos no estudo, encontramos uma diferença significativa, onde a maioria (57,81%) apresentou carga viral detectável <2000 UI/mL ($X^2= 80,37$; $p < 0,0001$), seguido de carga viral indetectável (29,68%) e carga viral >2000 UI/mL (12,5%). Nossos resultados são similares ao que foi encontrado em estudo prévio de Barros e colaboradores (2014), que realizaram um estudo envolvendo 133 pacientes com hepatite B crônica no estado do Maranhão e destes 60 (50%) apresentaram carga viral <2000 UI/mL. Outro estudo, avaliou 109 pacientes crônicos acompanhados em um hospital de referência do Município de São Paulo, onde 67% apresentavam carga viral <2000 UI/mL (LIMA, 2016).

Tabela 5 – Distribuição da carga viral presente nas amostras de sangue dos pacientes do estudo

CARGA VIRAL	>2000 UI/mL	%	<2000 UI/mL	%	Indetectável	%	Total
	32	12,5	148	57,81*	76	29,68	256

* $X^2= 80,37$; $p < 0,0001$

No soro dos pacientes são determinados o HBsAg, que significa a presença do vírus, o HBeAg, relacionado a replicação viral, e o HBV DNA, que em dosagem quantitativa, representa a carga viral. A quantificação do HBV DNA é útil para determinar se há replicação viral em portadores crônicos de HBsAg, para decidir na indicação de tratamento, bem como monitorar sua resposta. De acordo com a primeira norma internacional para HBV DNA a carga viral do HBV é expressa em unidades internacionais por mL (UI/mL), com um índice de conversão de 5,26 cópias por mL (BRASIL, 2010). Desde o início da inclusão dos níveis da

carga viral, no estudo dos pacientes com hepatite B crônica, tem-se adotado alguns critérios para definição de elevada ou baixa carga viral do HBV. Métodos sensíveis como a PCR em tempo real, tem sido empregados para essa quantificação. Essas técnicas são capazes de detectar limites muito baixos de HBV DNA, entre 250-1000 cópias/mL (50-200 UI/mL). Uma carga viral elevada nos pacientes HBeAg positivos deverá ser maior que 20.000 UI/mL, no HBeAg negativo, maior que 2000 UI/mL, e nos portadores inativos, deve estar persistentemente abaixo de 2000 UI/mL. Estudos investigaram o papel da replicação do vírus da Hepatite B como fator preditivo de progressão da doença, demonstrando uma relação direta entre a carga viral e a progressão para cirrose ou hepatocarcinoma. Portanto, a quantificação do HBV-DNA é uma ferramenta importante no manejo com os pacientes de hepatite B crônica. O risco começa a crescer significativamente a partir de 10.000 cópias/mL (2000 UI/mL), nível menor do que o considerado como de importância clínica. (TSIANG et al., 1999; ILOEGE et al., 2006; FERREIRA; BORGES, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, 2009).

Como já citado anteriormente, a maior parte dos pacientes envolvidos no estudo apresentaram carga viral abaixo do que é considerado como importante para terapêutica. Nossos dados indicaram que entre os pacientes que apresentaram carga viral detectável, 20,81% estavam em tratamento e 51,13% estavam sem tratamento, representando a maioria entre este grupo ($X^2= 28,23$; $p < 0,0001$). Quanto aos pacientes com carga viral indetectável, 16,28% estavam realizando tratamento com antivirais e 11,40% não estavam, neste grupo, não observamos diferenças entre as frequências ($X^2= 1,61$; $p = 0,2041$), como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6– Distribuição dos pacientes com carga viral detectável e indetectável e o tratamento

CARGA VIRAL	Com Tratamento	%	Sem Tratamento	%	Total	p*
INDETECTÁVEL	36	16,28	26	11,40	62	0,0192
DETECTÁVEL	46	20,81	113	51,13	159	
Total	82		139		221	

* Teste X^2 – Tabela de contingência 2x2; OR= 3,40 IC95% (1,8483-6,2593), $p=0,0001$

Nesse sentido, analisamos se existia relação entre a carga viral e a condição de estar, ou não, em tratamento. Nossos resultados mostraram que a relação foi estatisticamente significativa ($X^2= 5,48$; $p = 0,0192$), indicando que a carga viral está relacionada ao tratamento, e o fato da maioria dos pacientes não apresentarem nível de carga viral preditiva para entrar em terapêutica, aumenta esta frequência. Em nosso estudo, os pacientes que estão sem tratamento

tem 3,4 vezes mais chance de ter carga viral detectável, em relação aos pacientes que estão em tratamento.

Quanto aos tipos de medicamentos utilizados pelos pacientes em tratamento, independente da carga viral, nossos dados mostraram a monoterapia com Tenofovir como o mais frequente (56,09%), seguido do Entecavir (36,58%), Lamivudina (6,09%) e Adefovir (1,21%); ($X^2= 66,39$; $p < 0,0001$). Quando consideramos os dois principais medicamentos utilizados (Entecavir e Tenofovir) na terapêutica e analisamos se as médias de carga viral em cada grupo tratado eram diferentes, não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa ($U=214$; $p = 0,78$), inferindo, portanto, que os dois principais tipos de medicamentos utilizados pelos pacientes do estudo não interferem de maneira diferente na carga viral dos pacientes.

O objetivo do tratamento da hepatite B crônica é alcançar a supressão contínua da replicação viral e prevenir a progressão para cirrose ou hepatocarcinoma. O tratamento depende de um conjunto de fatores, como o estágio da doença, a presença ou ausência do antígeno “e”, o potencial de resistência ao medicamento, e a subsequente incapacidade de utilização do medicamento, em particular nos estágios finais da doença crônica do fígado (HADZIYANNIS et al., 2006). A resposta ao tratamento é baseada na redução dos níveis de HBV DNA no soro, perda do HBeAg com ou sem soroconversão para anti-HBe, perda do HBsAg com ou sem soroconversão para o anticorpo HBs, normalização dos níveis de ALT no soro e um decréscimo da inflamação hepática, por biópsia do fígado (AYOUB; KEEFFE, 2011; YUEN; LAI, 2011).

Atualmente, os tratamentos aprovados para a hepatite B incluem, Interferon-alfa (IFN), interferon-alfa peguilhado (PEG-IFN), e cinco análogos de núcleos(t)ídeos que inibem diretamente a atividade transcriptase reversa da polimerase do vírus HBV, sendo: Lamivudina, Adefovir, Entecavir, Telbivudina e Tenofovir (AYOUB, KEEFFE, 2011). O protocolo do Ministério da Saúde, preconizava o Interferon e a Lamivudina (LAM), para o tratamento da hepatite B crônica no Brasil, até Outubro de 2009. Atualmente, estão incorporados medicamentos como Adefovir (ADV), Entecavir (ETV) e Tenofovir (TDF) (ALMEIDA et al., 2012; BRASIL, 2010). A indicação do tratamento é baseado nos níveis de HBV-DNA e ALT no soro e na severidade da doença do fígado que é frequentemente analisada por biópsia hepática. O tratamento deve ser considerado se o HBV DNA exceder 2000 UI/ml, os níveis de ALT estiverem acima do nível normal e se inflamação moderada a severa e/ou pelo menos fibrose moderada for documentada por histologia. O tratamento deve ser iniciado também em pacientes com ALT normal, se o HBV-DNA estiver acima de 2000 UI/ml e se a histologia mostrar pelo menos inflamação moderada e fibrose (BRASIL, 2010; NIEDERAU, 2014).

Conclusão

A descrição da Hepatite B no estado de Roraima, a partir do perfil epidemiológico dos portadores da doença, pode contribuir para um melhor entendimento da sua relevância epidêmica local. O questionário epidemiológico nos permitiu traçar um panorama de como a Hepatite B está representada no estado, no entanto, pudemos observar que muitos dos pacientes não responderam as informações de forma correta, ou não quiseram responder ao questionário, resultando em uma grande parte das informações dadas como ignorada. Isso pode levar a uma subnotificação de dados, e mostrar que a situação epidemiológica em Roraima pode ser bem mais grave do que parece. No entanto, nossos resultados podem ajudar na melhoria dos programas educacionais sobre o vírus e a doença e nas estratégias de controle, prevenção e sensibilização.

Referências

- ABREU, A. C. C.; SIPAÚBA, B. G.; ARAÚJO, C. M. D.; ARAÚJO, T. M. E. Perfil clínico-epidemiológico dos casos de hepatite B e C do Piauí. **Revista Interdisciplinar**, v.6, n.4, p.102-111, out.nov.dez., 2013.
- ALAVIAN, S. M.; FALLAHIAN, F.; LANKARANI, K. B. Implementing strategies for hepatitis B vaccination. **Saudi Journal of Kidney Disease and Transplantation**, v. 21, n.1, p. 10-22, 2010.
- ALAVIAN, S. M.; MALEKZADEH, R.; AZIMI, K.; VOSOUGH, H.; SARRAFI, M. et al. Evaluation of Hepatitis B Transmission Risk Factors in Tehran Blood Donors. **Govaresh**, v. 3, n. 9, p. 169-75, 2004.
- ALMEIDA, A. M.; DA SILVA, A. L.; BRANDÃO, C. M. R.; CHERCHIGLIA, M. L.; ANDRADE, E. I. G.; DE OLIVEIRA, G. L. A. et al. Custo-efetividade dos análogos de nucleosídeos/nucleotídeos para hepatite crônica B. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 6, p. 942-949, 2012.
- ANASTÁCIO, J.; JOHANN, A. A.; COLLI, S. J. R. C.; SILVA, A. L.; PANAGIO, L. A. Prevalência do vírus da hepatite B em indivíduos da região centro-ocidental do Paraná, Brasil. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 3, n. 2, 2008.
- ARAÚJO A. **Hepatites B e C em Manaus**: perfil clínico-epidemiológico e distribuição espacial de casos conhecidos desde 1997 a 2001. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

ASSUNÇÃO, A. A.; ARAÚJO, T. M.; RIBEIRO, R. B. N.; OLIVEIRA, S. V. S. Vacinação contra hepatite B e exposição ocupacional no setor saúde em Belo Horizonte, MG. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 4, p. 665-73, 2012.

AYRES, M.; AYRES, Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. Bioestat Versão 5.0. **Sociedade Civil Mimirauá, MCT–CNPq**, Belém. 2008.

AYOUB, W. S.; KEEFFE, E. B. Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B. **Alimentary pharmacology and therapeutics**, v. 34, n. 10, p. 1145-1158, 2011.

BARONE, A. A. Hepatite Crônica pelo Vírus B. In: ARAUJO, E. S. A. de (Ed.), 2008, **O ABC das Hepatites: manual clínico para o manuseio e prevenção da hepatite B**. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008. p. 6-10.

BARROS, G. M. J.; BRAGA, W. S. M.; OLIVEIRA, C. M. C. et al. Hepatite crônica B oculta: prevalência e aspectos clínicos em população de elevada endemicidade de infecção pelo vírus da hepatite B na Amazônia ocidental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 596-601, 2008.

BARROS, L. M. F.; GOMES-GOUVEA, M. S.; KRAMVIS, A.; MENDES-CORRÊA, M. C. J.; DOS SANTOS, A.; SOUZA, L. A. B. et al. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 24, p. 68-75, 2014.

BARROS, Jacqueline de Aguiar. **Caracterização genotípica do vírus da hepatite B no estado de Roraima**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Funasa. Manual de procedimentos de vacinação. Brasília: Ministério da Saúde; 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento da hepatite viral crônica B e coinfeções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 132 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. **Relatório de situação: Roraima**. 5ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 35 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Imunização – PNI. 2018. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?pni/cnv/cpniuf.def>>. Acesso em: 25 de Julho 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. Ano III. nº 1. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de Imunizações (PNI): 40 anos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde; 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. Ano IV. nº 1. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. Ano V. nº 1. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. Ano VI. nº 1. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

CARLO, F. S.; LIMA, J. F.; SENE, M.; ROSA, N. M.; CARDOSO, V. H.; AGUIAR, J. E. Perfil do portador de hepatite B do município de Maringá. **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 1, n. 3, p. 241-46, 2008.

CHACHÁ, S. G. F.; FERREIRA, S. D. C.; COSTA, T. V.; ALMEIDA FILHO, L. C. D.; VILLANOVA, M. G.; SOUZA, F. F. et al. Clinical, demographic and epidemiological characteristics of patients with hepatitis B followed at a university hospital in southeastern Brazil: predominance of HBeAg negative cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 13-17, 2011.

CRISPIM, M. A. E.; FRAIJI, N. A.; CAMPELLO, S. C.; SCHRIEFER, N. A.; STEFANI, M. M. A.; KIESSLICH, D. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

CRUZ, C. R. B.; SHIRASSU, M. M.; MARTINS, W. P. Comparação do perfil epidemiológico das hepatites B e C em um serviço público de São Paulo. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 3, p. 225-229, 2009.

DANZMANN, L.; GASTMEIER, P.; SCHWAB, F.; VONBERG, R. P. Health care workers causing large nosocomial outbreaks: a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 98, 2013.

DIOGO, F. V.; SOUZA, V. A. S. M.; DIOGO, F. L.; CHAVASCO, J. K. Estudo da soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B entre os doadores de sangue do Núcleo Hemoterápico da Santa Casa de Alfenas (Alfenas/MG) por meio do marcador anti-HBc. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 14, n. 2, p. 59-64, 2012.

DVE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Dados de Hepatite B em Roraima 2010-2016**. Boa Vista, Roraima, 2017. Relatório digitado.

EROL, S.; OZKURT, Z.; ERTEK, M.; TASYARAN, M. A. Intrafamilial transmission of hepatitis B virus in the eastern Anatolian region of Turkey. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 4, p. 345-9, 2003.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Avanços no tratamento da hepatite pelo vírus B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 451-462, 2007.

FONSECA, J. C. F. **Eradication of Hepatitis B vírus infection in the State of Amazonas.** Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/events/WDHD/2007/2007_wgn_newsletter.pdf>. 2007. Acesso em: 01 jun. 2015.

GUSATTI, C. S.; COSTI, C.; HALON, M. L.; GRANDI, T.; MEDEIROS, A. F. R.; SILVA, C. M. D. et al. Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapecó, Southern Brazil, Originate from Italy. **PLoS One**. v. 10, n. 8, p. 1-14, 2015.

HADZIYANNIS, S. J.; TASSOPOULOS, N. C.; HEATHCOTE, E. J.; CHANG, T. T.; KITIS, G.; RIZZETTO, M. et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 9, p. 800-807, 2003.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. População residente por cor ou raça. 2011. Disponível em: <<http://serieestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=PD336>> Acesso em: 26 julho. 2018.

ILOEJE, U. H.; YANG, H. I.; SU, J.; JEN, C. L.; YOU, S. L.; CHEN, C. J. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology*, v. 130, n. 3, p. 678-686, 2006.

JUSTINO, E. M. G.; BACELAR, S. S. S.; ARAÚJO, S. D.; OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA, E. B.; SOUSA, G. A. et al. Perfil de portadores de hepatite B em um serviço de referência: estudo retrospectivo. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 27, n. 1, p. 53-61, jan./mar., 2014.

LIMA, L. S. B. **Avaliação de fatores virológicos associados ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCH) em pacientes com hepatite crônica.** Dissertação. (Mestrado em Gastroenterologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

LOBATO, C.; TAVARES-NETO, J.; RIOS-LEITE, M.; TREPO, C.; VITVITSKI, L.; PARVAZ, P. et al. Intrafamiliar prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 21, n. 5, p. 863-868, 2006.

LOPES, T. S. L.; SCHINONI, M. I. Aspectos gerais da Hepatite B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 10, n. 3, p. 337-344, set./dez., 2011

MOSCHETTA, F.; PERES, M. A. Perfil epidemiológico dos portadores de hepatite B no município de Chapecó-SC no período de 1996 a 2006. Florianópolis: Diretoria de Vigilância Epidemiológica; 2007.

MOURA, I. F.; LOPES, E. P.; ALVARADO-MORA, M. V.; PINHO, J. R.; CARRILHO, F. J. Phylogenetic analysis and subgenotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 14, p. 195-199, 2013.

NICOLAU, S.; MEDEIROS, A. S.; SANTOS, M. C. A.; MONTARROYOS, J. S. Perfil epidemiológico da Hepatite B em uma regional de saúde em Recife. **Revista de Saúde Coletiva - UEFS**, v. 7, n. 3, p. 30-35, 2017.

NIEDERAU, C. Chronic hepatitis B in 2014: Great therapeutic progress, large diagnostic deficit. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n.33, p. 11595-11617, 2014.

OLIVEIRA, M. D. S. et al. Análise de fatores associados à não aceitação da vacina contra hepatite B em adolescentes escolares de baixa renda. **Ciência & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 12, n. 5, p. 1247-1252, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, A. B.; PIMENTA, A. S.; ROJAS, M. F.; CHAGAS, M. C.; CRESPO, D. M.; CRESCENTE, J. A. B. et al. Likely transmission of hepatitis C virus through sharing of cutting and perforating instruments in blood donors in the State of Pará, Northern Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 837-44, 2010.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Hepatitis B. WHO Media Centre. Fact Sheet, Update July 2018. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact_sheets/detail/hepatitis-b>. Acesso em 20 de Julho 2018.

OSTI, C.; MARCONDES-MACHADO, J. Vírus da hepatite B: avaliação da resposta sorológica à vacina em funcionários de limpeza de hospital-escola. **Ciência e saúde coletiva**, vol.15, suppl.1, p.1343-1348, 2010.

PIMENTEL, R.; SCHINIONI, M. I.; FREIRE, S. M. Aspectos epidemiológicos da hepatite B a partir do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Estado da Bahia. **Revista de Ciências médicas e Biológicas**, v. 11, n. 2, p. 207-11, 2012.

PINHEIRO, J.; ZEITOUNE, R. C. G. Hepatite B: conhecimento e medidas de biossegurança e a saúde do trabalhador de enfermagem. **Esc. Anna Ner.**, v. 12, n. 2, p. 258-64, 2008.

PRESTES-CARNEIRO, L. E.; VIEIRA, J. T. M.; ISAAC, L. B.; PORTELINHA FILHO, A. M. Clinical, demographic, and epidemiologic characteristics of hepatitis B virus-infected patients at a tertiary public hospital in Presidente Prudente, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 24-28, Jan-Feb, 2016.

SANTOS, A. C. S.; MORAIS, M. T. M. Perfil epidemiológico e sociodemográfico dos portadores de Hepatite B de um município do Sudoeste Baiano. **Revista Saúde.com**, v. 14, n. 1, p. 1073-1080, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Hepatite B crônica: Tratamento. Projeto Diretrizes. 2009. Disponível em: <<http://saudedireta.com.br/docsupload/133132509434-Hepatite.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

SOUTO, F. J. D. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21st century. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.1, p. 11-23, Jan-Feb, 2016.

TANNO, H.; FAY, O. Viral hepatitis in Latin America. **Acta Gastroenterologica Latinoamericana**, v. 35, p. 169-82, 2005.

TSIANG, M.; ROONEY, J. F.; TOOLE, J. J.; GIBBS, C. S. Biphasic clearance kinetics of hepatitis B virus from patients during adefovir dipivoxil therapy. **Hepatology**, v. 29, n. 6, p. 1863-1869, 1999.

VIEIRA, A. O. S. M.; MELO, S. M.; LIMA, M. L. C.; ARCOVERDE, J. H. V. Hepatite B: fatores de risco para transmissão viral entre os profissionais da área de saúde. 2009. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/r0074-2.pdf>> Acesso em: 25 de Julho 2018.

YUEN, M.; LAI, C. Hepatitis B virus genotypes: natural history and implications for treatment. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 1, n. 2, p. 321-328, 2007.

4.2 Capítulo II – Phylogenetic Analysis and genotypes distribution of Hepatitis B Virus (HBV) in Roraima, Brazil

O **artigo 2** refere-se aos objetivos específicos a) e b) desta tese. Este artigo encontra-se publicado pela Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

SOUSA, Débora Dinelly de et al. Phylogenetic analysis and genotype distribution of Hepatitis B Virus (HBV) in Roraima, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* [online]. 2018, vol.60, e35. Epub July 19, 2018. ISSN 1678-9946. <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201860035>.

Phylogenetic analysis and genotype distribution of Hepatitis B Virus (HBV) in Roraima, Brazil

Débora Dinelly de Sousa¹, Claudiane Raquel de Sousa Silva¹, Wilson Pereira Lima Junior¹, Jacqueline de Aguiar Barros², Ismael Alexandre da Silva Nascimento¹, Victor Costa de Souza³, Felipe Gomes Naveca³, Fabiana Granja¹

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is a serious global health problem. HBV has a high viral genetic diversity, with 10 genotypes recognized. In Brazil, the Roraima State is the third in the Northern region regarding the number of hepatitis B cases. On the other hand, few data on HBV genotyping and phylogenetic analysis are available. The purpose of this study is to characterize the HBV genotypes circulating in Roraima State. Of the 113 chronic hepatitis B patients enrolled in this study, 40 were HBV-DNA positive. A fragment of 280 bp (S gene) was amplified by PCR and submitted to nucleotide sequencing. A dataset containing the viral sequences obtained in this study, plus 130 obtained from GenBank was used for genotyping by phylogenetic analysis. The HBV subgenotype distribution found was A1 (62.5%), A2 (7.5%), D2, D3, D4 (2.5%), F2a (12.5%), and F3 (10%). We characterized the genotypes and subgenotypes of HBV circulating among patients in the State of Roraima. In addition, our study shows for the first time the HBV/F3 genotype circulating in Brazil. In conclusion, our findings showed a high diversity of HBV genotypes in Roraima, which is also found in other Brazilian geographical regions.

KEYWORDS: Hepatitis B. Genotypes. Roraima State. Phylogeny.

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) evolution is driven by a high mutation rate during replication, estimated to be 1.4-3.2 x 10⁻⁵ nucleotide substitutions per site per year, which is more than 10-fold higher than other DNA viruses¹. This leads to a high degree of genetic heterogeneity, resulting in ten genotypes (A to J) which have distinct geographical distribution. HBV genotypes are characterized by a difference in the nucleotide sequences of 8% or more, whereas differences between 4 to 8% are classified as subgenotypes². Indeed, most genotypes are now divided into subgenotypes with distinct virological and epidemiological properties. HBV genotypes, subgenotypes and mutations in specific regions of the HBV genome play an important role in the rates of HBeAg and HBcAg seroconversion, viremia levels, immune escape, emergence of mutants, pathogenesis of liver fibrosis, disease progression, response and resistance to antiviral therapy, in addition to being predictive of clinical outcomes³.

Genotype A is mainly found in the North America and Africa. Genotypes B and C are prevalent in Southeast Asia and the Far East. Genotype D is found worldwide, mainly in the Mediterranean and Central Asia. Genotypes E and F are prevalent

¹Universidade Federal de Roraima, Centro de Estudos da Biodiversidade, Laboratório de Biologia Molecular, Boa Vista, Roraima, Brazil

²Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância em Saúde, SESAU/RR, Boa Vista, Roraima, Brazil

³Fiocruz-Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane, Manaus, Amazonas, Brazil

Correspondence to: Débora Dinelly de Sousa, Fabiana Granja
Universidade Federal de Roraima, Centro de Estudos da Biodiversidade, Laboratório de Biologia Molecular, Avenida Capitão Ene Garcez, 2413, Aeroporto, CEP 69310-000, Boa Vista, RR, Brazil

E-mail: debora_dinelly@yahoo.com.br,
fabiana.granja@yahoo.com.br

Received: 27 February 2018

Accepted: 14 May 2018

in West Africa and among the indigenous peoples of the Americas, respectively. Genotype G has been reported in the United States, France, Colombia and Brazil. Genotype H has been shown to be prevalent in Central and North America. In addition, two new genotypes, I and J, have been recently reported in Vietnam, Laos, and Japan⁴⁻⁷. In Latin America, the presence of genotypes F and H is related to indigenous origins, and genotypes A and D result from the mixture between European and African populations⁸.

Overall, genotype A is the most prevalent in Brazil, followed by genotypes D and F. However, genotypes B and C have also been detected in some individuals⁹. Even though Brazil is as a country with intermediate hepatitis B endemicity, there is a large heterogeneity between Brazilian regions. Some studies show that across South and Southeast of Brazil, less than 2% of the population is infected with HBV. Towards the North of the country the incidence increases, and thus the Amazon basin presents a high prevalence of HBV infection¹⁰.

Epidemiological data¹¹ shows that, among the different etiological agents of viral hepatitis, hepatitis B is the second most prevalent in Roraima. According to the National Immunization Program¹², even though Roraima is considered an endemic region and the HBV vaccine is

available for all age groups, coverage did not reach the goal stipulated by the Brazilian Ministry of Health in the following age groups: less than 1 year with 88.87%, 3 years 94.34%, 15 to 19 years 88.92%, 20 to 24 years 62.69% and 25 to 29 years 61.74%.

Valaydon *et al.*¹³ associated mutations in gene S with resistance to vaccine; however, the correlation between HBV genotypes, possible mutants and escape from vaccination is still unknown. Studies suggest that the infection with HBV in vaccinated children was related to a wild type of the genotype E¹⁴ or to the genotypes B and C¹⁵.

The present study aims to characterize different HBV subgenotypes circulating in Roraima State, an important epidemiological issue, especially in a border area. Thus, our data will probably contribute to a better understanding of HBV genotypes and subgenotypes dispersion in the Northernmost region of Brazil.

METHODS

Roraima State is located in the Amazon region (Figure 1). It is the Northernmost and least populated State of Brazil. It is bordered to the East by the State of Para and Guyana, to the South and West by the State of



Figure 1 - Geographic localization of Roraima State, Brazil

Amazonas, and to the North by Venezuela. Roraima has 15 municipalities, including the State capital, Boa Vista, where 63.53% of the State's population is concentrated¹⁶.

In the study period, from 2013 to 2015, the prevalence rate of Hepatitis B was 13.9 per 100,000 habitants in 2013; 16.5 in 2014 and 9.29 in 2015. The number of samples in this study represents 20.3% of the total of 197 chronic Hepatitis B patients registered in SINAN (*Sistema de Informação de Agravos de Notificação*) during this period¹².

This analysis included whole blood samples collected from 113 patients with chronic Hepatitis B, defined as the persistence of the HBsAg for at least 6 months, associated with the presence of total anti-HBc and non-reagent anti-HBc IgM. The number of samples analyzed accounts for 71.97% of the total number of patients on therapy during the entire studied period. Samples were collected at the Central Laboratory of Roraima State (LACEN/RR) between January 2013 and March 2016, during a blood test to assess viral load. HBsAg-positive individuals of both genders aged 18 years or more were enrolled in this study. Subjects signed an informed consent form prior to sample collection. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Roraima (Protocol N° 121005) on October 26, 2012.

Genomic DNA of each sample was extracted from 200 µl of whole blood using the QIAamp DNA Blood kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. HBV DNA amplification was performed by a nested PCR using type-specific primers for the target region. The first-round PCR primers amplify a 447 bp fragment of the S region with primers FHBS1 (position 244 to 267; 5'-GAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC-3'), and RHBS1 (position 688 to 691; 5' GCTAAATKGCCTAG TAAACTGAGCCA-3'), and the second-round primers amplify a 417-bp fragment with primers FHBS2 (position 255 to 278; 5'-CGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTC-3') and RHBS2 (position 648 to 671; 5'-GCCARGAGAAAC GGRCTGAGGCC-3'). PCR amplification was carried out (unpublished data).

The positive samples were further purified with polyethylene glycol (PEG) at a final concentration of 20% according to the protocol used in the genomic platform of the Leonidas and Maria Deane Institute (ILMD), FIOCRUZ unit in Manaus, Amazonas. Samples were sequenced with BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, USA). The sequencing reaction was analyzed on an ABI 3130 automated sequencer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA). The quality of each electropherogram and assembly of the consensus sequence was performed using the Geneious-R6® software. Sequence identity was

estimated using the BLASTn tool and compared with other HBV genomic sequences available at public databases. Sequences were genotyped by phylogenetic reconstruction using reference sequences from each HBV genotype obtained from GenBank (130 in total), comprising 280 bp of the partial S gene sequence. Bayesian phylogenetic analysis was conducted using the MCMC method implemented in MrBayes 3.1.2, using the nucleotide substitution model (GTR + G), as previously estimated in jModelTest v2.1.3. Fifteen million generations were enough to reach the convergence. A non-human primate external sequence was used as an external group to root the phylogenetic tree. The maximum clade credibility (MCC) tree was obtained by summarizing 15,000 trees and was then modified using a 10% burn-in. Effective sample sizes >200, for all estimated parameters, were obtained after analysis with Tracer v1.5. The resulting phylogenetic tree was visualized in FigTree v1.3.1. Sequences were deposited into the GenBank under the following accession numbers: KY780240 - KY780279.

RESULTS

In this study, the HBV DNA was found in 40 patients (35.40%). Gender, age, demographical, virology information, genotype and subgenotype of these patients are presented in Table 1.

The age average of the patients was 39.6 ± 13.7 SD years, with 21 women and 19 men ($X^2 = 0.22$, $p = 0.6394$). Of the total number of individuals analyzed in the study, 37 declared their ethnicity with a majority of 59.4% declaring to be of mixed ethnicity (mixture of white and black) ($X^2 = 31.75$, $p < 0.0001$).

Of the 33 patients who declared their place of birth, 25.8% reported having been born in Boa Vista, capital of the State of Roraima ($X^2 = 9.645$, $p = 0.0218$). Only one individual claimed to have been born in Guyana, but he has lived in Brazil for more than 20 years. Most patients, 67.5%, lived in the capital Boa Vista ($X^2 = 4.90$, $p = 0.0269$). All the individuals presented detectable viral load, with 50% of them with viral load above 2,000 IU/mL.

When we analyzed the genotypes (Figure 2), we found a higher frequency of genotype A, corresponding to 70% of the analyzed samples ($X^2 = 25.55$, $p < 0.0001$). For the subgenotypes, A1 was the most frequent one ($X^2 = 71.30$, $p < 0.0001$), representing 60% of the samples, followed by subgenotypes A2 = 10%, D2 = 2.5%, D3 = 2.5 %, D4 = 2.5%, F2a = 12.5%, F3 = 10%.

A1 genotype was more prevalent among the group with mixed ethnicity ($X^2 = 9.364$, $p = 0.0093$); genotype A2 and F2a were equivalent in those with mixed ethnicity and Caucasians; D1 and D4 were reported only in those

Table 1 – Characteristics of the 40 chronic hepatitis B patients included in this study

Parameters		P- value*
Patients	40	
Age (average±SD)	39,62(±13,74)	
Gender [n(%)]		
Male	19(47,5)	NS ^a
Female	21(52,5)	
Race [n(%)]		
White	7(18,9)	
Mixed ethnicity	22(59,4)	< 0.0001 ^a
Black	4(10,8)	
Indigenous	4(10,8)	
Not informed	3	
Residence place[n(%)]		
Boa Vista (capital)	26(67,5)	= 0.0269 ^a
Another Roraima's municipality	14(32,5)	
Birth place [n(%)]		
Boa Vista (capital)	8(25,8)	
Another Roraima's municipality	10(29)	= 0.0218 ^a
Another Brazil's state	15(41,9)	
Viral load (UI/mL) [n(%)]		
> 2000	20 (50)	NS ^a
< 2000	20 (50)	
Genotypes [n(%)]		
A	28(70)	< 0.0001 ^a
D	3(7,5)	
F	9(22,5)	
Subgenotypes [n(%)]		
A1	24(60)	< 0.0001 ^a
A2	4(10)	
D2	1(2,5)	
D3	1(2,5)	
D4	1(2,5)	
F2a	5(12,5)	
F3	4(10)	

a: Teste X²; p>0,05; NS- not significant; SD – standard deviation

with mixed ethnicity , D2 only in blacks and F3 only in the indigenous group.

Phylogenetic tree reconstructions (Figure 2) showed two distinct clades inside the subgenotype A1. One clade is predominantly “African” and includes isolates from South, East and Central Africa, and the other is an

“Asian-American” clade with isolates from Asia, Somalia, Caribbean islands and a restricted number of strains from South America¹⁷. Phylogenetic analysis of the subgenotype A1 indicated a posterior probability value of 1, splitting the “African” and “Asian-American” clades. In the “African” clade, strains were grouped into clusters previously isolated in Brazil, Cameroon, Gambia and Nigeria. The “Asian-American” clade clustered a larger number of analyzed strains, together with isolates from Brazil, Rwanda, Kenya, Colombia, Belgium and Martinique.

DISCUSSION

This study reports the geographic distribution of HBV genotypes in the Brazilian State of Roraima. Molecular characterization of HBV isolates is invaluable in establishing HBV evolutionary origins and dispersion patterns¹⁸. Molecular evolutionary studies to characterize HBV in Roraima have an even more vital role, once this State shares international land borders with Venezuela and British Guyana, countries where hepatitis B is highly endemic. The distribution of HBV genotypes varies across different geographical regions, some are distributed worldwide, whereas others are more geographically confined¹⁹.

The results of genotyping are in agreement with previous records found in Brazil, showing that genotype A prevails (28/40 - 70%), followed by genotypes F (9/40 - 22.5%) and D (3/40 - 7.5%); (X² = 25.55, p < 0.0001)²⁰⁻²³. Recently, a study involving samples of HBV representing the five Brazilian regions showed that the genotypes A, D and F are the main genotypes found in the country²⁴. The distribution of genotypes in the Brazilian population is correlated with its heterogeneous ethnic origin²⁵, which is an admixture of European, Native American and African ancestors⁶.

Genotype A is subdivided into subgenotypes A1 to A7. Among them, A1 is highly prevalent in sub-Saharan Africa and Northern Europe; subgenotype A2 and A3 are prevalent in Western Africa; A4 and A5 were found in sub-Saharan Africa (Mali, Gambia, Nigeria); A5 was found in people of African descent in Haiti^{26,27}.

In Northern Brazil, genotype A, mainly the subgenotype A1, is predominant and was probably introduced in Brazil during the slave trade^{28,29}. A study carried out in the Western Brazilian Amazon at Labrea municipality, Amazonas State, identified the presence of genotypes A (60%), D (35%) and F (5%)²². Another study on HBsAg-positive blood performed in Manaus, Amazon Region, Northern Brazil, showed a high prevalence of genotype A, as well as the predominance of HBV genotypes A and F²⁰.

Previous studies have shown that only two subgenotypes

Phylogenetic analysis and genotype distribution of Hepatitis B Virus (HBV) in Roraima, Brazil

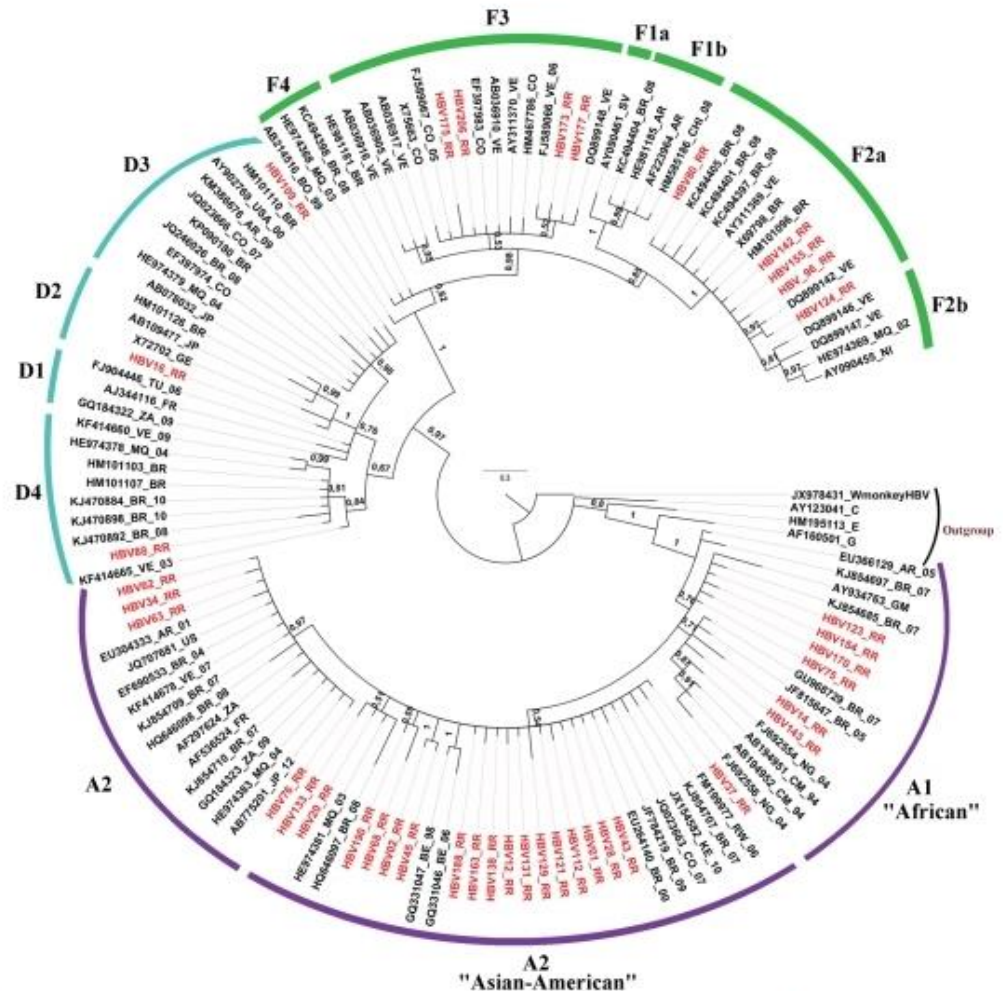


Figure 2 - Phylogenetic analysis of HBV strains isolated in Roraima. The maximum clade credibility (MCC) tree was estimated by Bayesian analysis of 130 sequences according to the S region (280 bp). The posterior probabilities of the key nodes are shown above according to the respective nodes. HBV isolates from Roraima are represented in red and were analyzed together with other worldwide strains.

of genotype A (A1 and A2) have been found in Brazil, where HBV/A1 has been the sole or most prevalent one^{18,21,23,30}. Our results corroborated a phylogenetic study with isolates from different regions of Brazil, which showed that two distinct clades have been recognized into subgenotype A1³¹. However, unlike our findings, Brazilian strains grouped into the “Asian-American” clade only.

Similar results of the split between “African” and “Asian-American” clades were also found in a study carried out in Martinique, which identified most of the sequences as belonging to the “Asian-American” clade¹⁷. The findings in our study are probably due to the presence of a highly mixed-race population in Roraima, which consists of descendants from different geographic regions in Brazil and abroad. Also, the sequences in these two clusters did not form a single clade in the tree and few sequences clustered with

other Brazilian sequences described above, indicating these viruses were probably introduced into the State at different moments. These results are similar to those of previous studies carried out in the Brazilian States of Rondonia¹⁸ and Rio de Janeiro³², which found a large number of HBV isolates belonging to subgenotype A1. Recently, another study performed in Para found the genotypes A and F as the predominant ones in these populations. Genotype A was the most frequent with 88.46%, and among the subgenotypes, A1 represented 78.26%, followed by A2 21.74% and the prevalence of genotype F was 11.54%³³.

In contrast, few sequences in this study were grouped into subgenotype A2, classified as European, which was supposedly introduced in Europe by Portuguese sailors traveling along the coastal waters of South Africa during the 15th, 16th and 17th centuries. Some authors have speculated

that subgenotype A2 has evolved from a subgroup of A1 isolates³⁴. This result corroborates previous findings that showed low prevalence or inexistence of genotype A2 in the North and Northeast regions^{4,18,20}. This subgenotype is found in Europe, the United States, England, Argentina, Colombia and Spain¹⁹. Considering the geographic distribution of the two subgenotypes (A1 in Africa and A2 in Europe), the prevalence of A2 in Southern Brazil correlates with the European origin of the population³¹.

Only three sequences were grouped into genotype D, presenting low prevalence (3/40 - 7.5%). Our study confirms the low prevalence or absence of genotype D found in the North and Northeast regions^{20,35}. In contrast, a study carried out among HBV chronically infected patients in the State of Rondonia, Northern Brazil, detected a prevalence of 42.8%¹⁸. Another recent study, performed in the State of Maranhao, located in the Brazilian Northwest region, showed that genotype D was the most frequent one (84%; 42/50)³⁶. Lampe *et al.*²⁴ showed that among the five Brazilian regions, genotype D is the most prevalent only in the South of Brazil, representing 80% (75/95) of the analyzed samples in that area. Previous studies have indicated that genotype D is more frequent in the Southern Brazilian populations, due to their prevalent European ancestry resulting from the massive migration of 1872-1975. The spread of genotype D strains in the Amazon basin is probably due to the presence of migrants from South and Southeast Brazil, where genotype D is widespread^{23,25}.

Within genotype D, four subgenotypes can be found: D1 occurs mostly in the Mediterranean and Middle East; D2 has been reported in India, Japan, Europe, and the United States; D3 has been registered in South Africa, Brazil, Rwanda, Costa Rica and the United States and D4 in Australia, South Africa, Somalia, Rwanda and Oceania¹⁹.

The phylogenetic tree showed three D strains subgenotypes: D2, D3 and D4. These subgenotypes were also found in previous studies carried out in the Amazon States of Amazonas³⁰ and Rondonia¹⁸, and in the Northeast State of Maranhao²¹. The sequence of subgenotype D4, isolated in the State of Roraima, formed a clade more closely related to strains previously isolated in the States of Rondonia¹⁸ and Maranhao²¹ and also a sequence similar to a Venezuelan strain³⁷, an HBV endemic country bordering Roraima, suggesting that these international borders may become the entry of new HBV genotypes into the country.

The sample designated subgenotype D2 formed a closer group with previously isolated sequences in Japan and Brazil. HBV subgenotype D2 was previously described as prevalent in the South and Central-West regions of Brazil²³, and it may have probably been introduced to Roraima by immigrants from those regions. The HBV subgenotype D3

strain was closely related to a Colombian isolate, forming a monophyletic group and exhibiting a genetic distance from other previously described Brazilian sequences. This result suggests that the presence of Colombian immigrants in the State might have introduced a different HBV strain into the country. HBV subgenotype D3 is more frequently found in the North and Central-West regions of Brazil²³. Due to the small number of representative sequences for each subgenotype of genotype D found in our study, further studies will be required to confirm these observations.

Genotype F is indigenous to the Americas, therefore is the most prevalent HBV genotype among Amerindians of the Amazon basin and Central and South America¹⁸. In addition, previous studies have indicated that genotype F is indeed the oldest genotype circulating in the Americas²⁸. This genotype is highly prevalent in Venezuela³⁸, a region inhabited by Amerindian populations, supporting the hypothesis that genotype F is inherent in these groups. Genotype F is classified into four subgenotypes (F1-F4) which are further subdivided into different clades. Subgenotype F1, which splits into F1a and F1b, is highly prevalent in Central America, Alaska and Southeast America; F2 (F2a and F2b) is highly prevalent in Venezuela, and is also found in Brazil (clade F2a only); F3 is present in Central America (Panama) and Northern Latin America (Colombia and Venezuela), and is also present in Brazil according to our results and F4 is present in Bolivia and Argentina³⁹.

Unlike other Latin American countries, where genotype F prevails, Brazil shows a low countrywide prevalence of HBV/F (13%), suggesting that indigenous people are less influential in introducing HBV into the country^{9,23}. This genotype has been frequently reported in the Brazilian Amazon, especially among native populations^{9,18,20}. Castilho *et al.*³⁵ reported a high prevalence of genotype F in three riverside communities of Labrea municipality, Amazonas State, Brazil. Another study conducted in the Brazilian Amazon Basin showed the prevalence of genotype F in 50% of the patients who developed fulminant hepatitis B and died³⁰. Nevertheless, these results show a low frequency of genotype F (9/40; 22.5%), as observed in most studies conducted across different Brazilian regions, including the Amazon basin^{9,18,21,22}. This low frequency in our study can be probably explained by the lower representation of indigenous subjects in our sample, the high miscegenation in Roraima, and the contact between indigenous and non-indigenous people.

Subgenotype F2a was prevalent where the sequences formed a clade with Venezuelan strains and other previously described Brazilian sequences. This result was corroborated by Mello *et al.*²⁸ who argued that subgenotype F2a is

prevalent countrywide, being found in all geographic regions of Brazil. In addition, HBV/F2a is found almost exclusively in Brazil and Venezuela, with the exception of one HBV/F2a sequence isolated in Nicaragua. By using a phylogeographical approach, the authors also concluded that this subgenotype probably originated in Venezuela and reached Brazil following a North-to-South viral flow. This corroborates that Roraima is a major point of entry for several pathogens into the country. Furthermore, our data are also similar to previous studies carried out in Brazil showing the same phylogenetic pattern for the circulation of subgenotype F2a^{18,21,23,28}. In addition, the analyzed strains did not form a homogeneous clade within the F2a subgenotype, suggesting different moments of virus entry into the State. This hypothesis is supported by the intense influx of people on the Brazilian-Venezuelan border, and especially the current increased Venezuelan immigration in Brazil, mainly towards the border State of Roraima, which might probably spread different HBV/F2a strains in the region.

HBV/F3 was the second most frequent subgenotype within genotype F. This work shows for the first time subgenotype F3 isolates found in Brazil. Subgenotype HBV/F3 is highly prevalent in the general population of Venezuela and Colombia^{4,40}, and has also been found in Panama⁴¹. In addition, previous studies have identified the HBV/F3 subgenotype circulating among indigenous peoples of Venezuela (Yukpa, Warao, Piaroa, Yanomami)⁴⁰. The four HBV/F3 isolates in our study were detected among members of indigenous people living in the Brazilian-Venezuelan borders (a region comprising part of Roraima and Amazonas). Our phylogenetic analysis showed that those sequences were clustered in different clades. Two of the sequences formed a monophyletic clade with another strain previously isolated from members of the Yanomami in Venezuela (DQ899148)⁴⁰, indicating that these strains probably co-circulate in this population, perhaps due to migration between neighboring communities. Other sequences revealing two distinct clusters have a genetic pattern similar to the previously isolated sequences in Colombia and are likely representative of the general population. A possible explanation for this greater genetic similarity is that these strains may have been introduced in Roraima at the Colombia/Amazonas border, thereby reaching the community and spreading throughout this territory. Since the F3 isolates described in our study come from self-identified indigenous individuals, we can infer that different strains of this subgenotype are likely to co-circulate exclusively in these communities. However, due to the few sequences of subgenotype F3 isolated in our study, further analysis is required to support these conclusions.

As our number of samples is low, we cannot perform more correlation studies, however, we believe on the importance of the genotypic characterization and its relationship with ethnicity, since these data will be able to supply us with a better understanding of the association between health data of the general population and their relationship with genotypes and subgenotypes, especially in this area of the country, which is influenced by its geographical location next to the Caribbean and bordering countries.

CONCLUSIONS

In this study, we performed a molecular characterization of HBV strains derived from HBV-DNA-positive patients living in the Brazilian State of Roraima. The frequency and distribution of the genotypes were similar to those found in different geographical regions of Brazil. We have shown that "Asian-American" HBV/A1 is the main circulating subgenotype. HBV subgenotypes A2, D2, D3, D4, F2a were also detected, and F3 was first recorded in Brazil. These findings underscore the importance of continuous molecular epidemiological surveillance at a local level in order to provide a better understanding of the virus behavior patterns and tools to better target this disease.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by grants from Universal (CNPq 476688/2013-2) and we are thankful to FIOCRUZ for the use of the nucleotide sequencing facilities at ILMD - Fiocruz Amazônia.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Federal University of Roraima, the Central Laboratory of Roraima State (LACEN/RR), the General Coordination of Health Surveillance (CGVS) and Leonidas and Maria Deane Research Center/ FIOCRUZ- Amazonas.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

DDS, FG, designed the study, wrote and revised the manuscript. DDS, CRSS, WPLJ and JAB performed the recruitment of the participants and the collection of blood samples, carried out viral RNA extraction and run the molecular biology experiments. DDS, CRSS, WPLJ, IASN and VCS performed the genomic sequencing. DDS, CRSS, WPLJ, IASN and VCS analyzed the genome sequence. DDS, IASN and WPLJ performed the phylogenetic analysis, bioinformatics and the statistical analyses. FGN revised the manuscript and contributed to the literature

review and discussion. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

- Chotiayaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;6:453-62.
- Kim BK, Revill PA, Ahn SH. HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antivir Ther*. 2011;16:1169-86.
- Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, Li X, Li J, Lu MJ. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis *World J Gastroenterol*. 2016;22:126-44.
- Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, et al. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: a Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol*. 2011;11:103-8.
- 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;83:2059-73.
- Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. 2009;83:10538-47.
- Yu H, Yuan Q, Ge SX, Wang HY, Zhang YL, Chen QR, et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One*. 2010;5:e9297.
- Roman S, Jose-Abrego A, Fierro NA, Escobedo-Melendez G, Ojeda-Granados C, Martinez-Lopez E, et al. Hepatitis B virus infection in Latin America: a genomic medicine approach. *World J Gastroenterol*. 2014;20:7181-96.
- Viana S, Paraná R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:808-14.
- Devesa M, Pujol FH. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res*. 2007;127:177-84.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Hepatites virais 2017. [cited 2017 Aug 30]. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2017>
- Roraima. Secretaria de Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Dados de Hepatite B em Roraima: 2010-2016. Boa Vista: Secretaria de Saúde; 2018.
- Valaydon ZS, Locarnini SA. The virological aspects of hepatitis B. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017;31:257-64.
- Mendy M, D'Mello F, Kanellos T, Oliver S, Whittle H, Howard CR. Envelope protein variability among HBV-infected asymptomatic carriers and immunized children with breakthrough infections. *J Med Virol*. 2008;80:1537-46.
- Chang MH. Breakthrough HBV infection in vaccinated children in Taiwan: surveillance for HBV mutants. *Antivir Ther*. 2010;15:463-9.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Roraima. [cited 2018 Febr 28] Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rr/panorama>
- Brichler S, Lagathu G, Chekaraou MA, Le Gal F, Edouard A, Deny P, et al. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J Gen Virol*. 2013;94:2318-29.
- Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Vieira DS, Pinho JR, Carrilho FJ, et al. Characterization of Hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. *Virol J*. 2010;7:315.
- Norder H, Couroucé A, Coursaget P, Echevarria JM, Lee S, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004;47:289-309.
- Crispim MA, Fraiji NA, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MM, Kiesslich D. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infect Dis*. 2014;14:94.
- Barros LM, Gomes-Gouvêa MS, Kramvis A, Mendes-Corrêa MC, Santos A, Souza LA, et al. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. *Infect Genet Evol*. 2014;24:68-75.
- Dias AL, Oliveira CM, Castilho MC, Silva MS, Braga WS. Molecular characterization of the hepatitis B virus in autochthonous and endogenous populations in the Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45:9-12.
- Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol*. 2007;7:103.
- Lampe E, Mello FC, Espírito-Santo MP, Oliveira CM, Bertolini DA, Gonçalves NS, et al. Nationwide overview of the distribution of hepatitis B virus genotypes in Brazil: a 1000-sample multicentre study. *J Gen Virol*. 2017;98:1389-98.
- Becker CE, Mattos AA, Bogo MR, Branco F, Sitnik R, Kretzmann NA. Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2010;47:13-7.
- Olinger CM, Venard V, Njayou M, Oyefolu AO, Maiga I, Kemp AJ, et al. Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol*. 2006;87:1163-73.

27. Andernach IE, Nolte C, Pape JW, Muller CP. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1222-8
28. Mello FC, Araujo OC, Lago BV, Motta-Castro AR, Moraes MT, Gomes SA, et al. Phylogeography and evolutionary history of hepatitis B virus genotype F in Brazil. *Viol J.* 2013;10:236.
29. Motta-Castro AR, Martins RM, Araujo NM, Niel C, Facholi GB, Lago BV, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. *Arch Virol.* 2008;153:2197-205.
30. Gomes-Gouveia MS, Soares MC, Bensabath G, Carvalho-Mello IM, Brito EM, Souza OS, et al. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *J Gen Virol.* 2009;90:2638-43.
31. Lago BV, Mello FC, Kramvis A, Niel C, Gomes SA. Hepatitis B virus subgenotype A1: evolutionary relationships between Brazilian, African and Asian isolates. *PLoS One.* 2014;9:e105317.
32. Bottecchia M, Souto FJ, Ó KM, Amendola M, Brandão CE, Niel C, et al. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. *BMC Microbiol.* 2008;8:11.
33. Castro Sant'Anna C, Almeida MK, Ferreira P, Oliveira RG, Baraúna AR, Gonçalves E, et al. Prevalence of occult hepatitis B in a population from the Brazilian Amazon region. *J Med Virol.* 2018;90:1063-70.
34. Hannoun C, Söderström A, Norkrans G, Lindh M. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *J Gen Virol.* 2005;86:2163-7.
35. Castilho MC, Oliveira CM, Gimaque JB, Leão JD, Braga WS. Epidemiology and molecular characterization of Hepatitis B virus infection in isolated villages in the Western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87:768-74.
36. Cruz-Santos MD, Gomes-Gouvêa MS, Costa-Nunes JD, Malta-Romano C, Teles-Sousa M, Fonseca-Barros LM, et al. High prevalence of Hepatitis B subgenotype D4 in Northeast Brazil: an ancient relic from African continent? *Ann Hepatol.* 2018;17:54-63.
37. Jaspe RC, Sulbarán YF, Loureiro CL, Martínez N, Devesa M, Rodríguez Y, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus and hepatitis C virus in human immunodeficiency virus type 1-co-infected patients from Venezuela. *J Med Microbiol.* 2014;63:1099-104.
38. Nakano T, Lu L, Hu X, Mizokami M, Orito E, Shapiro C, et al. Characterization of hepatitis B virus genotypes among Yucpa Indians in Venezuela. *J Gen Virol.* 2001;82:359-65.
39. Alvarado-Mora MV, Pinho JR. Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antivir Ther.* 2013;18:459-65.
40. Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, et al. Subgenotype diversity of Hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol.* 2008;80:20-6.
41. Norder H, Arauz-Ruiz P, Blitz L, Pujol FH, Echevarria JM, Magnus LO. The T1858 variant predisposing to the precore stop mutation correlates with one of two major genotype F hepatitis B virus clades. *J Gen Virol.* 2003;84:2083-7.

4.3 Capítulo III - Avaliação dos polimorfismos de CCR5 em pacientes portadores de hepatite B crônica, em Roraima, região Norte do Brasil

O **artigo 3** refere-se ao objetivo específico d) desta tese. Este artigo encontra-se em fase de organização para submissão à publicação na revista The Brazilian Journal of Infectious Diseases

Avaliação dos polimorfismos de CCR5 em pacientes portadores de hepatite B crônica, em Roraima, região Norte do Brasil

Resumo

Existem inúmeros fatores epidemiológicos, virais e genéticos, que influenciam na suscetibilidade a persistência da infecção pelo HBV. O receptor de quimiocina 5 (CCR5) é um gene, que juntamente com seu ligante CCR5 tem um importante papel na resposta imune à infecções virais, entre elas a hepatite B. A existência de um alelo mutante para o gene CCR5, que apresenta uma deleção de 32 pares de bases (CCR5 Δ 32) leva a uma diminuição da expressão e disfunção deste receptor. Os pacientes infectados cronicamente com o HBV são incapazes de remover a infecção viral dos hepatócitos, e provavelmente, uma baixa regulação do CCR5 leva à uma diminuição no recrutamento das células imunes para os hepatócitos infectados. O objetivo do estudo foi investigar a presença da mutação CCR5 Δ 32 em pacientes e controles saudáveis do Estado de Roraima e estabelecer sua possível correlação com a persistência/resolução da infecção pelo HBV. Foram testados 190 pacientes portadores de HBV crônico e 130 controles saudáveis. O DNA foi extraído e as amostras analisadas segundo a metodologia de Farias e colaboradores (2012). As frequências genotípicas e alélicas foram calculadas e avaliadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A comparação entre as proporções e as diferenças entre os grupos foi determinado pelo Teste Exato de Fisher e Qui quadrado. Nossos resultados mostraram a seguinte frequência genotípica entre os pacientes e indivíduos controles, respectivamente: CCR5/CCR5 (95,26% e 94,61%), CCR5/CCR5 Δ 32 (4,21% e 5,38%), CCR5 Δ 32/ CCR5 Δ 32 (0,52% e 0%), não havendo diferença significativa entre os grupos ($p=0,8745$), assim como para a frequência do alelo mutante (CCR5 Δ 32) nos pacientes e grupo controle, que foi de 2,6% em ambos ($p=0,9626$). Não foi encontrada relação entre a mutação e risco para HBV (OR = 0,97, IC95%0,36-2,60; $p=0,9626$), no entanto, observamos que em 1 amostra do grupo HBV, encontramos o polimorfismo em homozigose, até então nunca descrito para essa população. Em conclusão, não encontramos evidências que demonstrem a associação entre o polimorfismo CCR5 Δ 32 e a infecção por HBV, podendo ser explicada provavelmente pelo Estado de Roraima apresentar uma população miscigenada.

Palavras-Chave: Polimorfismo genético; CCR5 Δ 32; Hepatite B; Roraima.

Introdução

A Hepatite B viral (HBV) é um desafio ao sistema de saúde mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 2 bilhões de pessoas já entraram em contato com o vírus, e estima-se que 400 milhões possuem a forma crônica da doença (SILVA et al., 2013). A hepatite B é ocasionada por um vírus hepatotrópico não citopático, que pode causar doenças hepáticas agudas ou crônicas (AHN et al., 2006). É altamente contagioso e sua transmissão se dá por via parenteral, vertical e sexual (SILVA et al., 2013). Além dos fatores de epidemiologia, genótipos e características moleculares do vírus, os fatores imunológicos e genéticos do hospedeiro, com uma série de polimorfismos em diferentes genes, vem sendo associados com a persistência do HBV ou conclusão da doença (ZENG, 2014). Roraima se destaca como um estado com elevadas taxas de infecção por Hepatite B (DVE, 2016), e sua capital, Boa Vista, em 2016, foi uma das cinco capitais a apresentarem as maiores taxas de incidência (21,6/100.000 habitantes) (BRASIL, 2017).

O CCR5 é uma receptor de quimiocina CC acoplado à proteína G, que tem como ligantes CC, o CCL3, CCL4 e CCL5, na resposta imune a infecções virais. É expressado por linfócitos CD8⁺, células NK, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, células dendríticas imaturas, granulócitos e linfócitos Th1, tendo papel na migração e ativação dessas células para o local de infecção, inflamação ou lesão (AJUEBOR; CAREY; SWAIN, 2006). Estudos apontam que, as células NK, a principal célula imune envolvida contra o HBV, tem sua atividade ótima quando mediado pelo ligante CCL5, e conseqüentemente, pelo receptor CCR5. Junto com as citocinas, CCL induz proliferação e ativação das células NK para a forma de células NK ativadas por quimiocinas, que destroem os hepatócitos (AJUEBOR; CAREY; SWAIN, 2006; FISICARO et al., 2009; YANG et al., 2009). Estudos apontam que as células T CD4 positivas tem a expressão de CCR5 aumentada na hepatite B aguda quando comparada com a forma crônica (TREHANPATI et al., 2009). Achados anteriores indicam que os níveis de expressão do CCR5 pelas células NK e pelos linfócitos T citotóxicos foram diminuídos em pacientes infectados com HBV oculta (ARABABADI et al., 2010a, 2010b), portanto, o estado de expressão do CCR5 nessas células podem influenciar na resposta imune durante uma infecção. É provável que o CCR5 seja um regulador chave da resposta imune ao HBV e que sua expressão parece ser deficiente em pacientes infectados (SANCHOOLI et al., 2014).

O gene que codifica o CCR5 está localizado na região p21.3 do cromossomo 3 humano e consiste de uma única região aberta de leitura produzindo um único transcrito. Uma deleção de 32 pares de bases (CCR5 Δ 32) nesse gene leva a um alelo funcionalmente nulo.

Investigações prévias mostraram que esta deleção é polimórfica em diferentes populações étnicas e geográficas, e que a mutação resulta em uma proteína disfuncional e com sua expressão diminuída (ABOUSAIDI et al., 2011). Indivíduos heterozigotos para a deleção (CCR5 Δ 32/+) tem níveis substancialmente reduzidos de CCR5 na superfície celular comparados com aqueles que são homozigotos para o alelo CCR5 normal (+/+) (WU et al., 1997).

A frequência de heterozigose do gene CCR5 Δ 32 é mais alta em pacientes com hepatite B crônica que em controles, que mostra a relação desse polimorfismo com a suscetibilidade a desenvolvimento de doença hepática relacionadas ao HBV (SUNEETHA et al., 2006). Registros de Li e colaboradores (2011) indicam que a mutação não foi associada com a reinfecção pelo HBV em pacientes pós-transplantados. Um estudo na população da Coreia revelou que a mutação CCR5 Δ 32 não está associada nem a persistência nem a cura da infecção pelo HBV (AHN et al., 2006). Contrariando estes resultados, dois estudos feitos na população dos Estados Unidos, mostraram que a mutação esta correlacionada com uma redução no risco de desenvolvimento de HBV crônica (THIO et al., 2007, 2008).

O presente estudo teve como objetivo encontrar o tipo e a prevalência da mutação do CCR5 e comparar a distribuição alélica desse gene entre pacientes HBV crônicos e indivíduos saudáveis, visando estudar as possíveis associações com a suscetibilidade à doença.

Material e Métodos

A população do estudo foi constituída por 224 indivíduos com sorologia positiva para o HBV, que realizaram a coleta de sangue no ambulatório do Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima (LACEN/RR), no momento em que os mesmos iriam realizar os exames de carga viral. O LACEN realiza a carga viral para HBV dos pacientes oriundos de todos os municípios. As coletas ocorreram durante o período de Fevereiro de 2013 à Abril de 2017. Os critérios de inclusão foram: paciente com sorologia positiva para HBV; portadores de Hepatite B crônica em tratamento ou não; ter idade superior a 18 anos. Os critérios de exclusão foram: ter idade inferior a 18 anos; ser portador de HCV, HDV e HIV. A população controle foi constituída de 231 indivíduos saudáveis que foram recrutados no Hemocentro de Roraima (HEMORAIMA), durante o período de Março de 2015 à Janeiro de 2017. Os critérios de inclusão foram: ter idade superior a 18 anos, sem nenhuma história prévia de doença do fígado e negativos para infecção pelo HBV, HCV, HDV e HIV. Todos os pacientes participantes

assinaram e preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Roraima (protocolos 121005/12 e 1.134.336 /2015).

O DNA genômico foi extraído de 200µL de sangue total com o uso do kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (QUIAGEN, USA), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante.

O polimorfismo CCR5Δ32 foi analisado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), usando iniciadores específicos para a sequência (5' GGTCTTCATTACACCTGC 3' e 5' AGGATTCCCGAGTAGCAGATG 3') adaptado de Farias et al. (2012). Para a amplificação por PCR, utilizou-se um volume total de 25µL, contendo 3µL do DNA, 2,5µL do tampão 10x (200mM Tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl), 0,5µL dNTPs 10mM (Amresco®, USA), 1,0µL de MgCl₂ 50mM, 0,3µL dos iniciadores 25µM, 0,8µL de *Taq* DNA Polimerase 5U/µL (Ludwig Biotec, Brasil) e água livre de nucleases (*q.s.p*) 25µL. As condições da PCR foram como o seguinte: a 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos térmicos, cada um composto por etapa de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, seguida de 1 ciclo de extensão final a 72°C por 4 minutos. Os produtos da PCR foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose à 3%, corados com 2 µL de azul de bromofenol (Proquimios, Brasil) e 1 µL de BlueGreen (LGC Biotecnologia), e visualizados sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foram de 137pb para o tipo selvagem CCR5 e 105pb para o alelo mutante Δ32.

Para a análise estatística foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2008). O cálculo das frequências alélicas e genotípicas (Equilíbrio de Hardy-Weinberg) dos pacientes e grupo controle foi feito por meio de contagem direta. A comparação das frequências dos genótipos e das diferenças entre os grupos foi determinado pelo Teste Exato de Fisher. Os dados não paramétricos foram analisados pelo Qui quadrado de aderência e tabela de contingência (2x2 ou 2x3). Para os dados paramétricos, o teste t foi utilizado para comparar valores de médias entre dois grupos. Os resultados com valor $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

No grupo dos 224 pacientes infectados pelo HBV envolvidos no estudo, 190 (84,82%) apresentaram amplificação positiva para o gene CCR5, enquanto que na população controle,

dos 231 indivíduos, 130 (56,27%) apresentaram amplificação bem sucedida. A média de idade dos pacientes foi de 44.2 ± 11.4 anos, sendo constituída por 85 (44,74%) mulheres e 105 (55,26%) homens. O grupo controle apresentou uma média de idade de 38.9 ± 15.3 anos, composto por 84 (64,61%) homens e 46 (35,39%) mulheres. Foi observada diferença significativa entre as médias de idade da população infectada e controle ($p = 0,0007$), assim como entre o gênero feminino ($X^2 = 11.61$; $p = 0,0007$). Não foi observada diferença entre as proporções do gênero masculino ($X^2 = 2.33$; $p = 0,12$). As características dos pacientes e da população controle está sumarizada na tabela 1.

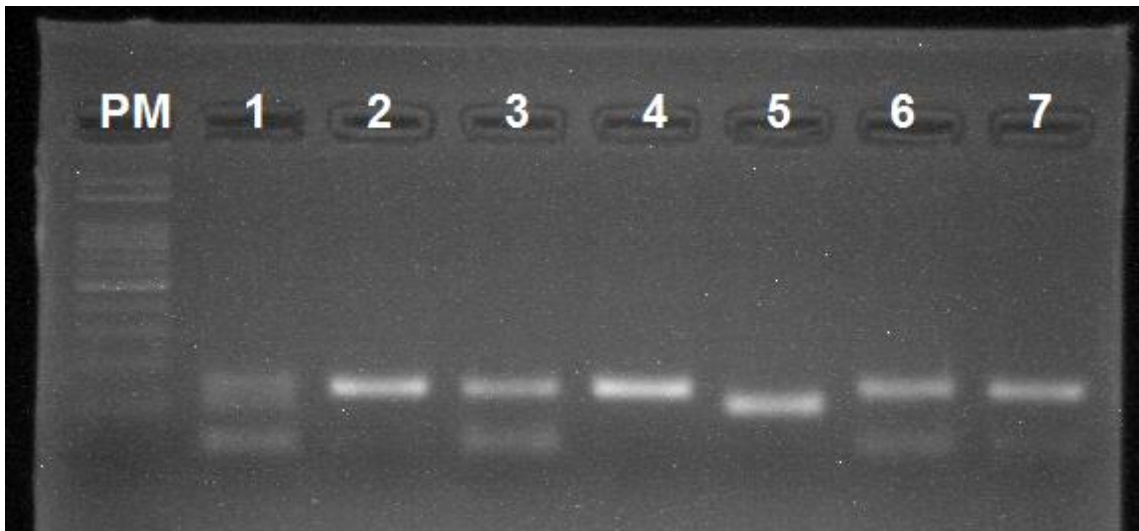
Tabela 1 – Características demográficas e informações clínicas dos pacientes infectados pela Hepatite B e da população controle

Parâmetros	Pacientes infectados com HBV	Controle saudável	<i>p</i>
Idade ± DP	44,2±11,4	38.9±15,3	0,0007 ^a
Sexo			
M	105 (55,26%)	84 (64,61%)	NS ^b
F	85 (44,74%)	46 (35,39%)	0,0007 ^c
HBsAg+	125 (65,78%)	0	-
HBeAg+	N. I.	0	-

Legenda: DP – desvio padrão; M – masculino; F – feminino; N.I. – não informado; ^a – Teste t (resumo amostral); ^{b, c} – Teste Qui-quadrado de aderência.

Quanto a distribuição genotípica dos alelos (tabela 2), 181 (95,26%) pacientes HBV e 123 (94,61%) controles saudáveis apresentaram o genótipo homozigoto selvagem (CCR5/CCR5). O genótipo CCR5/CCR5 foi mais frequentemente presente nos pacientes com HBV do que na população controle (95,26% vs 94,61%, $p = 0,0009$). O genótipo heterozigoto (CCR5/Δ32) foi encontrado em 8 (4,21%) pacientes HBV e em 7 (5,38%) dos controles, sem diferença significativa entre as frequências ($p = 0,7963$). O genótipo homozigoto (CCR5Δ32/CCR5Δ32) foi observado em 1 (0,52%) paciente HBV (figura1), entretanto, não observado nos casos controle.

Figura 1 – Produtos da PCR visualizados em gel de agarose 2,5% referentes aos três genótipos do gene CCR5 encontrados no grupo de pacientes portadores de Hepatite B



Legenda: PM – Peso molecular 100 pb; 1- genótipo Heterozigoto (CCR5/Delta32); 2,3,4,6,7 – genótipo Homozigoto dominante (CCR5/CCR5); 5- genótipo Homozigoto recessivo (Delta32/Delta32)

Nenhuma das populações estava de acordo com as frequências esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma vez que a população infectada pelo HBV mostrou diferença significativa entre a frequência observada e a esperada ($p=0,0139$). Não foi observada diferença significativa entre as frequências genótípicas da população infectada pelo HBV e a população controle ($p = 0,8745$). Os valores de Odds ratio demonstram que a presença do genótipo mutante CCR5 Δ 32/ CCR5 Δ 32 pode representar até 2,06 vezes mais chances de desenvolvimento de Hepatite B crônica do que os outros genótipos. A frequência do alelo mutante CCR5 Δ 32 em ambas as populações analisadas foi de 2,6%, resultando em um total de 5% para a população geral de Roraima. Não houve diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,9626$). Considerando os valores de Odds ratio, o alelo mutante do CCR5 representou até 1,15 vezes mais chances de desenvolvimento de cronicidade da doença do que o alelo selvagem, em relação ao heterozigoto.

Tabela 2 - Distribuição das frequências genóticas e alélicas do gene CCR5 entre os pacientes infectados com HBV e grupo controle

Genótipos	Pacientes HBV	Grupo controle	<i>p</i>	OR (95%IC)
	(n= 190)	(n= 130)		
CCR5/CCR5	181 (95,26%)	123 (94,61%)	0,0009	1,14 (0,41-3,15)*
CCR5/CCR5Δ32	8 (4,21%)	7 (5,38 %)	0,7963	0,77 (0,27-2,18)*
CCR5Δ32/ CCR5Δ32	1 (0,52%)	0	0,99	2,06 (0,08-51,11)*
EHW	X ² =6,0456	-----	0,0139	
	-----	X ² =0,0995	0,7524	
Frequência genotípica			0,8745 [†]	
CCR5/CCR5	0,952	0,946		
CCR5/CCR5Δ32	0,042	0,053		
CCR5Δ32/ CCR5Δ32	0,0052	0		
Frequência Alélica			0,9626 ^a	
CCR5	0,97	0,96		1,02 (0,38-2,72)*
CCR5Δ32	0,026	0,026		0,97 (0,36-2,60)*

[†]Teste Exato de Fisher; ^a Teste Qui quadrado; * Odds Ratio; EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Discussão

Este é o primeiro estudo que analisa a frequência dos polimorfismos no gene CCR5 com a população infectada pelo HBV em Roraima e com um população controle. Nossos resultados mostraram a presença do genótipo mutante em 0,52% (1/190) dos pacientes infectados com HBV e são opostos à maioria dos estudos prévios, que indicam nenhuma ocorrência do genótipo homocigoto da mutação em pacientes infectados com HBV (CORADO et al., 2016; KHORRAMDELAZAD et al., 2013; NUNES et al., 2013; YILMAZ et al., 2014). Nossos dados são semelhantes à outros estudos que, indicaram maior presença de heterozigose nos pacientes infectados, que na população controle. Suneetha e colaboradores (2006), revelaram maior frequência de heterozigose da mutação CCR5Δ32 em pacientes HBV crônicos do que na população controle. Achados de Yilmaz e colaboradores (2014) registraram maior

frequência da mutação em heterozigose na população infectada com HCV do que no grupo controle. Entretanto, discordando do que foi observado nos estudos citados acima, resultados de Abdolmohammadi e colaboradores (2016) indicaram que a heterozigose da mutação CCR5 Δ 32 foi maior em controles saudáveis do que entre os indivíduos infectados pelo HBV (11,2% versus 1,4%; $p < 0,03$).

As quimiocinas (CCL1, CCL2, CCL5) tem um papel importante ao longo do desenvolvimento da resposta imune contra infecções virais. Estas quimiocinas facilitam a atividade imune diretamente através de seu receptor específico, entre eles o CCR5, presentes na superfície das células imunes. Portanto, alguma alteração na expressão ou conformação estrutural do CCR5 deve levar a uma resposta imune inapropriada contra a infecção viral (CHOI et al., 2012; KHORRAMDELAZAD et al., 2013; LARRUBIA et al., 2008; VARGAS et al., 2006;). Estudos mostram que a deleção de 32 nucleotídeos do éxon 1 do gene CCR5 (mutação Δ 32) causa uma mutação *frameshift* (deslocamento do quadro de leitura) na posição 185 e isso leva a disfunção ou declínio da expressão do receptor CCR5 (ARABABADI et al., 2010a; JIN et al., 2008). Indivíduos homozigotos para essa mutação não expressam o CCR5 na superfície das células, enquanto o estado heterozigótico resulta na diminuição da expressão funcional da proteína CCR5 (WU et al., 1997).

Estudos sugerem que parâmetros genéticos, incluindo a mutação CCR5 Δ 32, devem afetar a expressão do CCR5 nas células dos pacientes infectados cronicamente com o HBV. Resultados de estudos prévios mostraram que essa mutação não estava presente no genoma de pacientes infectados por HBV no Sudeste do Irã, concluindo assim, que a infecção crônica pelo HBV, não estava associada à mutação CCR5 Δ 32, na população analisada. Um estudo da população da Coreia também revelou que o mutante CCR5 Δ 32 não estava associado nem a persistência nem a recuperação da infecção pelo HBV (AHN et al., 2006; GANCZAK et al., 2008; KHORRAMDELAZAD et al., 2013). Em contraste com esses resultados, um estudo envolvendo a população americana mostrou que a mutação está correlacionada com a redução do risco de desenvolvimento de infecção persistente pelo HBV (THIO et al., 2007). Outro estudo envolvendo pacientes da Índia revelou que a mutação Δ 32 no gene CCR5 está significativamente associada com a infecção crônica pelo HBV (SUNEETHA et al., 2006). Nossos resultados sugerem que a mutação em homozigose pode aumentar o risco de cronicidade da doença nos casos estudados, porém, sugerimos o aumento da população, para que possamos inferir claramente que relação existe entre a mutação CCR5 Δ 32 e outros aspectos clínicos da doença, assim como entender se esse aspecto genético é fator de risco ou protetivo na população.

O alelo mutante CCR5 Δ 32 possui uma frequência aproximada de 10% em caucasianos e ausente em populações negras ou japonesas. Essa frequência de 10% se mantém em caucasianos americanos e chega a 1,7 % em afro-americanos, frequência que pode ser explicada pelos eventos de miscigenação (LIU et al, 1996). Martinson e colaboradores (1997) mostraram que o alelo mutante não está confinado a descendentes europeus, sendo encontrado por toda a Europa, Oriente Médio e Ásia. Hunsai e colaboradores (1998) identificaram a mutação na Índia, em uma mulher heterozigota. Yudin e colaboradores (1998) analisaram indivíduos representativos da Sibéria Oriental e Ocidental, Ásia Central e Rússia, encontrando uma alta frequência da mutação na Sibéria Ocidental (11,1%) e uma frequência muito baixa (0,5-4,8%) nas populações da Ásia, Sibéria Oriental, Rússia e Canadá.

A população brasileira é formada por uma mistura de populações Ameríndia, Europeia e Africana, porém a ancestralidade Europeia é predominante no Brasil (DE NEVES MANTA et al., 2013; SANTOS et al., 2010b) De acordo com Passos e Picanço (1998) a frequência do alelo mutante na população urbana do Sudeste do Brasil é de 3,5% e 0% nos Ameríndios estudados. Outro estudo na região Sul do Brasil, feito por Vargas e colaboradores (2006) envolveu indivíduos brancos, negros e morenos, que revelaram uma frequência para o alelo Δ 32 de 6,8%, 3,8% e 6,4%, respectivamente. Farias e colaboradores (2012) investigaram cinco grupos diferentes da população de Rondônia, Norte do Brasil, e encontraram diferentes frequências do alelo mutante dependendo do contexto étnico, história ancestral de colonização e migração de cada grupo analisado (3,5%, 3,1%, 3,4%, 1,8, 0,6%).

O estado de Roraima se caracteriza por apresentar uma população bastante miscigenada, trazendo raízes indígenas (população nativa), europeias (período da colonização), migrantes de todas as regiões do Brasil e de outros países (como Venezuela e Guiana Inglesa, Japão, Colômbia). Segundo o IBGE (2011), a população de Roraima apresenta a seguinte constituição étnica: pardos (60,12%), brancos (23,95%), indígenas (5,02%), negros (9,67%) e amarelos (1,24%). A baixa frequência do alelo mutante encontrada em nosso estudo na população infectada e controle, que foi de 2,6%, provavelmente é o reflexo dessa mistura de padrões genéticos na população roraimense. O primeiro estudo sobre a prevalência de fatores imunogenéticos (polimorfismo do gene CCR5) no estado de Roraima, foi realizado por Corado e colaboradores (2016), investigando 116 indivíduos que representaram a população infectada com HIV no estado de Roraima, encontrando uma frequência de 4,6% do alelo mutante Δ 32 na população estudada.

Nosso estudo é o primeiro no estado de Roraima que investiga o papel do gene CCR5 e seu polimorfismo na população infectada pelo HBV e como ocorre o padrão genético na

população controle. Nossos dados da frequência do CCR5 Δ 32 (5%), se assemelham à estudos anteriores, que também encontraram uma frequência de 4,2 % (CARVALHAES; CARVALHO; GUERREIRO, 1999) e 4,6 % (CORADO et al., 2016) do alelo mutante na população do Norte do Brasil. Em contraste, discordam daqueles que indicaram uma baixa frequência desse alelo em diferentes grupos de populações brasileiras. Por exemplo, 0,7% na população afro-brasileira do Pará (CARVALHARES et al., 2011), 2,4% na população do Rio Grande do Sul (VIEIRA et al., 2011), 2,6% na população miscigenada da Bahia (GRIMALDI et al., 2002).

Conclusão

Nosso estudo foi o primeiro a analisar a frequência do polimorfismo do gene CCR5 na população de portadores HBV e na população saudável em Roraima. Baseados em nossos dados, observa-se que a mutação CCR5 Δ 32 não é prevalente na população HBV ou na população controle, ocorrendo em uma frequência de 5% na população geral de Roraima, provavelmente devido à forte miscigenação, característica do estado. Nosso estudo sugere que não existe relação entre a presença do alelo mutante e a susceptibilidade à infecção por HBV. Entretanto, diferente de outros estudos relacionados à mutação CCR5 Δ 32, encontramos 1 genótipo homozigoto recessivo na população de portadores de HBV de Roraima (0,52%). Estudos posteriores são necessários, incluindo o aumento do número amostral tanto da população HBV quanto controle, para uma possível inferência desse polimorfismo estar influenciando na severidade ou resolução da doença, e se representa um fator protetivo ou de risco para o restante da população saudável.

Referências

ABDOLMOHAMMADI, R, et al. CCR5 Polymorphism as a Protective Factor for Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis B Virus Infected Iranian Patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 17, n. 10, p. 4643-4646, 2016.

ABOUSAIDI, H.; VAZIRINEJAD, R.; ARABABADI, M. K.; RAFATPANAH, H.; POURFATHOLLAH, A. A.; DERAKHSHAN, R. et al. Lack of association between chemokine receptor 5 (CCR5) d32 mutation and pathogenesis of asthma in Iranian patients. **Southern Medical Journal**, v. 104, n. 6, p. 422-425, 2011.

AHN, S. H.; KIM, D. Y.; CHANG, H. Y.; HONG, S. P.; SHIN, J. S.; KIM, Y. S. et al. Association of genetic variations in CCR5 and its ligand, RANTES with clearance of hepatitis B virus in Korea. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 12, p. 1564-1571, 2006.

AJUEBOR, M. N.; CAREY, J. A.; SWAIN, M. G. CCR5 in T cell-mediated liver diseases: what's going on? **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 2039-2045, 2006.

ARABABADI, M. K.; POURFATHOLLAH, A. A.; JAFARZADEH, A.; HASSANSHAHI, G. Decreased expression of CCR5 on the NK cells in occult HBV infected patients. **Laboratory Medicine**, v. 41, n. 12, p. 735-8, 2010a.

ARABABADI, M. K. Peripheral blood CD8 T Cells CCR5 expression and its D32 mutation in Iranian patients with occult hepatitis B infection. **Laboratory Medicine**, v. 41, p. 226–230, 2010b.

AYRES, M.; AYRES, Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. Bioestat Versão 5.0. **Sociedade Civil Mimirauá, MCT–CNPq**, Belém. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. Ano V. nº1. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

CARVALHAES, F. A. P. L.; CARVALHO, M. I. M.; GUERREIRO, J. F. A mutação CCR5-delta 32 em populações humanas da Amazônia. In: 45º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, Gramado, RS, Brasil. Out. p. 3-6. 1999.

CARVALHAES, F. A. D. P. L.; CARDOSO, G. L.; HAMOY, I. G.; LIU, Y. T.; GUERREIRO, J. F. Distribution of CCR5-32, CCR2-64I, SDF1-3'A mutations in populations from the Brazilian Amazon region. **Human Biology**, v. 76, n. 4, p. 11, 2011.

CORADO, A. L. G.; DA SILVA, G. A. V.; LEÃO, R. A. C.; GRANJA, F.; NAVECA, F. G. Frequency of CCR5 genotypes in HIV-infected patients in Roraima, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 314–315, 2016.

CHOI, W.; LI, Z.; OH, H. J.; IM, S. K.; LEE, S. H.; PARK, S. H.; YOU, I. C.; YOON, K. C. Expression of CCR5 and its ligands CCL3, -4, and -5 in the tear film and ocular surface of patients with dry eye disease. **Curr Eye Res**, v. 37, n. 1, p. 12–17, jan., 2012.

DE NEVES MANTA, F. S.; PEREIRA, R.; VIANNA, R.; DE ARAÚJO, A. R. B.; GITAÍ, D. L. G.; DA SILVA, D. A. et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75145, 2013.

PASSOS, G. A. JR.; PICANÇO, V. P. Frequency of the delta ccr5 deletion allele in the urban Brazilian population. **Immunol Lett**, v. 61, n. 2-3, p. 205-207, 1998.

DVE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Dados de Hepatite B em Roraima 2010-2015**. Boa Vista, Roraima, 2016. Relatório digitado.

FARIAS, J. D. D.; SANTOS, M. G.; FRANÇA, A. K. D.; DELANI, D.; TADA, M. S.; CASSEB, A. A. et al. Distribution of the CCR5delta32 allele (gene variant CCR5) in Rondônia, Western Amazonian region, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 27-31, 2012.

FISICARO, P.; VALDATTA, C.; BONI, C.; MASSARI, M.; MORI, C.; ZERBINI, A. et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. **Gut**, v. 58, n. 7, p. 974-982, 2009.

GAŃCZAK, M.; BOHATYREWICZ, A.; SZYCH, Z.; BIAŁECKI, P. Markers of hepatitis B, C and HIV among orthopedic patients and staff at a Polish university hospital. **Polish Orthopedics and Traumatology**, v. 73, n. 2, p. 83-88. 2008.

GRIMALDI, R.; SHINDO, N.; ACOSTA, A.; DOURADO, I.; BRITES, C.; DE MELO CARVALHO, O. et al. Prevalence of the CCR5- 32 mutation in Brazilian populations and cell susceptibility to HIV-1 infection. **Human genetics**, v. 111, n. 1, p. 102-104, 2002.

HUSAIN, S.; GOILA, R.; SHAHI, S.; BANERJEA, A. C. First report of a healthy indian heterozygous for $\Delta 32$ mutant of HIV-1 co-receptor-CCR5 gene. **Gene**, v. 207, n. 2, p. 141-147, 1998.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. População residente por cor ou raça. 2011. Disponível em: <<http://serieestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=PD336>> Acesso em: 30 Junho. 2018.

JIN, Q.; AGRAWAL, L.; MEYER, L.; TUBIANA, R.; THEODOROU, I.; ALKHATIB, G. CCR5Delta32 59537-G/A promoter polymorphism is associated with low translational efficiency and the loss of CCR5Delta32 protective effects. **Journal of virology**, v. 82, n. 5, p. 2418-2426, 2008.

KHORRAMDELAZAD, H.; HAKIMIZADEH, E.; HASSANSHAHI, G.; REZAYATI, M.; SENDI, H.; ARABABADI, M. K. CCR5 $\Delta 32$ mutation is not prevalent in Iranians with chronic HBV infection. **Journal of medical virology**, v. 85, n. 6, p. 964-968, 2013.

LARRUBIA, J. R.; BENITO-MARTÍNEZ, S.; CALVINO, M.; SANZ-DE-VILLALOBOS, E.; PARRA-CID, T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 47, p. 7149-59, dez., 2008.

LI, H.; XIE, H. Y.; ZHOU, L.; WANG, W. L.; LIANG, T. B.; ZHANG, M. et al. Polymorphisms of CCL3L1/CCR5 genes and recurrence of hepatitis B in liver transplant recipients. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 10, n. 6, p. 593-598. 2011.

LIU, R.; PAXTON, W. A.; CHOE, S.; CERADINI, D.; MARTIN, S. R.; HORUK, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367-377, 1996.

MARTINSON, J. J.; CHAPMAN, N. H.; REES, D. C.; LIU, Y. T.; CLEGG, J. B. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nature genetics**, v. 16, n. 1, p. 100-103, 1997.

NUNES, A. C.; SENA, M. M.; GARCIA, S. B.; PEREIRA, A. P. L.; TRUGILO, K. P.; WATANABE, M. A. E. et al. Análise da deleção $\Delta 32$ do receptor de quimiocina CCR5 em descendentes asiáticos em Maringá – Paraná. **Biosaúde**, Londrina, v. 15, n. 1, p. 12-21, 2013.

SANCHOOLI, J.; SANADGOL, N.; KAZEMI ARABABADI, M.; KENNEDY, D. CCR5 plays important roles in hepatitis B infection. **Viral Immunology**, v. 27, n. 1, p. 2-6, 2014.

SANTOS, N. P.; RIBEIRO-RODRIGUES, E. M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K.; PEREIRA, R.; GUSMÃO, L.; AMORIM, A. et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Human mutation**, v. 31, n. 2, p. 184-190, 2010b.

SILVA, A. C. L. G. et al. Incidência e mortalidade por hepatite B, de 2001 a 2009: uma comparação entre o Brasil, Santa Catarina e Florianópolis. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 34-39, 2013.

SUNEETHA, P. V. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 44, p. 856-863, 2006.

THIO, C. L.; ASTEMBORSKI, J.; BASHIROVA, A.; MOSBRUGER, T.; GREER, S.; WITT, M. D. et al. Genetic protection against hepatitis B virus conferred by CCR5 Δ 32: evidence that CCR5 contributes to viral persistence. **Journal of Virology**, v. 81, n. 2, p. 441-445, 2007.

THIO, C. L.; ASTEMBORSKI, J.; THOMAS, R.; MOSBRUGER, T.; WITT, M. D.; GOEDERT, J. J. et al. Interaction between RANTES promoter variant and CCR5 Δ 32 favors recovery from hepatitis B. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 7944–7947, 2008.

TREHANPATI, N.; GEFFERS, R.; HISSAR, S.; RIESE, P.; TOEPFER, T.; BUER, J. et al. Gene expression signatures of peripheral CD4⁺ T cells clearly discriminate between patients with acute and chronic hepatitis B infection. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 781-790, 2009.

VARGAS, A. E.; MARRENO, A. R.; SALZANO, F. M.; BORTOLINI, M. C.; CHIES, J. A. B. Frequency of CCR5 Δ 32 in Brazilian populations. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 3, p. 321-325. 2006.

VIEIRA, V. C.; BARRAL, M. F. M.; MENDOZA-SASSI, R. A.; SILVEIRA, J. M.; SOARES, M. A.; MARTÍNEZ, A. M. B. D. The effect of combined polymorphisms in chemokines and

chemokine receptors on the clinical course of HIV-1 infection in a Brazilian population. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 408-414, 2011.

WU, L.; PAXTON, W. A.; KASSAM, N.; RUFFING, N.; ROTTMAN, J. B.; SULLIVAN, N. et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 9, p. 1681-1692, 1997.

YANG, B.; CHEN, L. M.; YE, W. H.; ZHANG, H. F.; CHENG, Y. Peripheral NK and NKT cell in pediatric subjects with chronic HBV infection. **Chinese journal of experimental and clinical virology**, v. 23, n. 1, p. 59-61, 2009.

YILMAZ, A.; ALAGOZLU, H.; OZDEMIR, O.; ARICI, S. Effects of the Chemokine Receptor 5 (CCR5)-Delta32 Mutation on Hepatitis C Virus-Specific Immune Responses and Liver Tissue Pathology in HCV Infected Patients. **Hepatitis monthly**, v. 14, n. 7, 2014.

YUDIN, N. S.; SERGEY, V. V.; POTAPOVA, T. A.; NAYKOVA, T. M.; SITNIKOVA, V. V.; KULIKOV, I. V. et al. Distribution of CCR5-delta 32 gene deletion across the Russian part of Eurasia. **Human genetics**, v. 102, n. 6, p. 695-698, 1998.

ZENG, Zheng. Human genes involved in hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 24, p. 7696-7706, 2014.

5 CONCLUSÕES

Diante de todos os aspectos expostos, este estudo é de suma importância, porque nos proporcionou o conhecimento da diversidade dos vírus de HBV circulantes no estado, bem como a utilização de ferramentas biotecnológicas, que possibilitou o conhecimento mais profundo sobre a genética do vírus. Adicionalmente, determinou a presença e frequência de polimorfismos genéticos em citocinas/moléculas reguladoras que apresentam papel importante na resposta imune à infecção viral. Por fim, a descrição de um perfil epidemiológico dos portadores de hepatite B crônica, o que nos possibilitou estabelecer alguns entendimentos dos genótipos e suas correlações com a epidemiologia, possíveis rotas filogenéticas e que, os fatores genéticos do vírus, assim como do hospedeiro, tem influência no curso natural da infecção e resposta ao tratamento. Sendo assim, esperamos ter produzido dados significativos para a prevenção da infecção pelo HBV.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; ANDREW H.L. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 479p.
- ABOUSAIDI, H. et al. Lack of association between chemokine receptor 5 (CCR5) d32 mutation and pathogenesis of asthma in Iranian patients. **Southern Medical Journal**, v. 104, n. 6, p. 422-425, 2011.
- AHN, S. H. et al. Association of genetic variations in CCR5 and its ligand, RANTES with clearance of hepatitis B virus in Korea. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 12, p. 1564-1571, 2006.
- AHMADABADI, B. N. et al. Downregulation of CCR5 expression on the peripheral blood CD8+ T cells of southeastern Iranian patients with chronic hepatitis B infection. **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 136-140, 2013.
- AJUEBOR, M. N.; CAREY, J. A.; SWAIN, M. G. CCR5 in T cell-mediated liver diseases: what's going on? **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 2039-2045, 2006.
- AL-ABDULHADI, S. A.; AL-RABIA, WO, M. Linkage and haplotype analysis for chemokine receptors clustered on chromosome 3p21. 3 and transmitted in family pedigrees with asthma and atopy. **Annals of Saudi Medicine**, v. 30, n. 2, p. 115, 2010.
- ALLEN, S. J.; CROWN, S. E.; HANDEL, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 787-820, 2007.
- ALVARADO MORA, M. V. et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. **Journal of General Virology**, London, v. 9, n. 2, p. 501-508, fev., 2010.
- ALVARIZ, R. C. Hepatite crônica pelo vírus B (HBV). **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 5, n. 1, p. 16-33, 2006.
- AMPONSAH-DACOSTA, E. et al. Evidence for a change in the epidemiology of hepatitis B virus infection after nearly two decades of universal hepatitis B vaccination in South Africa. **Journal of medical virology**, v. 86, n. 6, p. 918-924, 2014.
- AQUINO, J. A. et al. Soroprevalência de infecções por vírus da hepatite B e vírus da hepatite C em indivíduos do estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 4, p. 334-337, jul/ago., 2008.
- ARABABADI, M. K. et al. Decreased expression of CCR5 on the NK cells in occult HBV infected patients. **Laboratory Medicine**, v. 41, n. 12, p. 735-8, 2010a.
- ARABABADI, M. K. Peripheral blood CD8 T Cells CCR5 expression and its D32 mutation in Iranian patients with occult hepatitis B infection. **Laboratory Medicine**, v. 41, p. 226-230, 2010b.

ARABABADI, M. K. et al. No association between CCR5- Δ 32 mutation and multiple sclerosis in patients of southeastern Iran. **Laboratory Medicine**, v. 41, n. 1, p. 31-33, 2010c.

ARAUJO, N. M. et al. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. **Archives of Virology**, Wien, v. 149, n. 7, p. 1383-1395, jul., 2004.

ASSIS, S. B. et al. Prevalência de marcadores do vírus da hepatite B em crianças de 3 a 9 anos em um município da Amazônia brasileira. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 15, n. 1, p. 26-34, jan., 2004.

BALAYAN, M. S. et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. **Intervirology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 23-31, jan., 1983.

BALISTRERI, C. R. et al. CCR5 Receptor. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, n. 1, p. 162-172, 2007.

BANG, K. B.; KIM, H. J. Management of antiviral drug resistance in chronic hepatitis B. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 33, p. 11641-11649, 2014.

BARONE, A. A.; VISO, A. T. R. Patogenia da hepatite B e Delta. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 10, n. 1, p. 11-14, 2006.

BARONE, A. A. Hepatite Crônica pelo Vírus B. In: ARAUJO, E. S. A. de (Ed.). **O ABC das Hepatites: manual clínico para o manuseio e prevenção da hepatite B**. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008. p. 6-10.

BARROS, L. M. F. et al. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 24, p. 68-75, 2014a.

BARROS, Jacqueline de Aguiar. **Caracterização genotípica do vírus da hepatite B no estado de Roraima**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2014b.

BARTENSCHLAGER, R.; SCHALLER H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. **The EMBO journal**, v. 11, n. 9, p. 3413-3420, 1992.

BARTHOLOMEUSZ, A.; SCHAEFER, S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. **Reviews in Medical Virology**, v. 14, n. 1, p. 3-16, 2004.

BECK, J.; NASSAL, M. Hepatitis B virus replication. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 13, n. 1, p. 48-64, jan., 2007.

BELLONI, L. et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 47, p. 19975-19979, 2009.

BENN, J.; SCHNEIDER, R. J. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 22, p. 10350-10354, 1994.

BLITZ, L. et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 3, p. 648-651, mar., 1998.

BLUMBERG, B. S.; ALTER, H. J.; VISNICH, S. A “new” antigen in leucemia sera. **JAMA**, v. 191, n. 7, p. 541-546, 1965

BOGLIONE, L. et al. The E genotype of hepatitis B: clinical and virological characteristics, and response to interferon. **Journal of Infection**, v. 69, n. 1, p. 81-87, 2014.

BOLLYKY, P. L.; HOLMES, E. C. Reconstructing the complex evolutionary history of hepatitis B virus. **Journal of Molecular Evolution**, v. 49, n. 1, p. 130–141, 1999.

BOUCHARD, M. et al. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G1 transit via a Src kinase pathway. **Journal of virology**, v. 75, n. 9, p. 4247-4257, 2001.

BOUCKAERT, R.; ALVARADO-MORA, M. V.; PINHO, J. R. Evolutionary rates and HBV: issues of rate estimation with Bayesian molecular methods. **Antivir Ther**, v. 18, n. 3, p. 497-503, 2013.

BRASIL, L. M. et al. Prevalence of hepatitis B virus (HBV) infection in children, Codajas, Amazon Basin, Brazil: a pre-study vaccination. **Acta Hepatológica**, v. 1, p. 26, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Material instrucional para capacitação em vigilância epidemiológica das hepatites virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008a. 116 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: o Brasil está atento**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008b. 60 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. **Relatório de situação: Roraima**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 35 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. Ano III. nº 1. Brasília: Ministério da Saúde, 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Hepatites virais em números**. 2012b Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. Ano V. nº 1. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BUSTER, E. H. et al. Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b. **Gastroenterology**, v. 135, n. 2, p. 459-467, 2008.

CDC. Centers for Disease Control and prevention. **Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases** (The pink book). 10th edition. Waldorf (MD): Public Health Foundation; 2008.

CDC. Centers for Disease Control and prevention. **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases**. 12. ed. Washington DC: Public Health Foundation, 2011. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hepb.html> > Acesso em: 23 mai. 2014.

CHANG, K. M. Hepatitis B Immunology for Clinicians. **Clinics in liver disease**, Philadelphia, v. 14, n. 3, p. 409-424, ago., 2010.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 6, p. 610–21, 2006.

CHEN, Y. et al. Activation and function of hepatic NK cells in hepatitis B infection: na underinvestigated innate immune response. **Journal of Viral Hepatology**, v. 12, n. 1, p. 38-45, 2005.

CHEN, X. L.; LI, M.; ZHANG, X. L. HBV genotype B/C and response to lamivudine therapy: a systematic review. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, New York, v. 244, n. 4902, p. 359-362, 1989.

CHUNG, T. W.; LEE, Y. C.; KIM, C. H. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 10, p. 1123-1125, 2004.

COENEN, M.; NATTERMANN, J. The role of CCR5 in HCV infection. **European Journal of Medical Research**, v. 15, n. 3, p. 97, 2010.

COLEMAN, P. F. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 198, 2006.

COUROUCÉ-PAUTY, A. M.; PLANCON, A.; SOULIER, J. P. Distribution of HBsAg subtypes in the world. **Vox Sanguinis**, Switzerland, v. 44, n. 4, p. 197–211, abr., 1983.

CRISPIM, M. A. E. et al. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

CROAGH, C. M. N.; LUBEL, J. S. Natural history of chronic hepatitis B: Phases in a complex relationship. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 30, p. 10395-10404, ago., 2014.

CUSTER, B. et al. Global epidemiology of hepatitis B virus. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, n. 38, n. 10, sup. 3, p. S158–168, nov/dez., 2004.

- DANDRI, M.; LOCARNINI, S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. **Gut**, v. 61, n. Suppl 1, p. i6-i17, 2012.
- DANE, D. S.; CAMERON, C. H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australian antigen associated hepatitis. **Lancet**, v. 1, n. 45, p. 695-698, 1970.
- DASH, S.; RAO, K. V. S.; PANDA, S. K. Receptor for pre-SI (21–47) componente of hepatitis B virus on the liver cell: role in virus cell interaction. **Journal of Medical Virology**, v. 37, n. 2, p. 116–121, jun., 1992.
- DATTA, S. et al. Molecular Biology of the Hepatitis B Virus for Clinicians. **Journal of clinical and experimental hepatology**, v. 2, n. 4, p. 353–365, dez., 2012.
- DAWSON, T. C. et al. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 6, p. 1951-1959, 2000.
- DÉNY, P.; ZOULIM, F. Hepatitis B virus: From diagnosis to treatment. **Pathologie Biologie**, Paris, v. 58, p. 245–253. 2010.
- DE JONGH, F. E. et al. Survival and prognostic indicators in hepatitis B surface antigen-positive cirrhosis of the liver. **Gastroenterology**, v. 103, n. 5, p. 1630-1635, nov., 1992
- DIAS, Á. L. B. et al. M. Molecular characterization of the hepatitis B virus in autochthonous and endogenous populations in the Western Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 9-12, 2012.
- DOGANCI, T. et al. Horizontal transmission of hepatitis B virus in children with chronic hepatitis B. **World journal of gastroenterology**, v. 11, n. 3, p. 418-420, 2005.
- DVE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Dados de Hepatite B em Roraima 2010-2016**. Boa Vista, Roraima, 2017. Relatório digitado.
- FEINSTONE, S. M.; KAPIKIAN, A. Z.; PURCELL, R. H. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. **Science**, New York, v. 182, n. 116, p. 1026-1028, 1973.
- FERRARI C. et al. Immunopathogenesis of hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v. 39, S1, S36-S42, 2003.
- FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Avanços no tratamento da hepatite pelo vírus B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 451-462, 2007.
- FERREIRA, M. S. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 4, p. 389-400, 2000.
- FERREIRA, C. T.; DA SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 4, p.474-487, dez., 2004.

FISICARO, P. et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. **Gut**, v. 58, n. 7, p. 974-982, 2009.

FOCACACCIA, R.; VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.1343 p.

FONSECA, J. C. F. Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 3, p. 322-330, mai-jun. 2010.

FONSECA, J. C. F. **Eradication of Hepatitis B vírus infection in the State of Amazonas**. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/events/WDHD/2007/2007_wgn_newsletter.pdf>. 2007. Acesso em: 01 jun. 2018.

FRANCO, O. **História da Febre Amarela no Brasil**. Ministério da Saúde. Departamento Nacional de Endemias Rurais. 1969.

FREITAS J. Hepatites Víricas: Perspectiva histórica. Disponível em: <<http://www.aidsportugal.com/hepatitte>>. 2003. Acesso em: 18 jun. 2017.

FRANCO, E. et al. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries. **World Journal of Hepatology**, v. 4, n. 3, p. 74-80, 2012.

GAŃCZAK, M. et al. Markers of hepatitis B, C and HIV among orthopedic patients and staff at a Polish university hospital. **Polish Orthopedics and Traumatology**, v. 73, n. 2, p. 83-88. 2008.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B virus infection - natural history and clinical consequences. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 350, n. 11, p. 1118-1129, mar. 2004.

GANEM, D.; SCHNEIDER, R. J. Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 2923-2969. 2001.

GAO, S.; DUAN, Z. P.; COFFIN, C. S. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 8, p. 1086-1096, 2015.

GERLICH, W. H. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. **Virology Journal**, London, v. 10, n. 1, p. 1-25. 2013.

GOEL, V. et al. Chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphism in chronic hepatitis B patients treated with three different nucleos(t)ide analogues. **Indian Journal of Medical Research**, v. 137, n. 6, p. 1208-1209, 2013.

GONÇALES, N. S. L; CAVALEIRO, N. P. Marcadores Sorológicos da Hepatite B e sua Interpretação. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 19-22, ago. 2006.

- GRANJA, F. et al. Phylogeny of Hepatitis B Virus (HBV) circulation in Roraima State. **Virus Reviews & Research**, v.19, supl. 2, set./out. 2014.
- GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. 9, p. 67-76, 2011.
- GUIDOTTI, L. G. et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. **Science**, v. 284, n. 5415, p. 825-829, 1999.
- HAINES, K. M.; LOEB, D. D. The sequence of the RNA primer and the DNA template influence the initiation of plus-strand DNA synthesis in hepatitis B virus. **Journal of molecular biology**, v. 370, n. 3, p. 471-480, 2007.
- HANCOCK, A. M. et al. Adaptations to new environments in humans: the role of subtle allele frequency shifts. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1552, p. 2459-2468, 2010.
- HATAMI, H. et al. Intra-familial Transmission of Hepatitis B virus Infection in Zahedan. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 15, n. 1, p. 4, 2013.
- HOLLINGER, F. B. Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays. **Journal of Viral Hepatitis**, Oxford, v. 14, Suppl. 1, p. 11-15. 2007.
- HOOFNAGLE, J. H. et al. Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. **Hepatology**, v. 21, n. 1, p. 240-252, 1995.
- HORVART, R. T. Diagnostic and Clinical Relevance of HBV Mutations. **Laboratory Medicine**, v. 42, n. 8, p. 488-496, 2011.
- HU, J.; TOFT, D. O.; SEEGER, S. T. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex, which is incorporated into nucleocapsids. **The Embo Journal**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 59-68, jan., 1997.
- ILOEJE, U. H. et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. **Gastroenterology**, v. 130, n. 3, p. 678-686, 2006.
- KAJIWARA, E. et al. Hepatitis B caused by a hepatitis B surface antigen escape mutant. **Journal of gastroenterology**, v. 43, n. 3, p. 243-247, 2008.
- KAO, J. H. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 6, p. 643- 650, jun., 2002.
- KAO, J. H.; CHEN, D. S. Global control of hepatitis B virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, n. 7, p. 395-403, jul., 2002.
- KAO, J. H.; CHEN, D. S. HBV genotypes: epidemiology and implications regarding natural history. **Current Hepatology Reports**, Philadelphia, v. 5, n. 1, p. 5-13, fev., 2006.
- KAO, J. H. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus. **The Korean Journal of Internal Medicine**, Seoul, v. 26, n. 3, p. 255-261, set., 2011.

- KAY, A.; ZOULIM, F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. **Virus research**, v. 127, n. 2, p. 164-176, 2007.
- KHORRAMDELAZAD, H. et al. CCR5 Δ 32 mutation is not prevalent in Iranians with chronic HBV infection. **Journal of medical virology**, v. 85, n. 6, p. 964-968, 2013.
- KIDD-LJUNGGREN, K.; MIYAKAWA, Y.; KIDD, A. H. Genetic variability in hepatitis B viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 83, n. 6, p. 1267-1280, jun., 2002.
- KIRSCHBERG, O. et al. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus-genotypes A-F. **Journal of clinical virology**, v. 29, n. 1, p. 39-43, 2004
- KRAMVIS, A. et al. Full genome analysis of hepatitis B virus genotype E strains from South-Western Africa and Madagascar reveals low genetic variability. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 77, n. 1, p. 47-52, set., 2005.
- KURBANOV, F.; TANAKA, Y.; MIZOKAMI, M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. **Hepatology Research**, v. 40, n. 1, p. 14-30. 2010.
- KWON, S. Y.; LEE, C. H. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. **The Korean Journal of Hepatology**, [s.l.], v. 17, [s.n.], p. 87-95. 2011.
- LAI, Y. CCR5-targeted hematopoietic stem cell gene approaches for HIV disease: current progress and future prospects. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 4, p. 310-317. 2012.
- LAMPE, E. et al. Nationwide overview of the distribution of hepatitis B virus genotypes in Brazil: a 1000-sample multicentre study. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 1389-98, 2017.
- LAU, J. Y.; WRIGHT, T. L. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. **Lancet**, New York, v. 342, n. 8883, p. 1335-1340, nov. 1993.
- LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **Journal of viral hepatitis**, v. 11, n. 2, p. 97-107, 2004.
- LEIFELD, L. et al. Imbalanced intrahepatic expression of interleukin 12, interferon gamma, and interleukin 10 in fulminant hepatitis B. **Hepatology**, v. 36, n. 4 (Pt1), p. 1001-1008, 2002.
- LEPÈRE-DOUARD, C. et al. The first transmembrana domain of the hepatitis B virus large envelope protein is crucial for infectivity. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 83, n. 3, p. 11819-11822, fev. 2009.
- LEVRERO, M. et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. **Journal of hepatology**, v. 51, n. 3, p. 581-592, 2009.

- LI, H. et al. Polymorphisms of CCL3L1/CCR5 genes and recurrence of hepatitis B in liver transplant recipients. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 10, n. 6, p. 593-598. 2011.
- LI, Z.; HOU, X.; CAO, G. Is mother-to-infant transmission the most important factor for persistent HBV infection? **Emerging microbes & infections**, v. 4, n. 5, p. e30, 2015.
- LIANG, T. J. Hepatitis B: The Virus and Disease. **Hepatology**, Thorofare, v. 49, n. 5, Suppl., 2009.
- LIAW, Y. F. et al. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. **Hepatology**, v. 8, n. 3, p. 493-496, 1988.
- LIAW, Y. F.; CHU, C. M. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**, v. 373, p. 582–592. 2009.
- LINDH, M.; ANDERSSON, A. S.; GUSDAL, A. Genotypes, nt1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus – large-scale analysis using a new genotyping method. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 6, p. 1285-1293, 1997.
- LIU, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367-377, 1996.
- LIU, C. J.; KAO, J. H. Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J. **Seminars in Liver Diseases**, v. 33, n. 2, p. 97-102, maio. 2013.
- LOBATO, C. et al. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 21, n. 5, p. 863-868, 2006.
- LOCARNINI, S.; ZOULIM, F. Molecular genetics of HBV infection. **Antivir Ther**, v. 15, n. Suppl 3, p. 3-14, 2010.
- LOK, A. S. F.; MACMAHON, B. J. Chronic Hepatitis B. **Hepatology**, Baltimore, v. 45, n. 2, p. 507-539, Jan. 2007.
- LOPES, T. S. L.; SCHINONI, M. I. Aspectos gerais da Hepatite B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 10, n. 3, p. 337-344, set./dez., 2011
- MA, N. F. et al. COOH-terminal truncated HBV X protein plays key role in hepatocarcinogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 16, p. 5061-5068, 2008.
- MAHTAB, M. A. et al. Hepatitis B virus genotypes: an overview. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, [s.l.], v. 7, [s.n.], p. 457-464, 2008.
- MACMAHON, B. J. et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. **Journal of Infectious Disease**, v. 151, n. 4, p. 599-603, 1985.

MELLO, F. C. et al. A Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiology**, London, v. 7, p. 103-111, nov., 2007.

MENDONÇA, J. S.; VIGANI, A. G. História natural da hepatite B aguda e crônica. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 10, n. 1, p. 15-18, 2006.

MILLER, R. H. et al. Compact organization of the hepatitis B virus genome. **Hepatology**, Thorofare, v. 9, [s.n.], p. 322-327, 1989

MILICH, D.; LIANG, T. J. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. **Hepatology**, v. 38, p. 1075–1086, 2003.

MURRAY, J. M.; PURCELL, R. H.; WIELAND, S. F. The half-life of hepatitis B virions. **Hepatology**, Thorofare, v. 44, [s.n.], p. 1117-1121, 2006.

MURPHY, P. M. et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 1, p. 145-176, 2000.

NAITO, H.; HAYASHI, S.; ABE, K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 1, p. 362-364, 2001.

NIEDERAU, C. Chronic hepatitis B in 2014: Great therapeutic progress, large diagnostic deficit. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n.33, p. 11595-11617, 2014.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Hepatitis B vaccines. **Weekly Epidemiological Record**, [s.l.], v. 79, n. 28, p. 253–264, 2004.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Hepatitis B. WHO Media Centre. Fact Sheet, nº 204. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>>. Acesso em: 21 maio. 2018.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Hepatitis B. WHO Media Centre. Fact Sheet, Update July 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>>. Acesso em: 13 jul. 2018.

OSIOWY, C. Detection of HBsAg mutants. **Journal of medical virology**, v. 78, n. S1, p. S48-S51, 2006.

PANG, R.; TSE, E.; POON, R. T. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. **Cancer letters**, v. 240, n. 2, p. 157-169, 2006.

PARANÁ, R.; ALMEIDA, D. HBV epidemiology in Latin America. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 34, Suppl. 1, p. S130-133, dez., 2005.

PARANÁ, R.; VITVITSKI, L.; PEREIRA, J. E. Hepatotropic Viruses in the Brazilian Amazon: A Health Threat. **The Brazilian Journal and Infectious Diseases**, Salvador, v. 12, n. 3, p. 253-256, jun., 2008.

PARANÁ, R.; SCHINONI, M. I.; OLIVEIRA, A. P. Diagnóstico e Monitorização da Hepatite B. In: ARAUJO, E. S. A. de (Ed.). **O aBc das Hepatites**: manual clínico para o manuseio e prevenção da Hepatite B. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008. p. 65-70.

PARASKEVIS, D. et al. Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. **Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 908-16, 2013.

POLLACK, J.; GANEM, D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. **Journal of virology**, v. 67, n. 6, p. 3254-3263, 1993.

POLLICINO, T. et al. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications. **Journal of hepatology**, v. 61, n. 2, p. 408-417, 2014.

PONTISSO, P. et al. Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus preS1 region and, via polymerized human serum albumin, for the preS2 region. **Journal of virology**, v. 63, n. 5, p. 1981-1988, 1989.

PONTISSO, P. et al. Biological and clinical implications of HBV infection in peripheral blood mononuclear cells. **Autoimmunity reviews**, v. 8, n. 1, p. 13-17, 2008.

PROMRAT, K.; LIANG, T. J. Chemokine systems and hepatitis C virus infection: is truth in the genes of the beholders?. **Hepatology**, v. 38, n. 6, p. 1359-62, 2003

PURCELL, R. H. The Discovery of the Hepatitis Viruses. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 104, n. 4, p. 955-963, abr. 1993.

PYRSOPOULOS, N. T. Hepatitis B. Medscape Reference. 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/177632-overview>>. Acesso em: 25 mai. 2018.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 3, p. 215-229, mar., 2005.

REHERMANN, B. et al. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 7, p. 1655-65, 1996.

REUBEN, A. Landmarks in hepatology: the thin red line. **Hepatology**, v. 36, n. 3, p. 770-773, 2002.

RIBEIRO, C. S. S.; VISENTAINER, J. E. L.; MOLITERNO, R. A. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 435-440, 2007.

RIZZETTO, M. et al. Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system (delta/antidelta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. **Gut**, London, v. 18, n. 12, p. 997-1003, dez., 1977.

ROBERTS, L. R.; GORES, G. J. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. **Seminars in Liver Diseases**, v. 25, n. 2, p. 212-225, mai., 2005.

RODRÍGUEZ-FRIAS, F.; JARDI, R. Virología molecular del virus de la hepatitis B. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, Supl. 7, p. 2-10, mai., 2008.

RODRIGUEZ-FRIAS, F. et al. Quasispecies structure, cornerstone of hepatitis B virus infection: Mass sequencing approach. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 19, n. 41, p. 6995-7023, nov., 2013.

ROMAN, S. et al. Hepatitis B virus infection in Latin America: A genomic medicine approach. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7181-7196, 2014.

RONCATO, M.; BALLARDIN, P. A. Z.; LUNGE, V. R. Influência dos genótipos no tratamento da hepatite B. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 28, n. 3, p. 188-93, 2008.

ROSEMAN, A. M. et al. Structures of hepatitis B virus cores presenting a model epitope and their complexes with antibodies. **Journal of molecular biology**, v. 423, n. 1, p. 63-78, 2012.

ROUHO, L. C. K. et al. Chemokine and chemokine receptor gene polymorphism in Tunisian hemodialysis patients with HCV infection. **Arab Journal of Nephrology and Transplantation**, v. 4, n. 3, p. 117-24, 2011.

SANCHOOLI, J. et al. CCR5 plays important roles in hepatitis B infection. **Viral Immunology**, v. 27, n. 1, p. 2-6, 2014.

SANTOS, A. O. et al. Characterization of Hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. **Virology Journal**, London, v.7, n. 1, p. 315-321, 2010a.

SAYINER, A. A.; ÖZCAN, A.; SENGONUL, A. Naturally occurring MHR variants in Turkish patients infected with hepatitis B virus. **Journal of medical virology**, v. 80, n. 3, p. 405-410, 2008.

SCHIECK, A. et al. Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts. **Hepatology**, Thorofare, v. 58, n.1, p. 43-53. 2013.

SEEGER, C.; MASON, W. S. Hepatitis B virus biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 51-68, 2000.

SHEN, T.; YAN, X. Hepatitis B virus genetic mutations and evolution in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 18, p. 5435, 2014.

SHEPPARD, H. W. et al. HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. **JAIDS-HAGERSTOWN MD-**, v. 29, n. 3, p. 307-313, 2002.

SHI, W. et al. Identification of novel inter-genotypic recombinants of human hepatitis B viruses by large-scale phylogenetic analysis. **Virology**, v. 427, n. 1, p. 51-59, 2012b.

SIMMONDS, P. The origin and evolution of hepatitis viroses in humans. **Journal of General Virology**, v. 82, 693-712, 2001.

SINGH, J. et al. First report of genotype e of hepatitis B virus in an Indian population. **Intervirolgy**, v. 52, n. 5, p. 235-238, set., 2009.

STOLL-BECKER, S. et al. Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients. **Journal of virology**, v. 71, n. 7, p. 5399-5407, 1997.

SUGAUCHI, F. et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. **Journal of virology**, v. 76, n. 12, p. 5985-5992, 2002.

SUNEETHA, P. V. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 44, p. 856-863, 2006.

TANG, H. et al. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus X protein. **Cancer science**, v. 97, n. 10, p. 977-983, 2006.

TANWAR S.; DUSHEIKO, G. Is There Any Value to Hepatitis B Virus Genotype Analysis? **Current Gastroenterology Reports**, v. 14, p. 37-46, 2012.

TATEMATSU, K. et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 83, n. 20, p. 10538-10547, out., 2009.

TE, H. S.; JENSEN, D. M. Epidemiology of Hepatitis B and C viruses: a global overview. **Clinics in Liver Diseases**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 1-21, fev., 2010.

THIO, C. L. et al. Genetic protection against hepatitis B virus conferred by CCR5 Δ 32: evidence that CCR5 contributes to viral persistence. **Journal of Virology**, v. 81, n. 2, p. 441-445, 2007.

THIO, C. L. et al. Interaction between RANTES promoter variant and CCR5 Δ 32 favors recovery from hepatitis B. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 7944-7947, 2008.

THOMAS, H. C.; LEMON, S.; ZUCKERMAN, A. J. Viral Hepatitis. In: KANN, M.; GERLICH, W. H. (Eds.). **Structure and molecular virology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. p. 149-180.

THUY, P. T. B. et al. Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam: genotypes B4 and C1 predominate. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 82, n. 8, p. 1327-1333, 2010.

TIEGS, G.; LOHSE, A. W. Immune tolerance: what is unique about the liver. **Journal of autoimmunity**, v. 34, n. 1, p. 1-6, 2010.

TILLMANN, H. L. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus Infection. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 13, n. 1, p. 125-140, jan., 2007.

TOLEDO JR, A. C. et al. Seroprevalence of hepatitis B and C in Brazilian army conscripts in 2002: a cross-sectional study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, n. 5, p. 374-383, out., 2005.

- TONG, S. P. et al. In vitro replication competence of a cloned hepatitis B virus variant with a nonsense mutation in the distal pre-C region. **Virology**, v. 181, n. 2, p. 733-737, 1991.
- TORRES, J. Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America. **Gut**, London, v. 38, Suppl. 2, p. S48-S55, jan. 1996.
- TREHANPATI, N. et al. Gene expression signatures of peripheral CD4+ T cells clearly discriminate between patients with acute and chronic hepatitis B infection. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 781-790, 2009.
- TUNÇBILEK, S. Relationship between cytokine gene polymorphisms and chronic hepatitis B virus infection. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 20, p. 6226, 2014.
- VAZ, A. J; TAKEI, K; BUENO, E. C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 372 p.
- VAN BÖMMEL, F. et al. Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. **Hepatology**, Thorofare, v. 51, n. 1, p. 73-80, 2010.
- VILLENEUVE, J. P. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 34, Suppl. 1, p. S139-S142, dez. 2005.
- VOMASKE, J. et al. Cytomegalovirus CC chemokine promotes immune cell migration. **Journal of virology**, v. 86, n. 21, p. 11833-11844, 2012.
- YAN, H. et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. **Elife**, v. 1, p. e00049, 2012.
- YANG, J. et al. Identification of Hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing. **Journal of general virology**, v. 87, n. 8, p. 2203-2215, 2006.
- YANG, B. et al. Peripheral NK and NKT cell in pediatric subjects with chronic HBV infection. **Chinese journal of experimental and clinical virology**, v. 23, n. 1, p. 59-61, 2009.
- YANO, Y.; AZUMA, T.; HAYASHI, Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 3, p. 583-592, mar., 2015
- YIM, H. J.; LOK, A. S. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. **Hepatology**, v. 43, n. S1, 2006.
- YOU, J. et al. Peripheral T-Lymphocyte subpopulations in diferente clinical stages of chronic HBV Infection Correlate with HBV Load. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 15, n. 27, p. 3382-2293, jul., 2009.
- YU, H. et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". **PLoS One**, San Francisco, v. 5, p. e9297, fev., 2010.

YUEN, M.; LAI, C. Hepatitis B virus genotypes: natural history and implications for treatment. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 1, n. 2, p. 321-328, 2007.

YUEN, M. F.; LAI, C. L. Treatment of chronic hepatitis B: Evolution over two decades. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 26, n. 1, p. 138-143, jan., 2011.

WALD, O. et al. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. **Cytokine**, v. 39, n. 1, p. 50-62, 2007.

WANG, G. H.; SEEGER, C. Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 67, n. 11, p. 6507-6512, nov., 1993.

WANG, S. et al. Genetic variation and population structure in native Americans. **PLoS Genet**, v. 3, n. 11, p. e185, 2007.

WASMUTH, H.; TACKE, F.; TRAUTWEIN, C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. **Seminar Liver Disease**, v. 30, n. 3, p. 215–225, 2010.

WIEGAND, J.; HASENCLEVER, D.; TILLMANN, H. L. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. **Antiviral therapy**, v. 13, n. 2, p. 211, 2008.

WERLE, B. et al. Evolution of hepatitis B viral load and viral genome sequence during adefovir dipivoxil therapy. **Journal of viral hepatitis**, v. 11, n. 1, p. 74-83, 2004.

WU, L. et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 9, p. 1681-1692, 1997.

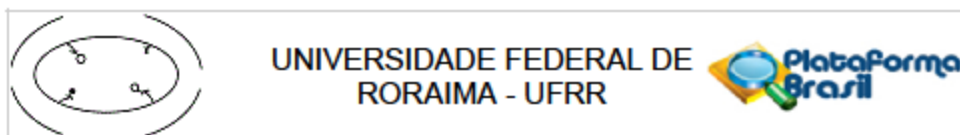
ZATTI, C. A. et al. Hepatite B: Conhecendo a Realidade Brasileira. **Brazilian Journal of Clinical Research–BJSCR**, v. 4, n. 1, p. 05-11, set./nov., 2013.

ZENG, Z. Human genes involved in hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 24, p. 7696-7706, 2014.

ZINKERNAGEL, R. M. Immunology taught by viruses. **Science**, v. 271, n. 5246, p. 173, 1996.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da UFRR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL MOLECULAR E FILOGENÉTICO DO VÍRUS DA HEPATITE B E A ANÁLISE DE FATORES IMUNOGENÉTICOS RELACIONADOS A INFECÇÃO

Pesquisador: Fabiana Granja

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 46591915.9.0000.5302

Instituição Proponente: Universidade Federal de Roraima - UFR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.134.388

Data da Relatoria: 01/07/2015

Apresentação do Projeto:

O Protocolo de pesquisa é um estudo que deve identificar a variabilidade genética dos vírus HBV circulantes no estado, vírus da Hepatite B, definindo genótipos, e como eles se relacionam filogeneticamente com os HBVs de outras regiões. Esta deve encontrar possíveis relações entre genótipo e desenvolvimento clínico dos pacientes, como também, relacionar

possíveis perfis de resistência ao tratamento e mutações que possam influenciar na resposta imune à infecção viral. Os resultados podem contribuir para uma melhor vigilância epidemiológica molecular/imunológica e permitir ações e medidas que melhorem a assistência aos pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a epidemiologia molecular dos vírus da Hepatite B circulantes e a relação do polimorfismo do gene CCR5 na infecção e progressão da doença em pacientes, no Estado de Roraima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sobre riscos, os sujeitos da pesquisa não serão de grupos vulneráveis, porém, estarão expostos a um baixo risco, relacionado ao procedimento de punção venosa para coleta de sangue, em que pode haver um leve desconforto durante a sua realização ou durante o questionário, onde os sujeitos poderão se sentir constrangidos, ficando a vontade para responder ou não as perguntas.

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.304-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br

Anexo B - Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Pesquisa: Perfil Molecular e Filogenético do vírus da hepatite B e análise dos fatores imunogenéticos relacionados à infecção pelo HBV

Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido pelas pesquisadoras Fabiana Granja e Débora Dinelly de Sousa, em relação a minha participação no projeto de pesquisa intitulado “Perfil Molecular e Filogenético do vírus da hepatite B e análise dos fatores imunogenéticos relacionados à infecção pelo HBV”, estou ciente que o estudo deverá esclarecer questões sobre a doença, tais como: (1) quem são as pessoas que estão adoecendo, quando adoeceram e em que local; (2) Como as pessoas estão se contaminando, ou seja, pegando a doença; (3) Determinar qual o tipo de vírus da hepatite B está causando a doença no Estado de Roraima; (4) Correlacionar o tipo de vírus da hepatite B com as principais variáveis clínicas e laboratoriais da doença, assim como a resposta dos indivíduos ao tratamento. Permito à pesquisadora fazer perguntas sobre as condições que vivo e sobre alguns hábitos e comportamentos. Permito que seja coletado sangue da veia, usando agulha e tudo de coleta (material descartável), perfurando-se a pele até alcançar a veia do braço, a fim de colher 5 ml de sangue. Este procedimento pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). Permito que a pesquisadora pesquise em meu prontuário médico dados relativos a resultados de exames clínicos, sorológicos, laboratoriais, de biópsia hepática e tratamento. Estou ciente que o resultado da Genotipagem (tipo de vírus B) será disponibilizado para o médico que me acompanha. O resultado não será passado para outras pessoas e meu nome também não será revelado. Estou ciente e autorizo a realização dos procedimentos acima citados e a utilização dos dados originados destes procedimentos para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras contanto que sejam mantidas em sigilo informações relacionadas à minha privacidade, bem como garantido meu direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de dúvidas acerca dos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, além de que se cumpra a legislação em caso de dano. É possível retirar o meu consentimento a qualquer hora e deixar de participar do estudo sem que isso traga qualquer prejuízo à minha pessoa. Desta forma, concordo voluntariamente e dou meu consentimento, sem ter sido submetido a qualquer tipo de pressão ou coação. Caso eu não queira participar ou se quiser desistir em qualquer momento, isso não vai implicar em nenhum prejuízo de qualquer natureza para minha pessoa ou de meus familiares. Eu concordo em participar deste estudo, assinando esse termo em duas vias, ficando uma cópia comigo.

Eu, _____, após ter lido e entendido as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo com Débora Dinelly de Sousa e a Profa. Dr^a Fabiana Granja, CONCORDO VOLUNTARIAMENTE, participar do mesmo.

Boa Vista/RR, ____/____/_____

Nome e assinatura (do pesquisado ou responsável) ou impressão datiloscópica

Anexo C - Modelo do questionário de abordagem aos pacientes HBV do estudo

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO VÍRUS DA HEPATITE B NO ESTADO DE RORAIMA QUESTIONÁRIO		
DADOS DO INDIVÍDUO		
1. Data da Coleta ____/____/____	2. Número do indivíduo para a coleta de sangue (Colar etiqueta) <input style="width: 150px; height: 20px;" type="text"/>	3. Data da entrevista ____/____/____
4. Nome do Indivíduo _____		4. Sexo 1. Masculino 2. Feminino
5. Qual a sua idade? <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> anos	6. Qual a data do seu nascimento? ____/____/____	7. Qual seu estado civil? 1. Solteiro 2. Casado 3. Amigado 4. Divorciado 5. Viúvo
8. Escolaridade 0. Analfabeto 1. 1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2. 4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3. 5ª à 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4. Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5. Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6. Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7. Educação superior incompleta 8. Educação superior completa 9. Ignorado 10. Não se aplica	9. Qual sua Profissão? _____	11. Qual cidade de Nascimento? _____
	10. Raça/cor 1. Branca 2. Preta 3. Amarela 4. Parda 5. Indígena	12. Qual cidade onde reside? _____ Quanto _____ tempo?
DADOS DE RESIDÊNCIA		
13. Rua: _____ 14. Nº: _____ 15. Bairro: _____ 16. Cidade: _____ 17. CEP: _____ 18. Telefone _____		19. Zona 1. Urbana 2. Rural 3. Periurbana
HISTÓRICO DE CONTATO		
20. O indivíduo foi submetido ou exposto a		
1. Sim 2. Não Obs: Se sim <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>har o ano.		
<input type="checkbox"/> Medicamentos Injetáveis Ano: _____ <input type="checkbox"/> Drogas inaláveis ou Crack Ano: _____ <input type="checkbox"/> Drogas injetáveis Ano: _____ <input type="checkbox"/> Relação Sexual sem camisinha Ano: _____ <input type="checkbox"/> Transplante Ano: _____ <input type="checkbox"/> Tatuagem/Piercing Ano: _____ <input type="checkbox"/> Acupuntura Ano: _____	<input type="checkbox"/> Hemodiálise Ano: _____ <input type="checkbox"/> Acidente com Material Biológico Ano: _____ <input type="checkbox"/> Transfusão de sangue /derivados Ano: _____ <input type="checkbox"/> Tratamento Cirúrgico Ano: _____ <input type="checkbox"/> Tratamento Dentário Ano: _____ <input type="checkbox"/> Compartilhamento de escova de dente/Lâmina de bar/Material de Manicure/Pedicure Ano: _____	
HISTORICO DE CONTATO		

<p>21. Quantos parceiros(as) sexuais você teve nos últimos 12 meses?</p> <p><input type="text"/> <input type="text"/></p>	<p>22. Você sabe se algum de seus (suas) parceiros (as) teve alguma doença venérea?</p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não</p> <p>8. Não informou</p> <p>9. Não se aplica</p>	<p>23. Você já teve relações sexuais com parceiro (a) sabidamente portador de Hepatite? <input type="checkbox"/></p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não</p> <p>8. Não informou</p> <p>9. Não se aplica</p>	<p>24. Você já teve alguma doença venérea (sífilis, gonorréia) ?</p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não</p> <p>8. Não informou</p> <p>9. Não se aplica</p>								
<p>25. Com que frequência você geralmente toma cerveja, vinho, pinga ou qualquer outro tipo de bebida alcoólica?</p> <p>1. Todos os dias</p> <p>2. Quase todos os dias</p> <p>3. 3 a 4 dias por semana</p> <p>4. 1 a 2 dias por semana</p> <p>5. 2 a 3 dias por mês</p> <p>6. uma vez por mês</p> <p>7. Menos de uma vez por mês</p> <p>8. Refere ter parado de beber; Quanto tempo <input type="text"/></p> <p>9. Nunca bebeu <input type="checkbox"/></p>		<p>26. Tomou vacina para Hepatite B</p> <p>1. Completa</p> <p>2. Incompleta</p> <p>3. Não vacinado</p> <p>4. Desconhece sua situação vacinal</p> <p>5. Desconhece sobre existência da vacina</p> <p>OBS: Tem Cartão de Vacina? <input type="text"/></p>									
<p>DADOS DA DOENÇA (HEPATITE B)</p>											
<p>38. Como e quando ficou sabendo que estava infectado pelo vírus B?</p> <p>1. Apresentou sintomas e procurou o serviço de saúde</p> <p>2. Banco de Sangue</p> <p>3. Triagem Sorológica</p> <p>4. Campanha</p> <p>5. Outro <input type="text"/></p> <p>Ano: <input type="text"/></p>	<p>39. Que sintomas apresentou?</p> <p>1. Sim 2. Não</p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Assintomático</td> <td><input type="checkbox"/> Ascite</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Astenia</td> <td><input type="checkbox"/> Dor no Hipocôndrio</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Icterícia</td> <td><input type="checkbox"/> Encefalopatia</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Hemorragia digestiva</td> <td></td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> Assintomático	<input type="checkbox"/> Ascite	<input type="checkbox"/> Astenia	<input type="checkbox"/> Dor no Hipocôndrio	<input type="checkbox"/> Icterícia	<input type="checkbox"/> Encefalopatia	<input type="checkbox"/> Hemorragia digestiva		<p>40. Possui contato com portadores de Hepatite B ? 1. Sim 2. Não Obs: Se sim, informar quantos</p> <p><input type="checkbox"/> Sexual Nº <input type="text"/></p> <p><input type="checkbox"/> Não Sexual (Domiciliar) Nº <input type="text"/></p> <p><input type="checkbox"/> Ocupacional Nº <input type="text"/></p>
<input type="checkbox"/> Assintomático	<input type="checkbox"/> Ascite										
<input type="checkbox"/> Astenia	<input type="checkbox"/> Dor no Hipocôndrio										
<input type="checkbox"/> Icterícia	<input type="checkbox"/> Encefalopatia										
<input type="checkbox"/> Hemorragia digestiva											
<p>41. Trata ou já tratou de Hepatite B?</p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>38. Exame Físico (Do Prontuário)</p> <p>Peso: <input type="text"/></p> <p>Altura: <input type="text"/></p>	<p>42. Uso de Medicamentos 1. Sim 2. Não (Dados do Prontuário)</p> <p><input type="checkbox"/> Interferon-alfa. Período: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> a <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/></p> <p><input type="checkbox"/> Interferon-alfa peguilado. Período: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> a <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/></p> <p><input type="checkbox"/> Lamivudina. Período: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> a <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/></p> <p><input type="checkbox"/> Tenofovir. Período: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> a <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/></p> <p><input type="checkbox"/> Entecavir. Período: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> a <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/></p> <p><input type="checkbox"/> Adefovir. Período: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> a <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/></p>										

<p>43. Presença de? 1. Sim 2. Não (Dados do Prontuário)</p> <p><input type="checkbox"/> Ascite</p> <p><input type="checkbox"/> Varizes esôfago na endoscopia</p> <p><input type="checkbox"/> Aranhas vasculares</p> <p><input type="checkbox"/> Encefalopatia hepática</p>	<p>44. Realizou Biópsia Hepática?</p> <p>1. Sim 2. Não</p> <p>Data: ____/____/____</p>	<p>45. Resultado da Biópsia Hepática (Anexar Cópia)</p> <p>Grau Alteração estrutura: _____</p> <p>Grau Infiltrado inflamatório portal-septal: _____</p> <p>Grau Atividade periportal: _____</p> <p>Grau atividade parenquimatosa: _____</p>
--	--	---

EXAMES LABORATORIAIS (DADOS DO PRONTUÁRIO)

Data					
Hb					
VCM					
Leucócitos					
Plaquetas					
RNI					
AST (TGO)					
ALT (TGP)					
BT/BD					
FA					
GGT					
Creatinina					
Albumina					
Alfa-feto					

EXAMES LABORATORIAIS (DADOS DO PRONTUÁRIO)

Data					
HBsAg					
Anti-HBs					
Anti-HBc IcM					
Anti-HBc IcC					
AgHBe					
Anti-HCV					
RNA VHC					
Anti-HIV					
Genótipo HBV					
PCR quanti VHB					

ANEXO D – Protocolo de purificação da reação de sequenciamento - EtOH/EDTA/Acetato de Sódio. – Bula Kit BigDye® v3.1 - Applied Biosystem™, USA

Para precipitar reações de 10uL em placas com 96 poços:

1. Remova a placa do termociclador e centrifugue 1 min 2000 RCF;
2. Adicionar 1µL de EDTA 125mM a cada um dos poços;

Nota: tenha certeza que o EDTA foi adicionado no fundo dos poços.

3. Adicionar 1µL de acetato de sódio 3M (pH 5,2) a cada um dos poços;

Nota: tenha certeza que o acetato foi adicionado no fundo dos poços.

4. Adicionar 25µL de EtOH 100% gelado, a cada um dos poços;
5. Sele a placa com *strips* e misture por inversão (4x);
6. Incube por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz;
7. Centrifugue a 2.000 RCF por 45 minutos;

Importante: o próximo passo deve ser feito imediatamente. Se isto não for possível, então faça um spin na placa por mais 2 minutos antes de recomeçar

8. Inverta a placa e faça um *spin* até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Obs: Antes de inverter a placa, desprezei o conteúdo da mesma na pia junto com uma leve batida na mesa. Após esta centrifugação, programá-la para a temperatura de 4°C

9. Adicione 35µL de EtOH a 70% em cada um dos poços;
10. Centrifugue por 15 minutos, à 4°C e 1.650 RCF;

Obs: Caso tenha esquecido a programação para 4°C, acione o FAST temperatura

11. Inverta a placa e faça um *spin* até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Nota: comece a contar o tempo assim que o rotor começar a se mover.

12. Incube a placa à 52°C por 15 minutos, cobrir com papel alumínio (termociclador)
13. Se não for colocar no sequenciador imediatamente, congelar a placa seca ao abrigo da luz;
14. No momento de sequenciar ressuspender com 10 uL de formamida Hi-Di, lavando as paredes dos poços;
15. Aqueça a placa 95°C por 1 minuto, monte e coloque no sequenciador.¹
