

PRISCILA APARECIDA TONETTO

**ANÁLISE MOLECULAR DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS
DA HEPATITE B EM PACIENTES DO ESTADO
DE SÃO PAULO, SUDESTE DO BRASIL**

CAMPINAS

2006

PRISCILA APARECIDA TONETTO

**ANÁLISE MOLECULAR DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS
DA HEPATITE B EM PACIENTES DO ESTADO
DE SÃO PAULO, SUDESTE DO BRASIL**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica, área de concentração em Ciências
Básicas.*

ORIENTADOR: *PROF. DR. FERNANDO LOPES GONÇALES JÚNIOR*

CO-ORIENTADOR: *DRA. NEIVA SELLAN LOPES GONÇALES*

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

T612a	Tonetto, Priscila Aparecida Análise molecular dos genótipos do vírus da Hepatite B em pacientes do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil / Priscilla Aparecida Tonetto. Campinas, SP : [s.n.], 2006. Orientadores : Fernando Lopes Gonçalves Júnior, Neiva Sellan Lopes Gonçalves Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Genótipo. 2. Hepatite B. 3. Genotipagem. I. Gonçalves Júnior, Fernando Lopes. II. Gonçalves, Neiva Sellan Lopes. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Título em inglês : Molecular analysis of the genotypes of hepatitis B virus (HBV) in patients in state of São Paulo, southeast of Brazil

Keywords: • Genotype
• Hepatitis B
• Genotyping

Área de concentração : Clínica Médica

Titulação: Mestrado em Ciências Básicas

**Banca examinadora: Prof Dr Fernando Lopes Gonçalves Júnior
Prof Dr Roberto Focaccia
Profa. Dra. Mariângela Ribeiro Resende**

Data da defesa: 22-08-2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: PROF. DR. FERNANDO LOPES GONÇALES JÚNIOR

MEMBROS:

1- Prof Dr Fernando Lopes Gonçales Júnior

2- Prof Dr Roberto Focaccia

3- Profa. Dra. Mariângela Ribeiro Resende

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/08/2006

DEDICATÓRIA

*A meus Pais, Luis e Cidinha, sempre atentos,
primeiros mestres da minha formação humana, por
seu amor, carinho e principalmente pelo incentivo
que sempre me deram em toda minha vida.*

Ao meu namorado, pela paciência e compreensão.

Ao meu único irmão, Luis Cesar.

Ao Prof. Dr. Fernando, pela orientação durante a realização deste trabalho, que contribuiu muito para minha formação profissional.

À Dra Neiva, pela orientação e por ter me acolhido para este trabalho, minha gratidão.

À bióloga e minha amiga Viviane, que me ensinou as bases e me salvou em momentos difíceis e principalmente muito obrigada pela amizade que nos une.

À Dra. Dulcinéia e à Ângela, do Hemocentro, que sempre me ajudaram em minhas intermináveis dúvidas...

À minha amiga Denise, que me mostrou que tudo pode ser mudado.... Muito obrigada pela amizade que nos une.

À enfermeira Maria Silvia, pela realização da coleta das amostras analisadas neste trabalho e pela amizade.

À Dra Maria Helena e Dra Aline, pela colaboração na seleção dos pacientes.

À Ruthinha, minha companheira de todas as horas difíceis.

À secretária Gláucia, pela disponibilidade e colaboração.

Aos profissionais do Laboratório de AIDS e do Laboratório Central do HC-Unicamp das Seções de Bioquímica e Imunologia, pela realização dos testes sorológicos.

Aos pacientes, sem os quais este trabalho seria impossível.

A meus verdadeiros amigos que hoje se alegram com meus logros.

*Todos nós somos doidos, mas ninguém tem
o direito de impor aos outros a sua loucura.*

GEORG BUCHNE

PROJETO FINANCIADO PELA FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), ATRAVÉS DO PROJETO DE PESQUISA TEMÁTICO REDE DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE VÍRUS (VGDN).

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xv</i>
ABSTRACT.....	<i>xvii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	19
1.1- Descoberta do vírus da hepatite B.....	20
1.2- Epidemiologia.....	20
1.3- História natural.....	22
1.4- Estrutura do VHB.....	24
1.5- Marcadores sorológicos do VHB.....	28
1.6- Replicação do VHB.....	30
1.7- Genótipos do VHB.....	31
2- OBJETIVOS.....	36
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	38
3.1- Casuística.....	39
3.1.1- Seleção dos pacientes.....	39
3.1.2- Critérios de inclusão.....	39
3.1.3- Critérios de exclusão.....	39

3.1.4- Biópsia hepática.....	39
3.2- Métodos.....	40
3.2.1- Avaliação clínico - epidemiológica.....	40
3.2.2- Análise sorológica.....	41
3.2.3- Análise bioquímica.....	41
3.2.4- PCR “in house” segundo técnica de Kaneko et al. (1989) modificada.....	41
3.2.5- PCR quantitativo.....	44
3.2.6- Reação de sequenciamento.....	45
3.3- Análise estatística.....	47
4- RESULTADOS.....	48
5- DISCUSSÃO.....	59
6- CONCLUSÃO.....	67
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8- ANEXOS.....	83
8.1- Anexo 1.....	84
8.2- Anexo 2.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

μl	Microlitros
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT	Alanina aminotransferase
anti-HBc	Anticorpo contra o HBcAg
anti-HBe	Anticorpo contra o HBeAg
anti-HBs	Anticorpo contra HBsAg
anti-HCV	Anticorpo contra VHC
anti-HIV	Anticorpo contra HIV
Asn	Aspartagina
BCP	Promotor básico do Core
ccc-DNA	Covalente Circular DNA
CTL	Linfócito T Citotóxico
CV	Carga viral
ddNTP	Didesoxinucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo
<i>et al.</i>	e colaboradores

FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GEHEP	Grupo de Estudos da Hepatites
HBcAg	Antígeno do nucleocapsídeo do vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno “e” do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HC	Hospital Central
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCl	Ácido clórico
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HVB	Hepatite por vírus B
Leu	Leucina
LSN	Limite superior da normalidade
MEIA	Ensaio Imuno Enzimático em Micropartículas
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MI	Disciplina de Moléstias Infecciosas
ml	mililitros
NaOH	Hidróxido de sódio
nt	Nucleotídeo

pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	picomole
RNA	Ácido ribonucléico
TBE	Tampão Borato-EDTA
TGP	Transaminase glutâmico piruvicas
Thr	Treonina
UI	Unidades Internacionais
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
YMDD	Seqüência de aminoácidos tirosina, metionina, ácido aspártico e ácido aspártico

	<i>Pág.</i>
Tabela 1- Características demográficas, epidemiológicas, clínicas e virológicas dos pacientes HBsAg positivos (n=139).....	51
Tabela 2- Características dos pacientes HBsAg positivos de acordo com a positividade ou não do HBeAg (n=139).....	53
Tabela 3- Resultados das biópsias hepáticas em pacientes com infecção pelo VHB.....	54
Tabela 4- Estádio de fibrose média nos grupos HBeAg (+) e HBeAg (-), de acordo com o genótipo do VHB (n=65).....	56
Tabela 5- Distribuição dos subtipos entre os genótipos (n=139).....	57
Tabela 6- Distribuição mundial dos subtipos.....	65

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Distribuição mundial da infecção crônica por HBV.....	21
Figura 2- Fases evolutivas nas infecções crônicas pelo VHB (Yim e Lok, 2006).....	23
Figura 3- Representação esquemática dos componentes do HBV (Summers e Mason, 1982).....	26
Figura 4- Representação esquemática dos componentes do VHB e seus antígenos associados (Adaptado de Wei et al, 1994).....	27
Figura 5- Replicação do VHB.....	31
Figura 6- Estrutura secundária do pré-genoma do VHB (Chan et al., 1999).....	34
Figura 7- Gel de agarose 1,8%.....	43
Figura 8- Eletroferograma da sequência de DNA de um paciente.....	47
Figura 9- Distribuição dos genótipos do VHB em pacientes atendidos pelo GEHEP (n=139). $P \leq 0,05$ = significativo.....	50
Figura 10- Estádio fibrose média de acordo com os genótipos do VHB.....	55
Figura 11- Carga viral média dos pacientes HBeAg positivo e HBeAg negativo (p-valor $<0,0001$).....	58



RESUMO

O vírus da hepatite B (VHB) pode ser classificado em oito principais genótipos (A-H), e essa classificação tem uma distribuição geográfica determinada. Os genótipos do VHB podem influenciar na progressão de doença. O objetivo foi determinar os genótipos e os subtipos do VHB e correlacioná-los com as variáveis clínicas epidemiológicas, laboratoriais e histológicas. Foram determinados os genótipos de 139 amostras de soro de pacientes infectados pelo VHB, coletadas em Campinas, no estado de São Paulo, Brasil. O método para genotipagem utilizado foi o seqüenciamento parcial do gene S do VHB. Os primers utilizados foram desenhados a partir de seqüências do gene S, com genótipo determinado, depositadas no GenBank. Todas as seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências depositadas no GenBank para determinação dos genótipos. O genótipo A (55%) do VHB foi o mais predominante na população, seguido pelos genótipos C (3%), D (38%) e F (4%). Entre os pacientes infectados pelos genótipos A e D, observou-se uma provável descendência africana de 18% (14/76) e 11% (6/53), respectivamente. Entre os quatro pacientes infectados pelo genótipo C, dois possuíam descendência asiática e dois eram caucasianos. Todos os pacientes infectados pelo genótipo F eram caucasianos sem ascendência indígena relatada. Aproximadamente 30% dos pacientes eram HBeAg positivo e 70% eram HBeAg negativo. A carga viral do DNA-VHB foi aproximadamente cinco vezes mais alta entre os HBeAg positivo quando comparada aos HBeAg negativo. Os genótipos A e D são os mais prevalentes entre os pacientes, aparentemente em virtude da imigração européia em nossa região.



ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) can be classified into eight major genotypes (A-H) that have mainly a geographic distribution. The HBV genotype may influence disease progression. Our objective was to determine the genotypes and the subtypes of HBV and to correlate them with the with variables clinical epidemiologies, laboratories and histological. Hepatitis B virus genotypes were determined in 139 plasma samples collected in Campinas, in the state of São Paulo, Brazil from HBV-infected patients. A method for genotyping hepatitis B virus by partial HBsAg gene sequencing with primers common to all known genotypes was developed. The results of sequencing corresponded to those found in HBV isolates obtained from GenBank, including all of the known HBV genotypes. HBV genotype A was predominant in our sample, appearing in 76 patients (55%), while genotypes C, D and F was found in 4 (3%), 53 (38%) and 6 (4%) of the patients, respectively. Among the patients infected by genotypes A and D, were observed a probably African descendents of the 18.3% (14/76) and 11.3% (6/53), respectively. Among the genotype C infected patients, 2 (50%) were of Asian descendents and 2 were Caucasians. The genotype F infected patients were all Caucasians without told indigenous origin. About 30% of the patients were HBeAg positive and 70% were HBeAg negative. The viral load of HBV-DNA was about 5 times higher among HBeAg positive than in HBeAg-negative patients. Genotypes A and D were the most prevalent among our HBV-infected patients, apparently a consequence of the types of immigration to our region.



1- INTRODUÇÃO

1.1- Descoberta do vírus da hepatite B

A existência de uma forma de hepatite de transmissão parenteral foi documentada pela primeira vez em 1885 em pacientes vacinados contra varíola.

O termo hepatite B foi introduzido em 1947 para definir a hepatite de transmissão parenteral, hepatites soro-homóloga, hepatite sérica, hepatite MS-2 e hepatite de longo período de incubação (Maccallum, 1947). Em 1965 foi publicada a descoberta de um antígeno no soro de um aborígine australiano, denominado antígeno Austrália (Blumberg et al., 1965). A associação desse antígeno com a hepatite B foi feita em 1968, recebendo o mesmo o nome de antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) (Prince et al., 1968), nome que perdura até hoje.

A partícula viral íntegra do vírus da hepatite B (VHB) foi visualizada pela primeira vez em 1970 (Dane et al., 1970). Em 1972, foi descrito o antígeno HBeAg, como o marcador sorológico de replicação viral (Magnius et al., 1972). Em 1988 foi identificada a sequência completa de nucleotídeos do genoma do VHB, clonado a partir do soro de um chimpanzé infectado (Vaudin et al., 1988).

Nesta época, a caracterização do VHB e de seus antígenos e anticorpos associados foi praticamente completada. Isto possibilitou estabelecer perfis sorológicos da infecção pelo VHB, bem como permitiu diferenciar casos de hepatites produzidas pelo vírus da hepatite A (VHA), que em 1973 foi isolado das fezes de doentes infectados (Feinstone et al., 1982; Hollinger, 1996).

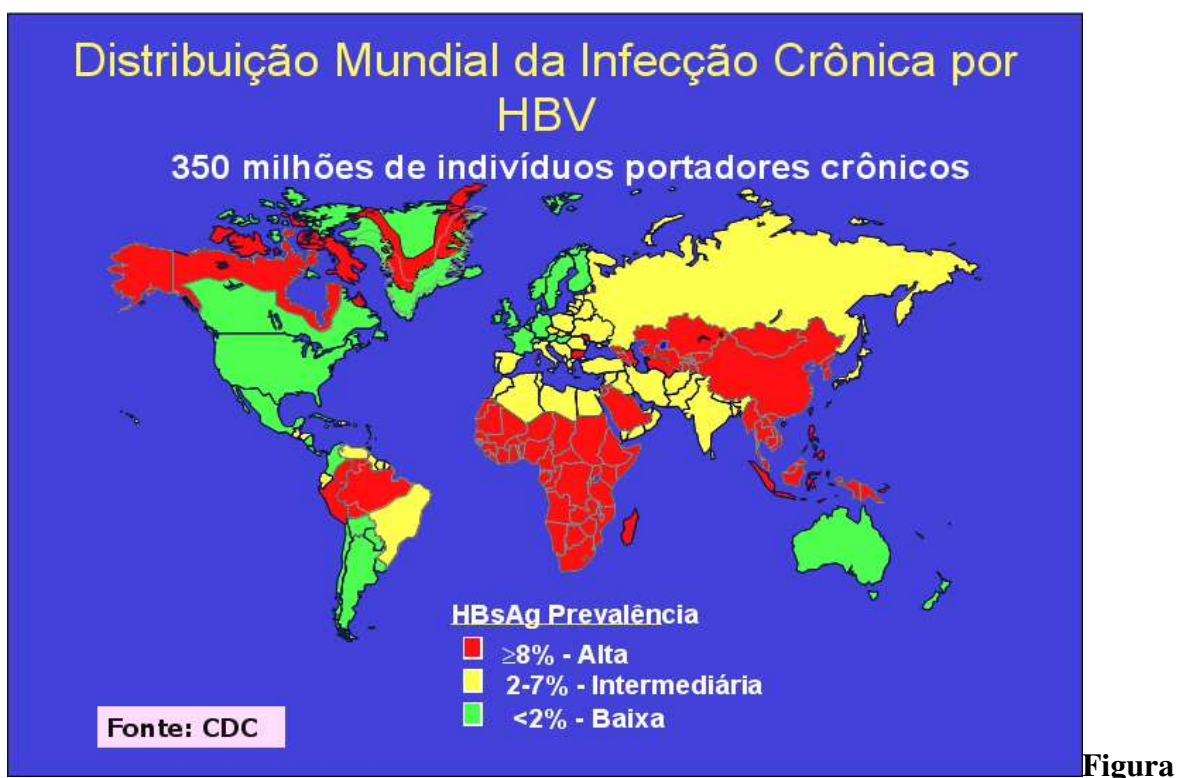
1.2- Epidemiologia

Apesar dos significantes progressos no desenvolvimento de vacinas, a infecção pelo VHB ainda é uma das mais disseminadas e importantes doenças infecciosas que afetam o ser humano (Clarke et al., 2002; Kao, 2002).

Ocorrem cerca de 1-2 milhões de mortes por ano como consequência direta desta infecção (Clarke et al., 2002). Nos Estados Unidos há aproximadamente um milhão de portadores do HBV (Hollinger, 1996).

Além da América do Norte, a Europa Ocidental, a Austrália e a região Sul da América Latina são consideradas áreas de baixa prevalência para o HBV (menor que 2%). Prevalências intermediárias (2-7%) são observadas no Leste Europeu, Ásia Central, Japão, Israel e ex-União Soviética, e prevalências altas (8-15%) são encontradas no Sudeste Asiático, China, Filipinas, África, Bacia Amazônica e Oriente Médio (CDC), como se pode observar na **Figura 1**.

Mais de 2 bilhões de pessoas tiveram contato com o VHB (Schaefer, 2005; Zuckerman e Zuckerman, 2000) e mais de 350 milhões são os portadores crônicos (Schaefer, 2005; Zuckerman e Zuckerman, 2000; Sitnik et al., 2004; Lee 1997; Teles et al., 1999).



1- Distribuição mundial da infecção crônica por HBV

1.3- História natural

Cerca de 6% dos indivíduos infectados após os 5 anos de idade desenvolverão infecção crônica (transmissão horizontal), e cerca de 90% dos recém-nascidos infectados no período pré-natal ou antes dos 5 anos de idade desenvolverão infecção crônica pelo VHB (transmissão vertical) (Yim e Lok, 2006).

A HVB pode se apresentar sob diferentes formas: clínico-patológica e evolutiva. Resumidamente, são elas: as hepatites agudas benignas, as hepatites agudas graves e as hepatites crônicas (Gonçales Junior, 1998; Liberato et al., 2002; Gonçalves Junior 2003b).

As hepatites agudas benignas podem ser: assintomáticas, anictéricas, ictericas, recorrentes, recrudescentes, colestatias ou prolongadas. As hepatites agudas graves podem ser fulminantes ou subagudas (Gonçales Junior, 1998; 2003b).

A recuperação da hepatite aguda é dependente da resposta das células B que produzem anticorpos contra os antígenos das regiões pré-S e S, bem como das células T. Assim, pacientes com infecção aguda autolimitada pelo VHB exibem uma vigorosa resposta policlonal HLA classe I restrita dos linfócitos T citotóxicos (CTL) contra múltiplos epítomos presentes nas regiões do envelope, do nucleocapsídeo e da polimerase viral. Esta resposta é mantida por décadas após a recuperação da infecção pelo VHB.

A resposta T citotóxica (CTL) é mantida por fragmentos residuais do VHB que podem ser detectados no fígado e nos linfócitos do sangue periférico, indicando que a completa eliminação deste vírus é raramente observada, menos nos pacientes considerados curados. Quando a resposta dos linfócitos T citotóxicos é fraca e limitada a poucos epítomos, a infecção pode se tornar crônica (Hollinger et al., 1996; Gonçalves Junior, 2003a). Nestes pacientes a resposta das células T-helper CD4+ também se mostra fraca (Gonçales Junior, 2003a).

Nas infecções crônicas pelo VHB existem diferentes fases evolutivas como se pode observar na **Figura 2**. Na primeira fase denominada de imunotolerância pode-se observar a presença do antígeno HBe (HBeAg), altos níveis de DNA-VHB, ALT normal e

moderado dano hepático. Essa fase pode durar de 15 a 35 anos em pacientes infectados verticalmente. Na segunda fase denominada Imuno Eliminação ou Hepatite Crônica HBeAg positiva verifica-se a presença do HBeAg, flutuações nos níveis de ALT e DNA-VHB e atividade inflamatória. Na terceira fase denominada de Portador Inativo observa-se a presença do anticorpo contra o antígeno “e” (anti-HBeAg), níveis de DNA-VHB indetectáveis e ALT normal. Essa fase pode persistir por período indeterminado na vida do paciente. Na quarta fase denominada Reativação da replicação ou Hepatite Crônica HBeAg negativa, pode-se notar a presença do anti-HBe, altos níveis de DNA-VHB e ALT. Nesta fase é que podem ocorrer as mutações na região pré-core e core promoter basal (Yim e Lok, 2006).

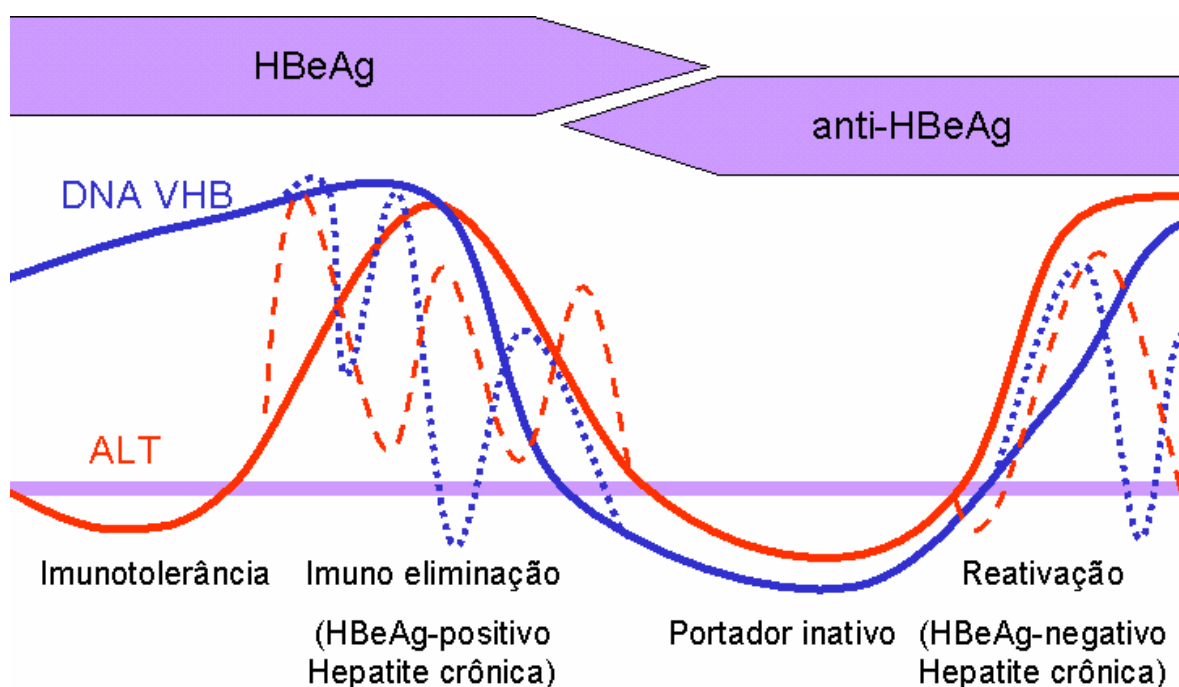


Figura 2- Fases evolutivas nas infecções crônicas pelo VHB (Yim e Lok, 2006).

O espectro variável de manifestações clínicas e a persistência da infecção pelo VHB dependem de vários fatores ligados ao hospedeiro e ao vírus como: integridade do sistema imune, idade do paciente na época da infecção pelo VHB, sexo, presença ou não de replicação viral e provavelmente da variabilidade genética do vírus, incluindo genótipos e mutações que influenciam na expressão dos antígenos virais (Fattovich et al., 1991).

1.4- Estrutura do VHB

O vírus da Hepatite B pertence ao gênero *Orthohepadnavirus* (Norder et al., 2004) família *Hepadnaviridae* (Gonçales Junior, 1998; Hollinger et al., 1996; Norder et al., 2004; Stuyver et al., 2000) em função da presença de DNA de fita dupla (incompleta), como material genético (Liberato et al., 2002). O VHB juntamente com outros vírus, muito semelhantes a ele, encontrados em patos da China, esquilos, marmotas completam a família *Hepadnaviridae* (Summers et al., 1978; Focaccia e Andrade, 1995). Tendo somente 3.200 pares de bases em seu genoma, o VHB é o menor vírus DNA conhecido (Kao, 2002).

Na microscopia eletrônica, encontram-se três tipos de partículas (Tiollais et al., 1985; Hollinger et al., 1996; Liberato et al., 2002). A partícula de Dane, que corresponde ao vírion completo, com 42nm de diâmetro, constituída por um envoltório lipídico que contém o antígeno de superfície do VHB (HBsAg) e um núcleo central denso (o core) que possui uma proteína (HBcAg) que induz a formação de anticorpos específicos (anti-HBcAg) pelos indivíduos infectados. O antígeno do core (HBcAg) não é secretado, por isso é muito difícil sua detecção no sangue circulante, diferentemente do que ocorre no fígado doente, onde é abundante. Na zona central da partícula de Dane, observa-se, ainda, a presença do ácido nucléico viral (DNA-VHB). Este DNA, que forma a matriz genética do vírus, possui uma dupla cadeia, disposta circularmente. No genoma ainda se encontram as enzimas como a DNA-polimerase e a fosfoquinase (Gonçales Junior, 1998).

Na parte central do vírus está presente, também, um outro antígeno que foi denominado antígeno e (HBeAg), que é secretado e diferentemente do HBcAg pode ser facilmente detectado no sangue. Este antígeno se associa à replicação e infectividade virais e induz a formação de anticorpo específico (anti-HBeAg) que normalmente se relaciona com a parada da replicação viral (Gonçales Junior, 1998).

Apesar de o HBcAg poder ser transformado em HBeAg por ação enzimática, é pouco provável que este seja o mecanismo principal de sua formação in vitro (Neurath e Thanavala, 1990). O HBeAg é um derivado da proteólise de um precursor (p25) com regiões comuns ao HBcAg, produzido quando a tradução se inicia à montante da região C do genoma viral, englobando a região pré-C (UY et al., 1986).

As outras duas partículas encontradas, observadas em microscopia eletrônica, são desprovidas de material genético, não são infectantes e são constituídas apenas por resíduos de membranas de células contaminadas, contendo o antígeno HBsAg como estrutura de superfície. Uma dessas duas partículas tem superfície esférica de 22nm e aparece quando a relação proteína-lipídeo se faz na proporção 1:1, enquanto a outra partícula de superfície tubular, de aproximadamente 200nm, tem essa aparência em função do maior conteúdo lipídico (Hollinger et al., 1996; Liberato et al., 2002) (**Figura 3**).

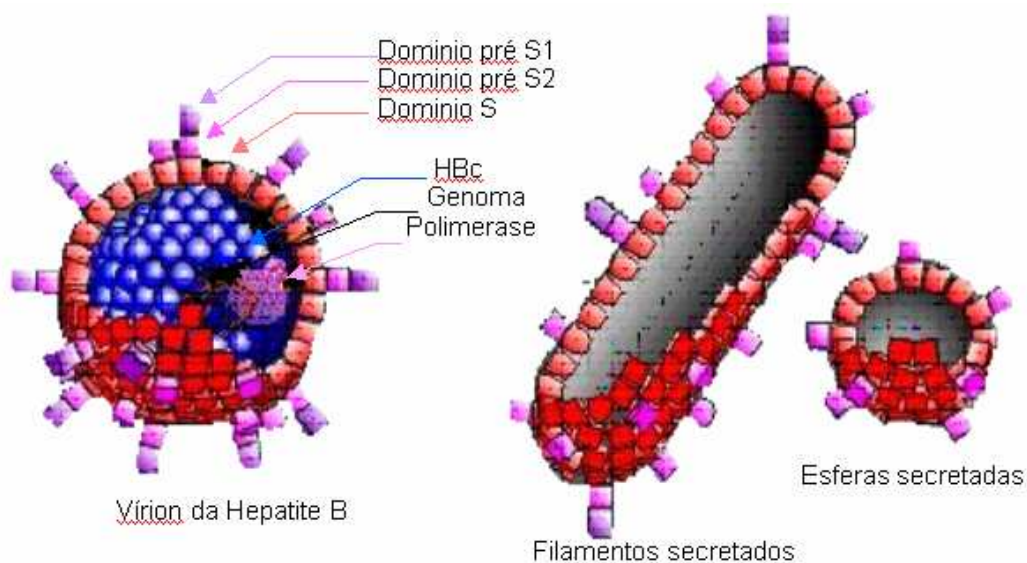


Figura 3– Representação esquemática dos componentes do HBV. (Summers e Mason, 1982)

O genoma viral, parcialmente de dupla-fita, tem aproximadamente 3.200 bases moleculares que codificam quatro unidades principais de transcrição S, P, C, X (Clarke et al., 2002) (**Figura 4**).

O antígeno HBs apresenta uma variedade de subtipos. Ele apresenta um determinante de grupo, denominado “a” comum a todos os sorotipos, e quatro determinantes de subtipos *d*, *y*, *w* e *r*. As combinações mais comuns são: *adw*, *adr*, *ayw* e *ayr*. Dentro de cada determinante de subtipos podem existir variedades antigênicas que são indicadas por um número, por exemplo, *adw2*, *adw4*, *ayw1*, *ayw2*. A distribuição geográfica dos subtipos provavelmente reflete o local de origem e migração das populações humanas infectadas, permitindo assim a investigação de casos de múltiplas exposições, tendo, portanto, grande importância epidemiológica (Okamoto et al., 1988; Liberato et al., 2002; Norder et al., 2004).

Os subtipos do VHB foram divididos inicialmente, em número de nove e são eles *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq+* e *adrq-* (Couroucé et al., 1976; Couroucé-Pauty et al., 1978; Couroucé-Pauty et al., 1983) por análise sorológica. As bases moleculares para as variações *d/y* e *w/r* estão relacionadas com a substituição de Lys/Arg nos resíduos 122 e 160, respectivamente (Okamoto et al., 1987). Através da sequência dos códons 101-180 do gene S do HBV, descobriu-se que um novo resíduo denominado 127 estava relacionado com as variações *w1/w2*, *w3* e *w4* codificando Thr e Leu respectivamente. A expressão do *w1* também foi relacionada com Arg 122, Phe 134 e/ou Ala 159 (Norder et al., 1992b).

1.5- Marcadores sorológicos do VHB

O marcador de diagnóstico da infecção pelo VHB o HBsAg pode ser detectado no soro 1 a 10 semanas após a exposição viral (Chan et al., 1999) e sua persistência no soro por mais de 6 meses indica infecção crônica (Hoofnagle, 2003; Liang et al., 1991; Gonçalves Junior, 2003a; Whalley et al., 2001).

O anti-HBs é o anticorpo protetor; há proteção cruzada contra subtipos do HBsAg em razão dos anticorpos produzidos pela presença do subdeterminante “a”, que é comum a todos. Ele é encontrado por muitos anos após a cura da infecção e indica estado de imunidade, porém sua presença isolada não indica necessariamente proteção ao VHB; títulos de anti-HBs superiores a 100 UI/l são considerados protetores (Focaccia e Andrade, 1995).

O anti-HBs está diretamente envolvido na resposta imune humoral, a qual produz imunidade protetora contra a infecção pelo VHB. Embora existam vários subtipos do VHB, todos possuem um epítipo neutralização composto por 24 aminoácidos no HBsAg, o determinante “a”. Este determinante comum “a” fica entre os aminoácidos 124 e 147 do HBsAg, e acredita-se ter uma conformação em dupla alça. Anticorpo monoclonal que reconhece a região dentro deste epítipo “a” é capaz de neutralizar o vírus da hepatite B (VHB).

Uma troca na sequência de aminoácidos nesta região poderia resultar na alteração da estrutura antigênica e a perda da imunoreatividade (Stirk et al., 1992; Carman, 1997). Escape mutantes, induzidos pela imunização ativa ou passiva, com troca de aminoácidos, que resultam na perda do determinante grupo específico do HBsAg, têm sido relatado por vários autores (Carman et al., 1990; Harrison et al., 1991; Fuji et al., 1992; McMahon et al., 1992; Okamoto et al., 1992; Karthigesu et al., 1994; Zhang et al., 1996; Chiou et al., 1997; Avellón e Echevarria, 2006).

A variante mais comum do HBsAg associada com resistência do anti-HBs induzido pela vacina é a mutação da Glicina pela Arginina na posição 145 da segunda alça do determinante “a” (Carman et al., 1990; Okamoto et al., 1992; Yamamoto et al., 1994).

O gene C e a região pré-core (pré-C) codificam os antígenos do core (HBcAg), que irá formar o capsídeo, e o HBeAg. Esses antígenos induzem a produção de IgM, que podem ser detectadas nos soros das pessoas agudamente infectadas (Liberato et al., 2002).

O HBcAg não é encontrado no sangue periférico (Gonçales Junior, 1998; Liberato et al., 2002) , mas está presente nos hepatócitos (Hoofnagle e Di Bisceglie, 1991; Bonino e Brunetto, 2003). Seu anticorpo (anti-HBc) aparece logo após o HBsAg e o anti-HBc da classe IgM permite informar se a infecção é atual ou antiga. Sua presença indica infecção atual e IgM negativo indica infecção pregressa (Focaccia e Andrade, 1995).

O HBeAg surge em estados precoces da infecção, no período mais agudo da doença. Em infecções severas, pode persistir. Durante o curso da infecção crônica do vírus da hepatite B a presença do HBeAg frequentemente está associado com doença ativa e contínua enquanto a soroconversão do HBe (Anti-HBe) coincide com o desaparecimento do DNA-VHB, normalização dos teste bioquímicos, remissão clínica e redução da atividade hepática inflamatória (Realdi et al., 1980; Hoofnagle et al., 1981; Chu et al., 1985), podendo eventualmente ser seguido pelo desaparecimento espontâneo do HBsAg (Liaw et al., 1991).

Como a presença do HBeAg se correlaciona com maior quantidade de partículas infectantes no sangue, ele indica maior risco de infectividade (Hadziyannis et al., 1983). Diferentemente do HBcAg, ele é solúvel e não estrutural (Liberato et al., 2002).

O gene X codifica a proteína X que é transativadora da transcrição viral, parecendo estar associada à fase de replicação, particularmente, na etapa de transcrição do DNA do HBV. Sua possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepático tem sido motivo de controvérsias entre os estudos (Koschy et al., 1989; Liberato et al., 2002).

O gene P codifica a DNA polimerase, uma enzima específica para duplicar o DNA, que também possui atividade de transcriptase reversa. Isto permite que o DNA do VHB seja produzido a partir do RNA precursor. A replicação do VHB ocorre predominantemente nos hepatócitos (Gonçales Junior, 1998).

1.6- Replicação do VHB

A replicação acontece quando o vírus se liga ao hepatócito através de um peptídeo codificado pela região pré-S1 (gene S) no receptor do hepatócito. Ele perde seu envoltório e seu genoma é inoculado na célula através da albumina polimerizada. O DNA do VHB vai para o núcleo e perde a sua disposição circular, pela ação da DNA-polimerase, e se converte num DNA super-helicoidal (ccc-DNA). Este ccc-DNA serve como molde para o RNAm e esse RNA é copiado várias vezes. No citoplasma são sintetizadas as proteínas do core que vão encapsular os RNA juntamente com a DNA-polimerase, e

também no citoplasma vão ocorrer a transcrição reversa do pré-genoma (RNA) em DNA e o pré-genoma que é destruído por enzimas. O core é envolto pelo envelope externo no retículo endoplasmático e esta estrutura viral completa deixa a célula e vai infectar outra célula (De Meyer et al., 1997), como se pode observar na Figura 5.

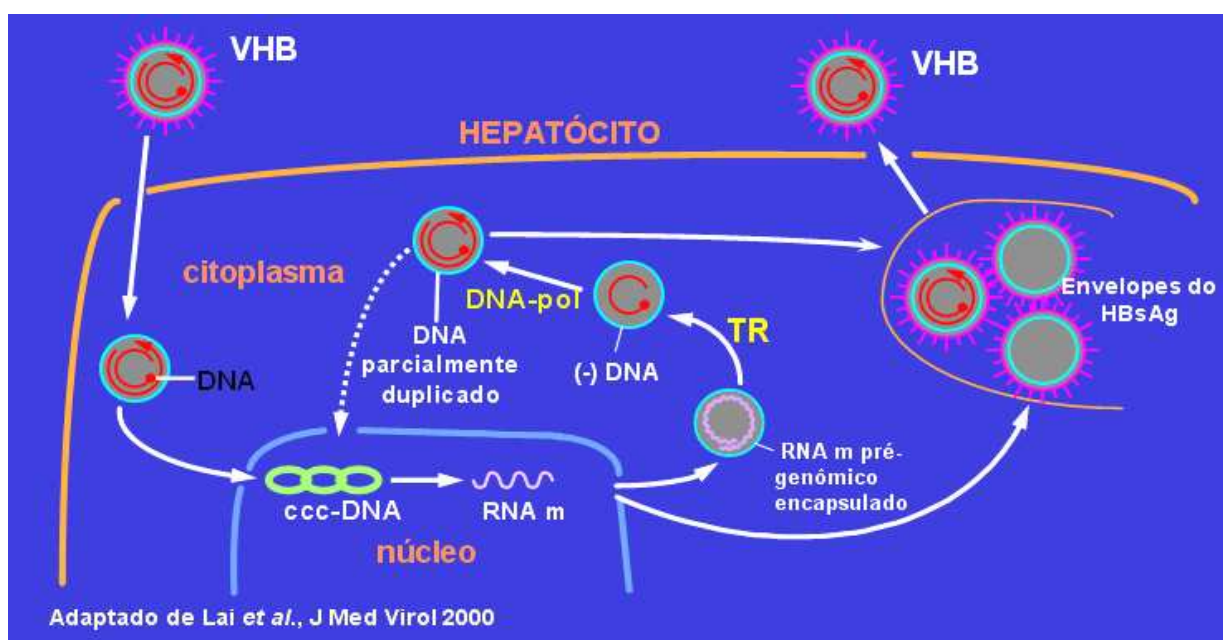


Figura 5- Replicação do VHB

Nem todas as partículas formadas são vírions. A maioria é montada de forma incompleta, podendo adquirir um formato esférico ou alongado, dependendo da proporção entre proteínas e lipídeos nelas encontradas (Liberato et al., 2002).

1.7- Genótipos do VHB

Inicialmente, quatro genótipos (A-D), do VHB, foram identificados comparando-se 18 seqüências de genomas completos, baseados em diferenças >8% (intergenotípica) e <4% (intra-genotípicas) (Okamoto et al., 1988). Em seguida, outros quatro genótipos foram identificados (E-H) (Norder et al., 1992a; Norder et al., 1994; Naumann et al., 1993; Stuyver et al., 2000; Arauz-Ruiz et al., 2002).

O genótipo A se origina principalmente da Europa, Índia, África e América do Norte. Ele foi subdividido em dois subgenótipos A1 e A2. O genótipo A1 é o Europeu e o A2 Afro-Asiático (Kramvis et al., 2002; Bowyer et al., 1997; Owiredo et al., 2001). Esta subdivisão foi baseada na seqüência de aminoácidos do gene S do vírus B genótipo A. Nas seqüências do subgenótipo A1 encontrou-se Asn 207 e Leu 209, enquanto na seqüência do A2 obteve-se Ser 207 e Val 209 (Norder et al., 1993).

Os genótipos B (VHB/B) e C (VHB/C) são predominantes no Leste e Sudeste Asiático e contém 3.215 nucleotídeos em seus genomas (Bartholomeusz e Schaefer, 2004; Weber, 2005). VHB/B foi subdividido em quatro subgenótipos B1, B2, B3 e B4 e VHB/C também foi subdividido em quatro subgenótipos C1, C2, C3 e C4 (Norder et al., 2004).

O Genótipo D (VHB/D) possui uma deleção de 33 nucleotídeos na região PreS1 tendo somente 3.182 nucleotídeos em seu genoma. Como o VHB/A o VHB/D também é muito difundido mundialmente; e é predominante na área do Mediterrâneo, Índia, Rússia e Estados Unidos (Bartholomeusz e Schaefer, 2004; Weber, 2005). Ele também possui subdivisão em quatro subgenótipos D1, D2, D3 e D4 (Norder et al., 2004).

O Genótipo E do VHB (VHB/E) possui seqüências ayw4 (Norder et al., 2004) e originário do Oeste da África (Norder et al., 2004; Weber, 2005; Bartholomeusz e Schaefer et al., 2004; Norder et al., 1994; Arauz-Ruiz et al., 1997). Além disso, apresenta, também, uma deleção de três nucleotídeos na região da Polimerase (Bartholomeusz e Schaefer, 2005; Weber 2005).

O genótipo F (VHB/F), subdividido em: subgenótipos F1 e F2, é caracterizado por substituições específicas no produto do gene S, Leu 45 e Thr 45, respectivamente (Arauz-Ruiz et al., 2002; Norder et al., 1993; Arauz-Ruiz et al., 1997). Ele é oriundo da Polinésia, Estados Unidos (Weber, 2005) e em populações aborígenes das Américas (Norder et al., 2004).

O genótipo G (VHB/G) é originário dos Estados Unidos, México e Europa suas seqüências são exclusivamente adw2. Seqüências do genótipo G compartilham duas únicas substituições, Gln51Leu e Thr63Ile, não encontradas em nenhum outro genótipo. O gene S

do VHB/G possui a mais alta similaridade com o VHB/A, porém, quando comparados seu genoma completo, o VHB/G possui uma grande divergência das demais seqüências dos outros genótipos do VHB (Norder et al., 2004). Ele possui uma inserção de 36 nucleotídeos no códon 2 do gene do Core dando a sua seqüência um total de 3248 nucleotídeos (Stuyver et al., 2000).

Todas as seqüências pertencentes ao genótipo H (VHB/H) são oriundas da Nicarágua, México, Califórnia (Arauz-Ruiz et al., 2002) e América Central e Sul (Bartholomeusz e Schaefer, 2004). VHB/H é muito similar ao VHB/F (Norder et al., 2004).

Foi sugerido que o genótipo viral pode se correlacionar com diferentes características clínicas da infecção. Por exemplo, dados recentes sugerem que pacientes com genótipo C são mais propensos a terem doença severa no fígado do que pacientes infectados com o genótipo B que, por sua vez, estão mais associados ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC) (Clarke e Bloor, 2002; Chan et al., 2003).

Os genótipos não-A do VHB podem apresentar, mutações na região do pré-core (mutante HBeAg negativo) , altamente disseminadas na área do Mediterrâneo (Bonino e Brunetto, 2003) e Japão (Yoo et al., 2003). Estudos recentes encontraram este mutante em diversas áreas geográficas e com freqüência crescente na América do Norte (Yoo et al., 2003).

As variações geográficas na prevalência da hepatite crônica associadas a mutantes HBeAg negativo se devem à prevalência dos genótipos do VHB em cada área. A mutação mais comum no pré-core (G1896A) é exclusiva de pacientes infectados com os genótipos B, C, D, E que possuem Timina (T) na posição 1858 do pré-core. No genótipo A o nucleotídeo 1858 é a citosina (C), impedindo a seleção da mutação G1896A (Fattovich, 2003).

Essa mutação G/A na posição 1896 da região pré-core conduz a uma parada no códon na leitura da seqüência da proteína HBeAg resultando na inibição da síntese da proteína e (HBeAg negativo) (Bonino e Brunetto, 2003).

O mutante que altera a guanina (G) da posição 1896 por adenina (A) confere um aumento da estabilidade da estrutura secundária do sinal de encapsulação só em genótipos que possuem o nucleotídeo T na posição 1858 (Bonino e Brunetto, 2003; Yoo et al., 2003) aumentando assim, a severidade da doença no fígado. Isso foi encontrado em pacientes com doença ativa no fígado ou hepatite fulminante, porém essa mutação A1896 também foi detectada freqüentemente em portadores assintomáticos HBeAg negativos (Yoo et al., 2003) (Fig. 6).

Figura 6 – Estrutura secundária do pré-genoma do VHB (Chan et al., 1999)

A determinação dos genótipos do VHB pode ser relevante para a conduta do tratamento dos pacientes assim como foi determinada essa relação entre genótipo e tempo de tratamento na hepatite C.



2- OBJETIVOS

1. Determinar os genótipos do VHB em amostras de soro de pacientes HBsAg positivos através do método de seqüenciamento parcial da região S do vírus da hepatite B;
2. Avaliar a sensibilidade dos métodos empregados em detectar o DNA-VHB e o genótipo do VHB em amostras de sangue de pacientes HBsAg positivos;
3. Correlacionar os genótipos do VHB com as principais variáveis clínicas, epidemiológicas, laboratoriais e histológicas presentes na população com hepatite B em nossa região;



3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Casuística

3.1.1- Seleção dos pacientes:

No período de março de 2003 a dezembro de 2005 foram selecionados 215 pacientes. O atendimento clínico laboratorial destes pacientes foi realizado no ambulatório do Grupo de Estudos das Hepatites (GEHEP) da Disciplina de Moléstias Infecciosas (MI) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp.

3.1.2- Critérios de inclusão

Todos os pacientes HBsAg reagente foram considerados elegíveis para o estudo. Não houve restrições quanto à faixa de idade dos pacientes.

3.1.3- Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes que apresentavam coinfeção com HIV ou HCV e/ou tripla infecção HBV, HCV e HIV.

3.1.4- Biópsia hepática

A coleta do material de biópsia foi feita por punção percutânea, guiados com ultra-som ou por laparoscópio, seguindo critérios padronizados de acordo com os padrões éticos exigidos. O fragmento de tecido hepático colhido foi colocado em formalina 10% e encaminhado ao Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, para processamento de acordo com a rotina. O fragmento hepático após ser processado era corado com hematoxilina eosina, tricômio de Masson e reticulina.

Os critérios usados para a classificação de hepatites crônicas incluíram o estadiamento da fibrose e o grau de atividade inflamatória segundo classificação Metavir (Desmet et al., 1994; Gayotto, 2000). O estadiamento da fibrose variou de 0 a 4 (0 – fibrose ausente; 1 - fibrose portal sem septos; 2 – fibrose portal com poucos septos; 3 - fibrose portal com numerosos septos e 4 – cirrose). O grau de atividade histológica foi, também, avaliado levando-se em conta a atividade inflamatória na região portal, peri-portal e lobular, usando-se os seguintes critérios: 0 – sem atividade histológica; 1 – lesões mínimas; 2 – atividade leve; 3 – atividade moderada; 4 – atividade intensa. Para a avaliação das seções histológicas foram considerados somente os fragmentos hepáticos com pelo menos 7 espaços porta.

3.2- Métodos

3.2.1- Avaliação clínico – epidemiológica

A inclusão foi sequencial após a confirmação da presença de infecção do VHB (HBsAg reagente), procedendo-se a coleta de amostra de sangue para o estudo molecular. Na primeira consulta ambulatorial, todos os pacientes foram identificados de acordo com o sexo, idade, cor, procedência e demais características pessoais. Como protocolo de rotina todos os pacientes responderam a um questionário específico contendo perguntas relacionadas ao comportamento sexual, ocorrência de transfusões sanguínea, uso de agulhas ou seringas não descartáveis, a prática de acupuntura ou tatuagem, o uso de drogas ilícitas e outros fatores que podem ser considerados como risco para aquisição das hepatites.

A avaliação do perfil bioquímico e sorológico para o VHB obedeceu a critérios clínicos, bem como a realização de biópsia hepática. Nenhuma biópsia hepática foi realizada para este estudo específico. Os dados epidemiológicos, clínicos de tratamento e os resultados das biópsias hepáticas foram levantadas dos prontuários dos pacientes após inclusão no estudo, bem como os resultados da pesquisa do anti-HCV e anti-HIV.

3.2.2- Análise sorológica

A pesquisa dos marcadores da hepatites: HBsAg, HBeAg, anti- HBc, anti-HBe, anti-HBs e o anti-HCV foram realizados pelo ensaio enzimático de micropartículas (MEIA) de terceira geração utilizando-se analisador automático AXSYM (ABBOTT Laboratórios, North Chicago, IL). Estes ensaios foram realizados pelo Laboratório de Patologia Clínica –HC Unicamp. Os testes anti-HIV foram realizados no Laboratório de AIDS- HC/Unicamp utilizando-se também, ensaios enzimáticos de micropartículas (MEIA) de terceira geração utilizando-se analisador automático AXSYM (ABBOTT Laboratórios, North Chicago, IL).

3.2.3- Análise bioquímica

As dosagens bioquímicas da alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico piruvicas (TGP) foram feitas através de um ensaio colorimétrico por analisador automático (Hitachi, Roche Laboratórios). Os valores considerados normais foram: homens 40UI/ml e mulheres 30UI/ml. Estes exames foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica-HC/Unicamp. Os resultados foram levantados dos prontuários dos pacientes referentes ao dia da coleta da amostra para estudo molecular.

3.2.4- PCR “In house” segundo a técnica de Kaneko et al. (1989) modificada

Durante o atendimento clínico do paciente no ambulatório foram coletadas amostras de sangue em tubo, vacutainer de 8-10ml com gel, previamente identificados. Os tubos foram enviados ao laboratório do GEHEP, em um intervalo máximo de quatro horas para processamento. Após a retração do coágulo, os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente e o soro foi distribuído em duas alíquotas de 1,5ml cada e armazenado em freezer à -20°C. Uma alíquota foi armazenada como soroteca e a outra foi utilizada para execução dos ensaios moleculares (PCR “in house”, PCR quantitativo, seqüenciamento para genotipagem).

A extração do DNA do VHB e a amplificação do material genético, foi realizada por desnaturação com NaOH e a neutralização com HCl.

Desnaturação da amostra: foi realizada em um microtubo de 0,2 ml, onde se adicionou 2,5 µl de NaOH 0,5 M a 10,0 µL de soro e em seguida, incubou-se a 37° C por 60 minutos.

Neutralização da amostra: após a incubação, foi adicionada em cada microtubo, 2,5 µL de HCl 0,5 M e em seguida a amostra foi utilizada para a amplificação.

Primeira amplificação: a amostra foi amplificada, adicionando-se um volume de reação de 100 µL, onde 85,0 µL era composto pelo Mix/PCR, que continha para cada amostra, 50,0 mmol/L de KCl, 50 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3) (10µl), 1,5 mmol/L de MgCl₂ (4,0µl), 2,5 U de Taq polimerase Invitrogen (0,5 µL), 2,5 mM/µl dNTPs (6 µl), 20 pmol/µl de primer (1µl) FHBS1 (244 5'- GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTC – 3' 267), 20 pmol/µl de primer (1µl) de primer RHBS1 (691 5'- GCT AAA TKG CAC TAG TAA ACT GAG CCA – 3' 668). Em seguida o tubo contendo a amostra, foi submetido à amplificação, que consta de repetidos ciclos de variação de temperatura em termociclador Perkin Elmer 2400. Inicia-se, à 94° C por 20 segundos, 56° C permitindo o anelamento do primer com sua respectiva cadeia de DNA. Finalmente a temperatura eleva-se a 72° C por 30 segundos para a extensão da cadeia de DNA. Este procedimento foi repetido por 35 ciclos utilizado para a amplificação. O tamanho do fragmento obtido foi de 447 pares de bases.

Ao final da primeira reação de PCR, 0,5 µL do produto amplificado, foi submetido a novo ciclo de amplificação (*nested*-PCR), adicionando-se um volume de reação de 15 µL, onde 14,5 µL era composto pelo Mix/PCR, 50,0 mmol/L de KCl, 50 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3) (1,5µl), 1,5 mmol/L de MgCl₂ (0,5µl), 2,5 U de Taq polimerase Invitrogen (0,2 µL), 1,25 mM/µl dNTPs (1,5 µl), 5mM/µl de primer (0,35µl) FHBS2 (255 5'- CGT GGT GGA CTT CTC TCA ATT TTC – 3' 278) e 5mM/µl de primer (0,35µl) RHBS2 (671 5'- GCC ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC – 3' 648).

Uma alíquota de água foi utilizada como controle negativo da reação e um soro de um indivíduo HBV EIA reagente com 1000 cópias/ml detectado pelo teste HBV e Amplicor Monitor (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ), foi utilizado como controle positivo. Utilizando-se amostras em diluições seriadas do painel HBsAg *low Titer Performance Panel* (PHA 105 – Boston Biomédica INC, MA) foi possível estabelecer-se o limite mínimo de detecção do método de PCR utilizado no presente estudo, em 100 cópias/mL.

Do produto final de cada amostra, foram retirados 3,0 µL que foram corados com 2,0 µL de Azul de Bromofenol e aplicados em gel de agarose a 1,8%, corado pelo Brometo de Etídio. Foi realizada uma corrida de 30 minutos de Eletroforese em seguida, visualizados sob luz ultravioleta e fotografado com uma Polaroid. O tamanho do fragmento obtido foi de 417 pares de bases (**Figura 7**).

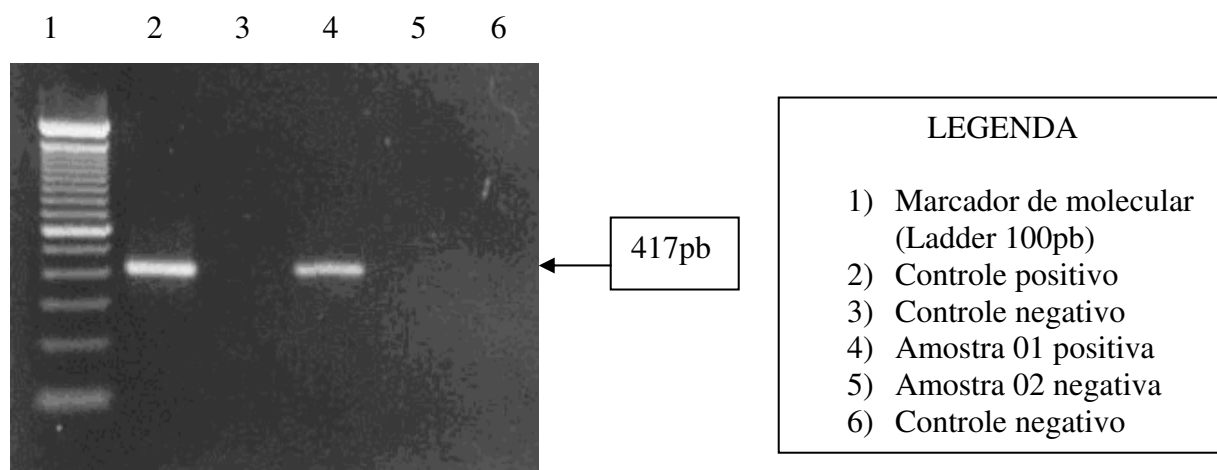


Figura 7- Gel de agarose 1,8%

3.2.5- PCR Quantitativo

As amostras dos pacientes que apresentaram resultado positivo para o DNA-VHB na PCR “*in house*”, foram submetidos ao teste comercial Amplicor HBV Monitor TM (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA).

Em resumo, o teste baseia-se em quatro processos principais: preparação da amostra, amplificação do DNA alvo por PCR usando iniciadores complementares específicos do HBV, hibridização dos produtos amplificados por sondas oligonucleotídicas específicas do(s) alvo(s), e detecção dos produtos amplificados e fixos à sonda por determinação colorimétrica. O teste permite uma amplificação por PCR simultânea do DNA alvo do HBV e do DNA do padrão interno do HBV. O reagente de mistura principal contém um par de iniciadores específicos para o DNA alvo do HBV e para o DNA do padrão interno do HBV. A quantificação do DNA viral do HBV é efetuada utilizando o padrão interno do HBV, que é uma cópia transcrita de DNA não infecciosa que contém local de fixação aos iniciadores idênticos aos do DNA alvo do HBV e uma região de fixação da sonda que permite que o amplicon do padrão interno se distinga do amplicon do HBV. O padrão interno encontra-se incorporado em cada amostra individual, num número de cópias conhecido e é transportado através dos passos de amplificação por PCR, hibridização e detecção da amostra em conjunto com o HBV alvo e amplificando conjuntamente com o HBV alvo.

Os níveis de DNA do HBV presentes nas amostras de teste são determinados comparando o sinal do HBV com o sinal do padrão interno em cada amostra. A quantificação do DNA do HBV é efetuada utilizando uma curva padrão gerada em cada execução. O número de cópias de cada padrão é representado graficamente contra a proporção do HBV: padrão interno para cada padrão para gerar uma curva padrão. Os níveis de DNA do HBV nas amostras são determinados por comparação da proporção do HBV: padrão interno para cada amostra com curva padrão gerada em cada execução. O padrão interno compensa os efeitos de inibição e controla o processo de amplificação visando permitir uma quantificação rigorosa do DNA do HBV em cada amostra.

O limite inferior de detecção do teste Amplicor HBV Monitor é de 1000 cópias/ml e superior de 40.000.000 cópias/ml no soro.

3.2.6- Reação de sequenciamento segundo a técnica de Sanger et al. (1977) modificada.

Para a reação de sequenciamento, foram utilizados um volume final de 10 µl, contendo 1µl do produto da nested-PCR, 1µl de primers 5 pmol (internos, sense FHBS2), e 1µl do reagente Terminator Ready Reaction Kit (Big Dye TM Applied Biosystems, EUA) que contém, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl₂, tampão Tris-HCl, deoxinucleotídeos (dNTPs) e dideoxinucleotídeos (ddNTPs) com cada base nitrogenada marcada especificamente com fluoresceína-dRodamina e água ultrapura até completar o volume. Após o preparo da reação as amostras foram colocadas em termociclador Perkin Elmer 2400 iniciando-se 94°C por 2 minutos e 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 56°C por 15 segundos e 72°C por 1 minuto.

Após a PCR para o sequenciamento, as amostras foram purificadas e precipitadas. Para tanto, foram adicionados 2µl de acetato de amônio 7,5 M e 50µl de etanol absoluto aos 10µl de reação, homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 13.200 rpm à temperatura ambiente. Em seguida, foi removido o sobrenadante e adicionado 100 µl de etanol 70% ao precipitado. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 13.200 rpm à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o etanol foi retirado e as amostras foram armazenadas em local escuro (proteção dos fluoróforos) ou secas em banho seco 65°C por 2 minutos.

Para ressuspender as amostras, foram adicionados 2 µl de tampão de carregamento de amostra (4 partes de formamida) e 1 parte de “blue dextran” (PE Applied Biosystems, EUA), homogeneizadas várias vezes, com a pipeta e rapidamente centrifugadas (um pulso). Após este procedimento, desnaturar as amostras a 95°C por 3 minutos para desnaturação. Imediatamente após a desnaturação, as amostras foram colocadas no gelo até a aplicação de 1,0 – 2,0 µl no gel de poliacrilamida.

O gel de seqüenciamento é constituído por poliacrilamida 5% com uréia 6 M em tampão TBE 1X concentrada em placas de 36 cm com 0,5 mm de espessura. O tampão TBE 1X concentrado foi utilizado na eletroforese, realizado no Seqüenciador Automático ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, EUA).

Após a corrida do gel os dados colhidos foram armazenados em um banco para posteriores análises. A leitura é baseada no eletroferograma (Figura 8), que é a presença de picos de intensidades diferentes produzidos por cada nucleotídeo marcado (didesoxinucleotídeos).

Resumidamente: os didesoxinucleotídeos, substâncias finalizadoras da reação em cadeia de polimerase, encontrar-se-ão ligados a um corante sensível, que contém em sua estrutura uma fluoresceína doadora (6-carboxi-fluoresceína) ligada a quatro diferentes dicloro-rodaminas aceptoras, uma específica para cada nucleotídeo. A substância doadora absorve energia proveniente do laser de aparelho e promove transferência de energia para o aceptor. Essa energia é captada pelo seqüenciador sendo decodificada em quatro diferentes cores (verde-adenina, vermelha-timina, azul-citosina e preta-guanina). O *Software sequence analysis* transforma esses dados em gráficos e permite a leitura da seqüência de nucleotídeos.

As leituras obtidas foram comparadas com as seqüências de consenso do HBV obtidas pelo GenBank.

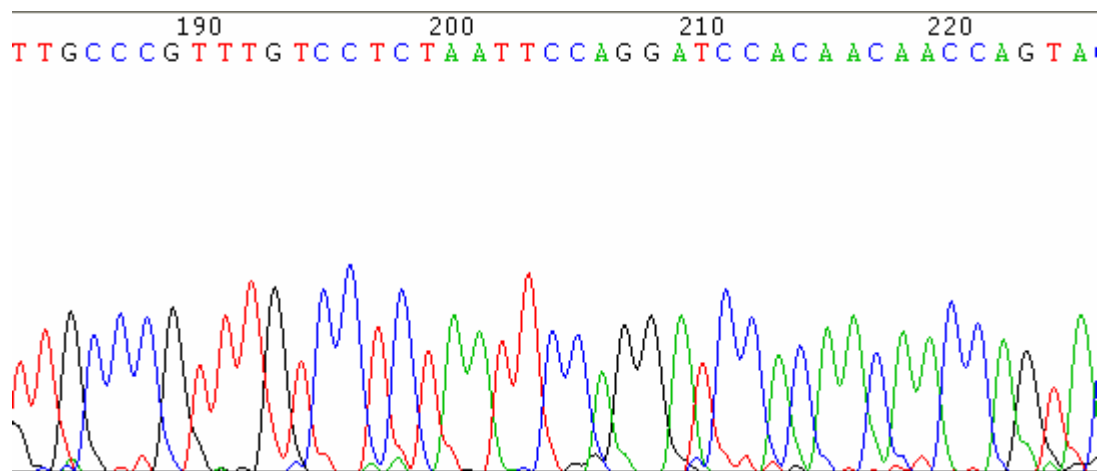


Figura 8- Eletroferograma da sequência do DNA de um paciente

3.3- Análise estatística

Análise descritiva por meio de tabelas de frequência para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas.

Para verificar associação ou comparar proporções foi utilizado o teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher, quando necessário.

Para comparação de medidas contínuas ou ordenáveis entre dois grupos foi aplicado o teste de Mann-Whitney.

A análise de regressão logística múltipla foi utilizada para comparar os genótipos entre os grupos, ajustando para as variáveis: idade, sexo e raça.

O nível significativo adotado para os testes estatísticos foi de 5%.



4- RESULTADOS

Foram selecionados 215 pacientes, HBsAg reagentes, dos quais 150 (70%) apresentaram resultado positivo para a PCR e foram submetidos à genotipagem do VHB. Nas 65 (30%) amostras que apresentaram resultado negativo o teste foi repetido para a confirmação do resultado. Também, foram excluídos 11 pacientes por apresentarem coinfeção pelo VHB e pelo vírus da Hepatite C (VHC) (5), pelo VHB e coinfeção pelo vírus da Imuno Deficiência Humana (HIV) (2) ou infecção tripla pelo VHB, VHC e HIV (4).

Dos 139 pacientes que eram HBsAg positivos e DNA-VHB positivos pela PCR, 89 (64%) eram do sexo masculino e 50 (36%) do sexo feminino. A idade média foi de $42 \pm 14,5$ anos, 84,2% (117) foram considerados caucasianos, 9,4% (13) pardos, 5% (7) negros e 1,4% (2) asiáticos.

Os pacientes selecionados era naturais dos estado de São Paulo (63%) (interior, cidade de Campinas e da cidade de São Paulo), do estado do Rio de Janeiro (1,4%), do Paraná (13%), de Minas Gerais (10%), da Bahia (2,9%), do Amazonas (0,7%), de Alagoas (2%) e 3 deles de outros países (Itália, China e África).

Em 61,2% (85/139) não se conseguiu determinar qual a via de transmissão da doença ou não foram encontrados esses dados no prontuário do paciente. A via parenteral com 20,1% (28/139) foi, portanto, a via que mais freqüentemente transmitiu o VHB aos pacientes, seguido pela sexual com 10,8% (15/139) e pela vertical com 7,9% (11/139) dos casos.

O genótipo **A** foi detectado em 55% (76/139) dos pacientes, seguido pelo **D** em 38% (53/139), pelo **F** em 4% (6/139) e pelo **C** em 3% (4/139) dos pacientes como se pode observar na **Figura 9**.

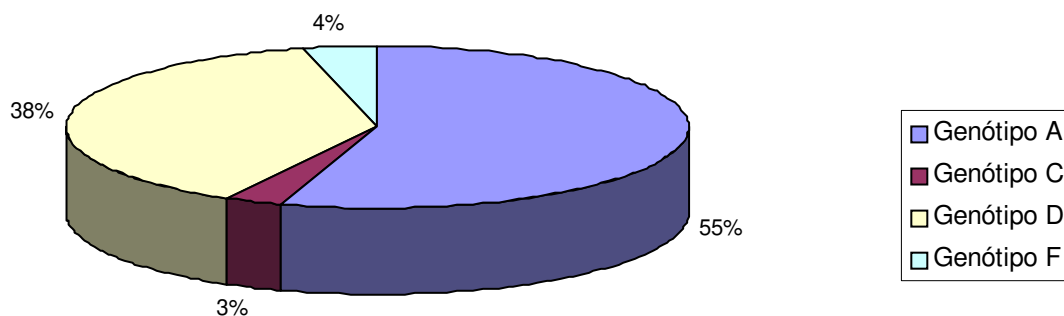


Figura 9- Distribuição dos genótipos do VHB em pacientes atendidos pelo GEHEP (n=139). $P \leq 0,05$ = significativo

Nos pacientes considerados portadores inativos, cujo coeficiente (q) de alanina aminotransferase (ALT) era inferior a 1,3 vezes o limite superior da normalidade (LSN) foi encontrado em 60% da população, enquanto 40% foram pacientes que provavelmente tinham hepatite crônica em atividade por apresentarem qALT maior que 1,3 vezes o LSN. O qALT médio da população estudada foi de 2,0.

Tabela 1- Características demográficas, epidemiológicas, clínicas e virológicas dos pacientes HBsAg positivos. (n=139)

		HBsAg + (n=139)
Sexo	M	89 (64%)
	F	50 (36%)
Média de idade		42±14,5
Naturalidade	Interior do Estado de SP	72 (52%)
	Campinas	15 (11%)
	São Paulo Capital	7 (5%)
	Rio de Janeiro	2 (1,4%)
	Paraná	18 (13%)
	Minas Gerais	14 (10%)
	Bahia	4 (2,9%)
	Amazonas	1 (0,7%)
	Alagoas	3 (2%)
	Outros Países	3 (2%)
Raça	caucasianos	117 (84,2%)
	asiáticos	2 (1,4%)
	negros	7 (5%)
	pardos	13 (9,4%)
Provável	Desconhecida	85 (61,2%)
via de transmissão	Parenteral	28 (20,1%)
	Sexual	15 (10,8%)
	Vertical	11 (7,9%)
	A	76 (55%)
Genótipos	C	4 (3%)
	D	53 (38%)
	F	6 (4%)
Portador inativo	(ALT<1,3 LSN)	83 (60%)
Hepatite crônica em		
atividade	(ALT>1,3 LSN)	56 (40%)
qALT média		2,0 ± 3,1

P≤ 0,05 = significativo

LSN = limite superior de normalidade

q ALT média = ALT paciente/ ALT máxima do método

Na **Tabela 2** os dados foram distribuídos pelos dois diferentes grupos de pacientes: os dados dos positivos para o antígeno *e* do VHB (HBeAg positivo) e o dos pacientes negativos para o antígeno *e* do VHB (HBeAg negativo).

Como se pode verificar, 30,2% (42/139) pacientes HBsAg positivos com DNA-VHB positivo neste estudo, eram HBeAg positivo e 69,8% (97/139) eram HBeAg negativo com DNA-VHB positivo. Como se nota mais de 2/3 dos pacientes HBsAg positivos não expressavam o antígeno *e*.

A **Tabela 2** permitiu analisar se houve predomínio de homens em ambos os grupos, tendo sido observado 73,8% de homens entre os HBeAg positivos contra 59,8% de homens no grupo HBeAg negativo ($p=0,1139$). A idade média foi significativamente maior entre os HBeAg negativos ($p=0,0055$). Em relação à raça em ambos os grupos predominaram os caucasianos, sendo 80,9% nos pacientes HBeAg positivo e 85,6% nos pacientes HBeAg negativos ($p=0,9319$). Não houve, portanto, diferenças significativas entre os dois grupos.

A via de transmissão parenteral foi a mais freqüente sendo de 23,8% nos HBeAg positivo contra 18,6% nos HBeAg negativo ($p=0,1324$).

A distribuição genotípica nos grupos HBeAg positivo e HBeAg negativo mostrou que o genótipo A predomina em ambos os grupos. No grupo HBeAg positivo 59,5%, eram genótipo A contra 52,6% de genótipo D entre pacientes HBeAg negativo. O genótipo D foi mais encontrado entre pacientes HBeAg negativo (42,3%) que nos HBeAg positivos (28,6%). O genótipo C foi mais prevalente entre pacientes HBeAg positivo quando comparados aos HBeAg negativo (7,1% X 1%). O genótipo F foi mais encontrado nos HBeAg positivo (4,8%) e com prevalência semelhante nos HBeAg negativo (4,1%). Portanto não se observou diferenças estatísticas significantes na distribuição dos genótipos entre ambos os grupos ($p=0,1138$).

Ainda na **Tabela 2**, nota-se que houve predomínio de pacientes com hepatite crônica em atividade (57% X 33%) quando comparados os grupos HBeAg positivo e HBeAg negativo. Encontrou-se também, uma porcentagem estatisticamente menor de

pacientes com hepatite crônica em atividade no grupo HBeAg negativo do que no grupo HBeAg reagente ($p=0,0077$). A qALT média foi significativamente maior entre os HBeAg positivo (2,5) do que entre os HBeAg negativo (1,8) ($p=0,0005$).

Tabela 2- Características dos pacientes HBsAg positivos de acordo com a positividade ou não do HBeAg (n=139).

		HBeAg + (n=42)	HBeAg - (n=97)	p-valor
Sexo	M	31 (73,8%)	58 (59,8%)	0,1139
	F	11 (26,2%)	39 (40,2%)	
Média de idade	(anos)	37±17,2	44±12,7	0,0055
	caucasianos	34 (80,9%)	83 (85,6%)	0,9319
Raça	asiáticos	2 (4,8%)	-	0,1324
	negros	2 (4,8%)	5 (5,1%)	
	pardos	4 (9,5%)	9 (9,3%)	
Provável	Parenteral	10 (23,8%)	18 (18,6%)	0,1138
via de transmissão	Desconhecida	16 (38,1%)	69 (71,1%)	
	Sexual	5 (11,9%)	10 (10,3%)	
	Vertical	11 (26,2%)	-	
Genótipos	A	25 (59,5%)	51 (52,6%)	0,0077
	C	3 (7,1%)	1 (1,0%)	
	D	12 (28,6%)	41 (42,3%)	
	F	2 (4,8%)	4 (4,1%)	
Portador inativo	(ALT<1,3 LSN)	18 (43%)	65 (67%)	0,0005
Hepatite crônica em atividade	(ALT>1,3 LSN)	24 (57%)	32 (33%)	
qALT média		2,5	1,8	

A **Tabela 3** mostra os resultados das alterações observadas nas biópsias hepáticas de 66 pacientes (29 HBeAg positivo e 36 HBeAg negativo). Com se pode observar, o estágio de fibrose foi 2,1 para os HBeAg positivo e de 2,3 para os pacientes HBeAg negativo ($p = 0,4253$).

Os graus de atividade inflamatória também foram similares 2,3 e 2,4 para os dois grupos ($p = 0,7417$). Em relação à fibrose, esta foi significativa em 41,4% dos HBeAg positivo contra 38,9% dos HBeAg negativo. A fibrose não foi significativa em 58,6% dos HBeAg positivo contra 61,1% dos HBeAg negativo ($p = 0,8386$).

Tabela 3- Resultados das biópsias hepáticas em pacientes com infecção pelo VHB

	HBeAg (+) (n=29)	HBeAg (-) (n=36)	p-valor=
*Estadio de fibrose(Média)	2,1	2,3	0,4253
**Grau de atividade (Média)	2,3	2,4	0,7417
*Fibrose significativa (n) (%)	12 (41,4%)	14 (38,9%)	
*Fibrose não significativa (n) (%)	17 (58,6%)	22 (61,1%)	0,8386

$P \leq 0,05$ = significativo

Na **Figura 10** estão demonstrados os resultados obtidos quando foram comparados os genótipos com o estágio da fibrose média. Como se pode verificar a média do grau de fibrose entre os pacientes do genótipo **A** foi de 2,4, no genótipo **C** foi de 1, no genótipo **D** foi de 2 e no genótipo **F** foi de 3 (p -valor = 0,1148).

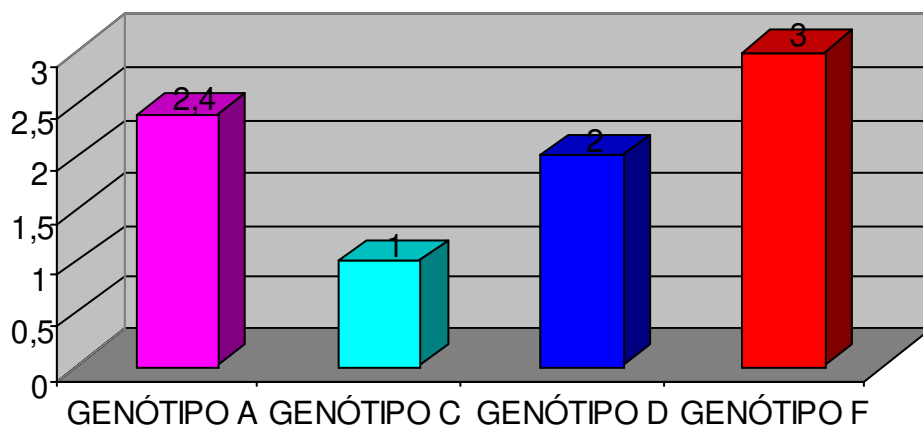


Figura 10- Estádio fibrose média de acordo com os genótipos do VHB. (p-valor = 0,1148)

Na **Tabela 4** encontram-se os resultados obtidos quando comparados os genótipos, os grupos HBeAg positivo e HBeAg negativo com o estágio de fibrose média. Observou-se que, no genótipo A, a fibrose média no grupo HBeAg positivo foi de 2,1 e no grupo HBeAg negativo foi de 2,8, e dos 25 pacientes genótipo A e HBeAg positivo 17 foram submetidos à biópsia hepática, enquanto no grupo HBeAg negativo dos 51 genótipo A HBeAg negativo 15 foram submetidos à biópsia hepática (p-valor = .0834).

Já no genótipo C, a média de fibrose do grupo HBeAg positivo foi 1 e no grupo HBeAg negativo não foi possível determiná-la, pois foi encontrado apenas um paciente pertencente ao grupo HBeAg negativo e em seu prontuário não constava biópsia hepática. Enquanto isto, no grupo HBeAg positivo foram encontrados três pacientes do genótipo C e 2 deles haviam sido submetidos à biópsia hepática.

No genótipo D, dos 12 pacientes HBeAg positivo oito foram submetidos à biópsia hepática e a média da fibrose foi de 2, enquanto no grupo HBeAg negativo dos 41, 20 foram submetidos à biópsia e a média também foi de 2 (p-valor = 0,9364).

No Genótipo F, no grupo HBeAg positivo 2 dos dois pacientes foram submetidos à biópsia e o estágio de fibrose foi de 3,5. Enquanto isto, no grupo HBeAg negativo em um dos quatro pacientes foi realizada a biópsia e o estágio de fibrose apresentado foi 2.

Quando comparado o estágio de fibrose entre o genótipo A e D no grupo HBeAg negativo notou-se que no genótipo A o estágio de fibrose (média do estágio de fibrose 2,8) é significativamente maior do que no genótipo D (média do estágio de fibrose 2,0) (p-valor=0,0179). Isto não foi observado no grupo HBeAg positivo.

Tabela 4- Estádio de fibrose média nos grupos HBeAg (+) e HBeAg (-), de acordo com o genótipo do VHB (n=65)

$P \leq 0,05$ = significativo

	HBeAg (+) (n=29)	Estágio Fibrose	HBeAg (-) (n=36)	Estágio Fibrose	P
GENÓTIPO A	n=17	2,1	n=15	2,8	0,0834
GENÓTIPO C	n=2	1	-	-	-
GENÓTIPO D	n=8	2	n=20	2	0,9364
GENÓTIPO F	n=2	3,5	n=1	2	-

Analisando a distribuição dos subtipos entre os diferentes genótipos pode-se observar que o subtipo mais prevalente dentre as 139 amostras sequenciadas e genotipadas foi o adw2 (67 amostras – 48,2%), sendo 64 do genótipo A e 3 do genótipo D. O subtipo ayw foi encontrado em 44,6% dos genótipos, sendo 50 do genótipo D e 12 no genótipo A. O genótipo F apresentou um único subtipo adw4 bom como o subtipo adr só foi encontrado no genótipo C.

Tabela 5- Distribuição dos subtipos entre os genótipos (n=139)

SUBTIPOS	GENÓTIPOS			
	A	C	D	F
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
adr		4		
adw2	64		3	
adw4				6
ayw	8		21	
ayw1	1			
ayw2	3		12	
ayw3			16	
ayw4			1	
Total	76	4	53	6

A **Figura 11** mostra os resultados da quantificação do DNA-VHB no soro em ambos os grupos (HBeAg positivo e HBeAg negativo. A carga viral (CV) plasmática do vírus B foi medida em 17 pacientes HBeAg positivos e em 53 pacientes HBeAg negativos. Como se pode notar, o grupo HBeAg positivo exibiu uma CV média significativamente maior que o grupo HBeAg negativo (p-valor < 0,0001).

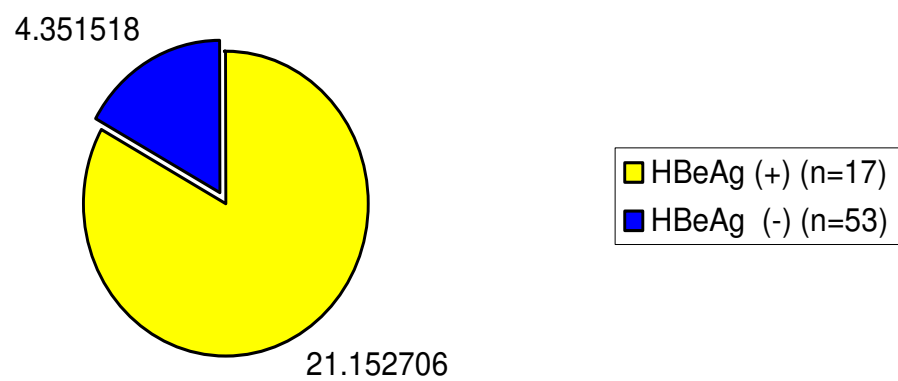


Figura 11- Carga viral média dos pacientes HBeAg positivo e HBeAg negativo (p-valor <0,0001)



5- DISCUSSÃO

É sugerido na literatura, como metodologia padrão ouro para a genotipagem do VHB a amplificação e o sequenciamento do genoma completo, seguido de análise filogenética (Bartholomeusz e Schaefer, 2004). Entretanto, este método consome um tempo excessivo, apresenta alto custo e requer programas altamente específicos para a análise e interpretação dos algoritmos.

Neste estudo, foi utilizada uma técnica que possibilita a amplificação e análise de seqüências da região “S” do genoma do VHB. Os primers utilizados foram desenhados considerando a porção mais conservada da região S que inclui o determinante “a” (Couroucé-Pauty et al., 1983). O limite de detecção do método da PCR utilizado é de 100 cópias/ml. O fragmento amplificado apresenta 417 pb que inclui praticamente toda a região S do VHB. Esta metodologia permite a identificação de todos os genótipos conhecidos (Norder et al., 1992a; Norder et al., 1992b; Sitnik et al., 2004), além dos subtipos e do epítipo “a”, o que não ocorre com outros métodos como o de enzimas de restrição (RFPL – Restriction Fragment Length Polymorphism) e o por hibridização reversa como LIPA (Line Probe Assay) .

A confiança na utilização de genes ou fragmentos de genes é diretamente proporcional ao grau de homologia das seqüências obtidas quando comparadas ao gene utilizado. Foram consideradas no presente estudo, apenas as seqüências que apresentavam homologia igual ou superior a 90%.

A amplificação do DNA-VHB foi possível em 150 (70%) das amostras dos pacientes com HBsAg positivo, acompanhados pelo Grupo de Estudos das Hepatites, que foram selecionados para o estudo. Os 65 (30%) pacientes cujo DNA-VHB não foi detectável pelo método utilizado, provavelmente apresentavam carga viral abaixo do limite de detecção da técnica ou já estavam em soroconversão, sendo então considerados portadores inativos do VHB. Nestes casos, como se sabe, pode haver apenas uma replicação viral residual.

Entre os trabalhos consultados e que mediram a positividade da PCR para a região “S” do VHB, observou-se que a mesma variou de 65% a 86%. (Arauz-Ruiz et al., 1997; Lanperche et al., 2001; Swenson et al., 2001; van Steenberg et al., 2002). Estes percentuais são semelhantes ao observado no presente estudo.

Houve predomínio de homens nesta casuística, talvez porque a maioria dos pacientes são diagnosticados pela doação de sangue. A idade média dos 130 indivíduos HBsAg positivo foi de $42 \pm 14,5$ anos. Quando observado os pacientes HBeAg positivo (Tabela 2) notou-se uma média de idade significativamente menor ($37 \pm 17,2$) do que a média dos pacientes HBeAg negativos ($44 \pm 12,7$). Isto provavelmente se associa à doença de mais longa data nos HBeAg negativos. Em uma população infectada há mais tempo normalmente surge um maior número de mutantes pré-core devido à pressão imunológica. (Carman et al., 1995; Carman et al., 1997). Os estudos mostram que a maioria destes indivíduos se infectaram há muitos anos e já passaram pelas fases de imunotolerância e estão na fase de imunoeliminação ou de portador inativo.

Observou-se o predomínio de caucasianos na população (84,2%), talvez refletindo o perfil de migração em nossa região. Só cerca de 15% eram representados por negros. Isto também pode estar associado a uma dificuldade na distinção das raças.

Do total de 139 pacientes, cerca de 60% apresentavam ALT elevada. Entre os pacientes HBeAg positivo, encontrou-se 57% com ALT elevada e entre os HBeAg negativo, 33%. Como se sabe, o paciente HBeAg positivo costuma apresentar maiores elevações de ALT séricas do que os HBeAg negativo, pois nestes ocorrem flutuações leves, decorrentes de uma menor viremia presente nos mesmos. Este fato foi comprovado quando se comparou a carga viral do DNA – VHB que foi cerca de cinco vezes maior entre os HBeAg positivo em relação entre pacientes com HBeAg negativo.

Essa maior taxa de replicação, com provavelmente maior grau de inflamação nos pacientes HBeAg positivo também foi observada em estudos anteriores (Chu et al., 1985; Bonino e Bruneto, 2003; Tsugen et al., 2002; Hoofnagle et al., 1981). A ALT média dos pacientes HBeAg positivo foi de 2,5 contra 1,8 nos HBeAg negativo o que poderia refletir um maior grau de inflamação.

Na **Tabela 1** nota-se que do ponto de vista de classificação clínica, do total de pacientes HBsAg positivos, encontrou-se 60% de portadores inativos contra 40% de pacientes com hepatite crônica. Na **Tabela 2** foi observado, também, que dos 56 pacientes com hepatite B crônica (HBsAg positivo, DNA-VHB positivo e ALT aumentada), 24 (43%) eram HBeAg reagente e 32 (57%) HBeAg negativo. Isto mostra que é alto o percentual de casos de hepatite B crônica HBeAg negativo na população estudada.

Em outros trabalhos consultados, também encontra-se uma considerável diferença, entre o percentual de pacientes HBeAg positivo e HBeAg negativo, sempre com uma maior prevalência dos HBeAg negativo que variou de 52,5% à 63,3% (Tsugeno et al., 2002; Lim et al., 2006; Resende et al., 2005; Yoo et al., 2003). Estes dados também foram observados em outro estudo do Brasil, onde 58% dos pacientes eram HBeAg negativo (Resende et al., 2005). Os resultados do presente estudo mostraram que cerca de 30% da população de pacientes era HBeAg positivo e que 70% era HBeAg negativo. Talvez a maioria dos pacientes com infecção pelo VHB tenha se infectado há muito tempo, sem apresentarem sintomas e muitos pela descendência italiana, por exemplo, ter se infectado ao nascimento (Lindh et al., 1997; Chu et al., 2003).

Em relação à intensidade de lesão hepática não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos, embora os HBeAg negativo, geralmente, se associem com doença hepática mais antiga. Normalmente por apresentarem menores cargas virais, e, portanto menor replicação, isto talvez justifique a presença de a lesão hepática menos intensa.

Também não foram observados maiores estádios de fibrose hepática quando se confrontou os vários genótipos (Figura 10). No entanto, ao se analisar o estágio de fibrose, de acordo com a presença ou ausência do HBeAg, notou-se que entre os pacientes HBeAg negativo infectados pelo genótipo A houve um maior grau de fibrose do que os HBeAg negativo infectados pelo genótipo D.

Os genótipos do VHB e, em menor extensão os subtipos, têm uma distribuição geográfica característica (Couroucé-Pauty et al., 1983; Norder et al., 1993; Arauz-Ruiz et al., 1997). O genótipo A foi o mais prevalente entre os pacientes, sendo este o genótipo mais encontrado no Norte da Europa, EUA e África na região do baixo Saara (Norder et al., 1993; Lindh et al., 1997; Mbayed et al., 1998; Norder et al., 1994; Okamoto et al., 1988; Sitnik et al., 1999; Sitnik et al., 2004; Rodrigues-Frias et al., 1995). Como se sabe estas áreas são fonte de imigrantes para os países da América do Sul, incluindo o Brasil.

Em estudos brasileiros o genótipo A foi o mais prevalente no Rio de Janeiro (50% genótipo A, 46,2% genótipo D e 3,8% genótipo F; n = 26), Pará (89,1% genótipo A, 8,7% genótipo F e 2,2% genótipo D; n = 51) e Santa Catarina (Teles et al., 1999; Conde et al., 2004; Moraes et al., 1996). Em outros dois trabalhos que estimaram a distribui o nacional do VHB, o genótipo A (58,6% e 55%) também foi o predominante (De Castro et al., 2001; Sitnik et al., 2004). O genótipo A, também, foi o único genótipo encontrado em comunidades afro-brasileiras (Motta-Castro et al., 2005).

Apesar da baixa prevalência, o genótipo C foi encontrado em quatro dos pacientes; dois deles pertenciam à etnia amarela e os outros dois eram caucasianos. O genótipo C é o mais prevalente no Leste Asiático, e, também, em algumas regiões do Sudeste da Ásia, onde o genótipo B predomina (Norder et al., 1993; Theamboonlers et al., 1998; Lindh et al., 1999; Kao et al., 2000; Alestig et al., 2001; Li et al., 2001; Orito et al., 2001a, 2001b; Sakai et al., 2001; Can et al., 2002; Kao et al., 2002; Kobayashi et al., 2002). No Brasil o genótipo C, também, foi encontrado em um estudo realizado em amostras de pacientes de todo o país, principalmente no estado do Paraná com uma prevalência de 13% (Sitnik et al., 2004; Bertolini et al., 2002). Em dois pacientes infectados com o genótipo C, sem origem asiática, não foi possível determinar a fonte de infec o.

O genótipo D largamente distribuído em várias regiões do mundo foi o segundo mais prevalente em nossa popula o. Como se sabe é o genótipo predominante na área do Mediterrâneo, sendo também encontrado em alta freqüência no sul da Ásia e nos Estados Unidos (Norder et al., 1993). No Brasil, o genótipo D foi encontrado por outros autores, como o de maior prevalência na região central com prevalência de 66,7% e 56,5% (Teles et al., 2002; Rezende et al., 2005) e em pacientes hemodialisados de 22 Centros de

Hemodiálise de Santa Catarina com frequência: 57,1% genótipo D, 30,6% genótipo A e 12,2% F; ntotal = 65. (Carrilho et al., 2004).

Apesar de o genótipo F ser considerado o genótipo mais importante na população de ameríndios no Novo Mundo (Norder et al., 1993), neste estudo, nenhum dos seis pacientes que apresentaram esse genótipo pertenciam a este grupo étnico indígena. Este fato também foi observado no Paraná (Bertolini et al., 2002), e foi muito distinto do observado em outras regiões da América Latina, como na Argentina, onde a prevalência do genótipo F é de 64% (França et al., 2004). Estes dados são similares aos encontrados na Venezuela (Blitz et al., 1998; Nakano et al., 2001) e América Central (Arauz-Ruiz et al., 1997).

Embora exista uma íntima relação entre subtipos e genótipos do VHB, vários subtipos podem ser encontrados dentro da mesma classificação genotípica (Norder et al., 1992a; Blitz et al., 1998; Swenson et al., 2001; Norder et al., 2004).

A comparação dos subtipos com os genótipos obtidos em nosso estudo, apresentou plena concordância com classificações da literatura (Norder et al., 1992b; Blitz et al., 1998; Norder et al., 2004), onde se pode verificar que todas as seqüências adw pertenciam ao genótipo C, enquanto nos genótipos A e D encontramos os subtipos adw e ayw. Em todos os nossos pacientes com genótipo F só foram encontradas seqüências adw4.

Segundo outro estudo (Norder et al., 2004), o encontro do subtipo ayw na seqüência do genótipo A do VHB se relaciona à origem africana A1. Neste trabalho, também observou-se esse fato em 12/76 (16%) pacientes que exibiam o subtipo ayw. Talvez se possa inferir que esses 16% dos pacientes com este genótipo sejam originários da África e, portanto respondem muito mal ao tratamento com interferon, como tem sido relatado em outros estudos (Enomoto et al., 2006).

Foi encontrado o subtipo adr em 100% dos pacientes infectados como genótipo C, normalmente relacionados com migração chinesa/asiática.

No mundo, os subtipos estão distribuídos geograficamente sendo mais ou menos prevalentes em determinadas áreas, como se pode notar na **Tabela 6**.

Tabela 6- Distribuição mundial dos subtipos

ayw1	Vietnã (51%)
ayw2	países do Mediterrâneo (73%) África Central (42%) Grécia e Iugoslávia (41%)
ayw3	Índia (35%) Grécia e Iugoslávia (54%) América do Sul (35%) América do Norte (74%) Antilhas (82%)
ayw4	África Ocidental (82%)
ayr	Vietnã (3,4%)
adrq	Polinésia Francesa (34%)
adrq+	Sul – Leste Asiático (mais prevalente)
adw2	Centro e Norte Europeu (70%) Leste da África do Sul (95%)
adw4	Polinésia Francesa (45%) Arquipélago de Marquesa (100%) Argentina (42%)

(Courouce-Pauty et al., 1983)

Em nosso estudo o subtipo adw (52,5%) foi o mais comum. Ele já havia sido observado como o subtipo mais prevalente em outros estudos (69,4% e 59%), realizados em diferentes regiões brasileiras (Gaspar et al., 1987; Souto et al., 2001).

Como já descrito todas as seqüências adr eram de pacientes com descendência ou origem asiática (Sitnik et al., 2004; Bertolini et al., 2002), com exceção de duas seqüências de pacientes que não apresentava essa origem.

A alta incidência do subtipo ayw (44,6%) na região estudada pode ser explicada pela grande influência da imigração italiana, uma vez que, na Itália, o subtipo mais prevalente é o ayw2 (62,7%) (Coroucé et al., 1983).

O estudo dos genótipos além de caracterizar o tipo viral predominante permitiu a nós termos considerações sobre processos migratórios de diferentes populações. A maior prevalência do genótipo A e uma possível menor prevalência do subtipo africano permite considerações importantes sobre a escolha da terapêutica. Os genótipos A africanos respondem pior à terapia com interferon do que os pacientes com genótipo A, originário da Europa. Isto pode auxiliar o clínico na decisão terapêutica mais apropriada (Enomoto et al., 2006).

O genótipo D, como se sabe, apresenta alto percentual de cepas com mutação pré-core e sua presença em nosso meio pode ser entendida como um importante fator desencadeante de hepatite B HBeAg negativa, principalmente nos brasileiros com hepatite B que tenham ascendentes na região do Mediterrâneo.



6- CONCLUSÃO

1. As técnicas de amplificação e seqüenciamento utilizados em nosso estudo para detecção e genotipagem do vírus da hepatite B foram eficientes e podem ser utilizadas em investigações clínicas e epidemiológicas. Foram amplificadas e genotipadas a maioria (70%) das amostras positivas para o HBsAg;
2. O genótipo A foi o mais prevalente em pacientes da nossa região (55%) seguido pelo genótipo D (38%), pelo genótipo F (4%) e pelo genótipo C (3%);
3. Houve predomínio de pacientes HBeAg negativo (70%). Também foi observado o predomínio de pacientes com hepatite crônica em atividade no grupo HBeAg positivo (57%) e a carga viral média deste grupo foi cerca de cinco vezes maior quando comparada ao grupo HBeAg negativo.
4. Entre pacientes com genótipo A foi observada provável ascendência africana em 16% dos casos. Metade dos pacientes infectados pelo genótipo C apresentou ascendência asiática sendo a outra metade encontrada em caucasianos, o que não é habitualmente descrito. Todos os infectados pelo genótipo F eram caucasianos em contraste com o encontro habitual deste genótipo em populações indígenas, em levantamentos realizados em outras regiões brasileiras;
5. Os genótipos apresentaram distribuição semelhante nos pacientes HBeAg positivo ou negativo. E entre os pacientes HBeAg negativo infectados pelo genótipo A houve maior grau de fibrose que nos infectados pelo genótipo D.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alestig E, Hannoun C, Horal P, Lindh M. Hepatitis B virus genotypes in Mongols and Australian Aborigines. *Arch Virol* 2001; 146:2321-29.

Araújo NM, Mello FCA, Yoshida CN, Gomes AS. High proportion of subgroup A (Genotype A) among Brazilian isolates of hepatitis B virus. *Arch Virol* 2004; 149:1383-1395.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnus LO. Genotype F prevails in VHB infected patients of hispanic origin in Central América and may carry the precore stop mutant. *J Med Virol* 1997; 51:305-312.

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

Avellón A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus “a” determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J Med Virol* 2006; 78:24-36.

Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004; 14:3-16.

Bedossa P, Poybard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative study group. *Hepatology* 1996, 24(2): 289-93.

Bertolini DA. Estudo da prevalência do vírus da hepatite b e dos seus genótipos no estado do Paraná, Brasil [Tese – Doutorado]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2002.

Blitz L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, Araujo M et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strain of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3):648-651.

Bonino F, Brunetto MR. Chronic HBeAg negative, anti-HBe positive Hepatitis B: An overview. In: EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. *J Hepatol* 2003;38:533-540.

Bowyer SM, van Staden L, Kew MC, Sim JGM. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. *J Gen Virol* 1997; 78:1719-1729.

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera. *Jama* 1965; 191: 541-546.

Blumberg BS, Sutnick AI, London WT. Australia antigen and hepatitis. *Jama* 1969; 207: 1895-1896.

Carman WF, Anetti AR, Karayiannis P, Water J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336:325-9.

Carman WF, Thursz M, Hadziyannis S, McIntyre G, Colman K, Gioustoz A, et al. Hepatitis B e antigen negative chronic active hepatitis: hepatitis B virus core mutations occur predominantly in known antigenic determinants. *J Viral Hepat* 1995; 2:77-82.

Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1997; 4(1):11-20.

Carman WF, Boner W, Fattovich G, Colman K, Dornan ES, Thursz M, et al. Hepatitis B virus core protein mutation are concentrated in B cell epitopes in progressive disease and helper T cell epitopes during clinical remission. *J Infect Dis* 1997;175:1093-1100.

Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JRR, Mello IMVGC, Bertolini DA, Lemos MF, Moreira RC, Bassit LC, Cardoso RA, Ribeiro-Santos G, Da Silva LC. Hepatitis B vírus infection in haemodialysis centers from Santa Catarina state, Southern Brazil: Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health* 2004; 4:13-23.

Chan HL, Ghany MG, Lok ASF. Hepatitis B. In: Schiff E R, Sorrell MF, Maddrey WC. *Disease of the liver*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999 p.757-91.

Chan HL-Y, Tsang SW-C, Liew C-T, Tse C-H, Wong M-L, Ching JY-L et al. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 98(2):406-412.

Chan HL, Wong ML, Hui AY, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B Virus Genotype C Takes a More Aggressive Disease Course Than Hepatitis B Virus Genotype B in Hepatitis B e Antigen-Positive Patients. *J. Clin Microb* 2003; 41:1277-1279.

Chiou HL, Lee TS, Kuo J, Mau YC, Ho MS. Altered antigenicity of “a” determinat variants of hepatitis B virus. *J Gen Virol* 1997; 78:2639-2645.

Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJF, Monjardino J, Liaw YF, Thomas HC. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: studies os hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 1985; 5:431-434.

Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, et al. Hepatitis B virus genotypes in the United States: Results of a nationwide study. *Gastroenterology* 2003; 125:444-51.

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

Conde SRSS, Moia LJP, Barbosa MSB, Amaral ISA, Miranda ECBM, Soares MCP, Brito EMF, Souza OSC, Araújo MT, Demachki S, Rebello JRP, Mesquita MGS, Bertolini DA, Ishak R. Prevalência dos genótipos e de mutantes pré-core A-1896 do vírus da hepatite B e suas implicações na hepatite crônica, em uma população da Amazônia oriental. *Rev Soc Brasileira Med Tropical* 2001; 37:33-39.

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

Couroucé-Pauty AM, Holland PV, Muller JY, Soulier JP. HBs Antigen Subtypes: *Bibliotheca Hematológica* 1976; 42:1.

Couroucé-Pauty AM, Lemaire JM, Roux JF. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category, 1978; 304-308.

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

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet 1970; 1:695-698.

De Castro L, Niel C, Gomes SA. Low frequency of mutations in the core promoter and precore regions of hepatitis b virus in anti-HBe positive Brazilian carriers. BMC Microbiology 2001; 1:10-18.

De Meyer S, Gong ZJ, Suwandhi W, van Pelt J, Soumillon A, Yap SH. Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: A review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. J Viral Hepatol 1997; 4:145-53.

Decker RH. Diagnosis of Acute and Chronic Hepatitis B. In Zuckerman, A.J.; Thomas H.C., editors. Viral Hepatitis. Churchill Livingstone; 1998. p.201-215.

Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis diagnosis, grading and staging. Hepatol 1994; 19:1513-20.

Emomoto M, Tamori A, Nishiguchi S. Hepatitis B virus genotypes and response to antiviral therapy. Clin Lab 2006; 52(1-2):43-7.

Fattovich G, Brollo L, Giustina G, Noventa F, Pontisso P, Alberti A, Realdi G, Ruol A. Natural History and Prognostic Factors of Chronic Hepatitis Type B. Gut 1991; 332:294-298.

Fattovich, G. Natural History of Hepatitis B. In: In: EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. J.Hepatol 2003; 38:533-540.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of viruslike antigen associated with acute illness. Science 1982; 182:1026-28.

Focaccia R, Andrade DR. Hepatite B In: Veronesi R. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1995 p.132-155.

França PHC, González JE, Munné MS, Brandão LH, Gouvêa VS, Sablon E, Vanderbought BOM. Strong association between genotype F and hepatitis B vírus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected Argentinean blood donors. J Clin Microbiology 2004; 42:5015-21.

Fujii H, Moriyama K, Sakamoto N, Kondo T, Yasuda K, Hiraizumi Y et al. Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. Biochen Biophys Res Commun 1992; 184(3):1152-1157.

Gaspar AM, Yoshida CFT. Geographic distribution of HBsAg subtypes in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82(2):253-258.

Gayotto LCC, Comitê SBP/SBH. - Visão histórica e consenso Nacional sobre classificação das hepatites crônicas. GED 2000;19(3):137-40.

Gonçales Junior FL Hepatite B. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de Infectologia. São Paulo:1998. p.299-314.

Gonçales Junior FL História Natural da Infecção. Apresentação Clínica. Complicações. In: Focaccia R. Tratado de Hepatites Virais. São Paulo: Atheneu; 2003a. p.141-149.

Gonçales Junior FL, Gonçales NSL. História Natural da Infecção. Apresentação Clínica. Complicações. In: Focaccia R. Tratado de Hepatites Virais. São Paulo: Atheneu; 2003b. p.167-173.

Gonçales Junior FL, Pereira JSFP, Silva C, Thomaz GRT, Pavan MHP, Fais VC, Magna LA, Gonçales NSL. Hepatitis B virus DNA in sera of blood donors and patients infected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. Clin Diagn Lab Immun 2003c; 10:718-720.

Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA. Analysis of liver disease, nuclear HbcAg, viral replication and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HbeAg vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* 1983; 3(5):656-662.

Harrison TJ, Hopes EA, Oon CJ, Zanetti AR, Zuckerman AL. Independent emergence of a vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *J Hepatol* 1991; 13:5105-5107.

Hollinger FB. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM Howley PM. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.2149-2154.

Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Seeff LB, Jones EA, Waggoner JG, Bales ZB. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Ann Intern Med* 1981; 94:744-748.

Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1991; 11(2):73-83.

Hoofnagle JH. Challenges in Therapy of Chronic Hepatitis B. In: EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. *J.Hepatology* 2003; 38:533-540.

Kao J-H, Chen P-J, Lai M-Y, Chen D-S. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118:554-559.

Kao Jia-Horng. Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002;17:643-650.

Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and Sensitive Method for the Detection of Serum Hepatitis B Virus DNA Using the Polymerase Chain Reaction Technique. *J.of Clinical Microbiology* 1989; 27:1930-1933.

Karthigesu VD, Allison LMC, Fourtuin M, Mendy M, Whittle HC, Howard CR. A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children. *J Gen Virol* 1994; 75:443-448.

Kramvis A, Weitzmann L, Owiredo WK, Kew MC. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol* 2002; 83:835-839.

Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Saitoh S et al. Clinical characteristics of patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B and C. *J Gastroenterol* 2002; 37:35-39.

Koshy R, Hofschneider PH. Transactivation by hepatitis B virus may contribute to hepatocarcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989; 144:165-281.

Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N.Engl.J.Med* 1997;337(24):1733-45.

Lamperche S, Girault A, Beaulieu MJ, Bouchardeau F, Couroucé AM. Determination of hepatitis B virus subtypes by an enzyme immunoassay method using monoclonal antibodies to type-specific epitopes of HBsAg. *J Viral Hepat* 2001; 8:447-453.

Li KS, Yamashiro T, Sumie A, Terao H, Mifune K, Nishizono A. Hepatitis B virus harboring nucleotide deletions in the core promoter region and genotype B correlate with low replication activity in anti-HBe positive carriers. *J Clin Virol* 2001; 23:97-106.

Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wans JR, Ben-Porath E. A Hepatitis B Virus Mutant Associated With an Epidemic of Fulminant Hepatitis. *N.Engl. J.Med* 1991;13:1705-9.

Liaw YF, Chu CM, Su IJ, Huang MJ, Lin DY, ChangChien CS. Clinical and histological events preceding hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* 1983; 84:216-219.

Liaw YF, Sheen IS, Chen TJ, Chu CM, Pao CC. The incidence, determinants and significance of delayed clearance of serum hepatitis B surface antigen in chronic hepatitis B virus infection: A prospective study. *Hepatology* 1991;13:627-632.

Liberato MIM, Oliveira BCEPD, Cabral MC. Hepatitis Virais. In: Santos NOS. *Introdução a Virologia Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.135-144.

Lim CK, Tan JTM, Khoo JBS, Ravichandran A, Low HM, Chan YC, Tan SH. Correlations of HBV genotypes, mutations affecting HBeAg expression and HBeAg/anti-HBe status in HBV carriers. *Int J Med Sci* 2006; 3:14-20.

Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus: large-scale analysis using a new genotyping method. *Journal of Infectious Diseases* 1997; 175:1285-93.

Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999; 179(4):775-782.

Maccalum FO, Bradley WH. Transmission of infective hepatitis to human volunteers. *Lancet* 1944; 2:228.

Maccallum, FO. Homologous serum jaundice. *Lancet* 1947;2:691- 2.

Magnius LO, Espmark JA. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *Journal of Immunology* 1972; 109:1017-25.

Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virology* 1980; 36(3):829-36.

Mbayed VA, Lopez JL, Telenta PFS, Palacios G, Badia I, Ferro A, Galoppo C, Campos R. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. *J Clin Microbiology* 1998; 36:3362-3365.

McMahon G, Ehrlich PH, Moustafa ZA, McCarthy LA, Dottavio D, Tolpin MD, Nadler PI, Ostberg L. Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological analysis of recurrent HbsAg derived from monoclonal antibody treated liver transplant patients. *Hepatology* 1992; 15:757-766.

Moraes MT, Gomes SA, Niel C. Sequence analysis of pre S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brasil. *Arch Virol* 1996; 141(9):1767-73.

Motta-Castro ARC, Martins RMB, Yoshida CFT, Teles SA, Paniago AM, Lima KMB, Gomes SA. Hepatitis B virus infection in isolated afro-brasilian communities. *J Med Virol* 2005; 77:188-193.

Nakano T, Lu L, Hu X, Mizokami M, Orito E, Shapiro C, Hadler S, Robertson B. Characterization of hepatitis B virus genotypes among Yucpa Indians in Venezuela. *J Gen Virol* 2001;82:359-65.

Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF, Gaspar AM, Repp R, Gerlich WH. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol* 1993; 74:1627-1632.

Neurath AR, Thanavala Y. Hepadnaviruses. In: Van Regenmortel MHV, Neurath AR. *Immunichemistry of virusis II: the basis for serodiagnosis and vaccines*. Amsterdam: Elsevier; 1990. p.403-458.

Norder H, Hammas B, Lofdal S, Courouce AM, Magnius LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Virol* 1992a; 73:1201-1208.

Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992b; 73:3141-45.

Norder H, Hammas B, Lee SD, Courouce AM, Mushahwar IK, Magnius LO. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains with diverse geographic origin and natural variation in the primary structure of hepatitis B surface antigen. *J Gen Virol* 1993; 74:1341-1348.

Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489-503.

Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Interv* 2004; 47:289-309.

Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakama Y, Mayumi M. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus ofr a d/y ou w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface a antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* 1987; 61(10):3030-3034.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastroewignojo RI, Sastroewignjo RI, Imai M, et al. Typing Hepatitis B Virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. J Gen Virol 1988; 69:2575-2583.

Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, Matsui A, Miyazaki H, Yamamoto et al. Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine. Pediatr Res 1992; 32(3):264-268.

Orito E, Mizokami M, Sakigawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Hepatology 2001a; 33:218-223.

Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horike N, Hino K et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic VHB infection in Japan. Hepatology 2001b; 34:590-594.

Owiredu WK, Kramvis A, Kew MC. Molecular analysis of hepatitis B virus genomes isolated from black African patients with fulminant hepatitis B. J Med Virol 2001; 65:485-492.

Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc.Natl.Acad.Sci 1968; 60: 814-821.

Realdi G, Albert M, Rugge M, Bortolotti F, Rigoli AM, Tremolada F, Ruol A. Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B virus infection. Gastroenterology 1980; 79:195-199.

Rezende REF, Fonseca BAL, Ramalho LN, Zucoloto S, Pinho JRRP, Bertolini DA, Martinelli ALC. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. J Clin Virol 2005; 32:53-59.

Rodrigues-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, Guardia J. Hepatitis B virus infection: Precore mutants and relation to viral genotypes and core mutants. Hepatology 1995; 22:1641-1647.

Sakai T, Shiraki K, Sugimoto K, Ohmori S, Murata K, Takase K et al. Hepatitis B genotypes in patients with acute hepatitis B virus infection [letters]. J Hepatol 2001; 35(6):829-830.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS 1977; 74:5463-5467.

Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. J Viral Hepat. 2005;12(2):111-24.

Sitnik R, Pinho JRR, Silva LC, Fonseca LEP, Carrilho FJ, Bernardini AP. Genótipos do vírus da hepatite B e mutações na região pré-core (VHB) em pacientes brasileiros com hepatite crônica B. In: Resumo na GED 1999;18(1):S25.

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

Souto FJ, Fontes CJF, Gaspar AMC. Prevalence of hepatitis B and C virus markers among Malaria-exposed gold miners in Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96:1-5.

Stirk HJ, Thornton JM, Howard CP. A topological model for hepatitis B surface antigen. Intervirology 1992; 33:148-158.

Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, Rossau R. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. J.Clin.Microbiol. 2000; 38: 702-7.

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

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

Swenson PD, Geyt CV, Alexander ER, Hagan H, Freitag-Koontz JM, Wilson S et al. Hepatitis B virus genotypes and HBsAg subtypes in refugees and injection drug users in the United States determined by LIPA and Monoclonal EIA. J Med Virol 2001; 64:305-311.

Tabachnick BG, Fidell LS. Using Multivariate Statistics. 4^a ed. Allyn&Bacon. Needham Heights. MA. USA 2001.

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

Teles AS, Martins RM, Gomes AS, Gaspar AM, Araújo NM, Souza KP, Carneiro MA, Yoshida CF. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: serological and molecular follow-up. J Med Virol 2002; 68(1):41-9.

Theamboonlers A, Tangkijvanich P, Pramoolsinsap C, Poovorawan Y. Genotypes and subtypes of hepatitis B virus in Thailand. Southeast Asian. J Trop Med Public Health 1998; 29(4):786-791.

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

Tsugeno H, Yamada G, Kinoshita M, Shimomura H, Iwasaki Y, Tsuji T. Quantitative analysis of wild-type and precore mutant hepatitis B vírus in carriers. Hepatology 2002; 23:48-54.

Uy A, Bruss V, Gerlich WH, Kochel HG, Thomssem R. Pre core sequences of hepatitis B virus inducing e antigen and membrane association of the viral core protein. Virology 1986; 155:89-96.

van Steenbergen JE, Niesters HGM, op de Coul ELM, van Doornum GJJ, Osterhaus ADE, Leentvaar-Kuijpers A et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Amsterdam 1992-1997. J Med Virol 2002;66:159-165.

Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, Zucherman AJ, Harrison T. The Complete Nucleotide Sequence of the Genome of a Hepatitis B Virus Isolated from a Naturally Infected Chimpanzee. *J.Gen.Virol* 1988; 69:1383-9.

Whalley SA, Murray JM, Brown D, Webster GJM, Emery VC, Dusheiko GM, Perelson AS. Kinetics of Acute Hepatitis B Virus Infection in Humans. *J.Exp Med* 2001; 193:847-853.

Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 2005; 32:102-112.

Wei Y, Fourel G, Renard C-A, Buendia M-A, Tiollais P. Hepatitis B viruses and hepatocellular carcinoma. In: *Viral hepatitis A to F: an update*. Chicago: American Association for the Study of Liver Diseases, 1994.

Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, et al. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B with various mutation in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol* 1994; 68:2671-6.

Yim, HJ, Lok AS-F. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: What we knew in 1981 and what we know in 2005. *HEPATOLOGY* 2006; 43:S173-S181.

Yoo BC, Park J, Kim HJ, Lee DH, Chan YJ, Park SM. Precore and Core Promoter Mutations of Hepatitis B Virus and Hepatitis B e Antigen-Negative Chronic Hepatitis B in Korea. *J.Hepatol* 2003; 38:98-103.

Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, Trépo C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of Hbe antigen negative chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1996; 48(1):8-16.

Zuckerman J, Zuckerman AJ. Hepatitis viruses and TT virus. In: *Leidingan JGG, Warrel DDA. Concise oxford textbook of medicine*. New York: Oxford Press; 2000. p.1553-55.

<http://www.cdc.gov/>



8- ANEXOS



UNICAMP

CEP, 28/06/05.
(Grupo III)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-7187

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

📧 cep@fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: N° 108/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE MOLECULAR DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE B ISOLADOS EM PACIENTES DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Priscila Aparecida Tonetto

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas - UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 21/03/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/06/06

II - OBJETIVOS

Determinar os genótipos presentes nas infecções pelo VHB dos pacientes atendidos pelo GEHEP. Caracterizar clínica e laboratorialmente a população de pacientes infectados pelo VHB em nossa área.

III - SUMÁRIO

O projeto é um estudo com a determinação por PCR do VHB no sangue do paciente, a seguir será determinada a quantificação do DNA, quando positiva a presença do vírus. Uma vez quantificado o material será genotipado e posteriormente analisado o sequenciamento para identificar as mutações.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O Projeto de Pesquisa está bem elaborado. A pesquisa não apresenta quaisquer riscos para os participantes; sendo que o benefício é auxiliar no tratamento do paciente uma vez que, dependendo do genótipo, existe um tipo de severidade da doença. Não haverá nenhum tipo de ajuda de custo ou auxílio aos pacientes que optarem por participar do projeto. Apresenta bibliografia básica condizente com o propósito da pesquisa. Apresenta orçamento de custos zero, e informa que o projeto não obteve verba de nenhuma instituição de amparo à pesquisa, pois, os materiais necessários são de uso comum da rotina do laboratório de pesquisa.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter

aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de junho de 2005.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

De: Câmara de Pesquisa – Estatística / FCM

Para: Priscila A.Tonetto – Clínica Médica

Data: 18/Abr/2006

**ANÁLISE MOLECULAR DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE B EM
PACIENTES DO ESTADO DE SÃO PAULO, SUDESTE DO BRASIL.**

Objetivos

Descrever o grupo estudado.

Comparar as variáveis entre grupos formados por HBeAg positivo e negativo.

Comparar o grau de fibrose entre genótipos e grupos.

Metodologia Estatística

Análise descritiva através de tabelas de frequências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas.

Para verificar associação ou comparar proporções foi utilizado o teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher, quando necessário.

Para comparação de medidas contínuas ou ordenáveis entre 2 grupos foi aplicado o teste de Mann-Whitney.

A análise de regressão logística múltipla foi utilizada para comparar os genótipos entre os grupos, ajustando para as variáveis idade, sexo e raça.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%.

Resultados

Quadro 1 – Análise descritiva geral.

Sexo

SEXO	Frequency	Percent	Cumulative Frequency

F	50	35.97	50
M	89	64.03	139

Idade

N	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
139	42.0	14.5	6.3	42.3	79.3

Raça

raca	Frequency	Percent	Cumulative Frequency

A	2	1.44	2
C	117	84.17	119
N	7	5.04	126
P	13	9.35	139

Provável via de transmissão

TRANSM	Frequency	Percent	Cumulative Frequency

D	85	61.15	85
P	28	20.14	113
S	15	10.79	128
V	11	7.91	139

Genótipos

GENOTIPO	Frequency	Percent	Cumulative Frequency

A	76	54.68	76
C	4	2.88	80
D	53	38.13	133
F	6	4.32	139

Lesão

qalt_c	Frequency	Percent	Cumulative Frequency

hep cronica	56	40.29	56
inativo	83	59.71	139

qALT

N	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
139	2.0	3.1	0.2	1.0	22.0

HBeAg

HBeAg	Frequency	Percent	Cumulative Frequency

NR	97	69.78	97
R	42	30.22	139

Quadro 2 – Análise descritiva e comparação das variáveis entre categorias de HBeAg.

SEXO				HBeAg		p-valor=0.1139 (Qui-quadrado)			
quadrado)									
Frequency									
Percent									
Col Pct				NR		R		Total	
F				39		11		50	
				28.06		7.91		35.97	
				40.21		26.19			
M				58		31		89	
				41.73		22.30		64.03	
				59.79		73.81			
Total				97		42		139	
				69.78		30.22		100.00	

Raça				HBeAg		p-valor=0.9319 (Qui-quadrado)			
raca									
Frequency									
Percent									
Col Pct				NR		R		Total	
C				83		34		117	
				60.58		24.82		85.40	
				85.57		85.00			
P+N				14		6		20	
				10.22		4.38		14.60	
				14.43		15.00			
Total				97		40		137	
				70.80		29.20		100.00	
Frequency Missing = 2									

Genótipos				HBeAg		p-valor=0.1138 (Fisher)			
GENOTIPO									
Frequency									
Percent									
Col Pct				NR		R		Total	
A				51		25		76	
				36.69		17.99		54.68	
				52.58		59.52			
C				1		3		4	
				0.72		2.16		2.88	
				1.03		7.14			
D				41		12		53	
				29.50		8.63		38.13	
				42.27		28.57			
F				4		2		6	
				2.88		1.44		4.32	
				4.12		4.76			
Total				97		42		139	
				69.78		30.22		100.00	

p-valor ajustado para idade, sexo e raça por análise de regressão logística múltipla = 0.6949									
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Idade											
HBe											
Ag		N		Média		dp		Mínimo		Mediana	
Máximo											
NR		97		44.1		12.7		10.3		43.3	
71.3											
R		42		36.9		17.2		6.3		33.3	
79.3											
p-valor=0.0055 (Mann-Whitney)											

Provável via de transmissão					
TRANS * HBeAg p-valor=0.1324 (Qui-quadrado)					
*excluindo Vertical					
Frequency					
Percent					
Col Pct					
NR		R		Total	
D		69		16	
		53.91		12.50	
		71.13		51.61	
P		18		10	
		14.06		7.81	
		18.56		32.26	
S		10		5	
		7.81		3.91	
		10.31		16.13	
Total		97		31	
		75.78		24.22	
				128	
				100.00	

Lesão					
galt_c HBeAg p-valor=0.0077 (Qui-quadrado)					
Frequency					
Percent					
Col Pct					
NR		R		Total	
hep cronica		32		24	
		23.02		17.27	
		32.99		57.14	
inativo		65		18	
		46.76		12.95	
		67.01		42.86	
Total		97		42	
		69.78		30.22	
				139	
				100.00	

qALT <table><tr><td>HBe</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Ag</td><td>N</td><td>Média</td><td>dp</td><td>Mínimo</td><td>Mediana</td></tr><tr><td>Máximo</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>NR</td><td>97</td><td>1.8</td><td>3.1</td><td>0.2</td><td>0.9</td></tr><tr><td>22.0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>R</td><td>42</td><td>2.5</td><td>3.0</td><td>0.7</td><td>1.4</td></tr><tr><td>15.0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> p-valor=0.0005 (Mann-Whitney)	HBe						Ag	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo						NR	97	1.8	3.1	0.2	0.9	22.0						R	42	2.5	3.0	0.7	1.4	15.0						Carga viral <table><tr><td>HBe</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Ag</td><td>N</td><td>Média</td><td>dp</td><td>Mínimo</td><td>Mediana</td></tr><tr><td>Máximo</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>NR</td><td>53</td><td>4351517.7</td><td>11552484.0</td><td>0.0</td><td>8000.0</td></tr><tr><td>40000000.0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>R</td><td>17</td><td>21152705.9</td><td>17258227.2</td><td>36000.0</td><td>16000000.0</td></tr><tr><td>40000000.0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> p-valor<0.0001 (Mann-Whitney)	HBe						Ag	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo						NR	53	4351517.7	11552484.0	0.0	8000.0	40000000.0						R	17	21152705.9	17258227.2	36000.0	16000000.0	40000000.0																																				
HBe																																																																																																																				
Ag	N	Média	dp	Mínimo	Mediana																																																																																																															
Máximo																																																																																																																				
NR	97	1.8	3.1	0.2	0.9																																																																																																															
22.0																																																																																																																				
R	42	2.5	3.0	0.7	1.4																																																																																																															
15.0																																																																																																																				
HBe																																																																																																																				
Ag	N	Média	dp	Mínimo	Mediana																																																																																																															
Máximo																																																																																																																				
NR	53	4351517.7	11552484.0	0.0	8000.0																																																																																																															
40000000.0																																																																																																																				
R	17	21152705.9	17258227.2	36000.0	16000000.0																																																																																																															
40000000.0																																																																																																																				
Estágio de fibrose <table><tr><td>HBe</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Ag</td><td>N</td><td>Média</td><td>dp</td><td>Mínimo</td><td>Mediana</td></tr><tr><td>Máximo</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>NR</td><td>35</td><td>2.3</td><td>1.1</td><td>0.0</td><td>2.0</td></tr><tr><td>4.0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>R</td><td>27</td><td>2.1</td><td>1.2</td><td>0.0</td><td>2.0</td></tr><tr><td>4.0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> p-valor=0.5386 (Mann-Whitney)	HBe						Ag	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo						NR	35	2.3	1.1	0.0	2.0	4.0						R	27	2.1	1.2	0.0	2.0	4.0						Grau de atividade <table><tr><td>HBe</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Ag</td><td>N</td><td>Média</td><td>dp</td><td>Mínimo</td><td>Mediana</td></tr><tr><td>Máximo</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>NR</td><td>37</td><td>2.4</td><td>0.9</td><td>1.0</td><td>2.0</td></tr><tr><td>4.0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>R</td><td>29</td><td>2.3</td><td>0.8</td><td>1.0</td><td>2.0</td></tr><tr><td>4.0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> p-valor=0.7417 (Mann-Whitney)	HBe						Ag	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo						NR	37	2.4	0.9	1.0	2.0	4.0						R	29	2.3	0.8	1.0	2.0	4.0																																				
HBe																																																																																																																				
Ag	N	Média	dp	Mínimo	Mediana																																																																																																															
Máximo																																																																																																																				
NR	35	2.3	1.1	0.0	2.0																																																																																																															
4.0																																																																																																																				
R	27	2.1	1.2	0.0	2.0																																																																																																															
4.0																																																																																																																				
HBe																																																																																																																				
Ag	N	Média	dp	Mínimo	Mediana																																																																																																															
Máximo																																																																																																																				
NR	37	2.4	0.9	1.0	2.0																																																																																																															
4.0																																																																																																																				
R	29	2.3	0.8	1.0	2.0																																																																																																															
4.0																																																																																																																				
Fibrose <table><tr><td>fibrosec</td><td>HBeAg</td><td colspan="3">p-valor=0.7251 (Qui-quadrado)</td></tr><tr><td>Frequency</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Percent</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Col Pct</td><td>NR</td><td>R</td><td colspan="2">Total</td></tr><tr><td>não sig</td><td>21</td><td>15</td><td colspan="2">36</td></tr><tr><td></td><td>33.87</td><td>24.19</td><td colspan="2">58.06</td></tr><tr><td></td><td>60.00</td><td>55.56</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>signif</td><td>14</td><td>12</td><td colspan="2">26</td></tr><tr><td></td><td>22.58</td><td>19.35</td><td colspan="2">41.94</td></tr><tr><td></td><td>40.00</td><td>44.44</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Total</td><td>35</td><td>27</td><td colspan="2">62</td></tr><tr><td></td><td>56.45</td><td>43.55</td><td colspan="2">100.00</td></tr></table> Frequency Missing = 4	fibrosec	HBeAg	p-valor=0.7251 (Qui-quadrado)			Frequency					Percent					Col Pct	NR	R	Total		não sig	21	15	36			33.87	24.19	58.06			60.00	55.56			signif	14	12	26			22.58	19.35	41.94			40.00	44.44			Total	35	27	62			56.45	43.55	100.00		fibrosec GENOTIPO <table><tr><td>Frequency</td><td colspan="4"></td></tr><tr><td>Percent</td><td colspan="4"></td></tr><tr><td>Col Pct</td><td>A</td><td>D</td><td>F</td><td>Total</td></tr><tr><td>não sig</td><td>14</td><td>20</td><td>1</td><td>35</td></tr><tr><td></td><td>22.95</td><td>32.79</td><td>1.64</td><td>57.38</td></tr><tr><td></td><td>46.67</td><td>71.43</td><td>33.33</td><td></td></tr><tr><td>signif</td><td>16</td><td>8</td><td>2</td><td>26</td></tr><tr><td></td><td>26.23</td><td>13.11</td><td>3.28</td><td>42.62</td></tr><tr><td></td><td>53.33</td><td>28.57</td><td>66.67</td><td></td></tr><tr><td>Total</td><td>30</td><td>28</td><td>3</td><td>61</td></tr><tr><td></td><td>49.18</td><td>45.90</td><td>4.92</td><td>100.00</td></tr></table> p-valor=0.0990 (Fisher)	Frequency					Percent					Col Pct	A	D	F	Total	não sig	14	20	1	35		22.95	32.79	1.64	57.38		46.67	71.43	33.33		signif	16	8	2	26		26.23	13.11	3.28	42.62		53.33	28.57	66.67		Total	30	28	3	61		49.18	45.90	4.92	100.00
fibrosec	HBeAg	p-valor=0.7251 (Qui-quadrado)																																																																																																																		
Frequency																																																																																																																				
Percent																																																																																																																				
Col Pct	NR	R	Total																																																																																																																	
não sig	21	15	36																																																																																																																	
	33.87	24.19	58.06																																																																																																																	
	60.00	55.56																																																																																																																		
signif	14	12	26																																																																																																																	
	22.58	19.35	41.94																																																																																																																	
	40.00	44.44																																																																																																																		
Total	35	27	62																																																																																																																	
	56.45	43.55	100.00																																																																																																																	
Frequency																																																																																																																				
Percent																																																																																																																				
Col Pct	A	D	F	Total																																																																																																																
não sig	14	20	1	35																																																																																																																
	22.95	32.79	1.64	57.38																																																																																																																
	46.67	71.43	33.33																																																																																																																	
signif	16	8	2	26																																																																																																																
	26.23	13.11	3.28	42.62																																																																																																																
	53.33	28.57	66.67																																																																																																																	
Total	30	28	3	61																																																																																																																
	49.18	45.90	4.92	100.00																																																																																																																

Quadro 3 – Análise descritiva e comparação do grau da fibrose.

GENOTIPO	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo		
A	30	2.5	1.2	0.0	3.0	4.0		
C	1	1.0	.	1.0	1.0	1.0		
D	28	2.0	1.0	0.0	2.0	4.0		
F	3	3.0	1.0	2.0	3.0	4.0		
p-valor=0.1016 (Mann-Whitney) comparando A e D								
GENOTIPO	HBe Ag	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
A	NR	14	2.9	1.2	0.0	3.0	4.0	0.0826
	R	16	2.1	1.1	1.0	2.0	4.0	
C	NR	0	.	.	.	.	.	-
	R	1	1.0	.	1.0	1.0	1.0	
D	NR	20	2.0	0.9	0.0	2.0	4.0	0.9364
	R	8	2.0	1.3	0.0	2.0	4.0	
F	NR	1	2.0	.	2.0	2.0	2.0	-
	R	2	3.5	0.7	3.0	3.5	4.0	
GENOTIPO	HBe Ag	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
A	NR	14	2.9	1.2	0.0	3.0	4.0	0.0139
	D	NR	20	2.0	0.9	2.0	4.0	
A	R	16	2.1	1.1	1.0	2.0	4.0	0.8730
	D	R	8	2.0	1.3	2.0	4.0	

Bibliografia

Conover, W.J. (1971). *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley & Sons Inc. Nova Iorque.

Tabachnick, B.G. e Fidell, L.S. (2001). *Using Multivariate Statistics*. 4ª ed. Allyn&Bacon. Needham Heights. MA. USA.

Programa Computacional

SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.1.3. SAS Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, USA.