



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Ludmila Oliveira Carvalho Sena

**GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE B EM
PACIENTES DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE.**

ARACAJU
2010

Ludmila Oliveira Carvalho Sena

**Genotipagem do Vírus da Hepatite B em pacientes
do Hospital Universitário da Universidade Federal de
Sergipe.**

Dissertação apresentada ao Núcleo de
Pós-Graduação em Medicina da
Universidade Federal de Sergipe como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alex Vianey Callado
França

ARACAJU
2010

LUDMILA OLIVEIRA CARVALHO SENA

GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE.

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alex Vianey Callado França

1ª Examinadora: Profa. Dra. Suzane Kioko-Ono Nita

2º Examinador: Prof. Dr. Hugo B. Leite

PARECER

[illegible]

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Tania Maria Oliveira Carvalho e Walbert Martins Carvalho, meus maiores exemplos de seres humanos e profissionais, e que sempre me apoiaram incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Prof. Dr. Alex Callado Vianey, pela dedicação, paciência, e pelas muitas lições aprendidas.

A meu esposo Marco Sena pelo apoio e carinho. Com você os obstáculos da minha vida tornam-se muito menos difíceis.

À Prof. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita por ter possibilitado a realização deste trabalho juntamente com a equipe do Laboratório de Investigação Médica da USP.

Aos amigos Paulo Nasser e Luciana Carvalho pelo tempo, carinho e paciência dedicados a esta pesquisa. Sem vocês nada disso seria possível.

A toda equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, principalmente a Elisabete, pela grande ajuda.

A meu primo Max Carvalho por me receber e me acompanhar durante a estadia em São Paulo.

A todos os pacientes que participaram deste trabalho pela disponibilidade e confiança.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O vírus da hepatite B foi classificado em oito genótipos que variam de acordo com a distribuição geográfica, apresentando diferentes manifestações clínicas e resposta ao tratamento anti-viral. **OBJETIVOS:** O estudo visa determinar a prevalência dos genótipos em Sergipe-Brasil, e avaliá-los de acordo com achados clínicos e histopatológicos.

METODOLOGIA: Em estudo transversal, foram avaliados 97 pacientes portadores crônicos do AgHBs com sinais de replicação viral. Destes, conseguiu-se amplificação do DNA em 43 amostras, as quais constituíram a casuística para realização de genotipagem. Foram, também, avaliados quanto à positividade do AgHBe, quantificação da carga viral (CV), aminotranferases (ALT) e avaliação histológica.

RESULTADOS: Foram identificados os genótipos A e F, sendo 35/43 (81,4%) do genótipo A. Vinte e cinco/43 pacientes (58,1%) apresentaram ALT normais, AgHBe negativo (23/43, 53,5%) e CV inferior a 10.000 cópias/ml (20/32 (62,5%). Nos pacientes com genótipo A, 20/32 (62,5%) apresentaram CV inferior a 10.000 cópias/ml enquanto o genótipo F, 5/7 (71,4%) apresentaram CV superior a 10.000 cópias/ml ($p=0,101$). Não houve diferença estatística entre genótipo viral e características histológicas.

CONCLUSÃO: Em Sergipe, foram descritos os genótipos A e F com predomínio do genótipo A. Não foram encontradas diferenças significantes entre os genótipos em relação às manifestações clínico-laboratoriais.

Palavras-chave: Hepatite B crônica, genótipo, correlações clínicas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The virus of hepatitis B was classified in eight genotypes that vary with geographic distribution, presenting different clinical manifestations and responses to anti-viral treatment. **PURPOSES:** This work intends to determine the prevalence of genotypes in Sergipe – Brasil and evaluate them according to clinical and histopathological findings.

METHODOLOGY: In a transversal search, were evaluated 97 patients, all of them AgHBs chronic porters, with traces of viral replication. From those patients, we got DNA's amplification in 43 samples, that formed the core to genotypical determination. Those were also evaluated on AgHBe positivity, viral load (CV) quantification, aminotransferases (ALT) and histological data.

RESULTS: The genotypes A and F, were identified, with 35/43 (81.4%) of genotype A. Twenty Five from 43 patients (58.1%) presented abnormal ALT level, AgHBe negative (23/43 – 53.5%) and CV below 10.000 copies/ml (20/32 – 62.5%). In the patients presenting genotype A, 20/32 (62.5%) presented CV below 10,000 copies/ml, but in those with the genotype F, 5/7 (71.4%) presented CV above 10,000 copies/ml ($p=0,101$). There was no statistic difference between viral genotype and histological findings.

CONCLUSION: In Sergipe, the genotypes A and F were found, but predominates the genotype A. Important differences were not found among the genotypes relatively to clinical and laboratorial findings.

Key-words: Chronic B Hepatitis, genotype, clinical correlations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial do VHB.....	18
Figura 2: Marcadores virais do VHB.....	22
Figura 3: Predominância dos genótipos do VHB no mundo.....	27
Figura 4: Distribuição dos genótipos no Brasil.....	29
Figura 5: Sequenciamento e locação da mutação dos aminoácidos TA e A1896.....	30
Figura 6: Esquema do DNA genômico do VHB.....	46
Figura 7: Foto do gel de agarose 1,5% demonstrando amplificações do DNA VHB.....	48
Figura 8: Sequência de genótipo A.....	50
Figura 9: Eletroferograma da sequência de DNA.....	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Correlações entre os Genótipos A, D e F e características clínicas e virológicas da Hepatite B.....	34
Quadro 2: Correlações entre os Genótipos A e características clínicas e virológicas da Hepatite B.....	35
Quadro 3: Correlações entre os Genótipos B e C e características clínicas e virológicas da Hepatite B.....	37
Quadro 4: Diferenças terapêuticas em pacientes com AgHBe positivo portadores de hepatite B crônica: Comparação entre os genótipos A e D.....	40
Quadro 5: Diferenças terapêuticas em pacientes com AgHBe positivo portadores de hepatite B crônica: Comparação entre os genótipos B e C.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Achados laboratoriais em 43 pacientes portadores do VHB	54
Tabela 2: Avaliação dos níveis séricos de ALT em relação à presença de AgHBe.....	54
Tabela 3. Relação entre os genótipos, carga viral e atividade inflamatória.....	56
Tabela 4. Relação entre os genótipos, carga viral e fibrose.....	56

Lista de abreviaturas

AgHBc - Antígeno do nucleocapsídeo do Vírus da Hepatite B

AgHBe - Antígeno “e” do vírus da hepatite

AgHBs - Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B

AgHBx - Antígeno “x” do vírus da hepatite

Anti-HBs - Anticorpo contra o antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B

Anti-HBe - Anticorpo contra o antígeno “e” do vírus da hepatite

Anti-HBc - Anticorpo contra o antígeno do nucleocapsídeo do Vírus da Hepatite B

ALT - Alanina aminotransferase

C1858 - Base C no nucleotídeo 1858

CH - Cirrose hepática

CHC - Carcinoma Hepatocelular

DNA - ácido desoxirribonucleico

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

G1896A - Substituição de uma base G por uma A na posição 1896

nm - Nanômetros

PCR - Reação em cadeia da polimerase

VHB - Vírus da Hepatite B

VHB/A - Genótipo A do Vírus da Hepatite B

VHB/Aa - Genótipo A subtipo Africano do Vírus da Hepatite B

VHB/Ae - Genótipo A subtipo Europeu do Vírus da Hepatite B

VHB/B - Genótipo B do Vírus da Hepatite B

VHB/Bj - Genótipo B subtipo Japonês do Vírus da Hepatite B

VHB/Ba - Genótipo B subtipo Asiático do Vírus da Hepatite B

VHB/C - Genótipo C do Vírus da Hepatite B

VHB/D - Genótipo D do Vírus da Hepatite B

VHB-DNA - Quantificação do DNA do Vírus da Hepatite B

VHB/E - Genótipo E do Vírus da Hepatite B

VHB/F - Genótipo F do Vírus da Hepatite B

VHB/G - Genótipo G do Vírus da Hepatite B

VHC - Vírus da Hepatite C

T1858 - Base T no nucleotídeo 1858

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1. Hepatite B -Epidemiologia.....	17
3.2. O vírus da hepatite B.....	19
3.3. Marcadores sorológicos.....	22
3.4. Classificação do VHB.....	24
3.5. Genótipos e distribuição mundial.....	26
3.6. Correlações entre genótipos com as manifestações clínicas e virológicas....	29
3.6.1. Genótipos e mutações.....	30
3.6.2. Genótipos e manifestações clínicas da hepatite B.....	32
3.7. Genótipos e resposta ao tratamento.....	38
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	43
4.1. Tipo de Estudo.....	43
4.2. Local do Estudo.....	43
4.3. População alvo.....	43
4.4. Critérios de Inclusão.....	44
4.5. Considerações éticas.....	45
4.6. Análise Estatística.....	45
4.7. Análise Laboratorial.....	45

4.7.1. Extração de DNA viral.....	46
4.7.2 .Desenho dos iniciadores.....	47
4.7.3. Amplificação por PCR.....	48
4.7.4. Purificação de fragmentos de PCR.....	50
4.7.5.Eletroforese.....	50
4.7.6. Sequenciamento de DNA.....	51
5.0.Resultados.....	53
6.0.Discussão.....	58
7.0.Conclusão.....	61
8.0.Referências Bibliográficas.....	62

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

474g Sena, Ludmila Oliveira Carvalho
Genotipagem do vírus da hepatite B em pacientes do Hospital
Universitário da Universidade Federal de Sergipe / Ludmila
Oliveira Carvalho Sena. – Aracaju, 2010.
72 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade
Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa,
Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

Orientador (a): Prof. Dr. Alex Vianey Callado França.

1. Hepatite B 2. Genótipo 3. Hepatologia I. Título

CDU 616.36-002

1.INTRODUÇÃO

A hepatite B é considerada um grave problema de saúde pública mundial. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a cada ano, existem mais de quatro milhões de pessoas apresentando doença aguda.

O VHB apresenta diferenças antigênicas que levaram a classificação em oito genótipos diferentes, variando do A ao H. Estes genótipos foram classificados com base no grau de similaridade da sequência de bases nucleotídicas do DNA viral.

A distribuição dos genótipos e subgenótipos variam de acordo com a distribuição geográfica. O VHB/A pode ser encontrado principalmente no noroeste da Europa, Índia, Américas do Norte, Central e do Sul e regiões leste e sul da África. O VHB/B e VHB/C são encontrados na Ásia e Oceania. O VHB/D, no sul da Europa, Índia, África, América do Sul e Arábia Saudita; O VHB/E, na África Subsaariana; O VHB/F, na América do Sul e América Central; O VHB/G, nos Estados Unidos e França e O VHB/H, na Nicarágua, México e Califórnia.

O Brasil apresenta uma grande miscigenação, talvez por isso ocorra também uma diferença entre a distribuição dos genótipos do VHB nas diferentes regiões. Foram descritos, no Brasil, os genótipos A, D, F, B e C, variando de acordo com as regiões e com as diferentes formas da doença. Vários estudos tentam relacionar os genótipos com diferentes manifestações clínicas e resposta ao tratamento apresentando resultados ainda conflitantes. Logo, o objetivo desse estudo é determinar o genótipo mais prevalente em Sergipe, Estado da região Nordeste do Brasil, e avaliar a relação entre o genótipo viral e os achados clínico-laboratoriais.

2.OBJETIVOS

2.1OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência dos genótipos dos vírus B encontrados nos pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe em Aracaju-SE.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar a genotipagem com os marcadores de replicação viral;
- Analisar a possível relação entre os genótipos encontrados e a gravidade da lesão hepática.

3.REVISÃO DA LITERATURA

3.1. HEPATITE B - EPIDEMIOLOGIA

A hepatite B é considerada, atualmente, um grave problema de Saúde Pública mundial. Estima-se que mais de dois bilhões de pessoas já entraram em contato com o vírus da hepatite B (VHB) em algum período da vida (KANE, 1996). Destes, cerca de 350 a 400 milhões são portadores crônicos do VHB (ABDO, 2006; KAO, 2002C). Além disso, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano, existem mais de quatro milhões de pessoas apresentando doença aguda. (WHO, 2002).

O risco de se tornar portador crônico está inversamente ligado a idade em que se adquire a infecção (VEGNENTE, 1992). Dos adultos que entram em contato com o vírus, apenas 5% desenvolvem doença crônica (PARANÁ, 2006) e destes, aproximadamente 25% evoluem para cirrose hepática (CH) ou carcinoma hepatocelular (CHC) (WHO, 2002). Já nas crianças, o risco de cronicidade é bastante elevado chegando a cerca de 90% dos indivíduos infectados ao nascimento e 25 a 50% entre um e cinco anos de idade (VEGNENTE, 1992).

A mortalidade do portador de hepatite B crônica é 5,2 vezes maior que a população em geral (PURCELL, 1993).

A prevalência da hepatite B varia de acordo com as regiões geográficas, sendo estas, divididas em três zonas de risco. Zonas de alto risco (>8%), risco intermediário (2-8%) e baixo (<2%) (Figura1).

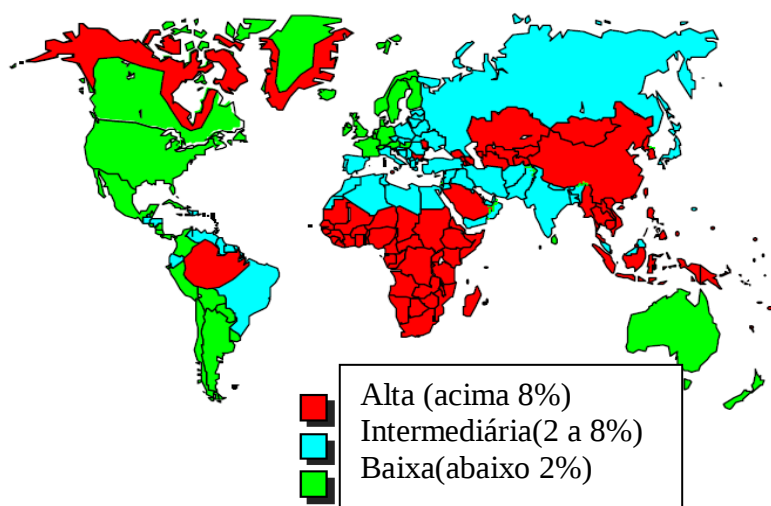


Figura1. Distribuição mundial do VHB (WHO, 2001).

Áreas de alta endemicidade incluem Centro e Sudeste da Ásia, Japão, Oceania, África Subsaariana, partes do Oriente Médio, Amazônia e alguns países do Leste Europeu, nas quais cerca de 8 a 20% da população é portadora do vírus B (HOLLINGER, 2001).

As regiões de endemicidade intermediária correspondem aos países do Leste Europeu, Rússia, países da Bacia Mediterrânea, Sudoeste da Ásia e Norte da América Latina, incluindo grande parte do Brasil, com prevalência de portadores crônicos variando entre 2 a 7% (HOLLINGER, 2001).

Já as áreas de baixa endemicidade correspondem à América do Norte, Oeste e Norte da Europa, partes da Austrália e da América do Sul, sendo menos de 2% da população portadora do vírus B (HOLLINGER, 2001).

O Brasil, em geral, apresenta endemicidade intermediária para o vírus, com três padrões de distribuição da doença. Alta endemicidade na região Amazônica e alguns locais do Espírito Santo e Santa Catarina; endemicidade intermediária no Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste; baixa endemicidade na região Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Clemens *et al* (2000), avaliando a prevalência do anti-HBc na América Latina, encontraram este marcador em 7,9% da amostra brasileira com variação importante entre as regiões. Na Bacia Amazônica, a prevalência foi de 21,4%. No Nordeste, taxa de 1,2% foi

detectada em Fortaleza. Nas Regiões Sudeste e Sul, prevalência de 5,5% e 7,5% foram observadas no Rio de Janeiro e em Porto Alegre, respectivamente.

De acordo com dados do DATASUS (2009), a incidência do VHB no Nordeste brasileiro, de 1999 a 2005, foi de 8.403 casos novos, correspondendo a 11,13% dos casos nacionais. Em Sergipe, a incidência da doença passou de sete casos/ano em 1999 para 89 casos/ano em 2005 refletindo a subnotificação da doença no Estado.

3.2. O VÍRUS DA HEPATITE B

A Hepatite B é causada por DNA vírus, com 3.200 nucleotídeos, da família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus* (GUST, 1986). Sua transmissão ocorre por via sexual, vertical e parenteral e tem período de incubação variando de dois a seis meses. (PARANÁ, 2006; PINHO, 2003).

O vírus da hepatite B (VHB) pode ser encontrado no soro de pacientes infectados sob duas formas: a partícula completa (partícula de Dane) ou partículas esféricas e cilíndricas não infectantes (KIDD-LJUNGGREN, 2002).

A partícula de Dane corresponde à forma infecciosa, com 42 nanômetros (nm) de diâmetro e nucleocapsídeos. Ela é composta por uma camada externa (antígeno de superfície - AgHBs) e por uma formação interna denominada “core”. Já as partículas esféricas e cilíndricas, não infecciosas, são constituídas apenas pelo envelope viral lipoprotéico com 22 nm e 200 nm de diâmetro, respectivamente. São formadas pela produção excessiva de proteínas de superfície (DANE, 1970).

O genoma do VHB apresenta quatro áreas abertas para leitura. As regiões: S, que codificam proteínas do envelope; P, responsável pela replicação viral; C, codifica as proteínas do nucleocapsídeo e X responsável pela formação do AgHBx (CHEINQUER, 2006).

O principal antígeno do envelope é o AgHBs, que induz a formação do anti-HBs, anticorpo que confere proteção contra a doença (KANN, 1998).

Já nas partículas viras íntegras, o nucleocapsídeo que protege o genoma viral possui o AgHBc, proteína do core, e o AgHBe, fração circulante da proteína do core, indicativa de replicação viral. Esses antígenos induzem a formação de anticorpos específicos o anti-HBc e o anti-HBe respectivamente (CHEINQUER 2006; PINHO 2003; SILVA, 2003). Este último anticorpo, geralmente se relaciona com a parada da replicação viral (PINHO 2003; SILVA, 2003).

Os anticorpos contra a proteína do core não são protetores e podem facilitar a hepatite B em recém-nascidos com mães portadoras do VHB (PINHO, 2003).

Além dessas proteínas, outras duas são produzidas pelo VHB: o AgHBx e o DNA polimerase (KANN, 1998; PINHO, 2003; SILVA, 2003). O AgHBx está relacionado ao aparecimento de CHC, por alterar a capacidade de reparo do DNA pela célula, potencializando, conseqüentemente, o efeito oncogênico em pacientes com hepatite B (KANN, 1998; PINHO, 2003).

O VHB pode sofrer mutações, em sua seqüência nucleotídica, fazendo com que surjam variantes virais (BRUNETTO, 1990; BUCKWOLD, 1996; CARMAN, 1989; DICKSON, 1997; LINDH, 1999).

A variante pré-core do VHB foi descrita em 1990 por Brunetto *et al.* Eles identificaram uma mutação na região pré-core, nas posições 1896/1899 levando à interrupção da síntese do AgHBe, antígeno modulador da resposta imune, mesmo sem cessar a replicação viral. Alterações nos nucleotídeos 1.762 a 1.764, denominados “mutantes promotores do core” também podem provocar perda do AgHBe (BUCKWOLD, 1996).

Essas mutações são mais frequentes na região do Mediterrâneo e no Oriente, caracterizando cerca de 40 a 95% dos casos de hepatite B crônica. Na América do Sul esta prevalência ainda não foi estabelecida adequadamente (CARMAN, 1989).

Esses pacientes que apresentam AgHBe negativo, AgHBs, anti-HBc e anti-HBe positivos, com DNA viral acima de 10.000 cópias, podem apresentar formas clínicas mais

graves, evoluindo para hepatite crônica ativa intensa, com pouca resposta ao interferon (BRUNETTO, 1990; PINHO, 2003).

Além disso, mutações na região pré-core, além de impedir a formação do AgHBe, afetam o sinal de encapsidação, aumentando a velocidade de replicação do vírus podendo provocar insuficiência hepática aguda grave. (OMATA, 1991; SATO, 1995; SCAGLIONI, 1997) e exacerbações severas da doença crônica (OMATA, 1991).

A mutação na região 1.762 a 1.764 foi associada à maior resposta inflamatória e a fibrose em portadores crônicos do VHB independente do AgHBe (LINDH, 1999).

Conquanto alguns estudos tenham relacionado as mutações pré-core com agressões hepáticas severas (BRUNETTO, 1990; OMATA, 1991; SATO, 1995; SCAGLIONI, 1997), essas mutações também foram encontradas em portadores assintomáticos do VHB (YOO, 2003).

Existem outras mutações, menos frequentes, que afetam o envelope do VHB. A primeira ocorre na região conhecida como determinante “a” (entre os aminoácidos 124 a 147), geralmente após vacinação de recém nascidos de mães portadores do VHB e pacientes AgHBs positivos submetidos a transplante hepático (DICKSON, 1997). Esses pacientes apresentaram AgHBs positivo, podendo evoluir para hepatite crônica, mesmo na presença de anti-HBs.

A outra mutação do envelope viral ocorre devido às deleções na região X do genoma viral que levam a diminuição da expressão do AgHBs com a manutenção da virulência do VHB (PINHO, 2005). Essas alterações foram descritas em pacientes submetidos à hemodiálise nos Estados Unidos (FEITELSON, 2003) e Japão (UCHIDA, 1994) e crianças talassêmicas politransfundidas (FEITELSON, 1994).

3.3. MARCADORES SOROLÓGICOS

Os marcadores sorológicos do VHB estão presentes em diferentes fases da doença e são de grande importância no diagnóstico e seguimento dos pacientes com hepatite B (Figura 2).

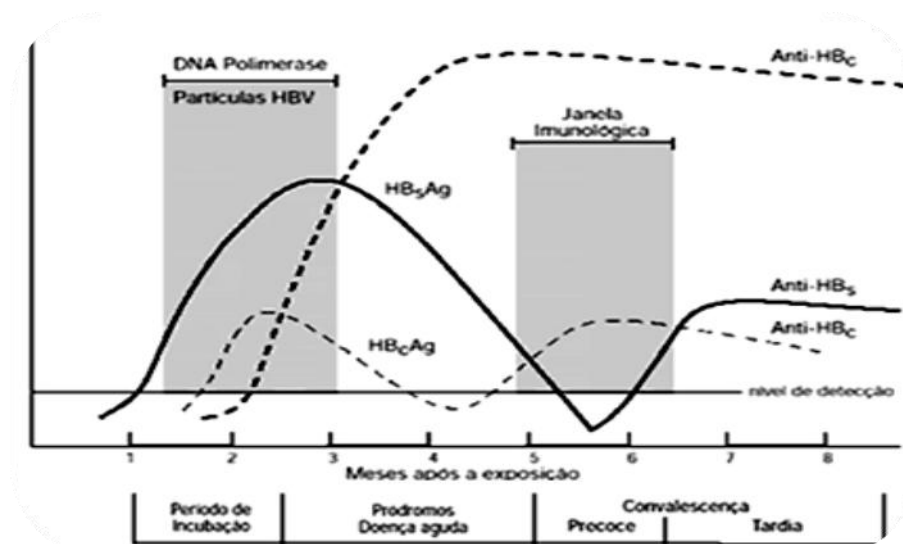


Figura2. Marcadores virais do VHB

O primeiro marcador detectado no soro de pacientes infectados é o AgHBs (CHEINQUER, 2006; SILVA, 2003). Esse antígeno está presente uma a cinco semanas após o contato com o VHB, geralmente antes de qualquer manifestação clínica da doença (PREVISANI, 2004). A persistência desse marcador por mais de seis meses indica infecção crônica (CHEINQUER, 2006; PREVISANI, 2004; SILVA, 2003).

Semanas após a negatificação do AgHBs, ocorre a formação do anti-HBs indicando resolução da infecção e imunidade contra nova infecção pelo VHB. No entanto, antes da formação desse anticorpo, existe um período no qual não se encontram marcadores do AgHBs. Esse período consiste na janela imunológica (CHEINQUER, 2006; PREVISANI, 2004; SILVA, 2003). A presença isolada do anti-HBs indica vacinação contra o VHB (CHEINQUER, 2006).

O primeiro anticorpo encontrado no soro é o anti-HBc, geralmente surge uma a duas semanas após o AgHBs, já na fase sintomática da doença (PREVISANI, 2004). A presença do anti-HBc indica infecção aguda (anti-HBc IgM) ou pregressa (anti-HBc IgG) e

não induz imunidade contra a hepatite B (CHEINQUER, 2006; PINHO, 2003; PREVISANI, 2004). Seu antígeno (AgHBc) não pode ser detectado em sangue periférico, sendo encontrado apenas no citoplasma do hepatócito (CHEINQUER, 2006).

Outro marcador de grande importância no seguimento de portadores do VHB, que indica replicação viral, é o AgHBe. A persistência desse marcador indica multiplicação viral enquanto sua soroconversão (anti-HBe), em geral, ocorre concomitante ao desaparecimento do DNA-VHB, à remissão clínica e à redução da atividade inflamatória hepática. Entretanto, o AgHBe pode estar ausente durante a infecção crônica sem significar, necessariamente, remissão da doença. Isso ocorre devido a mutações na sequência antigênica do vírus resultando em pacientes com carga viral elevada apesar do antígeno “e” ausente. (BRUNETTO, 1990; OMATA, 1991; PINHO, 2003; SATO, 1995; SCAGLIONI, 1997).

Na doença crônica existem quatro fases evolutivas. A primeira corresponde a fase de imunotolerância onde se pode observar o AgHBs e o AgHBe além de altos níveis de VHB-aDNA (maior que 100000 cópias/ml), com ALT normal. Na segunda fase, imunoclearamento, o AgHBe permanece positivo com flutuações do VHB-DNA e ALT na tentativa do sistema imune em eliminar o vírus. Na terceira fase, portador inativo ou fase de integração, ocorre a presença do AgHBs e do anti-HBe, o VHB-DNA está indetectável ou menor que 10.000 cópias/ml e o ALT normal. O AgHBe não é encontrado nessa fase. E a última fase corresponde à reativação da replicação da hepatite crônica onde encontramos anti-HBe com altos níveis de VHB-DNA e ALT. Nessa fase alguns pacientes voltam a positivar o AgHBe (CHEINQUER, 2006) .

No Brasil, a maior parte dos pacientes portadores de hepatite crônica apresentam AgHBe negativo (REZENDE, 2005; TORNETO, 2009). Em Campinas, 70% da população tinha AgHBe negativo. Dos pacientes AgHBs positivos, 60% eram portadores inativos e 40% apresentavam hepatite crônica. Dos pacientes com hepatite crônica 43% eram AgHBe positivo enquanto 57% eram negativos (TORNETO, 2009). A ALT foi mais elevada nos AgHBe positivo (2,5x) que nos negativos (1,8x). Os positivos eram mais jovens que os negativos sem diferença de gênero. A carga viral foi significativamente mais elevada (4,9x) nos pacientes com AgHBe positivo (TORNETO, 2009).

3.4. CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS

O AgHBs apresenta diferenças antigênicas que permitem que o VHB seja classificado em 9 subtipos e 8 genótipos diferentes (CHEINQUER, 2006; PINHO, 2003).

Os subtipos são classificados em 4 grupos: o adw (adw2, adw4), o ayw (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4), o adr (adr+, adr-) e o ayr, e apresentam diferentes distribuições geográficas que sugerem recombinação do DNA viral (COUROUCE-PAUTY, 1983).

Courouce-Pauty *et al* (1983), avaliando a distribuição global dos subtipos do AgHBs, encontraram prevalência do awy3 em 74% da população analisada no norte da América do Sul, enquanto no norte e porção central da Europa, a prevalência do adw2 foi de 70% demonstrando a variação dos subtipos de acordo com as regiões geográficas.

A divergência das seqüências do genoma completo em um mesmo subtipo é aproximadamente 8%, semelhante àquela encontrada entre subtipos diferentes (PINHO, 2003). Norder *et al* (1992) observaram que a única variação entre os subtipos africanos ayw1 e o adw2, classificados, posteriormente, como genótipo A, encontrava-se na posição 122, mostrando que uma única substituição na cadeia nucleotídica leva a variação dos subtipos. Logo, os subtipos não refletiam a verdadeira variação genotípica do AgHBs (PINHO, 2003).

Em 1988, Okamoto *et. al.* classificaram o VHB em 4 genótipos (A a D), baseados no grau de similaridade da seqüência de bases nucleotídicas do DNA viral, com divergência entre os grupos de 8% ou mais e variação inter-grupo de 5,6% ou menos. O genótipo A (VHB/A) incluiu os subtipos adw2 e ayw1; o genótipo B (VHB/B), o adw e ayw1; o genótipo C (VHB/C), o adw, ayr, adr, e o genótipo D (VHB/D) o adw, ayw2 e ayw3.

Em 1989, Orito *et al* descreveram quatro novos genótipos com características levemente divergentes das encontradas por Okamoto *et al* (1988). Em 1992, Norder *et al* (1992b), comparando as seqüências nucleotídicas do AgHBs, encontraram diferença estatística em duas seqüências quando comparadas aos genótipos descritos por Okamoto *et al* (1988), classificando-as como genótipos E (VHB/E) e F (VHB/F). A divergência dos VHB/E e VHB/F para os genótipos previamente descritos foi maior que 8,8 e 13,0%, respectivamente

(NORDER, 1994). O genótipo E (VHB/E) é, geneticamente, mais próximo ao genótipo D, enquanto o genótipo F (VHB/F) mostrou-se o mais divergente dos genótipos (15%) (NAUMANN, 1993).

Em 1997, Bowyer *et al*, em análise filogenética da região pré S2/S, encontraram diferenças no sequenciamento de amostras do VHB encontradas na África do Sul quando comparadas com as formas isoladas armazenadas no banco de dados GenBank. A maioria dessas sequências se assemelhava ao VHB/A (24/29 total). Essa nova sequência ficou conhecida com subgrupo A' ou subtipo africano (A1 ou Aa) enquanto o genótipo A previamente descrito na Europa e nos Estados Unidos ficou conhecido como subtipo europeu (A2 ou Ae). O subgrupo Aa (VHB/Aa) apresenta os subtipos adw e ayw enquanto o subtipo Ae apresenta o subtipo adw (BOWYER, 1997). Esses subgenótipos mostraram sequências divergentes que pode afetar a replicação do vírus e sua capacidade de expressar proteínas (KIMBI, 2004). Em 2005, Kurbanov *et al* descreveram um novo subgenótipo do VHB/A (A3 ou Ac) baseados em uma divergência na sequência de bases nucleotídicas maior que 4% para os subgenótipos Aa e Ae.

Em 2000, Stuyver *et al*, analisando os soros de 121 pacientes portadores crônicos do VHB dos EUA e França, observaram, por sequenciamento e análise filogenética, um novo grupo divergente dos genótipos A ao F. Essa nova cadeia foi chamada de genótipo G (VHB/G) que, pela sequência de aminoácidos, pertenceria ao subtipo adw2.

Finalmente, em 2002, Arauz-Ruiz *et al*, comparando cadeias de aminoácidos completas de três amostras colhidas na América Central com os genótipos já descritos, encontraram 16 aminoácidos únicos. Essas três cadeias foram classificadas, então, como genótipo H (VHB/H).

Em 2002, dois subgrupos do VHB/B foram identificados, na Ásia, baseados em divergências do sequenciamento na região precore e gene core. Estes subgrupos apresentavam-se com ou sem recombinação com o VHB/C. Apenas as amostras colhidas no Japão não apresentavam o subtipo recombinante logo, esse subgrupo foi designado subtipo Bj (VHB/Bj). Os subtipos recombinantes, encontrados em outros países asiáticos, foram classificados como subtipo Ba (VHB/Ba) (SUGAUCHI, 2002). Essas diferenças podem se

refletir em diferentes manifestações clínicas produzidas pelo VHB/B. Outros subtipos do genótipo B foram descritos (B3 e B4) assim como subtipos dos genótipos C (C1, C2, C3 e C4), D (D1, D2, D3 e D4) e F (F1 e F2) (NORDER, 2004).

A coinfeção pelo VHB por genótipos diferentes é encontrada em, aproximadamente, 10% dos indivíduos infectados (MIYAKAWA, 2003).

3.5. GENÓTIPOS E DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL

Atualmente, o VHB é classificado em oito genótipos, do A ao H, que variam de acordo com a distribuição geográfica do VHB (KIDD-LJUNGGREN, 2002; NORDER, 1993).

Segundo pesquisas, o VHB/A é encontrado, principalmente, no noroeste da Europa, Índia, Américas do Norte, Central e do Sul e regiões leste e sul da África (CHU, 2003; MIYAKAWA, 2003) sendo o VHB/Ae encontrado na Europa, Estados Unidos e Japão (SUGAUCHI, 2004; TANAKA, 2004) enquanto o VHB/Aa é encontrado em países de origem africana e asiática (BOWER, 1997; HASEGAWA, 2004; KIMBI, 2004). Já o VHB/Ac foi descrito apenas na população de Camarões (KUBANOV, 2005).

Nos Estados Unidos, o VHB/Ae foi mais prevalente entre brancos, negros e hispânicos enquanto o VHB/Aa foi mais prevalente nos asiáticos (HASEGAWA, 2004).

O VHB/B e VHB/C podem ser encontrados na Ásia e Oceania (MIYAKAWA, 2003; ORITO, 2001). O subtipo puro do VHB/B, o VHB/Bj, foi descrito apenas em populações do Japão enquanto o recombinante com o VHB/C, o VHB/Ba, foi descrito na China, Taiwan, Tailândia, Indonésia, Vietnã e Japão (SUGAUCHI, 2002).

Estudo realizado com trabalhadores imigrantes vindos da região de Cambodia, Laos, e Myanmar para a Tailândia, observou que o genótipo mais encontrado foi VHB/C, seguido pelo VHB/B (SA-NGUANMOO, 2010).

O VHB/D foi encontrado no sul da Europa, Índia, África, América do Sul e Arábia Saudita (ABDO, 2006; MAYERAT, 1999; MIYAKAWA, 2003); o VHB/E na África Subsaariana (KIDD-LJUNGGREN, 2002; PALUMBO, 2007; FORBI, 2010; DUPINAY, 2010); o VHB/F na América do Sul e América Central (NAUMANN, 1993; TELENTA, 1997); o VHB/G foi encontrado, recentemente, em mais de 10% dos casos diagnosticados nos Estados Unidos e na França (STUYVER, 2000) enquanto o VHB/H foi descrito na Nicarágua, México e Califórnia (ARAUZ-RUIZ, 2002; RIBEIRO, 2006) (Figura 3).

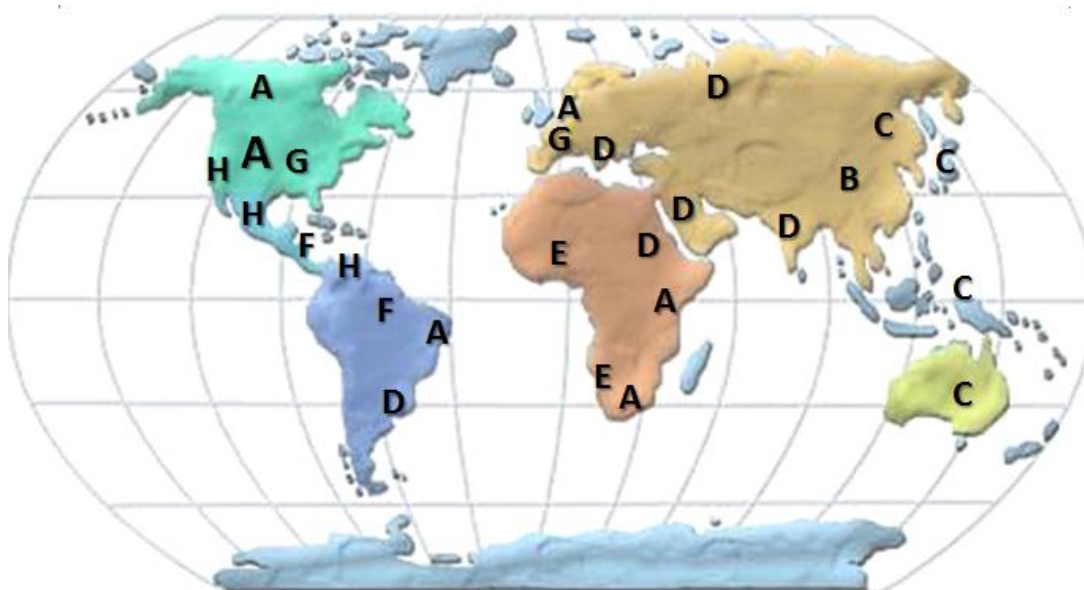


Figura 3. Predominância dos genótipos do VHB no mundo

Em estudo multicêntrico realizado nos Estados Unidos, foi encontrada alta correlação entre os genótipos com a etnia da população. O VHB/A foi mais prevalente entre os brancos e negros enquanto o VHB/B e VHB/C foram mais comuns nos pacientes de origem asiática. O genótipo mais encontrado nos pacientes que nasceram nos Estados Unidos, Europa, Extremo Oriente e Sudeste Asiático foi, respectivamente, o A, D, C, e B (CHU, 2003).

O Brasil também apresenta uma grande miscigenação racial. Talvez por isso, ocorra também uma diferença na distribuição dos genótipos do VHB em diferentes regiões geográficas. Os genótipos A, D e F são os mais predominantes no Brasil (MELO, 2007).

Os estudos detectaram o VHB/A (50%), VHB/D (46,6%) e VHB/F (3,8%) no Rio de Janeiro (MORAES, 1996). Estes mesmos genótipos foram encontrados em pacientes de hemodiálise em Santa Catarina, com predominância do VHB/D (CARRILHO, 2004). No Pará houve predomínio do VHB/A (89,1%), seguido pelos genótipos F (8,7%) e D (2,2%) (CONDE, 2004).

Em São Paulo, foram encontrados o VHB/A (49,5%), VHB/B (2,9%), VHB/C (13,6%), VHB/D (24,3%) e VHB/F (9,7%) em pacientes com hepatite crônica. O VHB/B e o VHB/C foram os mais frequentes nos pacientes de origem asiática, enquanto que o VHB/A, VHB/D e VHB/F foram encontrados, quase que exclusivamente, em pacientes de ascendência ocidental (SITNIK, 2004).

Em Campinas, o VHB/A também foi o mais prevalente (55%), seguido pelo VHB/D (38%), VHB/F (4%) e VHB/C (3%) (TORNETTO, 2009). No entanto, estudo realizado com doadores de sangue em Ribeirão Preto, demonstrou a prevalência de genótipo D, seguido pelo genótipo A (HADDAD, 2010).

Em análise de 114 pacientes com hepatite B crônica na cidade de Salvador, foram encontrados o VHB/A, VHB/B e VHB/F com predominância do VHB/A (RIBEIRO, 2006).

Na região Amazônica, foi encontrado apenas o VHB/F em índios de tribos que não tinham contato com brancos. Já nas tribos em que este contato era frequente foi encontrado o VHB/A (BERTOLINI, 2000).

Outros estudos sugerem uma mudança no perfil genotípico desta população, possivelmente, decorrente das migrações para a Amazônia que se iniciaram no final do século XIX. Isto se refletiria na predominância do VHB/A (81,81%) sobre o VHB/F (13,63%) nos nativos desta região (VICTORIA, 2008).

Melo *et al* (2007), avaliando candidatos a doadores de sangue nas cinco regiões brasileiras, encontraram os genótipos A, D e F com distribuição variável de acordo com a região (Figura 4).

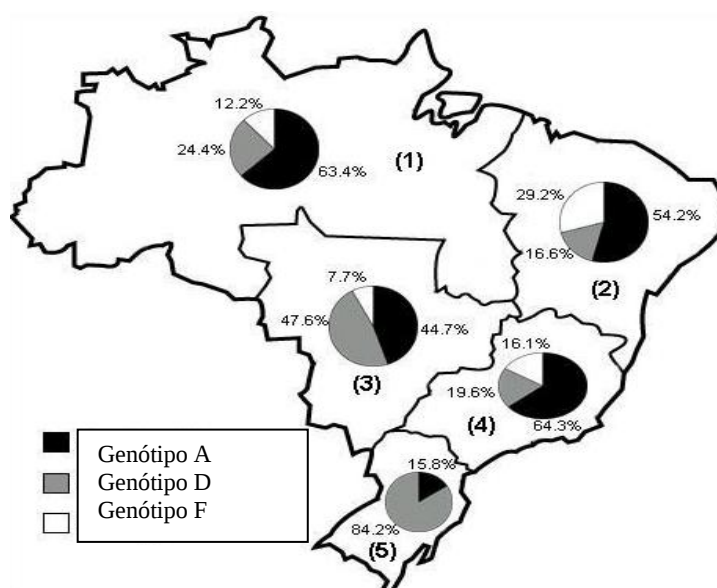


Figura 4. Distribuição dos genótipos no Brasil (MELO, 2007).

A predominância do genótipo D na região Sul pode estar relacionada à imigração de pessoas da Europa Central para essa região.

Em relação ao genótipo A, 90,2% correspondia ao subtipo Aa podendo estar relacionado ao grande influxo de africanos para o Brasil durante a colonização. Ao contrário do previsto, o VHB/F foi encontrado em pequena parte da população brasileira (13%) até mesmo na região norte do país onde era esperada maior incidência desse genótipo pela influência da população indígena (MELO, 2007).

3.6. CORRELAÇÕES ENTRE GENÓTIPO VIRAL E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E VIROLÓGICAS

As relações entre o genótipo viral e as manifestações clínicas e virológicas da hepatite B ainda não foram bem estabelecidas (KIDD-LJUNGGREN, 2002).

3.6.1. Genótipo e as mutações

Alguns estudos têm demonstrado relação entre os genótipos do VHB com mutações nas regiões *precore* e *core* que levam a uma inibição na produção do AgHBe (GRANDJACQUES, 2000).

Em estudo multicêntrico realizado com pacientes portadores dos genótipos A ao H, o VHB/A e o VHB/C foram os mais relacionados à presença do AgHBe (CHU, 2003).

A principal mutação relacionada à produção deste antígeno é a substituição de uma base G por uma A na posição 1896 (G1896A) criando um *stop códon* prematuro (CHAN, 1999; LINDH, 1997; YOO, 2003). Essa mutação é mais frequente nos genótipos B, D e E, sendo menos encontrada nos genótipos C e F e rara no A (LINDH, 1997; TANAKA, 2004; YOO, 2003) (Figura 5).

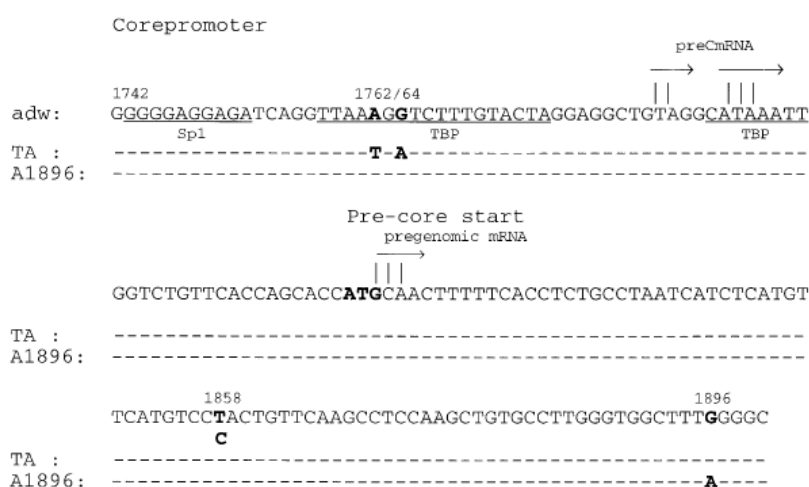


Figura.5. Sequenciamento e localização da mutação dos aminoácidos TA e A1896 (CHAN,1999)

Estudos mostram que o VHB/A, geralmente, apresenta uma base C no nucleotídeo 1858, formando, portanto, ligações mais estáveis com a base G da posição 1896 reduzindo, por isso, a incidência das mutações na região *precore* (LINDH, 1997).

A região *precore* e *core* foram sequenciadas na população de UAE, sendo genótipo D o mais prevalente (79.5%), seguido pelo genótipo A (18.2%) e C (2.3%). (ALFARESI, 2010).

Já o VHB/C apresenta cadeias heterogêneas, com aminoácidos T (T1858) ou C (C1858) na posição 1858, variando de acordo com a região geográfica. (YOO, 2003; CHAN, 1999).

A mutação G1896A é mais prevalente na Ásia e países mediterrâneos onde os genótipos B, C e D são os mais prevalentes (LINDH, 1997; RODRIGUEZ, 1995; YOO, 2003) e rara nos países da América do Norte e Europa, onde predominam o VHB/A (LINDH, 1997; MANGIA, 1996).

No Brasil, o T1858 esteve presente em todos os pacientes com genótipos B, C e D sendo menos frequente no genótipo F (30%) e A (10%). No entanto, mesmo com essa alteração, a presença de mutantes *precore* não foi frequente, sendo mais encontrada nos genótipos B (33,3%) e C (23,1%) (SITNIK, 2004).

Lok *et al* (1995) mostraram que, pacientes infectados por genótipos que tinham C1858, aparentemente, apresentavam clareamento do AgHBe semelhantes àqueles infectados por genótipos que tinham T1858.

Não foi encontrada relação entre a mutação G1896A com a atividade da doença hepática (MANGIA, 1996; YOO, 2003).

Outra alteração que leva à diminuição da transcrição do RNA *precore* ocasionando uma menor produção do AgHBe, ocorre pela dupla mutação da base A para a T na posição 1762 e da base G para a A na posição 1764. *In vitro*, essa alteração foi relacionada à maior produção viral (BUCKWOLD, 1996).

A relação dos genótipos com essa mutação ainda é incerta (MIYAKAWA, 2003). Alguns estudos controversos mostraram maior prevalência no VHB/C quando comparado com o VHB/B (KAO, 2003; LINDH, 1999; ORITO, 2001B; SUMI, 2003). Os portadores dessa alteração, independente do genótipo, apresentavam lesão hepática mais avançada, com risco aumentado para o desenvolvimento do CHC, contudo, sem correlação com o AgHBe (BAPTISTA, 1999; KAO, 2003; LINDH, 1999; ORITO, 2001B).

Comparando os subgenótipos VHB/Ba, genótipo recombinante com o VHB/C, com o VHB/Bj, a mutação dupla no promotor do core (T1762/A1764) foi predominante no VHB/Ba. Entretanto, em pacientes maiores de 30 anos, o AgHBe foi mais prevalente no subtipo HBV/Ba (SUGAUCHI, 2003).

Em relação aos subgenótipos VHB/Ae e VHB/Aa, a mutação T1762/A1764 foi significativamente mais freqüente no VHB/Aa que no VHB/Ae (SUGAUSHI, 2004; TANAKA, 2004). Essa mutação foi menos prevalente no VHB/D quando comparado com o VHB/A (TANAKA, 2004).

3.6.2 Genótipo e manifestações clínicas da hepatite B

Em relação às manifestações clínicas causadas pelos diferentes genótipos, alguns estudos fazem comparações entre os achados encontrados em pacientes com o VHB/A versus portadores do VHB/D e de pacientes infectados pelo VHB/B *versus* o VHB/C.

Genótipo A versus Genótipo D (Tabela 1)

Os genótipos A e D são os mais freqüentes na Índia, e alguns países da Europa, América do Sul e África. Alguns estudos observacionais relacionaram esses genótipos com as alterações agudas e crônicas da hepatite B (MAYERAT, 1999).

Um estudo comparando a prevalência desses genótipos em pacientes com doença crônica e aguda encontraram predomínio do VHB/A em doentes crônicos enquanto o VHB/D foi o predominante na doença aguda (MAYERAT, 1999). Outros estudos encontraram resultados semelhantes (LYRA, 2005; RIBEIRO, 2006; PEZZANO, 2010).

Nestes estudos, os autores cogitaram a hipótese que o VHB/A teria menor capacidade que o VHB/D de induzir a resposta imunológica apresentando, consequentemente, manifestações agudas mais silenciosas e menor capacidade em realizar o *clearence* imune, aumentando, portanto, o risco de hepatite crônica em portadores do VHB/A (MAYERAT, 1999; RIBEIRO, 2006).

Contraditoriamente, um estudo retrospectivo realizado no Japão, onde o VHB/B e VHB/C são os mais prevalentes, foi encontrada prevalência do VHB/A em pacientes com infecção aguda (SUZUKI, 2005).

Alguns autores tentam também relacionar os genótipos com manifestações graves da hepatite B como a CH e o CHC apresentando resultados ainda conflitantes (BAIG, 2007; KUMAR, 2005; TAKUR, 2002).

O VHB/A foi associado a níveis mais elevados de ALT e maior positividade do AgHBe quando comparado com o VHB/D (KUMAR, 2005). A carga viral foi mais baixa no VHB/A quando comparado ao VHB/D (TANAKA, 2004).

Portadores crônicos do VHB/A apresentavam remissão bioquímica sustentada mais prolongada e maior *clearance* do HBV-DNA que os pacientes com VHB/D e VHB/F. O *clearance* do AgHBs também foi maior no VHB/A que no VHB/D (SANCHEZ, 2002; WANG, 2010).

O grau de fibrose foi mais elevado nos pacientes com VHB/F (3,0) quando comparados com o VHB/A (2,4), VHB/D (2,0) e VHB/C (1,0) embora sem diferença estatística significativa ($p=0,1148$) (TONETTO, 2009).

Em relação ao prognóstico, os pacientes com VHB/F apresentaram maiores índices de mortalidade relacionada à doença hepática que o VHB/A e VHB/D (SANCHEZ, 2002).

Quadro 1. Correlações entre os Genótipos A, D e F e características clínicas e virológicas da Hepatite B.

Manifestações Clínicas	A	D	F	Referências Bibliográficas
Mutação G1896A	Rara	Mais frequente	-	LINDH,1997; SITNIK, 2004; TANAKA,2004; YOO 2003
Mutação dupla	Mais frequente	Menos frequente	-	TANAKA,2004
AgHBe	Mais frequente	Menos frequente	Maior VHB/A	CHU,2003; KUMAR,2005; SANCHEZ, 2002
ALT	Níveis elevados	Níveis menores	NS*	KUMAR,2005; * SANCHEZ, 2002
Carga viral	Níveis menores	Níveis elevados	NS*	TANAKA,2004; * SANCHEZ, 2002; RIBEIRO, 2006,
Hepatite aguda	Menos frequente	Mais frequente	-	MAYERAT, 1999; RIBEIRO, 2006
Cirrose hepática	Controverso		NS*	BAIG, 2007; KUMAR,2005; TAKUR,2002; TONETTO,2009 ; * SANCHEZ, 2002
Carcinoma Hepatocelular	Menos frequente	Mais frequente	NS*	BAIG, 2007; TAKUR,2002; * SANCHEZ, 2002
Prognóstico	Melhor	Melhor	Pior	SANCHEZ, 2002

* NS- não significativo

Estudos mostram diferentes manifestações clínicas do VHB/A baseadas em seus subtipos: o africano (VHB/Aa) e o europeu (VHB/Ae) (HASEGAWA, 2004; KIMBI, 2004; SUGASHI, 2004; TANAKA, 2004) (Tabela2).

Em estudo caso-controle, comparando grupos portadores do VHB/Aa, VHB/Ae e VHB/D, encontrou-se menor prevalência do AgHBe em portadores do VHB/Aa (31%) quando comparados com o VHB/Ae (49%) ($p=0.033$). Os níveis séricos do VHB-DNA também foram menores nos portadores do VHB/Aa. (TANAKA, 2004).

Estudos observacionais realizados em países africanos mostraram que menos de 5% dos pacientes infectados pelo VHB apresentam AgHBe positivo e que estes pacientes apresentavam, concomitantemente, baixos níveis séricos do VHB-DNA (DUSHEIKO, 1985; KRAMVIS, 1997). Por outro lado, em estudos europeus, a maioria dos pacientes portadores do VHB apresentam AgHBe reagente (ERHARDT, 2000; SANCHEZ, 2002). Essa divergência talvez venha a ser elucidada após análise genotípica.

Quadro 2. Correlações entre os Genótipos A e características clínicas e virológicas da Hepatite B

Manifestações Clínicas	Aa	Ae	Referência
Mutação dupla	Mais frequente	Menos frequente	SUGAUSHI, 2004; TANAKA,2004
AgHBe	Menos frequente	Mais frequente	DUSHEIKO, 1985; KRAMVIS, 1997; ERHARDT,2000; HASEGAWA, 2004; SANCHEZ,2002; TANAKA,2004
Carga viral	Níveis menores	Níveis elevados	DUSHEIKO, 1985; KRAMVIS, 1997; TANAKA,2004

Kurbanov *et al* (2005), analisando a população de Camarões, identificaram o VHB/Ac, VHB/Aa e VHB/E. Assim como descrito para o VHB/Aa (DUSHEIKO, 1985; KRAMVIS, 1997; TANAKA,2004), esses pacientes também apresentaram seroconversão precoce do AgHBe (KURBANOV,2005).

Genótipo B versus Genótipo C (Tabela 3)

Dos 350 milhões de infectados pelo VHB, aproximadamente dois terços estão no continente asiático onde os genótipos B e C são predominantes (MIYAKAWA, 2003). Por isso, estudos de coorte prospectiva, multicêntricos, comparam as diferentes manifestações clínicas relacionadas com esses genótipos, apresentando evidências menos conflitantes do que as envolvidas nas manifestações dos genótipos A e D.

Grande parte dos estudos indica que o VHB/C é mais prevalente nos pacientes portadores de lesão hepática crônica grave, indicando que este genótipo induz lesões mais severas que o VHB/B (CHAN, 2003; ISHIKAWA, 2002; KAO, 2000; LINDH, 1999;

NAKAYOSHI, 2003; ORITO, 2001; SUGAUSHI, 2002; SUMI, 2003; TANGKIJAVANICH, 2005; YOU, 2008).

No entanto, a relação entre os genótipos e o desenvolvimento do CHC ainda é incerta. Em grande parte dos estudos, a predominância do CHC nos genótipos B e C variou de acordo com o genótipo dominante da região geográfica estudada (KAO, 2000; ORITO, 2001; CHAN, 2003; SUGAUCHI, 2002; SUMI, 2003; TANGKIJAVANICH, 2005; YOU, 2008). Mesmo assim, nem todos os estudos mostraram resultados semelhantes (ISHIKAWA, 2002; NAKAYOSHI, 2003).

Essas diferenças na carcinogênese do VHB/B poderiam ser justificadas também pelas diferenças nos subtipos do VHB/B no Japão (VHB/Bj) e em outras regiões da Ásia (VHB/Ba) que poderiam levar a manifestações clínicas distintas (ORITO, 2003).

Além disso, o VHB/C também pode ser relacionado com a maior capacidade inflamatória. Pacientes infectados pelo VHB/C apresentam níveis séricos mais elevados de ALT, de HBV-DNA e de AgHBe quando comparados com os portadores do VHB/B (ISHIKAWA, 2002; LINDH, 1999; ORITO, 2001; SUGACHI, 2002; SUGAUCHI, 2002B; SUMI, 2003).

O genótipo C também foi relacionado a múltiplos episódios de exacerbação aguda sem conversão do AgHBe (KAO, 2002 B).

Imamura *et al* (2003), no Japão, encontraram maior expressão do VHB/B em pacientes portadores de manifestações agudas do VHB quando comparados com os portadores crônicos da doença (39% *versus* 11,7%, $p < 0,001$). Esse genótipo foi ainda mais prevalente nos portadores de lesão hepática aguda grave quando comparados com os afetados por formas limitadas (62,5% *versus* 31,1% $p = 0,027$).

Quadro 3. Correlações entre os Genótipos B e C e características clínicas e virológicas da Hepatite B

Manifestações Clínicas	B	C	Referência
Mutação G1896A	Mais frequente	Menos freqüente	LINDH,1997; SITNIK, 2004; TANAKA,2004; YOO 2003
Mutação dupla	Menos frequente	Mais freqüente	KAO, 2003; LINDH, 1999; ORITO,2001B; SUMI,2003
AgHBe	Menos frequente	Mais freqüente	CHU,2003; ISHIKAWA, 2002; LINDH,1999; FURUSYO, 2002; ORITO,2001; SUGACHI, 2002; SUGAUCHI, 2002B; SUMI,2003; NAKAYOSHI, 2003; TANGKIJAVANICH, 2005; ZENG 2005
ALT	Níveis menores	Níveis elevados	ISHIKAWA, 2002; LINDH, 1999; SUGAUCHI, 2002; TANGKIJAVANICH, 2005
Carga viral	Níveis menores	Níveis elevados	ISHIKAWA, 2002; LINDH,1999; ORITO,2001; SUGACHI, 2002; SUGAUCHI, 2002B; SUMI,2003
Hepatite aguda	Mais frequente	Menos freqüente	IMAMURA, 2003.
Portadores assintomáticos	Mais frequente	Menos freqüente	ISHIKAWA, 2002; KAO, 2000; SUGAUSHI,2002
Cirrose hepática	Menos frequente	Mais freqüente	CHAN, 2003; ISHIKAWA, 2002; KAO, 2000; LINDH, 1999; NAKAYOSHI, 2003; ORITO, 2001; SUGAUSHI, 2002; SUMI,2003; TANGKIJAVANICH,2005
Carcinoma Hepatocelular	Controverso		KAO, 2000; ORITO,2001; ORITO,2003; CHAN,2003; SUGAUCHI,2002; SUMI,2003; TANGKIJAVANICH,2005; ISHIKAWA, 2002; NAKAYOSHI, 2003

3.7. GENÓTIPOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO

Muitos estudos também relacionam os genótipos com diferentes respostas ao tratamento com antivirais (RONCALO, 2008; COOKSLEY, 2010).

Os candidatos ao tratamento para hepatite B são os pacientes com AgHBs positivo por mais de 6 meses, com indicadores de replicação viral (AgHBe positivo ou VHB-DNA acima de 10.000 cópias/ml), ALT elevada e atividade necroinflamatória na biópsia hepática (CHENQUER, 2006; LIU, 2005).

Os pacientes que respondem bem ao tratamento, em geral, apresentam altos níveis de ALT e baixos níveis de VHB-DNA.

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções de 2009, há evidências de que a resposta ao tratamento e a evolução para hepatite crônica variam em função desses genótipos, vez que alguns deles apresentam melhor resposta ao interferon, como o A e o B. Por outro lado, os genótipos C e F estão relacionados a maiores riscos de carcinogênese. Todavia, no momento, os genótipos do VHB ainda não são utilizados na rotina clínica para tomada de decisão terapêutica.

Os tratamentos utilizados para o VHB são o interferon alfa (IFN- α), lamivudina (LAM), adefovir (ADE) e entecavir (ETE). O IFN- α é o principal tratamento para o VHB, entretanto, sua taxa de atividade é de apenas 30 a 40% (VAN DER EIJK, 2006).

O Protocolo para tratamento de HBV crônica preconiza que a fase de Imunoclearance seja o melhor momento para tratamento dentro dos critérios de inclusão descritos, devido a elevação das transaminases e presença de HBeAg reagente.

Estudos mostram que o VHB/A e o VHB/B apresentaram melhor resposta ao tratamento com IFN- α que os outros genótipos.

Avaliando resposta sustentada (seis meses após o tratamento) em pacientes portadores dos genótipos A e D, a resposta ao IFN α foi maior no HBV/A que no VHB/D (49% *versus* 26%, $p<0,005$). Essa diferença foi encontrada tanto nos pacientes com AgHBe positivos, resposta sustentada em 42% do VHB/A *versus* 24% no VHB/D ($p<0.03$), quanto nos AgHBe negativos, 59% no VHB/A e 29% no VHB/D, ($p<0.05$). (ERHARDT, 2005).

Em estudo realizado apenas com pacientes AgHBe negativo, houve maior resposta ao IFN nos pacientes com VHB/A (70%) quando comparados com os pacientes com VHB/D ou VHB/E (40%). A resposta foi independente do nível de VHB-DNA pré-tratamento e das doses do IFN (ZHANG, 1996). Analisando pacientes com AgHBe positivo, os portadores do VHB/A também apresentaram maior resposta ao IFN- α que o VHB/D (33% *versus* 11%, $p=0,002$) (HOU, 2001).

Gerner *et al* (1998) relataram mudança do genótipo A para o D em algumas crianças após seroconversão do AgHBe com uso de IFN- α .

Em estudo multicêntrico, os genótipos A (47%) e B (44%) apresentaram melhor resposta ao interferon peguilado que o C (28%) e o D (25%) ($p=0.01$) (JANSSEN, 2005).

Entretanto, um estudo com 814 pacientes não encontrou diferença significativa na resposta ao tratamento com peguilado, nos diferentes genótipos. Os autores justificam o achado pela pequena incidência dos genótipos A e D no grupo (LAU, 2005).

Um estudo com poucos pacientes com VHB/D sugeriu que esses pacientes, aparentemente, apresentam melhor resposta a terapia combinada com interferon peguilado com lamivudina que os portadores do mesmo genótipo em uso de monoterapia. Esse benefício não foi encontrado em outros genótipos (BONINO, 2007).

No entanto, o genótipo D (ayw) apresentou maior resposta a lamivudina com maior diminuição nos níveis do VHB-DNA no primeiro ano de tratamento que o VHB/A (adw). Já Buti *et al* (2002) encontraram resposta semelhantes com o uso da lamivudina nos genótipos A e D.

O genótipo A(adw) apresentou maior resistência a lamivudina que o VHB/D (ayw) e a resistência a lamivudina no VHB/A surgiu em estágios mais precoces do tratamento (ZOLLNER, 2001). Entretanto, Buti *et al* (2002) encontraram maior resistência a lamivudina no VHB/A *versus* VHB/D apenas no primeiro ano de tratamento.

Quadro 4. Diferenças terapêuticas em pacientes com AgHBe positivo portadores de hepatite B crônica: Comparação entre os genótipos A e D. (Adaptado, LIU, 2005).

	Genótipos do VHB		Nível de evidência
	A	D	
Resposta a interferon	Melhor	Pior	II-1
Resposta a interferon peguilado	Melhor	Pior	II-1
Resposta a lamivudina	Controverso		II-2
Falha após descontinuação da lamivudina	Não disponível		
Resistência a lamivudina	Maior	Menor	II-2
Resposta a adefovir	Comparável		II-1
Resposta a entecavir	Comparável		II-1

(BONINO, 2007; BUTI, 2002; ERHARDT, 2005; HOU, 2001; JANSEN, 2005; LURIE, 2000; WESTLAND, 2003; ZOLLNER, 2001)

Em estudo retrospectivo comparando o VHB/B com o VHB/C, a resposta ao tratamento com IFN- α foi atingida em 39% dos pacientes com VHB/B e 17% do VHB/C ($p=0.03$). No grupo controle, em uso de placebo, 10% dos VHB/B e 8% do VHB/C apresentaram *clearence* espontâneo do AgHBe ($p= 0.88$). Em análise multivariada, o VHB/B, níveis elevados de ALT e baixos níveis de VHB-DNA pré-tratamento foram fatores independentes associados à resposta antiviral, sem significância, no entanto, do tratamento com IFN α (WAI, 2002).

Ma *et al* (2007), avaliando a resposta ao IFN- α em pacientes com genótipos B, C e D, também encontraram resposta significativamente melhor nos pacientes com VHB/B (56%) que nos pacientes VHB/C (25,6%) e VHB/D (31,3%). A resposta completa ao IFN- α

foi encontrada apenas em portadores do VHB/B. A taxa de seroconversão do antígeno e induzida pelo IFN α foi significativamente mais elevada no VHB/B.

Os níveis de VHB-DNA foram significativamente mais elevados nos portadores do VHB/C que no VHB/B e VHB/D, assim como a incidência de mutações, podendo justificar a baixa resposta ao IFN α desse genótipo (MA, 2007). Outro estudo também mostra melhor resposta ao IFN no VHB/B quando comparado ao VHB/C (KAO, 2000B).

Em relação ao tratamento com lamivudina, o VHB/B também apresentou melhor resposta virológica que o VHB/C. Entretanto, os dois genótipos apresentam riscos semelhantes de desenvolver resistência após um ano de tratamento (KAO, 2002). Já Chang *et al* (2003) não encontraram influência dos genótipos B e C na resposta à lamivudina.

Em relação ao adefovir e o entecavir, ainda não foi encontrada diferença significativa na resposta antiviral de acordo com os genótipos (LURIE, 2005; WESTLAND, 2003).

Quadro 5. Diferenças terapêuticas em pacientes com AgHBe positivo portadores de hepatite B crônica: Comparação entre os genótipos B e C. (Adaptado, LIU, 2005)

	Genótipos do VHB		Nível de evidência
	B	C	
Resposta a interferon	Melhor	Pior	II-1
Resposta a interferon peguilado	Controverso		II-1
Resposta a lamivudina	Controverso		II-2
Falha após descontinuação da lamivudina	Menor	Maior	II-2
Resistência a lamivudina	Comparável		II-2
Resposta a adefovir	Comparável		II-1
Resposta a entecavir	Comparável		II-1

(BONINO, 2007; CHANG, 2003; JANSEN, 2005; KAO, 200B; LURIE, 2005; MA 2007; WAI, 2002; WESTLAND, 2003)

JUSTIFICATIVA

Devido aos questionamentos sobre a importância entre a relação da gravidade da doença e o seu genótipo, à escassez de estudos no Nordeste, e ausência de estudos no Estado de Sergipe, optamos pela realização desta pesquisa.

4.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foi realizado um estudo com pacientes portadores de Hepatite B crônica em acompanhamento regular no Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

4.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo transversal.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada no Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário (HU-UFS) da Universidade Federal de Sergipe, sendo o HU-UFS o único serviço especializado de referência no Estado.

Os exames laboratoriais foram realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de Sergipe; a análise das biópsias foi realizada no Laboratório de Patologia do HU-UFS e a análise molecular das amostras foi realizada no Laboratório de Investigação Médica – LIM07, Gastro LBM, na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP.

4.3 POPULAÇÃO ALVO

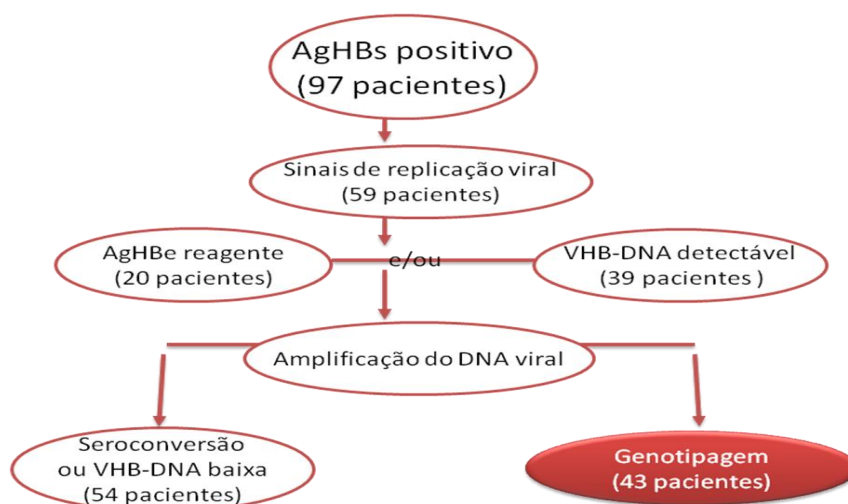
O estudo teve como população alvo, pacientes portadores de Hepatite B crônica, acompanhados regularmente pela equipe médica do Ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário da Universidade de Sergipe em Aracaju - SE.

A pesquisa foi realizada através da análise dos prontuários dos pacientes selecionados; da análise do material extraído de biópsia hepática no Laboratório de Patologia do HU; e da realização do PCR para amplificação viral e posterior sequenciamento no Laboratório de

Investigação Médica – LIM07, Gastro LBM, na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP.

Foram selecionados 97 pacientes com AgHBs positivo e sinais de replicação viral, onde foram coletados dos prontuários destes os seguintes dados: AgHBs, AgHBe, Anti-HBe, Testes bioquímicos (ALT, AST, GGT, FA, Albumina, Bilirrubinas), Pesquisa sérica quantitativa do DNA-VHB e biópsia hepática quando indicada pelo médico responsável. De acordo com as indicações clínicas 72,1% foram submetidos à biópsia hepática.

A duração da seleção foi de Janeiro de 2008 a Setembro de 2009.



4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Idade igual ou superior a 18 anos ao tempo de coleta de dados;
- Ser acompanhado regularmente no ambulatório do Serviço de Hepatologia do Hospital da Universidade Federal de Sergipe;
- Ser portador crônico de AgHBs por mais de 6 meses, com carga viral detectável, independentemente do resultado do sistema “e” (AgHBe ou AntiHBe positivo ou negativo).

4.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe sob o CAAE 0012.0.107.000-09. Os potenciais participantes foram convidados a participar deste estudo. Os objetivos do estudo foram apresentados aos pacientes e com a concordância dos mesmos, o termo de consentimento pós-esclarecido foi assinado pelo paciente e pesquisador, conforme a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Este estudo foi realizado respeitando as normas éticas e os preceitos da Declaração de Helsinque de 1975.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em relação à análise estatística, as variáveis qualitativas foram apresentadas através de frequências e percentuais. Para associação dos dados, foram utilizados o teste quiquadrado e a correlação de Pearson. O p só foi considerado significativo quando menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$). Para a execução desta tarefa, foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para Windows na versão 13.0.

4.7 ANÁLISE LABORATORIAL

Os testes imunológicos foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFS através do método de Meia (Microparticle enzyme-immunoassay), no aparelho da ABBOTT®, modelo AXSYM. Já a pesquisa sérica quantitativa do VHB foi realizada no LACEN, em aparelho modelo Cobas, da marca Roche®, utilizando o método de TaqMan.

A pesquisa sérica quantitativa do VHB foi realizada no LACEN, no aparelho modelo Cobas, da marca Roche, utilizando o método de TaqMan.

Os materiais extraídos das biópsias hepáticas foram analisados no Laboratório de Patologia do Hospital Universitário da Universidade de Sergipe. Os fragmentos das biópsias hepáticas foram fixados em formol a 10%, processados com álcool e xilol, incluídos em

parafina e seccionados em cortes de 3-5µm de espessura. Estes foram corados pela hematoxilina-eosina, tricômio de Masson, Reticulina e Perls. A análise histológica incluiu aspectos qualitativos e quantitativos das seguintes alterações morfológicas: fibrose e atividade inflamatória baseados na classificação Metavir.

Foram selecionadas 97 amostras de soro, sendo estas fracionadas em alíquotas de aproximadamente 2ml, devidamente identificadas, armazenadas em tubos estéreis, e congeladas à aproximadamente -20°C. As amostras selecionadas foram transportadas em gelo seco para o Laboratório de Investigação Médica – LIM07, Gastro LBM, na Faculdade de Medicina da USP, sob supervisão da Profa. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita.

O laboratório para amplificação de material genético apresenta características fundamentais para o sucesso do procedimento. Áreas restritas para evitar contaminação do material a ser amplificado e também de outras áreas de uso comum. Todo o material utilizado durante amplificação é estéril, como bancadas, luvas, pipetas, ponteiras e vidrarias evitando com isso amplificação de material cruzado.

Foi necessária a utilização de capela de fluxo laminar antes mesmo da amplificação e extração do material. Em indivíduos normais a quantidade de DNA presente no soro ou plasma é pequeno, porém suficiente para a realização de PCR. Em diferentes diagnósticos, como por exemplo, câncer, doenças auto imunes e infecções virais ou bacterianas esta quantidade de DNA circulante pode aumentar sensivelmente (BARTLETT & STILING, 2003).

4.7.1 Extração de DNA viral

O DNA viral foi extraído de acordo com o *QIAmp[®] DNA Blood mini kit* (Qiagen, Alemanha). Em resumo, 200 microlitros (µL) de soro equilibrado em temperatura ambiente foram adicionados a um microtubo (*Axygen*) de 1,5 mililitros (ml) contendo 20 µL de proteinase K. A seguir adiciona-se 200 µL de buffer AL e mistura-se por agitação em vortex (Vortexgene, USA) por 15 segundos. Incubados a 56° C por 10 minutos e após breve centrifugação, adiciona-se 200 µL de etanol 100% (v/v) à amostra, misturando-se por

agitação. Novamente, após breve centrifugação, transfere-se a mistura à coluna de centrifugação e centrifuga-se por 1 min à 5.900g (centrífuga *Eppendorf* modelo 5415R, Alemanha). Transferida a coluna para novo tubo coletor de 2 ml, adiciona-se 500 µL de *buffer* AW1 e centrifuga-se a 5.900g por 1 min. Adiciona-se 500 µL de *buffer* AW2 e então centrifuga-se a 16.000g por 3 min. Transferida a coluna para um microtubo de 1,5 ml e adiciona-se 100 µL de *buffer* AE. Por fim, a amostra é incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada a 5.900g por 1 min. O DNA obtido, de acordo com o fabricante é livre de proteínas, nucleases e outros contaminantes e inibidores.

4.7.2 Desenho dos iniciadores

Foi utilizado um conjunto de iniciadores que amplificam seletivamente a região do gene S do vírus da hepatite tipo B.

Para amplificação de um segmento de 418 pb no gene S foram utilizados os seguintes iniciadores:

VHBgeneS –D: 5' TCTAGACTCGTGGTGGACTTCT 3'

VHBgeneS –R1: 5' AGTGGGCCTCAGTCCGTTTCT 3';

VHBgeneS –R2: 5' AGTGGGCCTCAGCCGTTTCT 3'.

Dois iniciadores reversos foram necessários devido a região codificadora do gene S ser muito variável para a genotipagem.

A sequência completa da proteína S encontra-se no geneBank (National Center of Biothecnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sob o código AF363961.

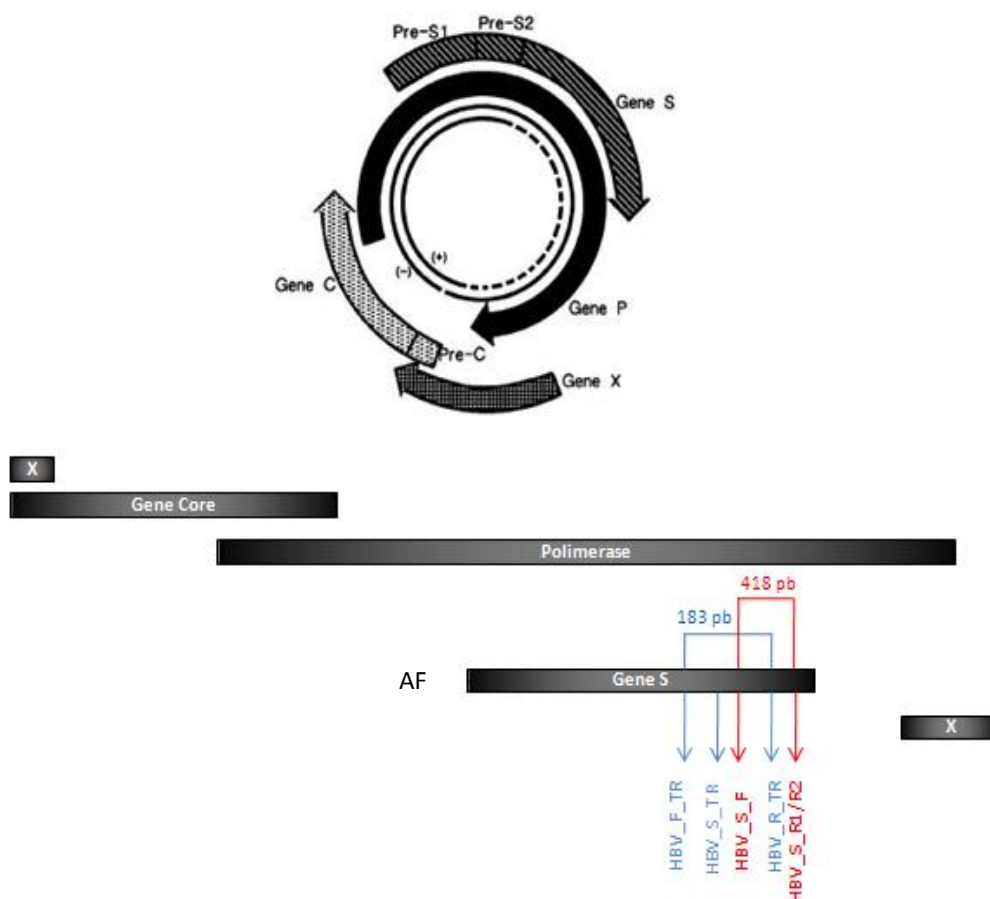


Figura 6. Esquema do DNA genômico do VHB. Localização dos iniciadores utilizados no gene S. **HBV_F_TR** iniciador direto do PCR em tempo real, **HBV_S_TR** sonda 5'FAM- MGB para o PCR em tempo real, **HBV_S_F** iniciador direto do PCR convencional e sequenciamento, **HBV_R_TR** iniciador reverso do PCR em tempo real, **HBV_S_R1/R2** iniciadores reversos do PCR convencional e sequenciamento.

4.7.3 Amplificação por PCR

Foi realizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando como fita molde o DNA viral extraído anteriormente. Foram utilizados iniciadores (Invitrogen, Carlsbad

California) correspondentes à região do gene S do vírus (descritos acima). As reações de PCR foram feitas no termociclador Mastercycler Eppendorf.

Condições de ciclagem:

95° C - 5 min *hot start* da enzima

95° C - 1 min	}	35 ciclos
62° C - 1 min		
72° C - 2 min		

Após o fim dos 35 ciclos os produtos de PCR foram estocados a -20° C.

De acordo com o desenho do experimento, foi amplificado um fragmento de 418 pb compreendendo uma fração da região do gene S do vírus.

Os resultados das amplificações de PCR foram identificados em gel de agarose 1,5% utilizando como marcador 100bp DNA *mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e corado com brometo de etídio.

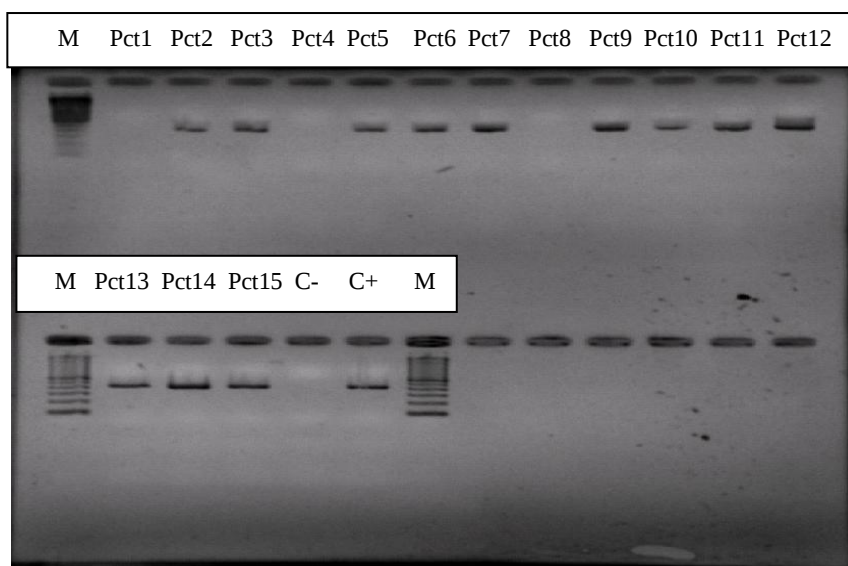


Figura 7: Foto do gel de agarose 1,5% demonstrando amplificações do DNA VHB.

4.7.4 Purificação de fragmentos de PCR

Para purificar os fragmentos de PCR, foi utilizado o *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen, Alemanha). Resumidamente, foi adicionado ao produto de PCR, 5 volumes da solução PBI para cada volume de reação de PCR e colocada em uma coluna a base de sílica. Centrifugada por 1 minuto a 16.000g em temperatura ambiente. O que passou pela coluna foi descartado e a coluna novamente colocada no tubo coletor. Em seguida, serão aplicados 750 µl da solução PE no centro da coluna e essa mistura foi centrifugada a 16.000g por 1 minuto. O que passou pela coluna foi novamente descartado e a coluna foi colocada em um microtubo de 1,5 ml estéril. Foi adicionado na coluna, 50 µl de solução EB (*Elution Buffer*, 10mM Tris-Cl, pH 8.5). Essa mistura foi incubada por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugada a 16.000g por 1 minuto. A solução EB desloca o fragmento de PCR que está na coluna de sílica. A amostra purificada foi armazenada em *freezer* -20° C até o momento da reação de sequenciamento.

4.7.5 Eletroforese:

Eletroforese foi usada tanto para quantificação de DNA viral após a purificação quanto para resolver os fragmentos amplificados. Foi utilizada cuba de eletroforese horizontal Labnet (e gel de agarose 1.5 % (p/v) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) 12,5 cm X 12 cm em tampão TEB 10 X (tris 108 g; 40 ml de EDTA 0,5 M e ácido bórico 55 g e H₂O em quantidade suficiente para 1000 ml). As corridas foram realizadas sob uma tensão de 10 V/cm. O gel de agarose foi corado com brometo de etídeo (EtBr) e fotografado utilizando câmera fotográfica Olympus C 4000 (Olympus, Japão) sob luz Ultra Violeta. Foi utilizado marcador de peso molecular *Low DNA mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad CA) para a avaliação e quantificação de DNA viral. Para a análise do fragmento de PCR, foi utilizado 100bp DNA *mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA).

4.7.6 Sequenciamento de DNA:

Os sequenciamentos dos fragmentos de PCR foram feitos com o kit *DYEnamicTMET Terminator* (GE-Healthcare , UK limited.) utilizando o sequenciador MegaBace 1000 GE-Healthcare. A reação de sequenciamento foi feita no *termociclador Mastercycler Eppendorf* utilizando 40 ng a 60 ng de fragmento de PCR purificado, 10 pmol de iniciador Direto e Reverso, 4 µl de *DYEnamic ET terminator premix* e água *MilliQ* autoclavada em quantidade suficiente para 10 µl. As reações de sequenciamento foram feitas nas seguintes condições:

95° C -20 seg	} 25 ciclos
50° C -15 seg	
60° C -1 minuto	

Após o término dos ciclos, as reações foram precipitadas com 20 µl de isopropanol 80 % (v/v), e submetidas à centrifugação por 1.500g por 60 minutos à temperatura ambiente na centrífuga *Eppendorf* modelo 5804R. O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado foi lavado com 200 µl de etanol 70 % (v/v) e centrifugado novamente nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o precipitado seco a 55° C por aproximadamente 40 minutos no termociclador *Mastercycler Eppendorf*. Após a precipitação, as reações de sequenciamento devidamente secas foram ressuspensas em 10 µL de *loading solution buffer forTMMEGABACE* (Formamida) e levadas para sequenciar ao LIM 56 no Instituto de Medicina Tropical (IMT).

HUFS

CTCTCAATTTTCTAGGGGGATCACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCCAACCTCCAATC
 ACTCACCAACCTCCTGTCCTCCAATTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCAT
 ATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTATTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTG
 CCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCCACAACAACCAGTACGGGACCCTGCAAAACCTGCACGAC
 TCCTGCTCAAGGCAACTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGACGGAAATTGCAC
 CTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAG

Figura 8: Sequência de genótipo A

A sequência determinada durante a genotipagem é lançada no programa Genotyping, sendo interpretada em um gráfico que irá comparar a sequência encontrada com outras previamente descritas na literatura.

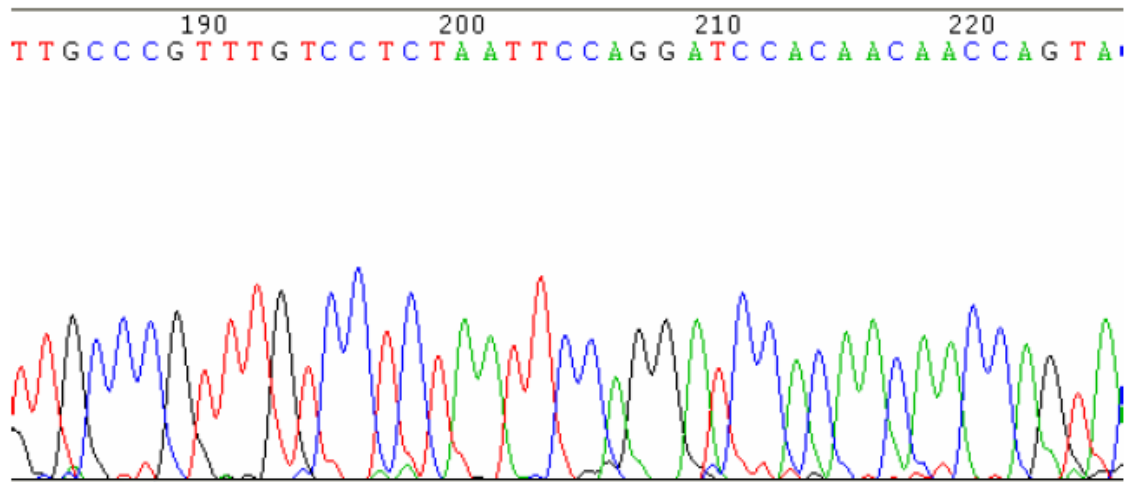


Figura 9: Eletroferograma da sequência de DNA.

Das 97 amostras que passaram pelo processo de extração de DNA, 43 foram amplificadas com sucesso.

5.0 RESULTADOS

Do total de 97 amostras de pacientes, conseguiu-se amplificar o DNA viral em 43, as quais foram submetidas à genotipagem do VHB, sendo identificados os genótipos A e F. O genótipo A foi o mais frequente no grupo com 35/43 (81,4%) pacientes. Oito/43 (18,6%) pacientes eram portadores do VHB genótipo F. Destes, 4 são da mesma família, do interior do estado.

Houve predomínio do gênero masculino com 29/43 pacientes (67,4%). A idade média dos pacientes foi de 36,33 +/- 11,09 (18-57) anos.

Foi realizada análise estatística para avaliar possível relação entre o genótipo viral e parâmetros laboratoriais e histológicos: níveis séricos de ALT, carga viral, presença de AgHBe e achados de atividade inflamatória e fibrose no exame anátomo-patológico (Tabela 1). Não houve diferença estatística entre os grupos de genótipos em nenhum dos parâmetros avaliados. Houve maior nível de carga viral no grupo de pacientes com genótipo F, apesar de não apresentar significância estatística.

Em relação ao nível de fibrose segundo critérios METAVIR, 19/31 (61,3%) foram classificados de 0 a 1 (F0/1) e 12/31 (38,7%) F2/4. Dos pacientes com genótipo A, 15/25 (60%) apresentaram F0/1 e 10/25 (40%) F2/4. Do genótipo F, 4/6 (66,7%) apresentaram F0/1 e 2/6 (33,3%) F2/4. Não houve diferença significativa em relação aos achados no exame anátomo-patológico nos diferentes genótipos encontrados.

Tabela 1. Achados laboratoriais em 43 pacientes portadores do VHB

		Genótipo A	Genótipo F	Pearson Chi-Square
ALT	>1X	20/35 (57,1%)	5/8 (62,5%)	0,78
	<1X	15/35 (42,8%)	3/8 (37,5%)	
AgHBe	Reagente	16/35 (42,7%)	4/8 (50%)	0,82
	Não reagente	19/35 (54,2%)	4/8 (50%)	
Carga Viral	<10.000	20/32 (62,5%)	2/7 (28,6%)	0,101
	>10.000	12/32 (37,5%)	5/7 (71,4%)	
Biópsia	A 0/1	13/25 (52%)	3/6 (50%)	0,93
	A 2/3	12/25 (48%)	3/6 (50%)	
	F0/1	15/25 (60%)	4/6 (66,7%)	
	F2/4	10/25 (40%)	2/6 (33,3%)	

Em relação aos achados laboratoriais, 20/43 (46,5%) apresentaram ALT menor que uma vez o valor de referência (VR) enquanto 15/43 (34,9%) apresentaram níveis de ALT maior que uma vez o VR. Houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de ALT de acordo com a presença do AgHBe (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação dos níveis séricos de ALT em relação à presença de AgHBe

	ALT normal	ALT elevada	Total
AgHBe negativo	17 (73,9%)	6 (26,1%)	23 (100%)
AgHBe positivo	8 (40,0%)	12 (60,0%)	20 (100%)

P= 0,025

Em pacientes com genótipo A, 20/35 (57,1%) apresentaram níveis séricos normais de ALT e em 15/35 (42,8%) , esses níveis foram maiores que o VR. Já no genótipo F, 5/8 (62,5%) apresentaram níveis séricos normais de ALT e 3/8 (37,5%), valores mais elevados. Apenas um paciente/40 (2,5%) apresentou nível sérico de ALT maior que quatro vezes o VR. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de ALT nos genótipos descritos p=0,78.

Em relação à presença do AgHBe, 20/43 (46,5%) apresentaram AgHBe reagente enquanto 23/43 (53,5%) apresentaram AgHBe negativo. Um dos pacientes com AgHBe positivo também apresentou o anti-HBe reagente. Dos pacientes com genótipo A, 20/32 (62,5%) apresentaram o AgHBe reagente enquanto a positividade deste marcador esteve presente em 4/8 (50%) dos pacientes com o genótipo F.

Dos 23 pacientes AgHBe negativos, 8/23 (34,8%) apresentavam carga viral (CV) maior que 10.000 cópias/ml. Destes, 6/8 (75%) eram do genótipo A e 2/8 (25%) do F. Destes pacientes apenas 2/8 (25%) apresentavam níveis séricos de ALT maiores que uma vez o VR, um paciente do genótipo A e um do F. Em relação aos achados no exame anatomopatológico, 6/8 (75%) destes pacientes apresentaram achados de fibrose (graus 2 a 4 na classificação de Metavir) e/ou atividade inflamatória (graus 2 a 3 na classificação de Metavir) importante. Sendo destes, cinco pacientes do genótipo A e um do genótipo F.

Dos 43 pacientes submetidos à identificação do genótipo do VHB, 39 (90,1%) foram submetidos à avaliação da CV do VHB. Destes, 22/39 (56,4%) apresentaram CV menor que 10.000 cópias/ml, 7/39 (17,9%) apresentaram CV entre 10.000 e 100.000 cópias/ml e 10/39 (25,6%) apresentaram CV maior que 100.000 cópias/ml.

Trinta e dois/39 (82,05%) pacientes com genótipo A e 7/8 (87,5%) pacientes com genótipo F foram avaliados quanto à CV. Dos pacientes com genótipo A, 20/32 (62,5%) apresentaram CV inferior a 10.000 cópias/ml, enquanto 12/32 (37,5%) apresentavam CV maior que 10.000 cópias/ml. Dos portadores do genótipo F, 2/7 (28,5%) apresentaram CV inferior a 10.000 cópias/ml, enquanto 5/7 (71,4%) apresentavam CV maior que 10.000 cópias/ml. No entanto, não houve diferença significativa em relação a CV nos diferentes genótipos encontrados ($p=0,101$).

Dos pacientes avaliados quanto a CV, 12/39 (30,8%) eram portadores inativos do VHB (AgHBe negativo, CV menor que 10.000 cópias/ml e níveis séricos de ALT normais).

De acordo com as indicações clínicas, 31/43 (72,1%) pacientes foram submetidos à biópsia hepática por orientação do médico assistente.

Quanto ao grau de atividade inflamatória e fibrose baseados na classificação de Metavir, 16/31(51,61%) apresentaram atividade inflamatória entre 0 e 1(A0/1) enquanto 15/31 (48,4%) apresentaram atividade entre 2 e 3 (A2/3). Dos pacientes com genótipo A, 13/25 (52%) apresentaram A0/1 e 12/25 (48%) A2/3. Do genótipo F, 3/6 (50%) apresentaram A0/1 e 3/6 (50%) A2/3.

A relação entre genótipos e níveis de atividade e fibrose no exame anátomo-patológico não apresentou diferenças significantes quando comparados à carga viral maior ou menor que 10.000cópias/ml (Tabela3 e Tabela 4).

Tabela 3. Relação entre os genótipos, carga viral e atividade inflamatória

	CV <10.000*		CV>10.000**	
	Genótipo A	Genótipo F	Genótipo A	Genótipo F
Atividade 0/1	8/13(61,53%)	1/1 (100%)	4/10(40%)	2/5(40%)
Atividade 2/4	5/13(38,46%)	0/1 (0%)	6/10(60%)	3/5(60%)

*p=0,586

**p=0,624

Tabela 4. Relação entre os genótipos, carga viral e fibrose

	Genótipo A		Genótipo F	
	CV <10.000*	CV>10.000**	CV <10.000*	CV>10.000**
Fibrose 0/1	10/13(76,9%)	4/10(40%)	1/1 (100%)	3/5 (60%)
Fibrose 2/4	3/13 (33,1%)	6/10 (60%)	0/1 (0%)	2/5(40%)

*P=0,653 **P= 0,896

Em relação a doenças associadas, apenas 1/43 (2,3%) pacientes apresentou hepatite C associada ao genótipo F. Dois/43 (4,7%) apresentaram achados de esquistossomose em biópsia hepática e apresentaram genótipo A. Dois/43 (4,7%) apresentaram sorologia positiva

para HIV, sendo um genótipo A e outro genótipo F. E 1/43 paciente (2,3%) evoluiu com carcinoma hepatocelular sendo ele paciente genótipo A.

6.0 DISCUSSÃO

Em Sergipe, estado na região Nordeste do Brasil, encontramos apenas os genótipos A e F com predominância do genótipo A em 81,4% da população avaliada. Dados semelhantes foram obtidos em Salvador, cidade da mesma região do Brasil, onde foram encontrados, em pacientes com hepatite crônica, os genótipos A e F, (RIBEIRO, 2006). O genótipo D foi descrito apenas em pacientes com hepatite aguda (LYRA, 2005) e o genótipo B em uma paciente de origem asiática.

Segundo o Protocolo de 2009 para Hepatite B, e de suma importância que pesquisas como esta, avaliem a população de pacientes de Hepatite B crônica com a finalidade de auxiliar o Estado a estabelecer diretrizes terapêuticas nacionais e orientar os profissionais de saúde no manejo da hepatite viral crônica B e coinfeções, visando estabelecer uma política baseada nas melhores evidências disponíveis na literatura científica. Adicionalmente, possibilitar a prescrição segura e eficaz, buscando o uso racional do arsenal terapêutico e a melhor relação de custo-efetividade, de forma a garantir a sustentabilidade do acesso universal ao tratamento.

Os genótipos do VHB apresentam uma importante relação com a região geográfica. No Brasil, já foram descritos os genótipos A, D, F, B e C, sendo o A, D e F os predominantes (CARRILHO, 2004; TONETTO, 2009). Os genótipos B e C descritos no Brasil, em geral, foram encontrados em pacientes de origem asiática (RIBEIRO, 2006; SITNIK, 2004).

A distribuição dos genótipos apresenta relação importante com as características étnicas da população. Na região Amazônica, em tribos que não tinham contato com brancos, foi encontrado, exclusivamente, o genótipo F. Já nas tribos em que este contato era frequente foi encontrado também o VHB/A (BERTOLINI, 2000). Isto sugere que o genótipo F é o genótipo encontrado na população nativa brasileira, enquanto o genótipo A pode ser encontrado decorrente da imigração de negros e europeus para o Brasil, tendo em vista esse genótipo ser o mais frequente nestes continentes (KIMBI, 2004; MAYERAT, 1999). Quatro/8 pacientes deste estudo eram da mesma família do interior do Estado.

Em relação ao gênero, a maior parte dos pacientes portadores de hepatite crônica submetidos à genotipagem era do gênero masculino (67,4%) da mesma forma que já relatado em outros estudos (ABDO, 2006; TONETTO, 2009; LINDH, 1999).

A ALT foi mais elevada nos pacientes AgHBe positivos, evidenciando a atividade de replicação viral nestes pacientes (TONETTO, 2009).

No presente estudo, 53,5% dos pacientes com sinais de replicação viral eram AgHBe negativos. No Brasil, a maior parte dos pacientes portadores de hepatite crônica também apresentam AgHBe negativo (RIBEIRO, 2006).

Em estudo anterior em nosso serviço, 87% dos pacientes portadores crônicos do AgHBs foram AgHBe negativos (SANTOS, 2009). Entretanto, é possível ter havido um viés de seleção no presente estudo já que, alguns pacientes AgHBe não reagentes foram excluídos deste estudo pela impossibilidade de amplificação do DNA viral durante o processo de seleção.

Em estudo caso-controle, comparando grupos de portadores do subtipo Aa e Ae encontrou-se menor prevalência do AgHBe positivo em portadores do VHB/Aa (31%) quando comparados com o VHB/Ae (49%) ($p=0.033$) (TANAKA, 2004). Estudos observacionais em países africanos mostraram que menos de 5% dos pacientes infectados pelo VHB apresentavam AgHBe positivo e que estes pacientes apresentavam, concomitantemente, baixos níveis séricos do VHB-DNA (KRAMVIS, 1997; ERHARDT, 2005). Por outro lado, estudos europeus mostram que pacientes portadores do VHB apresentam maior taxa de remissão sustentada após seroconversão do AgHBe (SÁNCHEZ-TAPIAS, 2002). Essa divergência talvez venha a ser elucidada pela diferença no padrão do genótipo A, genótipo predominante nesses continentes.

A ausência do AgHBe sugere que o subtipo africano seja o mais encontrado em nosso Estado. Segundo Melo et.al. (2007), em estudo com candidatos a doadores de sangue no Brasil, o genótipo A também foi o mais prevalente (48,5%) sendo que a maior parte destes pacientes (90,2%) apresentavam o subtipo africano (Aa).

Com relação à carga viral, não houve diferença quando levado em consideração o genótipo viral. Em Salvador, analisando portadores crônicos do VHB com genótipos A e F,

não foi encontrada diferença significativa dos níveis de HBV-DNA nos diferentes genótipos. Na Espanha, não houve diferença significativa entre as cargas virais e os genótipos A e F. Contudo, os pacientes com genótipo A apresentaram maior *clearance* do HBV-DNA que os pacientes com VHB/D e VHB/F (SÁNCHEZ-TAPIAS, 2002).

Alguns estudos têm demonstrado relação entre os genótipos do VHB com mutações nas regiões *precore* que levam a uma diminuição na produção do AgHBe (GRANDJACQUES, 2000).

Evidências laboratoriais de infecção por mutantes *precore* (carga viral maior que 10.000 cópias/ml com AgHBe não reagente) foram encontrados em 8/43 (18,6%) dos pacientes, a maioria 6/8 (75%) do genótipo A.

A relação entre genótipos com atividade e fibrose no anatomopatológico não apresentou diferença estatisticamente significativa. Em estudo realizado na cidade de Campinas (TONETTO, 2009), o grau de fibrose foi mais elevado nos pacientes com VHB/F (3,0) quando comparados com o VHB/A (2,4), VHB/D (2,0) e VHB/C (1) embora também sem diferença significativa ($p=0,1148$).

Neste trabalho, foram descritos os genótipos A e F com predomínio do genótipo A. No entanto, possivelmente pelo número de pacientes analisados, não foram encontradas diferenças significantes entre os genótipos com as manifestações clínicas/laboratoriais e histológicas. É necessário o seguimento destes pacientes a fim de determinar se os genótipos interferem na progressão da doença e se estes são determinantes de mortalidade como ocorre na hepatite C.

7.0. CONCLUSÃO

- Foram identificados apenas os genótipos A e F do VHB na população estudada.
- O genótipo A foi mais prevalente (81%).
- Não foram identificadas associações entre o genótipo viral e os marcadores de replicação viral AgHBe ou carga viral sérico do VHB.
- Não foram identificadas associações entre o genótipo viral e os níveis séricos de ALT ou alterações histológicas.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDO AA, JARALLAH BMA, SANAI FM, HERSI AS, AL-SWAT K, AZZAM NA, AL-DUKHAYIL M, AL- MAARIK A, AL-FALEH FZ. Hepatitis B genotypes: Relation to clinical outcome in patients with chronic hepatitis B in Saudi Arabia. **World J Gastroenterol.** v. 21, p. 7019-24, 2006.
2. ALFARESI M, ELKOUSH A, ALSHEHHI H, ALZAABI A, ISLAM A. Hepatitis B vírus genotypes and precore and core mutants in UAE patients. **Viol J.** v.15; 7:160, 2010.
3. ARAUZ-RUIZ P, NORDER H, ROBERTSON BH, MAGNIUS LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **Journal of General Virology.** v.83, p. 2059–73, 2002
4. BAIG S, SIDDIQUI AA, AHMED W, QURESHI H, ARIF A. The association of complex liver disorders with HBV genotypes prevalent in Pakistan. **Viol J.** v.4, p.128-34, 2007.
5. BAPTISTA M, KRAMVIS A, KEW MC. High prevalence of 1762(T) 1764(A) mutations in the basic core promoter of hepatitis B virus isolated from black Africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers. **Hepatology,** v.29, p.946–53,1999.
6. BARTLETT JMS, STIRLING D. PCR protocols – Methods in Molecular Biology. Humana Press, v. 226, 2003.
7. BERTOLINI DA, MOREIRA RC, SOARES M, BENSABATH G, LEMOS MF, MELLO IMVGC, PINHO JRR. Genotyping of hepatitis B virus in indigenous populations from Amazon region, Brazil. **Virus Rev. Res,** v.5 (2), p.101, 2000.
8. BONINO F, MARCELLIN P, LAU GK, HADZIYANNIS S, JIN R, PIRATVISUTH T, GERMANIDIS G, YURDAYDIN C, DIAGO M, GUREL S, LAI MY, BRUNETTO MR, FARCI P, POPESCU M, MCCLOUD P. Predicting response to peginterferon a-2a, lamivudine and the two combined for HBeAg-negative chronic hepatitis B. **Gut,** v.56, p.699–705, 2007.
9. BOWYER SM, VAN STADEN L, KEW MC, SIM JG. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. **J Gen Virol,** v. 78 (7), p.1719-29, 1997.
10. BRUNETTO MR, STEMLER M, BONINO F, SCHODEL F, OLIVERI F, RIZZETTO M, VERME G, WILL H. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. **J Hepatol,** v.10(2), p.258-61, 1990.
11. BUCKWOLD VE, XU Z, CHEN M, YEN TS, OU JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. **J Virol,** v.70, p. 5845–51, 1996
12. BUTI M, COTRINA M, VALDES A, JARDI R, RODRIGUEZ-FRIAS F, ESTEBAN R. Is hepatitis B virus subtype testing useful in predicting virological response and resistance to lamivudine? **J Hepatol,** v.36, p. 445-6, 2002;

13. CARRILHO FJ, MORAES CR, PINHO JRR, MELLO IMVGC, BERTOLINI DA, LEMOS MF, MOREIRA RC, BASSIT LC, CARDOSO RA, SANTOS GR, SILVA LC. Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. **BMC Public Health**, v. 4, p.13-24, 2004 Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/4/13>, acessado em 22/07/09. doi:10.1186/1471-2458-4-13
14. CARMAN WF, JACYNA MR, HADZIYANNIS S, KARAYIANNIS P, MCGARVEY MJ, MAKRIS A, THOMAS HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. **Lancet**, v. 2, p.588-90, 1989.
15. CHAN HL, HUSSAIN M, LOK AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. **Hepatology**, v.29, p.976-84, 1999.
16. 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 Microbiol**, v.41, p.1277-9, 2003.
17. CHAN H L, WONG M L, HUI A Y, CHIM A M, TSE A M, HUNG L C, CHAN FK, SUNG JJ. Hepatitis B virus genotype has no impact on hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine treatment. **World J Gastroenterol**, v.9, p.2695-7, 2003B
18. CHEINQUER H. Hepatites Virais agudas e Crônicas. In: Lopes AC(ed): **Tratado de clínica médica**. São Paulo, Roca, v.1, p.1287-307, 2006.
19. CHU CJ, KEEFFE EB, HAN SH, PERRILLO RP; MIN AD; SOLDEVILA-PICO C; CAREY W; BROWN RS JR; LUKETIC VA; TERRAULT N; LOK AS. Hepatitis B virus genotypes in the United States: Results of a nationwide study. **Gastroenterol**, v. 125, p.444-51, 2003.
20. CLEMENS SAC, FONSECA JC, AZEVEDO T, CAVALCANTI A, SILVEIRA TR, CASTILHO MC, CLEMENS R. Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.33(1), p.1-10, 2000.
21. CONDE SRSS, MOIA LJP, BARBOSA MSB, AMARAL ISA, MIRANDA ECBM, SOARES MCP, BRITO EMF, SOUZA OSC, ARAÚJO MT, DEMACHKI S, REBELLO JRP, MESQUITA MGS, BERTOLLINI DA, ISHAK R: Prevalência de 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 Bras Med Trop**, v.37, p.33-9, 2004.
22. COUROUCE-PAUTY A M, PLANCON A, SOULIER JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. **Vox sanguinis** v.44, p.197-211. 1983.
23. DANE DS, CAMERON CH, BRIGGS M. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-Associated hepatitis. **Lancet**, v.1, p.695-8, 1970.
24. DICKSON, DC, EVERHART, JE; LAKE, JR; WEI Y, SEABERG EC, WIESNER RH, ZETTERMAN RK, PRUETT TL, ISHITANI MB AND HOOFNAGLE JH. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B

- core antigen. The NIDDK. Liver Transplantation database. **Gastroenterol**, v. 113, p.1668-72, 1997.
25. DUPINAY T, RESTORP K, LEUTSCHER P, ROUSSET D, CHEMIN I, MIGLIANI R, MAGNIUS L, NORDER H. High prevalence of hepatitis B virus B virus genotype E in Northern Madagascar indicates a West-African lineage. *J Med Virol*; 82(9):1515-26, 2010.
 26. DUSHEIKO GM, BOWYER SM, SJOGREN MH, RITCHIE MJ, SANTOS AP, KEW MC. Replication of hepatitis B virus in adult carriers in an endemic area. **J Infect Dis**, v.152, p.566-71, 1985.
 27. ERHARDT A, BLONDIN D, HAUCK K, SAGIR A, KOHNLE T, HEINTGES T, HÄUSSINGER D. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. **Gut**, v.54, p.1009-13, 2005.
 28. FEITELSON MA, DUAN LX, GUO J, SUN B, WOO J, STEENSMA K et al. X region deletion variants of hepatitis B virus in surface antigen - negative infections and non-A, non-B hepatitis. **J Infect Dis**, v.172(3), p.713-22, 1995.
 29. FEITELSON, M, LEGA L, GUO J, RESTI M, ROSSI ME, AZZARI C ET AL. Pathogenesis of post transfusion viral hepatitis in children with beta - thalassemia. **Hepatology**, v.19(3), p.558-68, 1994.
 30. FORBI JC, VAUGHAN G, PURDY MA, CAMPOS DS, XIA GL, GANOYA-RAEYA LM, RAMACHANDRAN S, THAI H, KHUDYAKOV, YE. Epidemic history and evolutionary dynamics of hepatitis B virus infection in two remote communities in rural Nigeria. **PLoS One**.v. 19;5(7):e11615, 2010.
 31. FURUSYO N, NAKASHIMA H, KASHIWAGI K, KUBO N, HAYASHIDA K, USUDA S, MISHIRO S, KASHIWAGI S, HAYASHI J. Clinical outcomes of hepatitis B virus (HBV) genotypes B and C in Japanese patients with chronic HBV infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**,v.67(2), p. 151-7, 2002.
 32. GERNER PR, FRIEDT M, OETTINGER R, LAUSCH E, WIRTH S. The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children. **Virology**, v.245, p.163-72, 1998.
 33. GRANDJACQUES C, PRADAT P, STUYVER L, CHEVALLIER M, CHEVALLIER P, PICHOU D, MAISONNAS M, TREPO C, ZOULIM F. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome : correlation with viral persistence and disease severity. **J Hepatol**, v.33, p.555-9, 2000.
 34. GUST ID, BURRELL CJ, COULEPIS AG, ROBINSON WS, ZUCKERMAN AJ. Taxonomic classification of human hepatitis B virus. **Intervirology**, v.25(1), p.14-29, 1986.
 35. HADDAD R, MARTINELLI ADE L, UYEMURA SA, YOKOSAWA J. Hepatitis B virus genotyping among chronic hepatitis B patients with resistance to treatment with lamivudine in the City of Ribeirão Preto, State of São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**. v.43(3): 224-8, 2010.

36. HASEGAWA I, TANAKA Y, KRAMVIS A, KATO T, SUGAUCHI F, ACHARYA SK, ORITO E, UEDA R, KEW MC, MIZOKAMI M. Novel Hepatitis B Virus Genotype A Subtyping Assay That Distinguishes Subtype Aa from Ae and Its Application in Epidemiological Studies. **J Virol**, v.78(14), p. 7575–81, 2004.
37. HOU J, SCHILLING R, JANSSEN H L A. Molecular characteristics of hepatitis B virus genotype A confer a higher response to interferon treatment. **J Hepatol**, v.34(1), p.15-6, 2001.
38. HOLLINGER FB, LIANG TJ. Hepatitis B Virus. In: Knipe D.M. et. al. eds. **Fields Virology**, 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, p.2971-3036, 2001.
39. IMAMURA T, YOKOSUKA O, KURIHARA T, KANDA T, FUKAI K, IMAZEKI F, SAISHO H. Distribution of hepatitis B viral genotypes and mutations in the core promoter and precore regions in acute forms of liver disease in patients from Chiba, Japan. **Gut**, v.52(11), p.1630-7, 2003.
40. ISHIKAWA K, KOYAMA T, MASUDA T. Prevalence of HBV genotypes in asymptomatic carrier residents and their clinical characteristics during long-term follow-up: the relevance to changes in the HBeAg/anti-HBe system. **Hepatol Res**, v.24(1), p.1-7, 2002.
41. JANSSEN HL, VAN ZONNEVELD M, SENTURK H, ZEUZEM S, AKARCA US, CAKALOGLU Y, SIMON C, SO TM, GERKEN G, DE MAN RA, NIESTERS HG, ZONDERVAN P, HANSEN B, SCHALM SW. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. **Lancet**, v.365, p. 123-9, 2005.
42. KANE MA. Global status of hepatitis B immunization. **Lancet**, v.348, p.696, 1996.
43. KANN M, GERLICH W. Hepadnaviridae. Structure and molecular virology. In; Zuckerman AJ, Thomas HC. **Viral Hepatitis** (3ed.) London, Living-Stone, p.149-180, 1998.
44. KAO JH, CHENG PJ, LAI MY, CHEN DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterol**, v. 118, p.554-9, 2000.
45. KAO JH, WU NH, CHEN PJ, LAI MY, CHEN DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. **J Hepatol**, v.33, (6), p. 998-1002, 2000B.
46. KAO JH, LIU CJ, CHEN DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. **J Hepatol**, v.36, p.303-4, 2002.
47. KAO JH, CHEN PJ, LAI MY, CHEN DS Genotypes and Clinical Phenotypes of Hepatitis B Virus in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. **J Clin Microbiol**, v.40(4), 1207–9, 2002B.
48. KAO JH, CHEN DS. Global control of hepatitis B virus infection. **Lancet Infect Dis**, v.2(7), p.395-403, 2002C.
49. KAO JH, CHEN PJ, LAI MY, CHEN DS: Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. **Gastroenterol**, v.124, p.327–34, 2003.

50. KIDD-LJUNGGREN, K., MIYAKAWA, Y., KIDD AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. **J Gen Virol**, v.83, p. 1267-80, 2002.
51. KIMBI GC, KRAMVIS A, KEW MC. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. **J Gen Virol**, v.85, p.1211-20, 2004.
52. KRAMVIS A, BUKOFZER S, KEW MC, SONG E. Nucleic acid sequence analysis of the precore region of hepatitis B virus from sera of Southern African black adult Carriers of the Virus. **Hepatology**, v. 25 (1), p.235-40, 1997.
53. KURBANOV F, TANAKA Y, FUJIWARA K, SUGAUCHI F, MBANYA D, ZEKENG L, NDEMBA N, NGANSOP C, KAPTUE L, MIURA T, IDO E, HAYAMI M, ICHIMURA H, MIZOKAMI M. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. **J Gen Virol**, v.86, p.2047-56, 2005.
54. KUMAR A, KUMAR SI, PANDEY R, NAIK S, AGGARWAL R. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D. **Indian J Gastroenterol**, v.24(1), p.19-22, 2005.
55. LAU GKK, PIRATVISUTH T, LUO KX, MARCELLIN P, THONGSAWAT S, COOKSLEY G, GANE E, FRIED MW, CHOW WC, PAIK SW, CHANG WY, BERG T, FLISIAK R, MCCLOUD P, PLUCK N. Peginterferon Alfa-2a, Lamivudine, and the Combination for HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B. **N Engl J Med**, v. 352(26), p.2682-95, 2005.
56. 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 Asia hepatitis B virus carriers, **J Infect Dis**, v.179, p.773-82, 1999.
57. LINDH M, ANDERSSON AS, GUSDAL A. Genotypes at 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large scale analysis using a new genotyping method. **J Infect Dis**, v. 175, p.1285-93, 1997.
58. LIU CJ, KAO JH, CHEN DS. Therapeutic Implications of Hepatitis B Virus Genotypes. **Liver International**, v.25(6), p.1097-107, 2005.
59. LOK SF, AKARCA US, GREENE S. Predictive value of precore hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance. **Hepatology**, v.21, p.19-24, 1995.
60. LURIE Y, MANNS M P, GISH R G, CHANG T T, YURDAYDIN C, LAI C L, SHOUVAL D, BROWN RS, APELIAN D, FERNANDES L, KLESCZEWSKI K, CROSS A., WILBER R. The efficacy of entecavir is similar regardless of disease-related baseline subgroups in treatment of nucleoside-naïve, HBeAg(+) and HBeAg(-) patients with chronic hepatitis B. **J Hepatol**, v.42(Suppl 2), p.184, 2005.
61. LYRA AC, PINHO JR, MELLO IM, DE M MALTA F, GOMES MM, DI BISCEGLIE AM, LYRA LG, CARRILHO FJ, DA SILVA LC. Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among patients with acute viral hepatitis. **J Clin Gastroenterol**, v.39(1), p.81-2, 2005.

62. MA JC, WANG LW, LI XJ, LIAO YF, HU XY, GONG ZJ. Relationship between HBV genotypes and anti-viral therapeutic efficacy of interferon-alpha. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, v.6(2), p.166-71, 2007.
63. MANGIA A, CHUNG YH, HOOFNAGLE JH, BIRKENMEYER L, MUSHAHWAR I, DIBISCEGLIE AM. Pathogenesis of chronic liver disease in patients with chronic hepatitis B virus infection without serum HBeAg. **Dig Dis Sci**, v.41, p.2447-52, 1996.
64. MAYERAT C, MANTEGANI A, FREI PC, Does hepatitis B vírus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? **J Viral Hepatol** , v.6, p.299-304, 1999.
65. MELO FCA, SOUTO FJD, NABUCO LC, VILLELA-NOGUEIRA CA, COELHO HSM, FRANZ HCF, SARAIVA JCP, VIRGOLINO HA, MOTTA-CASTRO ARC, MELO MMM, MARTINS RMB, GOMES AS. Hepatitis B genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiology**, v. 7, p.2180-7, 2007. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/103>. doi:10.1186/1471-2180-7-103
66. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS, Incidência da Hepatite B. Região: Nordeste. Período 1999-2005. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2006/d0108.def>.
67. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acessado em 15/09/09 às 14 horas . Disponível em: http://portal.saude.gov.br/SAUDE/visualizar_texto.cfm?idtxt=21920
68. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. Brasília-DF, 2009.
69. MIYAKAWA Y, MIZOKAMI M. Classifying Hepatitis B Virus Genotypes. **Intervirol**, v.46, p.329-38, 2003.
70. 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 Brazil. **Arch Virology**. v.141, p.1767-73, 1996.
71. NAKAYOSHI T, MAESHIRO T, NAKASONE H, SAKUGAWA H, KINJO F, ORITO E, MIZOKAMI M: Difference in prognosis between patients infected with hepatitis B virus with genotype B and those with genotype C in the Okinawa Islands: A prospective study. **J Med Virol**, v.70, p.350-4, 2003.
72. NAUMANN H, SCHAEFER S, YOSHIDA CF, GASPAR AM, REPP R, GERLICH WH. Identification of a new hepatitis B vírus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. **Journal of General Virology**., v.74, p.1627-32, 1993.
73. NORDER H, COUROUCÉ AM, MAGNIUS LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. **Journal of General Virology**, v.73, p.3141-5, 1992.
74. NORDER, H., HAMMAS, B., LOFDAHL, S., COUROUCÉ, A.-M. & MAGNIUS, L.O. Comparison of the amino acid sequence of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. **Journal of General Virology**, v.73, p.1201-8, 1992B.

75. NORDER H, HAMMAS B, LEE SD, COUROUCÉ AM, MUSHAHWAR IK, MAGNIUS LO. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen . **J Gen Virol**, v. 74, p. 1341-8, 1993.
76. NORDER H, COUROUCÉ 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**, v. 198, p.489-503, 1994.
77. 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. **Intervirol**, v.47, p.289-309, 2004.
78. OKAMOTO, H., TSUDA, F., SAKUGAWA, H., SASTROSEWIGNJO, R., IMAI, M., MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **Journal of General Virology**, v.69, p. 2575-83, 1988.
79. OMATA M, EHATA T, YOKOSUKA O, HOSODA K, OHTO M. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. **N Engl J Med**, v.324, p.1699-1704, 1991.
80. ORITO E, MIZOKAMI M, INA Y, MORIYAMA EN, KAMESHIMA N, YAMAMOTO M, GOJOBORI T. Host-independent evolution and a genetic classification of hepadnavirus family based on nucleotide sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 7059-62, 1989
81. ORITO E, ICHIDA T, SAKUGAWA H, SATA M, HORIIKE N, HINO K, OKITA K, OKANOUE T, LINO S, TANAKA E, SUZUKI K, WATANABE H, HIGE S, MIZOKAMI M. Geografic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotyping in patients with chronic HBV infection in Japan. **Hepatology**, v.34, p.590-4, 2001.
82. ORITO E, MIZOKAMI M, SAKUGAWA H, MICHITAKA K, ISHIKAWA K, ICHIDA T, OKANOUE T, YOTSUYANAGI H, IINO S. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. **Hepatology**, vol. 33 (1), p. 218-23, 2001B.
83. ORITO E, MIZOKAMI M. Hepatitis B Virus Genotypes and Hepatocellular Carcinoma in Japan. **Intervirol**, v.46, p.408–12, 2003.
84. PALUMBO E., SCOTTO G., FALEO G., CIBELLI D.C., SARACINO A., ANGARANO G. Prevalence of HBV-Genotypes in immigrants affected by HBV-related chronic active hepatitis. **Arq. Gastroenterology**, v.44, p.54-7, 2007.
85. PARANÁ R, CODES L, ALMEIDA D. Epidemiologia das doenças hepáticas: Hepatites por vírus hepatotróficos. In: Lopes AC(ed): **Tratado de clínica médica**. São Paulo, Roca, v.1, p.1181-9, 2006.
86. PEZZANO SC, TORRES C, FAINBOIM HA, BOUZAS MB, SCHRODER T, GIULIANO SF, PAZ S, ALVAREZ E, CAMPOS RH, MBAYED VA. Hepatitis B virus in Buenos Aires,

- Argentina, genotypes, virological characteristics and clinical outcomes. **Clin. Microbiol. Infect.** Epub ahead of print, 2010.
87. PINHO JRR. Diagnóstico contemporâneo da hepatite B oculta ou críptica. **Einstein**, s.1: p. 32-8, 2005.
 88. PINHO JRR. Vírus da hepatite B. In: Luiz Caetano da Silva (ed): **Hepatites agudas e crônicas**. 3 edição. Savier, p.15-23, 2003.
 89. PREVISANI N, LAVANCHY D, ZUCKERMAN AJ. In: Zuckerman AJ, Mushahwar IK. **Viral Hepatitis. Molecular Biology, Diagnosis, Epidemiology and Control**. P.31-98, 2004
 90. PURCELL,R.H. The discovery of the hepatitis viruses. **Gastroenterology**, v.104, p.955-63, 1993.
 91. RIBEIRO N. R.C., CAMPOS G.S., ANGELO A.L.D., BRAGA E.L., SANTANA N., SOARES M.M.S., PINHO J.R.R., CARVALHO W.AA., LYRA L.G.C., LYRA A.C. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. **Liver international**, v. 26, p.636-42, 2006.
 92. REZENDE RE, FONSECA BA, RAMALHO LN, ZUCOLOTO S, PINHO JR, BERTOLINI DA, MARTINELLI AL: The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. **J Clin Virol**, v.32, p.53-9, 2005.
 93. RODRIGUEZ-FRIAS F, BUTI M, JARDI R, COTRINA M, VILADOMIU L, ESTEBAN R, GUARDIA J. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. **Hepatology**, v.22, p.1641-7, 1995.
 94. RONCATO M, BALLARDIN PAZ, LUNGE VR. Influência dos Genótipos no Tratamento da Hepatite B. **Rev HCPA**, v.28(3), p.188-93, 2008.
 95. SA-GUANMOO P, TANGKIJVANICH P, THAWOMSUK M, VICHAIWATTANA P, PRIANANTATHAVOM K, et al. Molecular epidemiological study oh hepatitis B virus among migrant workers from Cambodia, Laos and Myanmar to Thailand. **J Med Virol**.v.82(8):1341-9, 2010.
 96. SÁNCHEZ-TAPIAS JM, COSTA J, MAS A, BRUGUERA M, RODÉS J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. **Gastroenterology**, v.123(6), p.1848-56, 2002.
 97. SATO S, SUZUKI K, AKAHANE Y, AKAMATSU K, AKIYAMA K, YUNOMURA K, TSUDA F, TANAKA T, OKAMOTO H, MIYAKAWA Y, MAYUMI M. Hepatitis B Virus Strains with Mutations in the Core Promoter in Patients with Fulminant Hepatitis. **Ann Intern Med**, v.122, p.241-8, 1995.
 98. SCAGLIONI PP, MELEGARI M, WANDS JR. Biologic properties of hepatitis B genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. **Virology**, v.233, p.274-81, 1997.
 99. SILVA LC, GRANATO CFH. Importância e uso clínico dos Marcadores Virais e Sorológicos. In: Luiz Caetano da Silva (ed): **Hepatites agudas e crônicas**. 3 edição.Savier, p.60-78, 2003.

100. SITNIK R., PINHO J.R.R., DA SILVA L.C., FONSECA L.E.P., CARRILHO F.J., BERNARDINI A.P. Hepatitis B Virus Genotypes and Precore and Core Mutants in Brazilian Patients. **J Clin Microbiol**, v.42(6), p.2455–60, 2004.
101. SANTOS P, SANTANA N, NASCIMENTO P, LEITE H, FRANÇA A. Avaliação de pacientes AgHBs positivos no serviço de Hepatologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). **Revista da AMRIGS**, 2009, 3: S73.
102. STUYVER L, DE GENDT S, VAN GEYT C, ZOLIUM F, ZOULIM F, FRIED M, SCHINAZI RF, ROSSAU R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **Journal of General Virology**, v.81, p.67–74, 2000.
103. SUGAUCHI F, ORITO E, ICHIDA T, KATO H, SAKUGAWA H, KAKUMU S, ISHIDA T, CHUTAPUTTI A, LAI CL, UEDA R, MIYAKAWA Y, MIZOKAMI M. Hepatitis B Virus of Genotype B with or without Recombination with Genotype C over the Precore Region plus the Core Gene. **J Virol**, v. 76(12), p.5985–92, 2002.
104. SUGAUCHI F, CHUTAPUTTI A, ORITO E, KATO H, SUZUKI S, UEDA R, MIZOKAMI M. Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. **J Gastroenterol Hepatol**, v.17(6), p. 671–6, 2002B.
105. SUGAUCHI F, KUMADA H, ACHARYA SA, SHRESTHA SM, GAMUTAN MTA, KHAN M, GISH RG, TANAKA Y, KATO T, ORITO E, UEDA R, MIYAKAWA Y, MIZOKAMI M. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. **J General Virology**, v.85, p.811–20, 2004.
106. SUMI H, YOKOSUKA O, SEKI N, ARAI M, IMAZEKI F, KURIHARA T, KANDA T, FUKAI K, KATO M, SAISHO H: Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. **Hepatology**, v.37, p.19–26, 2003.
107. SUZUKI Y, KOBAYASHI M, IKEDA K, SUZUKI F, ARFASE Y, AKUTA N, HOSAKA T, SAITOH S, KOBAYASHI M, SOMEYA T, MATSUDA M, SATO J, WATABIKI S, MIYAKAWA Y, KUMADA H. Persistence of acute infection with hepatitis B virus genotype A and treatment in Japan. **J Med Virol**, v.76(1), p.33-9, 2005.
108. TANAKA Y, HASEGAWA I, KATO T, ORITO E, HIRASHIMA N, ACHARYA SK, GISH RG, KRAMVIS A, KEW MC, YOSHIHARA N, SHRESTHA SM, KHAN M, MIYAKAWA Y, MIZOKAMI M. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. **Hepatology**, v.40(3), p.747-55, 2004.
109. TANGKIJAVANICH P, MAHACHAI V, KOMOLMIT P, FONGSARUN J, THEAMBOONLERS A, POOVORAWAN Y. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Thailand. **World J Gastroenterol**, v.11(15), p.2238-43, 2005.
110. TELENTA PF, POGGIO GP, LOPEZ JL, GONZALEZ J, LEMBERG A, CAMPOS RH. Increased prevalence of genotype F hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35 (7), p. 1873-5, 1997.

111. THAKUR V, GUPTAN RC, KAZIM SN, MALHOTRA V, SARIN SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. **J Gastroenterol Hepatol**. v.17(2),p.165-70, 2002.
112. TONETTO PA, GONÇALES NSL, FAIS VC, VIGANI AG, GONÇALES ESL, FELTRIN A, GONÇALES-JR FL. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, p.149-60, 2009. Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/149>. doi:10.1186/1471-2334-9-149
113. UCHIDA T, SHIMOJIMA M, GOTOH K, SHIKATA E, TANAKA T, KIYOSAWA K. Silent hepatitis B virus mutants are responsible for non-A, non-B, non-C, non-D, non-E hepatitis. **Microbiol Immunol**, v.38(4), p.281-5, 1994.
114. VAN DER EIJK AA, NIESTERS HG, HANSEN BE, HEIJTINK RA, JANSSEN HL, SCHALM SW, MAN RA . Quantitative HBV –DNA levels as an early predictor of nonresponse in chronic HBeantigen positive hepatitis B patients treated with interferonalpha. **J Viral Hepat**, v.13, p.96-103, 2006,
115. VEGNENTE A, IORIO R, GUIDA S, CIMMINO L. Chronicity rate of Hepatitis B Virus infection in the families of 60 hepatitis B surface antigen positive chronic carrier children: Role of horizontal transmission. **Eur J Pediatr**, v. 151, p. 188-91, 1992.
116. VICTORIA FS, OLIVEIRA CMC, VICTORIA MB, VICTORIA CB, FERREIRA LCL. Characterization of HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B in Western Brazilian Amazonia **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12(1), p.27-37, 2008.
117. WAI CT, CHU CJ, HUSSAIN M, LOK ASF. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. **Hepatology**, v.36, p.1425-30, 2002.
118. WANG J, ZHOU B, LAI Q, WANG Y, SHAN G, WANG Z, CHEN J, HOI J. Clinical and Virological characteristics of chronic hepatitis B with concurrent hepatitis B E antigen and antibody detection. **J Viral Hepat**. Epub ahead of print, 2010.
119. WESTLAND C, DELANEY W 4TH, YANG H, CHEN SS, MARCELLIN P, HADZIYANNIS S, GISH R, FRY J, BROSGART C, GIBBS C, MILLER M, XIONG S. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. **Gastroenterology**, v.125, p.107-16, 2003.
120. World Health Organization. Introduction of Hepatitis B vaccine into childhood immunization services, 2001
121. World Health Organization. Hepatitis B, 2002. Disponível em: http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdcsrlyo2002_2.pdf (acessado em 28.04.09)
122. YOO BC, PARK JW, KIM HJ, LEE DH, CHA 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**, v.38, p.98–103, 2003.

123. YOU J, SRIPLUNG H, CHONGSUWIVATWONG V, GEATER A, ZHUANG L, HUANG JH, CHEN HY, YU L, TANG BZ. Profile, spectrum and significance of hepatitis B virus genotypes in chronic HBV-infected patients in Yunnan, China. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v.7(3), p. 271-9, 2008.
124. ZENG G, WANG Z, WEN S, JIANG J, WANG L, CHENG J, TAN D, XIAO F, MA S, LI W, LUO K, NAOUMOV NV, HOU J. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China. **J Viral Hepat**, v.12, p.609-17, 2005.
125. ZÖLLNER B, PETERSEN J, SCHROTER M, LAUFS R, SCHODER V, FEUCHT HH. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. **Lancet**, v.357, p. 934-5, 2001.
126. ZÖLLNER B, PETERSEN J, SCHÄFER P, SCHRÖTER M, LAUFS R, STERNECK M, FEUCHT HH. Subtype-dependent response of hepatitis B virus during the early phase of lamivudine treatment. **Clin Infect Dis**, v. 34, p. 1273-7, 2002.