



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

**MARCELLA KELLY COSTA DE ALMEIDA**

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE B EM  
PACIENTES ATENDIDOS NO PROGRAMA DE HEPATITES VIRAIS DO NÚCLEO  
DE MEDICINA TROPICAL – UFPA, BELÉM - PARÁ**

**BELÉM, PARÁ  
2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

MARCELLA KELLY COSTA DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE B EM  
PACIENTES ATENDIDOS NO PROGRAMA DE HEPATITES VIRAIS DO NÚCLEO  
DE MEDICINA TROPICAL – UFPA, BELÉM - PARÁ**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, pelo Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luísa Caricio  
Martins

Área de concentração - Patologia

BELÉM, PARÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Almeida, Marcella Kelly Costa de, 1980-

Caracterização dos genótipos do vírus da hepatite B em pacientes atendidos no programa de hepatites virais do Núcleo de Medicina Tropical - UFPA, Belém-Pará / Marcella Kelly Costa de Almeida. - 2016.

Orientadora: Luísa Carício Martins.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2016.

1. Hepatite B - Belém (PA). 2. Vírus da Hepatite B - Belém (PA). I. Título.

CDD 22. ed. 616.3623

---

Marcella Kelly Costa de Almeida

CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE B EM  
PACIENTES ATENDIDOS NO PROGRAMA DE HEPATITES VIRAIS DO NÚCLEO  
DE MEDICINA TROPICAL – UFPA, BELÉM-PARÁ.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do  
Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito à  
obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Área de Concentração: Patologia

Aprovada em: \_\_\_\_\_

BANCA AVALIADORA

---

Dr<sup>a</sup> Luisa Carício Martins  
Orientadora

Núcleo de Medicina Tropical – NMT/Universidade Federal do Pará

---

Dr<sup>a</sup> Edna Ishikawa Aoba Yassui

Núcleo de Medicina Tropical – NMT/Universidade Federal do Pará

---

Dr<sup>a</sup> Fabiola Elizabeth Villanova

Núcleo de Medicina Tropical – NMT/Universidade Federal do Pará

---

Dr<sup>a</sup> Anna Rafaella Ferreira Baraúna  
Faculdade Metropolitana da Amazônia - Famaz

---

Dr<sup>o</sup> Igor Brasil Costa

Instituto Evandro Chagas - Seção de Virologia

---

Dr<sup>o</sup> Evander de Jesus Oliveira Batista

Núcleo de Medicina Tropical – NMT/Universidade Federal do Pará (Suplente)

Aos meus sobrinhos Leônidas, Bernardo e Heitor, porque  
você são o futuro.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Odorico e Maria, que nunca mediram esforço para me proporcionar uma educação de qualidade. Por me mostrar que a dedicação aos estudos me levaria a qualquer lugar que eu quisesse estar, e principalmente por confiar incondicionalmente nos meus objetivos de vida, muito obrigada!

Ao Kemper, meu parceiro de vida, desta e de todas as outras que estaremos juntos. Obrigada por me apoiar em tudo, me mostra o meu melhor lado, acreditar que sempre devemos estar melhor, hoje mais do que ontem. Crescer ao seu lado fez esta caminhada ser mais prazerosa e inspiradora.

A Dr<sup>a</sup> Luisa Caricio Martins, minha “chefa” do coração, minha mãe científica, meus eternos agradecimentos. Vou levar por toda a minha vida seus ensinamentos, és meu espelho profissional. Passar por toda esta etapa de transformação tendo você como minha orientadora fez toda a diferença, sua compreensão neste momento foi essencial. Essa vitória também é sua.

A família LPDT (Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais) por me fazer acreditar que grupos de pesquisa podem ser unidos. Andrea, Rose, Carol, Patrícia e Carla pela companhia nos almoços e na fuga à sorveteria no lanche de quase todas as tarde. Amanda e Andrei, que mesmo longe ainda fazem parte desta família tão especial para mim. Agradeço especialmente a Carla pela sua amizade e dedicação nesta etapa tão importante da minha vida. Seu auxílio e companheirismo foi de fundamental importância para o sucesso deste trabalho e por isso serei eternamente grata, essa vitória também é sua.

Aos pacientes que aceitaram em participar deste estudo, sem eles nada disso seria possível. Que este trabalho possa de alguma forma contribuir para a melhoria de vida pessoas que tanto precisam.

Aos professores e funcionários do Núcleo de Medicina Tropical.

Ao Laboratório de Hepatites Virais da FIOCRUZ-RJ nas pessoas da Dr<sup>a</sup> Elisabeth Lampe, Marcia Pascoal e Ricardo Almeida, que em um momento de dificuldade desta pesquisa nos acolheram e repassaram informações de grande ajuda.

As pessoas que direta ou indiretamente ajudaram e auxiliaram com o desenvolvimento desta pesquisa. A Rafaella pela ajuda em um momento decisivo deste trabalho, ao Drº Evonildo Gonçalves pelo auxílio no sequenciamento de parte das amostras.

Aos meus amigos pela companhia nos momentos de folga e força nos momentos difíceis, em especial ao Rafael e a Joseane que me incentivam a ser sempre melhor e por me dizer que estudar era a melhor escolha. Muita coisa mudou deste a nossa primeira conversa sobre o futuro.

“Não precisa ser fácil, só precisa ser possível.”

Bethany Hamilton

“Por mais longe que seja a caminhada, o mais importante é dar o primeiro  
passo.”

Vinicius de Moraes

## RESUMO

O vírus da hepatite B pertence ao gênero *Orthohepnavirus* e a família *Hepadnaviridae*, compreendendo um vírus de DNA, hepatotrópico capaz de infectar mamíferos. Classificados em 10 genótipos (A-J) diferentes e muitos subgenótipos, estudos sugerem que eles podem influenciar na gravidade da doença, na resposta ao tratamento e na resposta vacinal. Os genótipos e subgenótipos do VHB tem uma distribuição variada, sendo alguns restritos a determinadas regiões geográficas, enquanto outros mostram uma distribuição mundial. É encontrada nas diversas regiões do Brasil com prevalência dos genótipos A, D e F. Este estudo teve como objetivo identificar os genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B entre os pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical - UFPA, na cidade de Belém, estado do Pará, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015. De um total de 1274 pacientes atendidos no NMT-UFPA dentro do período, foram selecionadas para o estudo 222 pacientes, de ambos os sexos, com sorologia reagente para os marcadores HBsAg e/ou anti-HBc total. As amostras foram submetidas a testes de biologia molecular, PCR "in House" e PCR multiplex para detecção do DNA viral e genotipagem, e posteriormente ao sequenciamento, para a confirmação e determinação dos subgenótipos virais. Em 65 das 222 amostras foi detectada a presença do DNA do VHB, sendo identificada a presença dos genótipos A (46/65), com predominância os subgenótipos A1(36/48) seguido do subgenótipo A2 (10/46), e genótipo F (17/65) sendo detectado apenas o subgenótipo F2 (17/17) circulando nesta população. A média de idade entre os paciente foi de 38 anos, com predominância do sexo masculino, sendo a maioria dos pacientes naturais do estado do Pará. Alguns fatores de risco foram identificados entre a população estudada, sendo a não utilização de preservativo durante as relações sexuais o mais predominante. Ao se comparar a presença do DNA viral com a sorologia para o marcador HBsAg, fica evidenciado um quadro que sugerem a presença de hepatite oculta entre os pacientes atendidos. Os resultados encontrados nesta pesquisa estão de acordo com o que é relatado em outros estudos no Brasil.

**PALAVRAS-CHAVES:** HBV. Amazônia. Pará. Genótipos. Subgenótipos.

## ABSTRACT

The hepatitis B virus belongs to the genus *Orthohepnavirus* and *Hepadnaviridae* family, comprising a DNA virus capable of infecting mammalian hepatotropic. Classified into 10 genotypes (A-J) and many different subgenotypes, studies suggest that they may influence the severity of the disease, response to treatment and vaccine response. Genotypes and subgenotypes HBV has a wide distribution, some being restricted to certain geographic regions, while others show a worldwide distribution. It is found in different regions of Brazil with prevalence of genotypes A, D and F. This study aimed to identify genotypes and subgenotypes of hepatitis B virus among patients treated at the Tropical Medicine Center - UFPA, in the city of Belém, state Pará, from January 2011 to December 2015. A total of 1274 patients treated at the NMT-UFPA in the period, were selected for the study 222 patients of both sexes, with positive serology for HBsAg and / or anti-HBc. The samples were subjected to molecular biology, PCR "in house" and multiplex PCR to detect viral DNA and genotyping, and then the sequencing for confirmation and determination of viral subgenotypes. In 65 of the 222 samples was detected the presence of HBV DNA, but only 63 samples were satisfactory after the result of sequencing, which were identified the presence of genotypes A (46/63), especially the subgenotype A1 (36/46) followed by subgenotype A2 (10/46), and genotype F (17/63) and only detected subgenotype F2 (17/17) circulating in this population. The average age of the patients was 38 years, predominantly male, and most natural state of Pará patients. Some risk factors have been identified among the population studied, and not using a condom during sex the most predominant. Comparing the presence of viral DNA with serology for HBsAg marker is shown a picture that suggests the presence of occult hepatitis among the patients treated. The results found in this study are consistent with what is reported in other studies in Brazil.

KEYWORDS: HBV, Amazon, Pará, Genotypes, Subgenotypes

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ L: microlitro

A: Ampère

AgAu: Antígeno Austrália

ALT: Alanina Aminotransferase

Anti-HBc: Anticorpos contra o antígeno “C” do vírus da hepatite B

Anti-HBe: Anticorpo contra o antígeno “E” de vírus da hepatite B

Anti-HBs: Anticorpos contra o antígeno “S” do vírus da hepatite B

CDC: *Center for Disease Control and prevention*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EIE: Ensaio imunoenzimático

ELISA: *Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*

FIOCRUZ: Fundação Instituto Oswaldo Cruz

HBcAg: Antígeno “C” do vírus da hepatite B

HBeAg: Antígeno “E” do vírus da hepatite B

HBsAg: Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBSP: Proteína *Spliced* do vírus da hepatite B

HBxAg: Antígeno “X” do vírus da hepatite B

HCC: Carcinoma Hepatocelular

HCV : Vírus da hepatite C

HEMOPA: Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará

HIV : Vírus da imunodeficiência humana

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas

IC: Intervalo de confiança

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

Kb: kilobases

ml: mililitros

mRNAs: RNA mensageiro

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

nm: nanômetros

nM: nanomolar

NMT-UFPA: Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará

°C: Graus Celsius

OMS : Organização Mundial da Saúde

ORF: *Open Reading Frame*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pgRNA: RNA pré genômico

RPM: rotação por minuto

RNA: Ácido Ribonucléico

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

UFPA: Universidade Federal do Pará

UV: Ultravioleta

V: volts

VHB : Vírus da hepatite B

VHB-DNA: DNA do vírus da hepatite B

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica das partículas virais presente no soro dos indivíduos infectados. ....	21
Figura 2. Representação esquemática da partícula viral completa.....	21
Figura 3. Representação esquemática do genoma do HBV. ....	22
Figura 4. Esquema do ciclo de replicação do VHB. ....	25
Figura 5. Prevalência mundial do marcador HBsAg do VHB. ....	29
Figura 6. Árvore filogenética do genoma viral completo representando os genótipos do VHB existentes. ....	31
Figura 7. Linha do tempo de identificação e designação de alguns genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B. ....	32
Figura 8. Distribuição geográfica dos genótipos do VHB no mundo. ....	32
Figura 9. Localização geográfica do Núcleo de Medicinal Tropical da UFPA. ...	38
Figura 10. Caracterização do padrão de banda para detecção do DNA do VHB. Foto do gel de agarose a 1,5% com a positividade do VHB-DNA.....	43
Figura 11. Padrões de bandas para a genotipagem do VHB com o conjunto de oligonucleotídeos SET 1 e SET 2.....	45
Figura 12. Foto do gel de agarose a 1,5% mostrando a 1º PCR e 2º PCR para a amplificação parcial do gene S do VHB com as mesmas amostras.....	47
Figura 13. Frequência de positividade na PCR das amostras analisadas no estudo. ....	55
Figura 14. Análise do marcador sorológico HBsAg e do teste de PCR nos pacientes estudados. ....	55
Figura 15. Genótipos do vírus da hepatite B encontrados em pacientes atendidos no NMT-UFPA na cidade de Belém entre 2011 a 2015.....	56
Figura 16. Gráfico demonstrativo correlacionando os genótipos encontrados com os gêneros dos pacientes atendidos. ....	57
Figura 17. Gráfico demonstrativo correlacionando os genótipos encontrados com os naturalidade dos pacientes atendidos.....	57

Figura 18. Eletroferograma da sequencia de DNA da região S do VHB com qualidade de superior a 80%, referente a uma amostra de paciente do estudo. ....58

Figura 19. Dendrograma a partir do sequenciamento da região do gene S do VHB entre os pacientes atendidos no NMT-UFPA no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015, utilizando o método de Máxima Verossimilhança.....59

Figura 20. Análise da proximidade filogenética entre as sequencias obtidas da região do gene S para os genótipos A e F do VHB entre os pacientes atendidos no NMT-UFPA no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015. ....60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização e características dos genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B. ....	33
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na detecção do VHB-DNA para amplificação da região do Core nos pacientes. ....	43
Tabela 3. Sequencia de oligonucleotídeos utilizados para a determinação de 8 genótipos do VHB (A-H) utilizando a reação em cadeia da polimerase multiplex. ....	44
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene S do VHB para a reação de sequenciamento. Posição dos iniciadores no <i>GenBank</i> : V00866. ....	46
Tabela 5. Sequências referências dos genótipos e subgenótipos relacionadas com seus respectivos número de acesso no GenBank. ....	49
Tabela 6. Comparação entre o número de solicitações de exames para hepatite B e pacientes com o perfil sorológico para compor o estudo. ....	50
Tabela 7. Descrição do perfil sócio demográfico encontrado nos pacientes do estudo. ....	51
Tabela 8. Fatores de risco para aquisição do VHB encontrados entre os pacientes atendidos no NMT pelo programa de hepatites virais no período de 2011 a 2015. ....	52
Tabela 9. Naturalidades identificadas entre os pacientes atendidos no NMT pelo programa de hepatites virais no período de 2011 a 2015. ....	53
Tabela 10. Perfil sorológico encontrado nos pacientes atendidos no NMT-UFPA no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015. ....	54

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	REFERENCIAL TEORICO.....	19
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A HEPATITE B E O HBV. ....	19
2.2	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO HBV.....	20
2.4	REPLICAÇÃO VIRAL .....	24
2.5	EPIDEMIOLOGIA .....	27
2.5.1	Transmissão viral.....	27
2.5.2	Distribuição da infecção pelo VHB .....	29
2.5.3	Epidemiologia molecular do vírus da hepatite B .....	30
3.	OBJETIVOS.....	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	36
4.	METODOLOGIA .....	37
4.1	CASUISTICA .....	37
4.1.1	Desenho do estudo.....	37
4.1.2	Local do Estudo .....	37
4.1.3	Caracterização da amostra.....	37
4.1.4	Aspectos éticos.....	38
4.1.5	Riscos e Benefícios .....	39
4.1.6	Critérios de Inclusão e Exclusão.....	39
4.2	MÉTODOS LABORATORIAIS.....	39
4.2.1	Obtenção da amostra biológica .....	39
4.2.2	Diagnóstico sorológico da hepatite B.....	40
4.2.2.1	Procedimentos para a determinação do antígeno de superfície HBsAg – Kit ETI-MAK-4 (Diasorin, Itália).....	40

4.2.2.2 Procedimentos para a determinação dos anticorpos Anti-HBc total – Kit ETI-AB-COREK PLUS (Diasorin, Itália).....	41
4.2.2.3 Procedimentos para a determinação dos anticorpos Anti-HBs – Kit ETI-AUK-3 (Diasorin, Itália).....	41
4.2.3 Diagnóstico molecular.....	42
4.2.3.1 Extração e isolamento do ácido nucléico .....	42
4.2.3.2 Reação em cadeia da polimerase da região do Core do VHB para detecção do DNA viral.....	42
4.2.3.3 Genotipagem do vírus VHB.....	44
4.2.3.4 Amplificação parcial do gene S do vírus da hepatite B para a reação de sequenciamento. ....	45
4.2.3.5 Purificação do gel de agarose .....	48
4.2.3.6 Reações de sequenciamento.....	48
4.2.3.7 Análise das sequências.....	48
<b>5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>49</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>APENDICE .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>82</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A doença causada pelo vírus da hepatite B é um problema de saúde pública de importância mundial. Dois bilhões de pessoas já entraram em contato com este vírus e aproximadamente 240 milhões de pessoas são portadores crônicos (WHO, 2015). Os portadores crônicos são expostos ao desenvolvimento das complicações decorrentes da hepatite B, levando a cirrose e/ou, carcinoma hepatocelular, resultando em um total de 780 mil mortes todos os anos por conta destas complicações (ALVARADO-MORA et al, 2011; DA SILVA CONDE et al, 2013; WHO, 2015). O HBV pode ser transmitido por via perinatal, percutânea, sexual ou por transmissão horizontal, presumivelmente através de cortes ou feridas abertas, além do contato com sangue contaminado (DE ALMEIDA; 2012; BECKER et al, 2013).

Para fins de vigilância epidemiológica no Brasil, define-se como caso confirmado de hepatite B, o indivíduo que apresente um ou mais marcadores sorológicos reagentes (HBsAg reagente, Anti-HBc IgM reagente, HBeAg reagente) ou exames de biologia molecular para hepatite B (DNA do HBV detectável) (BRASIL, 2012). No Brasil, o Ministério da Saúde estima que pelo menos 15% da população já foi infectada com o HBV, com portadores crônicos equivalente a 1% da população brasileira (MARTINS, COSTA, 2015) e uma taxa de mortalidade de 0,6 por 100.000 habitantes (BRASIL, 2015). A literatura relata a região Amazônica com área de alta prevalência da infecção pelo HBV (CASTILHO et al, 2012, BECKER et al, 2013; BARROS et al, 2014).

A introdução de testes de detecção do DNA do HBV há 20 anos mostrou um maior conhecimento da variabilidade genética deste vírus e demonstrou que a infecção pelo HBV apresenta um amplo espectro de padrões sorológicos associados com a persistência do HBV-DNA (BRECHOT et al., 2001). Os novos avanços com os testes permitiram uma melhor compreensão da história natural, da imunopatogênese da hepatite B, além da detecção de uma nova forma clínica denominada como hepatite B oculta (MINUK et al, 2012; CHANG, LIAW, 2014), sendo esta definida pela presença do HBV-DNA no fígado e/ou soro, com o HBsAg indetectável em ensaios imunoenzimáticos (RAIMONDO et al., 2008).

O VHB pertence ao gênero *Orthohepnavirus* e a família *Hepadnaviridae*, compreendendo um vírus de DNA, hepatotrópico capaz de infectar mamíferos (MELLO, et al, 2007; DE ALMEIDA, 2012). É um vírus pequeno e o seu genoma apresenta uma organização altamente compacta, com um DNA circular de cadeia dupla medindo 3.2Kb com quatro principais regiões de transcrição sobrepostas, codificando sete proteínas virais: três antígenos de superfície, duas proteínas *Core*, a polimerase e a proteína X (FARAZMANDFAR et al, 2012; LOU et al, 2013; Xu et al, 2015).

Classificado em pelo menos oito genótipos (A-H), sendo que recentemente mais dois foram descritos no sudeste da Ásia (genótipo I e J) (ALVARADO-MORA et al, 2013, SUNBUL, 2014). Os diferentes genótipos estão associados com mutações nas regiões dos genes pré-core e promotor core basal, além de mutações no gene S (OLINGER et al, 2008; DA SILVA CONDE et al, 2013). Os genótipos do VHB são subdivididos em subgenótipos, cuja nomenclatura utiliza números ordinais. Estudos sugerem que os genótipos possam influenciar na gravidade da doença, na resposta ao tratamento e na resposta vacinal (TESHALE et al, 2011; CASTILHO et al, 2012; ALVARADO-MORA et al, 2013).

Os genótipos e subgenótipos do HBV tem uma distribuição variada, sendo alguns restritos a determinadas regiões geográficas, enquanto outros mostram uma distribuição mundial (POURKARIM et al, 2014). O genótipo A é encontrado principalmente na América do Norte e África (SANTOS et al, 2014). Os genótipos B e C são predominantes na Ásia (SANTOS et al, 2014; SUNBUL, 2014). O genótipo D tem distribuição mundial sendo prevalente em Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia e Índia (POURKARIM et al, 2014; SANTOS et al, 2014). Os genótipos E e F tem prevalência na África e Brasil respectivamente (SANTOS et al, 2014). Genótipo G é encontrado na Europa e América do Norte e o genótipo H na América Central e América do Sul (SANTOS et al, 2014; SUNBUL, 2014). Recentemente, através de análise filogenética, um novo genótipo foi caracterizado no Vietnã e Laos, sendo designado como o genótipo I (OLINGER et al, 2008; YU et al, 2010), enquanto que o genótipo J foi identificado no Japão. (OSIOWY et al, 2010; ALVARADO-MORA et al, 2011; SANTOS et al, 2014).

Os genótipos A, D e F são os mais prevalentes no Brasil. Estudos mais específicos demonstram a predominância do subgenótipos A1, D3 e F2a, porém na

maioria das regiões brasileira se fazem necessários mais estudos na população. (ALVARO-MORA et al, 2013; BARROS et al, 2014; CRISPIM et al, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a hepatite B é uma doença com um alto potencial de complicação e morte, sendo que no Brasil, dados do Ministério da Saúde indicam que 15% da população já estiveram em contato com o vírus (BECKER et al, 2013; MARTINS, COSTA, 2015).

Segundo o Ministério da Saúde, foram notificados no SINAN mais de 120.000 casos confirmados de hepatite B no Brasil no período de 1999 a 2011, sendo 15.571 (13,1%) casos identificados na região Norte. A positividade sorológica no país corresponde a 7,4% em indivíduos na faixa etária de 10 a 69 anos (BRASIL, 2012).

O avanço silencioso da hepatite B é um problema de saúde pública pelo fato de o indivíduo desconhecer que é portador do vírus, isso impede que os indivíduos infectados procurem tratamento até o aparecimento dos primeiros sintomas clínicos o que pode contribuir para o agravamento dos casos (MARTINS, COSTA, 2015).

Historicamente, o diagnóstico de hepatite B concentra-se em marcadores sorológicos, porém a tecnologia molecular tem feito grandes avanços, e agora é possível avaliar o DNA do VHB qualitativamente e quantitativamente, assim como identificar os genótipos e seus subgenótipos (FARAZMANDFAR et al, 2012; BECKER et al, 2013).

A prevalência da infecção tem grandes variações geográficas, sendo de 3% na América do sul (DE ALMEIDA et al, 2012; BARROS et al, 2014). No Brasil a distribuição se mostra heterogênea, sendo uma alta prevalência na região amazônica (DÉNY, ZOULIM, 2010; DE OLIVEIRA et al, 2011, DE ALMEIDA et al, 2012; SANTOS et al, 2014). Apesar deste fato, existe uma escassez de estudos identificando quais os genótipos e subgenótipos do VHB circulando na população no estado do Pará, por tanto se faz necessário à realização de mais estudos a fim de levantar dados que possam subsidiar a epidemiologia do VHB na região.

Os doadores atendidos no HEMOPA, com sorologia reagente para o VHB são encaminhados para o Núcleo de Medicina Tropical na Universidade Federal do Pará, para confirmação do diagnóstico. A partir desta população, o presente estudo visa identificar quais são os possíveis genótipos e seus subgenótipos circulantes dentro desta população na capital do estado do Pará.

## 2. REFERENCIAL TEORICO

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A HEPATITE B E O HBV.

Embora doenças associadas com icterícia tenham sido reconhecidas desde a antiguidade, a história sobre a pesquisa do HBV é recente (BLUMBERG, 2003; FONSECA, 2010). Nos meados dos anos 1960, o geneticista americano Baruch Blumberg detectou no soro de um paciente transfundido o antígeno Austrália (AgAu), que posteriormente, em 1968, seria renomeado com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) nome até hoje utilizado (BLUMBERG, 2003; TONETTO, 2006; DE ALMEIDA, 2012). Pela descoberta do vírus, Blumberg recebeu em 1978, o prêmio Nobel de Medicina por ser considerado como um dos fatos mais importantes da medicina do último século. (FONSECA 2010).

Na década de 70, foi descrito um novo antígeno distinto do HBsAg, sendo denominado de antígeno “e” do vírus da hepatite B (HBeAg) e também identificado o seu anticorpo correspondente (Anti-HBe) (MAGNIUS e ESPMARK, 1972; BLUMBERG, 2003). A partícula viral foi visualizada pela primeira vez em 1970, sendo chamada de partícula Dane e nos anos 80 o genoma do HBV foi sequenciado (TONETTO, 2006; FONSECA, 2010; FILHO, 2010).

Após a confirmação da descoberta do HBV, o pesquisador Samuel Krugman, iniciou estudos relacionados a uma possível vacina capaz de prevenir a doença (KRUGMAN, 1971). Em 1981 foi registrada a primeira vacina contra o HBV, que em 1986 foi substituída por uma vacina produzida por engenharia genética, até hoje utilizada (FONSECA, 2010; DE ALMEIDA, 2012). Embora a incidência de hepatite aguda tenha diminuído devido à implantação da vacinação, as complicações relacionadas com o HBV continuam aumentando (WANG et al, 2014; MARINHO et al, 2014; SANTOS et al, 2014).

O período de incubação do HBV vai de 30 a 180 dias com média em torno de 60 a 90 dias. A transmissibilidade já é possível a partir de duas a três semanas antes do aparecimento dos primeiros sintomas, sendo que os portadores crônicos podem transmitir o vírus por muitos anos (BRASIL, 2005).

As primeiras publicações sobre a presença do HBsAg no Brasil deram-se na década de 70. Em 1973, estudos realizados na região Amazônica Brasileira revelaram pela primeira vez a presença do antígeno entre população na zona rural

do estado do Amazonas (SALZANO, BLUMBERG, 1970; BENSABATH, BOSHELL, 1973). Entre 1990 a 1992, nos diversos estados da região Amazônica, a vacina contra o HBV foi integrada no programa nacional de imunização (BLUMBERG, 2006; FONSECA, 2007; 2010).

O HBV é um membro da família *Hepadnaviridae*, podendo ser encontrado em mamíferos (Orthohepadnaviruses) e aves (Avihepadnaviruses) (SCHAEFER, 2007; SUH et al, 2014). Apresentando um material genético de cadeia parcialmente dupla e utilizando a transcriptase reversa no seu ciclo replicativo (RASTEGARVAND et al, 2015), o HBV apresenta uma elevada taxa de mutação quando comparado com outros vírus de DNA (SCHAEFER, 2007; SAYED, KOBEISY, 2012; XU et al, 2015), uma justificativa para a elevação desta taxa refere-se à replicação semelhante aos retrovírus, pois utiliza um RNA intermediário no ciclo replicativo e a polimerase viral não apresenta atividade de revisão (KRAMVIS et al, 2005; SCHAEFER, 2007; RASTEGARVAND et al, 2015).

Após o sequenciamento do HBV, vários vírus semelhantes a ele foram descobertos em aves, roedores (marmotas e esquilos) e primatas (orangotango, chimpanzés e gorilas) (SUH et al, 2014), apresentando uma homologia de 40% com a família *Avihepadnaviruses* e diferindo apenas 17% entre o HBV humano e o encontrado nos primatas (SCHAEFER, 2007).

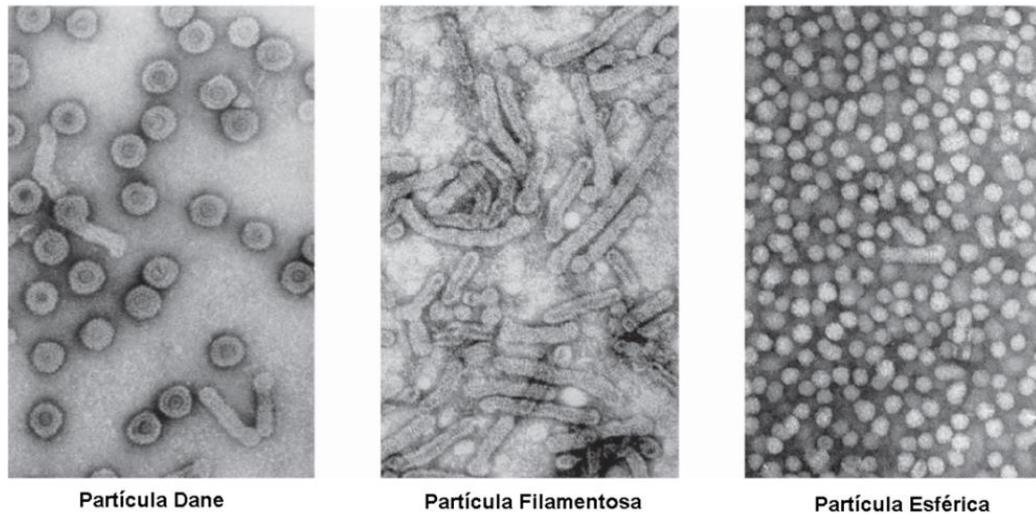
## 2.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO HBV.

Através da microscopia eletrônica observam-se três tipos de partículas relacionadas ao HBV presentes nos indivíduos infectados: partículas filamentosas, partículas esféricas e partículas completas também chamadas de partículas de Dane (Figura 1) (DE ALMEIDA, 2012; GERLICH, 2013).

A partícula infectante tem tropismo pelo hepatócitos (TAROCCHI et al, 2014), apresenta um envoltório externo, também chamado de envelope, composto por lipídios e proteínas que consiste no HBsAg (antígeno de superfície). Internamente ao envelope o HBV possui o nucleocapsídeo (core) constituído pelo capsídeo e pelo genoma viral. Apresentando simetria icosaédrica, o capsídeo mede aproximadamente 27nm de diâmetro, sendo formado por 180 capsômeros compostos pelo antígeno "c" (HBcAg). O material genético situa-se na região central do capsídeo e apresenta um tamanho de aproximadamente 3.200 nucleotídeos

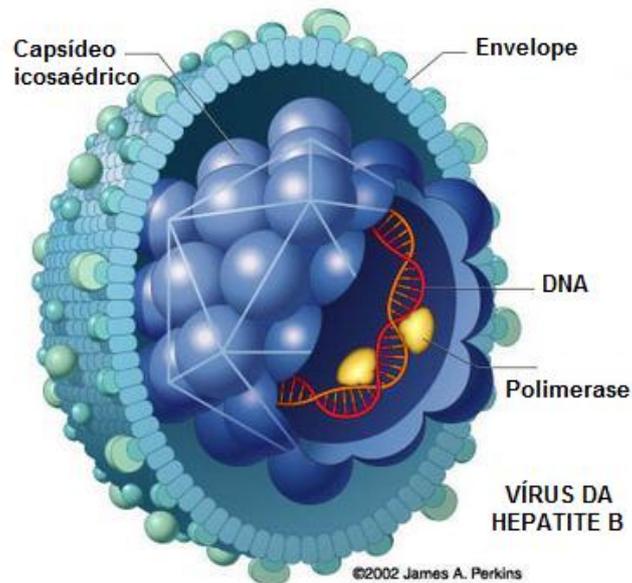
sendo encontrado associado ao genoma a enzima DNA polimerase (DE ALMEIDA, 2012; MORAES, 2013) (Figura 2).

Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica das partículas virais presente no soro dos indivíduos infectados.



Fonte: GERLICH, 2013. (adaptado)

Figura 2. Representação esquemática da partícula viral completa.

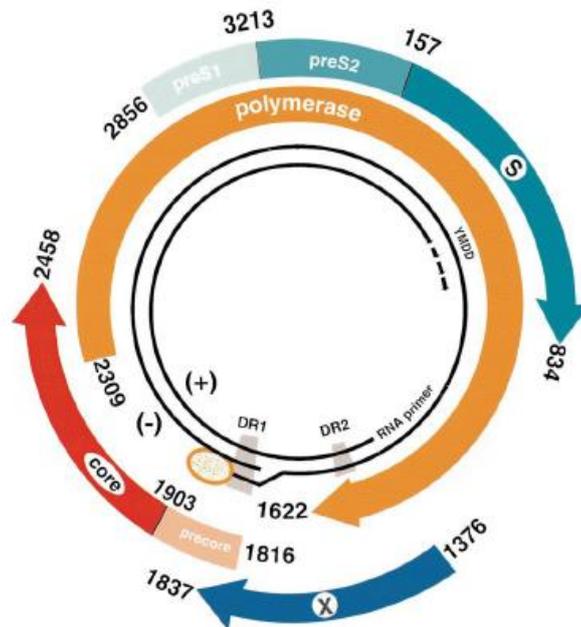


Fonte: © 2002 James A. Perkins, Medical and Scientific Illustrations (adaptado).

O VHB é um pequeno vírus que apresenta como material genético DNA, envelopado. Seu genoma circular de fita parcialmente dupla é quase todo codificante, possuindo quatro sequências de leitura aberta (ORFs) conhecidas como S, P, C e X (Figura 3). (TAROCCHI et al, 2014; WANG et al, 2014).

A circularidade do DNA é mantida pelo pareamento das bases nas terminações 5' de ambas as fitas (MORAES, 2013). A fita menor, denominada incompleta, apresenta polaridade positiva e sentido de leitura 5' para extremidade 3'. A fita maior, denominada completa, possui polaridade negativa sendo complementar ao RNA pré-genômico (MARINHO, 2013). As terminações 5' de ambas as fitas mantêm a circularidade do DNA do VHB e contém duas sequências repetidas de 11 nucleotídeos denominadas DR1 e DR2, que desempenham papel essencial na replicação viral, assim como na integração do DNA do HBV ao genoma do hospedeiro (MORAES, 2013; QUARLERI, 2014).

Figura 3. Representação esquemática do genoma do HBV.



Fonte: AIRES, 2011

O *gene S* que incluem as regiões pré-S1, pré-S2 e S, são responsáveis pela codificação das proteínas do envelope, constituindo-se em proteínas antigênicas denominadas de antígenos de superfície (HBsAg), que se ligam aos receptores celulares facilitando a entrada do vírus nos hepatócitos (DE ALMEIDA, 2012; MORAES, 2013). A proteína S, codificada pela região S, possui cerca de 24 kDa e apresenta uma região bem conservada, o determinante antigênico “a”, com capacidade de induzir anticorpos neutralizantes capazes de proteger contra a infecção pelo HBV, sendo utilizada no desenvolvimento de vacinas (MORAES, 2013). Alguns mecanismos de ação das proteínas codificadas pelo *gene S* estão envolvidas no processo do desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. (DE ALMEIDA, 2012; WANG et al, 2014; TAROCCHI et al, 2014).

A região Pré-*core/core*, segunda sequência aberta de leitura, apresenta dois códons de iniciação responsáveis por codificar a proteína do *core* (HBcAg) e a proteína “e” (HBeAg), ambos induzem a produção de anticorpos específicos (anti-HBc e anti-HBe, respectivamente) (AIRES, 2011). A proteína do *core*, uma fosfoproteína de 21Kda, é responsável pela montagem do nucleocapsídeo, sendo importante na etapa de empacotamento do RNA pré-genômico (MARINHO, 2013). O HBeAg é um peptídeo solúvel codificado pelas regiões pré-*core/core*, que é processado e secretado pelas células hepáticas, sendo considerado um importante marcador de replicação viral (MORAES, 2013; MARINHO, 2013). Esse antígeno é encontrado durante a infecção aguda ou nos portadores crônicos, podendo induzir tolerância imunológica e, conseqüentemente, o desenvolvimento de hepatite crônica (AIRES, 2011; MARINHO, 2013).

As regiões pré-*core* e *core* são as porções mais complexas do genoma do VHB e as mutações neste local estão associadas com a persistência da infecção e desenvolvimento de cirrose e HCC (DE ALMEIDA, 2012; QUARLERI, 2014; PARK, 2015).

O *gene P* é a maior sequência aberta de leitura, sobrepondo-se aproximadamente três quartos do genoma codificando a polimerase viral (AIRES, 2011; QUARLERI, 2014). A proteína é dividida em domínios distintos: (1) amino-terminal, que atua como proteína terminal ou primase, necessária para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa; (2) espaçadora, que não tem função bem definida; (3) transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA pré-

genômico em DNA e (4) carboxi-terminal, que exibe atividade de ribonuclease H (RNAse H), participando da degradação do RNA pré-genômico (MORAES, 2013; TAROCCHI et al, 2014; WANG et al, 2014).

O gene X é responsável pela codificação de HBxAg, um proteína multifuncional capaz de ativar diferentes mecanismos de transcrição, sendo capaz de modificar a expressão de genes da célula hospedeira e impedir o reparo no DNA (AIRES, 2011; MARINHO, 2013). Essencial para a replicação viral, esta região desempenha um papel importante no desenvolvimento do HCC induzido por VHB, pois pode interferir na atividade da proteína p53, que apresenta função supressora de tumor e ativadora de apoptose (MARINHO, 2013; MORAES, 2013). No citoplasma ativa cascatas de sinalização mitogênicas e no núcleo modula a expressão de gene de interação com vários fatores de transcrição, sugerindo a influência com as vias de sinalização na oncogênese, proliferação, apoptose, resposta imunológica e inflamação. O HBX se mantém sendo transcrito em células tumorais de carcinoma hepatocelular, mesmo não havendo replicação viral (TAROCCHI et al, 2014).

Recentemente foi descoberta a proteína HBSP (Proteína *Spliced* do VHB) envolvida na patogênese da infecção e viabilidade de células infectadas com o VHB. Tem sido relacionado com a hepatite B crônica e replicação viral, porém o exato mecanismo ainda não é bem esclarecido (CHEN et al, 2010; TAROCCHI et al, 2014).

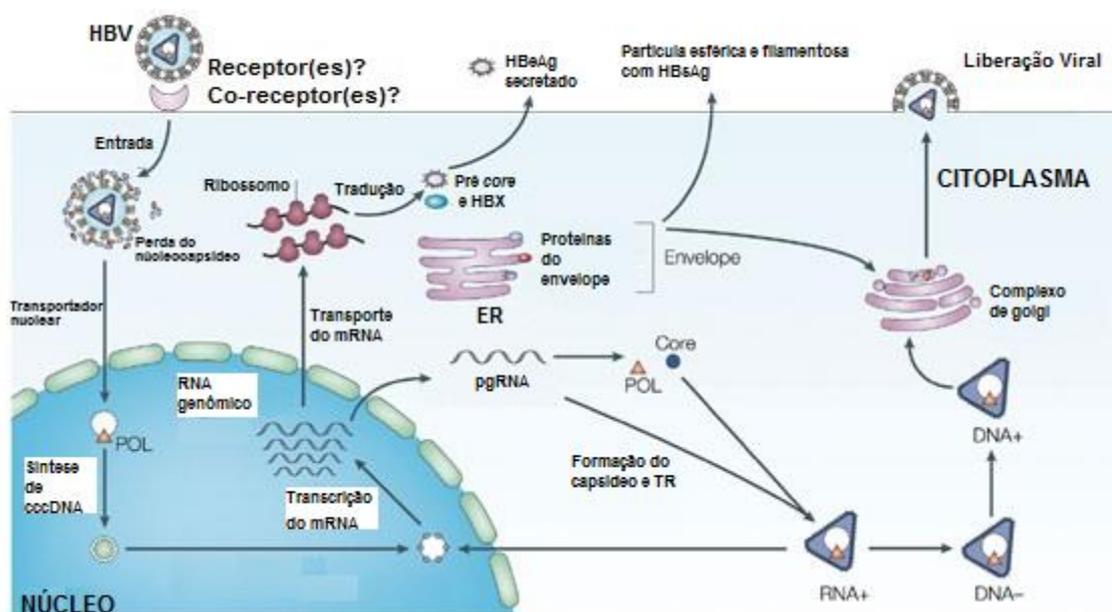
## 2.4 REPLICAÇÃO VIRAL

Apresentando replicação diferenciada, o VHB utiliza a maquinaria celular do hospedeiro para multiplicar-se em grande número e formar seu próprio mRNA utilizado na síntese das proteínas virais (MARINHO, 2013; QUARLERI, 2014 ). O VHB apresenta tropismo pelos hepatócitos, replicando-se em um taxa de  $10^{11}$  vezes por dia (MORAES, 2013; QUARLERI, 2014). A transcriptase reversa do VHB não apresenta atividade de revisão ou edição, e juntamente com esta elevada produção diária de vírus, erros inevitáveis ocorrem durante a replicação (QUARLERI, 2014), sendo atribuída a transcriptase reversa uma alta taxa de substituição de nucleotídeos (VAN DE KLUNDERT et al, 2012; XU et al, 2015). Essa replicação é

responsável pela maioria das mutações pontuais, deleções e inserções observadas no genoma do vírus (KAO, 2011).

A esquematização da replicação do VHB está representada na figura 4 (REHERMANN, NASCIMBENI, 2005). O ciclo tem início com a adsorção viral através do reconhecimento entre os receptores específicos na membrana dos hepatócitos e proteínas do envelope viral, facilitando a entrada do vírus por endocitose (MORAES, 2013). Vários candidatos a receptor celular ou complexo receptor celular já foram propostos, entretanto estes mecanismos não estão totalmente esclarecidos (MORAES, 2013; MARINHO, 2013). Em relação a proteína viral de ligação, acredita-se que a porção N-terminal da proteína L do envelope possua um sítio de reconhecimento, essencial para mediar a ligação do vírus a célula (HOLLINGER 2007; MORAES, 2013; MARINHO, 2013).

Figura 4. Esquema do ciclo de replicação do VHB.



Legenda: cccDNA: DNA complementar; mRNA: RNA mensageiro; pgRNA: RNA pré genômico; TR: transcriptase reversa.

Fonte: REHERMANN, NASCIMBENI, 2005 (adaptado).

No interior do citoplasma após a adsorção, o vírus perde o seu envelope e o nucleocapsídeo, liberando o DNA viral para penetrar no núcleo do hepatócito através dos poros nucleares (MORAES, 2013; MARINHO, 2013; TAROCCHI et al, 2014). A forma circular do DNA viral é levado ao núcleo, onde as polimerases, viral e do hospedeiro, reparam a fita parcialmente dupla formando uma estrutura de DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) (TAROCCHI et al, 2014), a qual serve de molde para a transcrição de todos os mRNAs virais e pgRNA, essencial para a replicação do vírus (MORAES, 2013; XU et al, 2015). Essa transcrição ocorre por ação da enzima celular RNA polimerase II (MARINHO, 2013). Os mRNAs são transportados para o citoplasma onde ocorre a tradução das proteínas virais (de superfície, *core*, polimerase e X), a montagem do nucleocapsídeo e a replicação do DNA viral (HOLLINGER, 2007; MARINHO, 2013).

No citoplasma, o nucleocapsídeo é formado pela montagem do *pgRNA* juntamente com a DNA polimerase e transcriptase reversa (MARINHO, 2013; QUARLERI, 2014). Inicia-se então a transcrição do *pgRNA* dentro do nucleocapsídeo viral, formando a primeira fita de cadeia longa (negativa) do DNA viral. Durante ou após a síntese dessa fita, o *pgRNA* é degradado pela ação enzimática da RNase H da polimerase e, por ação da DNA polimerase, ocorre a síntese da fita positiva ou incompleta do DNA viral (MARINHO, 2013; MORAES, 2013).

Uma vez completa a síntese do genoma viral, o nucleocapsídeo adquire a membrana lipídica a partir do retículo endoplasmático rugoso ao qual estão aderidas as proteínas de superfície do vírus, formando a partícula completa e infecciosa, que é secretada do hepatócito (MORAES, 2013). Algumas partículas virais imaturas são transportadas de volta ao núcleo, podendo ser convertidas em cccDNA, resultando na persistência viral intracelular (MARINHO, 2013; QUARLERI, 2014). A presença do cccDNA é essencial na manutenção da infecção pelo VHB. Admite-se que o cccDNA resida no núcleo dos hepatócitos infectados na forma de DNA episomal estável, não integrado ao genoma do hospedeiro (MORAES, 2013; TAROCCHI et al, 2014).

Como o cccDNA serve de molde para a síntese de mRNA viral, sua estabilidade nos hepatócitos significa fonte constante de partículas virais, podendo persistir no núcleo do hepatócito durante toda a vida da célula. Neste sentido tem

sido admitido que a persistência do cccDNA tenha papel importante na reativação da doença após interrupção da terapia antiviral e em casos de imunossupressão, bem como no desenvolvimento de resistência a drogas (MORAES, 2013; TAROCCHI et al, 2014; QUARLERI, 2014).

## 2.5 EPIDEMIOLOGIA

### 2.5.1 Transmissão viral

Apresentando um período de incubação que varia de 30 dias a 180 dias (BRASIL, 2008), admite-se que a transmissão do VHB ocorra pelas vias parenteral/percutânea, sexual e vertical (ALBUQUERQUE et al, 2012; MORAES, 2013; CRISPIM et al, 2014). A presença viral tem sido detectada em diversos fluídos corporais, sendo o sangue e o sêmen considerados os espécimes infecciosos (DE OLIVEIRA et al, 2011; MORAES, 2013; MARINHO, 2013; RASTEGARVAND et al, 2015). Além disso, a estabilidade do VHB em superfícies ambientais favorece sua transmissão por objetos inanimados, pois se mantém estável por mais de sete dias, sendo o risco de transmissão maior neste caso quando o nível do VHB-DNA é elevado no soro, principalmente em pacientes HBeAg reagentes (MORAES, 2013; MARINHO, 2013).

Neste contexto, a transmissão pode ocorrer pelo compartilhamento de objetos perfurocortantes contaminados como lâminas de barbear e depilar, escova de dente, alicate de unha, materiais para colocação de *piercing*, confecção de tatuagens e instrumentos para uso de drogas injetáveis (BRASIL, 2008; ELGOUHARI et al. 2008 DE ALMEIDA, 2012; MORAES, 2013). Também a transmissão pode ocorrer por acidentes com exposição a material biológico, por procedimentos cirúrgicos, odontológicos e de hemodiálise que não seguem normas de biossegurança e de controle da infecção além de transfusão de sangue e hemoderivados (DE ALMEIDA, 2012; ALBUQUERQUE et at, 2012; MORAES, 2013).

A infecção pelo VHB adquirida a partir de procedimentos transfusionais tem se tornado raro nos países desenvolvidos devido a implantação da triagem sorológica ao vírus, bem como por procedimentos de biologia molecular permitindo a identificação do DNA viral (FRANCO et al. 2012; MORAES, 2013 ). No Brasil a partir de 1993 torna-se obrigatório o rastreamento das hepatites viras nos hemocentros (BRASIL, 2008; DE ALMEIDA, 2012) e em 5 de fevereiro de 2002, o Ministério da

Saúde criou o programa nacional para prevenção e o controle das hepatites virais, com o intuito de contribuir para o aprimoramento de ações de saúde relacionadas às hepatites virais no Brasil (FERREIRA e SILVEIRA, 2004; DE ALMEIDA, 2012)

A via vertical caracteriza-se pela transmissão do VHB durante a gestação (transplacentária), no momento do parto (contato com sangue/líquido amniótico contaminado) e após o mesmo (JONAS, 2009; MORAES, 2013; MARINHO, 2013). No momento do parto, o VHB é transmitido em 70% a 90% dos casos cujas gestantes apresentam replicação viral, no entanto, a transmissão perinatal ocorre em menos de 5% dos casos em que a mãe, embora HBsAg positiva, não apresenta marcadores indicativos de replicação do vírus (ZAIDAN, 2009; KWON, LEE 2011; MORAES, 2013). Considera-se por outro lado que crianças nascidas de mães HBsAg positivas que não se tornam infectadas durante o período perinatal, permanecem sob risco de se infectarem durante a infância quando não vacinadas (MORAES, 2013).

Embora o mecanismo exato de transmissão não seja conhecido, o contato interpessoal frequente com indivíduos cronicamente infectados, durante longo período de tempo, também representa fator de risco para aquisição da infecção pelo VHB (CASTILHO et al, 2012; MORAES, 2013; MARINHO, 2013; CRISPIM et al, 2014). Neste sentido, em áreas de alta endemicidade para o VHB, estudos sugerem a circulação viral no ambiente familiar (CASTILHO et al, 2012; CRISPIM et al, 2014), considerando-se o número de membros e de carreadores do VHB, o compartilhamento de itens de higiene pessoal e a exposição a fluídos corpóreos contaminados (BRASIL et al, 2003; LOBATO et al, 2006). Tal fato demonstra a importância do contato interpessoal na disseminação do vírus, bem como da possibilidade de transmissão em ambientes fechados (MORAES, 2013; MARINHO, 2013).

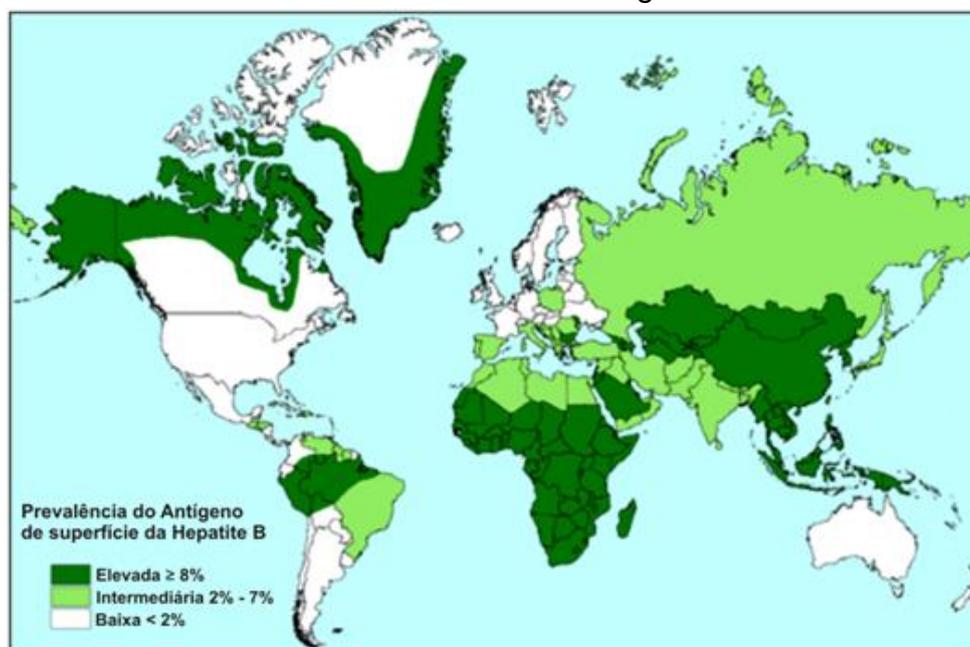
A transmissão sexual da hepatite B persiste como problema de saúde pública de difícil intervenção. Sendo classificada como uma doença sexualmente transmissível, é a rota mais frequente de transmissão do VHB entre adolescentes e adultos. Neste sentido, entre indivíduos com conduta de risco como multiplicidade de parceiros sexuais e prática de sexo sem preservativo, têm sido observados índices elevados de prevalência para este agente (MORAES, 2013; MARINHO, 2013).

## 2.5.2 Distribuição da infecção pelo VHB

Desde 1950, a maioria dos estudos realizados entre populações da América do Sul, principalmente em algumas áreas da Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana, peruana e equatoriana, tem relatado alta prevalência de infecção e doença ocasionada pelo VHB (PAULA et al 2001; NUNES et al, 2007; DE ALMEIDA et al, 2012).

A prevalência da infecção tem grandes variações geográficas (figura 5), sendo de 3% na América dos sul, e no Brasil, a distribuição é heterogênea sendo considerada na região amazônica, uma alta prevalência superior a 2% (DÉNY, ZOULIM, 2010; CASTILHO et al, 2012; DE ALMEIDA, 2012). Os estudos epidemiológicos relacionados com a distribuição do VHB em populações são, geralmente, relacionados a grupos específicos como doadores de sangue e gestantes (DE OLIVEIRA et al, 2011; DE ALMEIDA, 2012).

Figura 5. Prevalência mundial do marcador HBsAg do VHB.



Fonte: CDC, 2008 (<http://folk.uib.no/mihtr/Fredskorpset/FK082006.html#dis9>). Adaptado.

No Brasil, embora índices variáveis de prevalência para o HBsAg sejam observados em diferentes regiões e em diferentes grupos populacionais, o inquérito de base populacional encomendado pelo Ministério da Saúde e realizado em

capitais brasileiras e no Distrito Federal, no período de 2005 a 2009 define o Brasil como uma região de baixa endemicidade considerando a prevalência de 0,37% para HBsAg e de 7,4% para anti-HBc (BRASIL, 2012).

No período de 1999 a 2011, foram notificados no SINAN 15.571 casos de hepatite B na Região Norte, o que corresponde a 13,1% do total de casos no Brasil. A prevalência para o marcador de exposição ao VHB (anti-HBc) na região Norte foi de 10,9% (IC 95% 8,87% - 12,9%) e para o marcador HBsAg, foi de 0,63% (IC 95% 0,22% - 1,03%), classificando esse conjunto como de baixa endemicidade. No período de 1999 a dezembro de 2011, foram notificados 8.276 (52,5%) casos positivos em homens e 7.471 (47,4%) em mulheres da região Norte (BRASIL, 2012).

No estado do Pará (municípios de Altamira e São Félix do Xingu), Nunes e colaboradores (2007) realizaram estudo epidemiológico sobre hepatites virais B e D em uma população indígena da região (n = 258) em que mostrou prevalência de 3,9% de positividade para o marcador HBsAg e 53,5% para o Anti-HBc total.

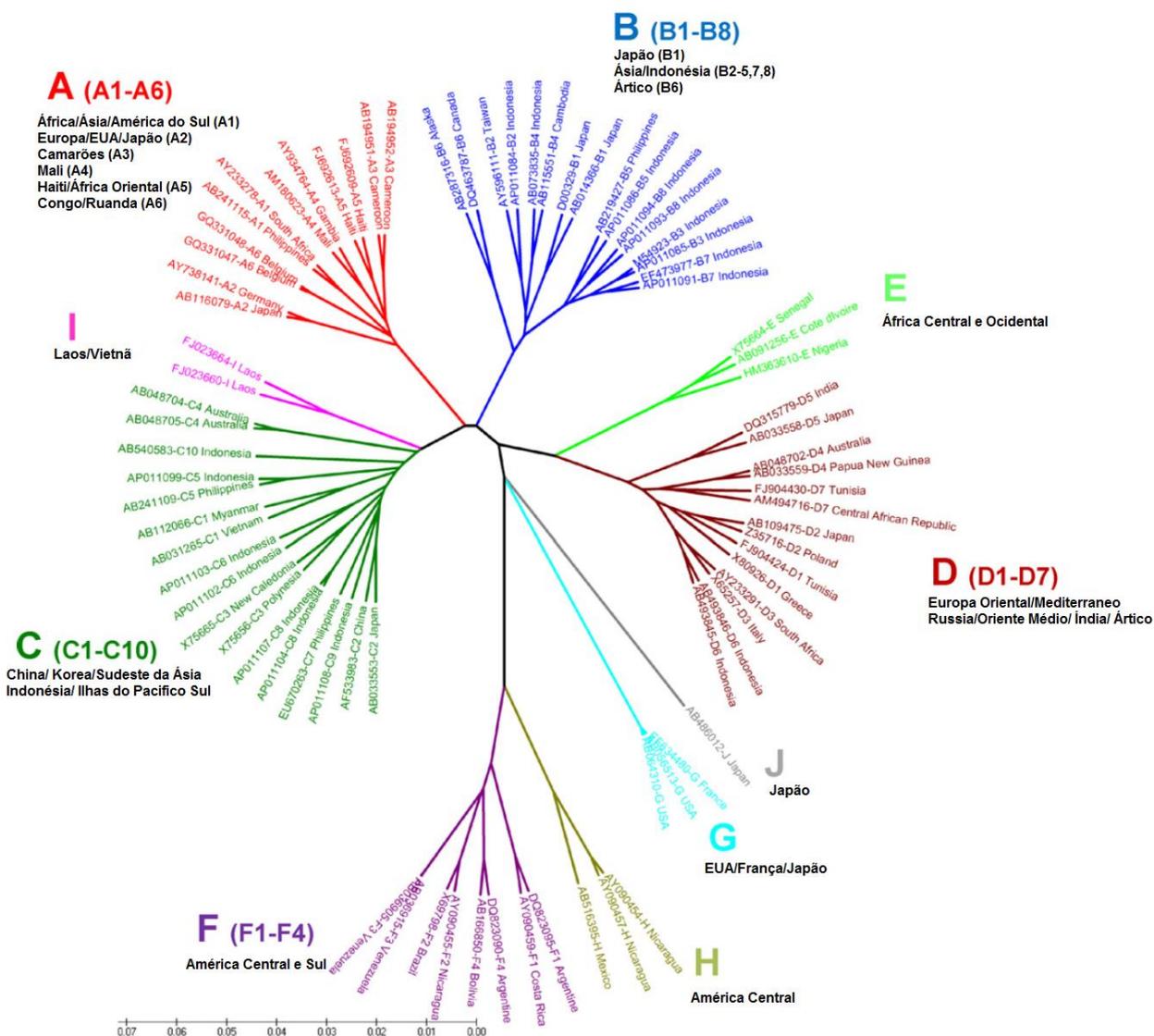
### **2.5.3 Epidemiologia molecular do vírus da hepatite B**

Apresentando uma diversidade viral complexa, o VHB apresenta diferentes genótipos e subgenótipos (Figura 6) (HUY et al, 2008; HANNACHI et al, 2010; WANG et al, 2014).

Inicialmente, quatro genótipos (A-D) do VHB, foram identificados comparando-se sequências de genomas completos, baseados em diferenças maior que 8% (intergenotípica) e menor que 4% (intra-genotípicas) (HUY et al, 2008; HANNACHI et al, 2010; WANG et al, 2014). Em seguida, outros quatro genótipos foram identificados (E-H). Atualmente, o VHB é dividido em dez genótipos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) (CASTILHO et al, 2012; CRISPIM et al, 2014; RAHMAN et al, 2016) que estão associados com diferentes mutações (SAYED, KOBEISY, 2012; RASTEGARVAND et al, 2015). Além disso, os genótipos são subdivididos em subgenótipos, cuja nomenclatura utiliza números (1, 2, 3, etc). Estudos recentes sugerem que os genótipos possam influir na gravidade da doença e na resposta ao tratamento (HUY et al, 2008; McMAHON, 2009; CASTILHO et al, 2012; WANG, 2014).

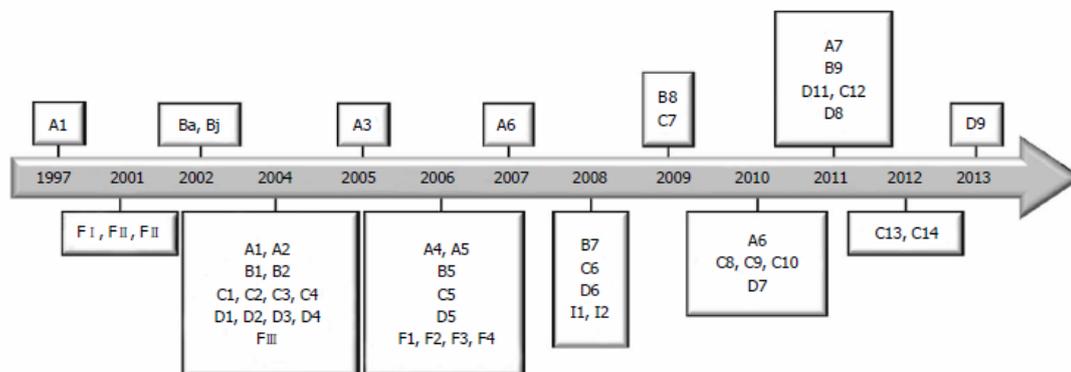
A longa evolução do VHB levou a presente existência de vários genótipos, subgenótipos, mutantes, recombinantes do vírus (KAO, 2011; POURKARIM et al, 2014) (Figura 7).

Figura 6. Árvore filogenética do genoma viral completo representando os genótipos do VHB existentes.



Fonte: ARAÚJO et al, 2011. (adaptado)

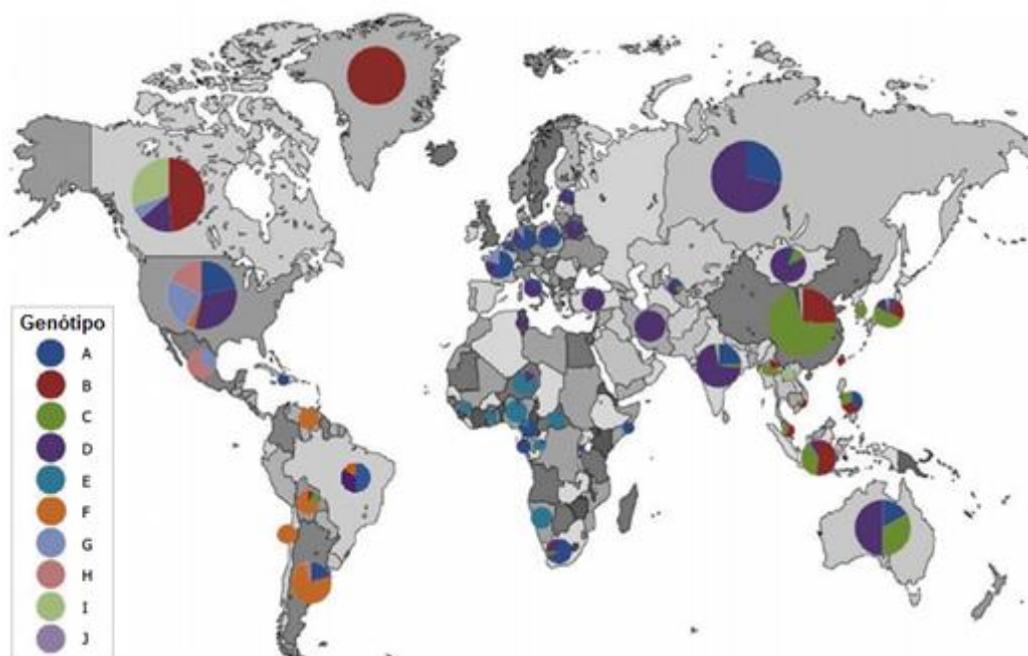
Figura 7. Linha do tempo de identificação e designação de alguns genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B.



FONTE: POURKARIM et al, 2014.

O VHB é um vírus cosmopolita com uma distribuição distinta (Figura 8), sendo que alguns dos seus genótipos e subgenótipos apresentam localização geográfica bem estabelecida (Tabela 1) (ALVARADO-MORA et al, 2011; DA SILVA CONDE et al, 2013; WANG et al, 2014.)

Figura 8. Distribuição geográfica dos genótipos do VHB no mundo.



Fonte: Fonte: SUNBUL, 2014. (Adaptado)

Tabela 1. Localização e características dos genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B.

GENÓTIPO	LOCALIZAÇÃO	CARACTERÍSTICA
A	Mundial – Europa, Índia, África e América do Norte	6 subgenótipos Sequência de AA do gene S
B e C	Ásia Leste e Sudeste Asiático	Subgenótipos B-9 e C-16 Associados ao HCC
D	Mundial Índia, Rússia, EUA, Brasil	9 subgenótipos Deleção de 33 nucleotídeos
E	África Colômbia e Norte da Índia	Deleção de 3 nucleotídeos na região da polimerase.
F	EUA, Polinésia e Américas (Brasil)	4 subgenótipos
G	EUA, Brasil, México e Europa Distribuição desconhecida	2 substituições únicas Gene S semelhante ao A
H	Nicarágua, México e Américas Central e Sul	Similar ao F
I e J	Vietnã, Laos, Canadá e França	I – combinação A, C e G

FONTE: Do autor, 2016.

O genótipo A mostra uma distribuição global (RAHMAN et al, 2016) sendo encontrado na Europa, Índia, África, América do Norte e Brasil (DA SILVA CONDE et al, 2013; SANTOS et al, 2014; CRISPIM et al, 2014). Ele foi subdividido em seis subgenótipos distintos geneticamente (A1 a A6) (POURKARIM, et al, 2010; ALVARADO-MORA et al, 2011). O genótipo A1 é prevalente na Ásia e África (POURKARIM et al, 2014) e o A2 é dominante na Europa e América (DA SILVA CONDE et al, 2013; POURKARIM et al, 2014). Esta subdivisão foi baseada na sequência de aminoácidos do gene S do genótipo A. Nas sequências do subgenótipo A1 encontrou-se uma asparagina na posição 207 e uma leucina na posição 209, enquanto que na sequência do A2 obteve-se uma serina na posição 207 e valina na posição 209 (TONETTO, 2006; DE ALMEIDA, 2012).

Em 2005 o subgenótipo A3 foi caracterizado por Kurbanov e colaboradores, primeiramente em Camarões e posteriormente em Gibão, ambas cidades do continente Africano. No período de 2006 a 2009 os subgenótipos A4, A5, e A6 também foram identificados na África e Haiti (POURKARIM, et al, 2010).

Os genótipos B e C são predominantes no Leste e Sudeste Asiático (ALVARADO-MORA et al, 2011; POURKARIM, et al, 2014; RAHMAN et al, 2016) e contém 3.215 nucleotídeos em seus genomas (DE ALMEIDA, 2012). Ambos os genótipos foram subdivididos em vários subgenótipos (genótipo B – B1, a B9, genótipo C – C1a C16) (WANG et al, 2014; POURKARIM, et al, 2014) . Os subgenótipos B1, B2, C1 e C2 tem maior distribuição na China do que os demais subgenótipos que são distribuídos em países do sudeste asiático (WANG et al, 2014; POURKARIM, et al, 2014; PARK, 2015). Os genótipos B e C estão mais associados com o desenvolvimento do HCC do que os demais. (PARK, 2015).

O Genótipo D possui uma deleção de 33 nucleotídeos na região Pré-S1 tendo somente 3.182 nucleotídeos em seu genoma (TONETTO, 2006). O genótipo D também é muito difundido mundialmente (POURKARIM, et al, 2014), sendo predominante na área do Mediterrâneo, Índia, Rússia e Estados Unidos (SANTOS et al, 2014; RAHMAN et al, 2016). Ele também possui subdivisão em nove subgenótipos D1 a D9 (WANG et al, 2014; POURKARIM, et al, 2014). Estudo realizado em São Paulo e na Região Amazônica demonstram a presença do genótipo D no Brasil (CASTILHO et al, 2012; DA SILVA CONDE et al, 2013; SANTOS et al, 2014; CRISPIM et al, 2014).

O Genótipo E do VHB é originário da África, podendo também ser encontrado na Colômbia e Norte da Índia (WANG et al, 2014; RAHMAN et al, 2016). Possui sequências *ayw4* e, além disso, apresenta também uma deleção de três nucleotídeos na região da polimerase (TONETTO, 2006, DE ALMEIDA, 2012).

O genótipo F, subdividido em quatro subgenótipos (F1 a F4) (POURKARIM, et al, 2014), sendo caracterizado pela substituição da leucina na posição 45 e treonina na mesma posição, sendo ambas específicas no produto do gene S (TONETTO, 2006; DE ALMEIDA, 2012). Ele é oriundo da Polinésia e Estados Unidos, sendo encontrado em populações aborígenes das Américas e encontrado em diversas regiões do Brasil (WANG et al, 2014; CRISPIM et al, 2014; RAHMAN et al, 2016).

O genótipo G é encontrado nos Estados Unidos, México, Brasil e Europa (RAHMAN et al, 2016), mas a distribuição não é totalmente conhecida (DEVESSE, PUJOL, 2007; DA SILVA CONDE et al, 2013; SANTOS et al, 2014) . Sequências do genótipo G compartilham duas únicas substituições, não encontradas em nenhum outro genótipo (TONETTO, 2006), caracterizando uma baixa variabilidade genotípica

(DEVESSA, PUJOL, 2007). O gene S do HBV/G possui a mais alta similaridade com o HVA/A (DEVESSA, PUJOL, 2007), porém, quando comparados seu genoma completo, o HBV/G possui uma grande divergência das demais sequências dos outros genótipos do HBV. Ele possui uma inserção de 36 nucleotídeos no códon 2 do gene do Core dando a sua sequência um total de 3248 nucleotídeos (TONETTO, 2006; DE ALMEIDA, 2012).

Todas as sequências pertencentes ao genótipo H são oriundas da Nicarágua, México, Califórnia e América Central e Sul (WANG et al, 2014; RAHMAN et al, 2016), sendo o HBV/H muito similar ao HBV/F, apesar de não circularem na mesma região. (TONNETO, 2006; DEVESA, PUJOL, 2007).

Os mais recentes genótipos do HBV são os I e J (WANG,2014; SUNBUL, 2014). A variante do VHB, provisoriamente atribuído ao genótipo I foi detectado no Vietnã, Laos, Canada e França (HUY et al, 2008, RAHMAN et al, 2016 ). O genótipo I surge com a combinação entre os genótipos A, C e G. (HUY et al, 2008; OLINGER et al, 2008 OSIOWY et al, 2010; WANG,2014; ). O genótipo J foi detectado em uma ilha no Japão (SUNBUL, 2014; RAHMAN et al, 2016).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B entre os pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical - UFPA, na cidade de Belém, estado do Pará.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Descrever o perfil epidemiológico dos pacientes atendidos.
- Determinar os perfis sorológicos entre os pacientes.
- Detectar o DNA viral na amostra estudada.
- Determinar os genótipos circulantes.
- Determinar a proximidade filogenética entre as sequências.
- Comparar com sequencias referencias do *GenBank*.
- Comparar as metodologias de genotipagem (PCR e sequenciamento).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 CASUÍSTICA**

#### **4.1.1 Desenho do estudo**

Trata-se de um estudo do tipo retrospectivo transversal, com amostras obtidas por conveniência, que foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (NMT-UFPA) no qual foi investigada a frequência dos genótipos e subgenótipos do VHB em pacientes atendidos pelo programa de hepatites virais do NMT-UFPA, no período de Janeiro de 2011 a Dezembro de 2015.

#### **4.1.2 Local do Estudo**

A cidade de Belém, capital do estado do Pará, está localizada ao norte do estado, é considerada a “Metrópole da Amazônia” por ter a maior concentração populacional do norte brasileiro com uma população de 1.432,844 habitantes. Apresenta uma extensão territorial de 1,059,458 km<sup>2</sup> (-1<sup>o</sup> 27'20 S - 48<sup>o</sup> 30'15 O) (Figura 9) (IBGE, 2015).

O Núcleo de Medicina Tropical é uma unidade de integração da Universidade Federal do Pará destinada ao ensino de pós-graduação, pesquisa e extensão na área de Doenças Tropicais e demais temas de interesse amazônico. Nesta Instituição é desenvolvido desde 2002 o programa de hepatites, onde doadores de sangue com sorologia reagente na triagem do hemocentro do estado, são encaminhados. O programa visa atendimento ambulatorial e a realização de exames laboratoriais para confirmação do diagnóstico e acompanhamento clínico.

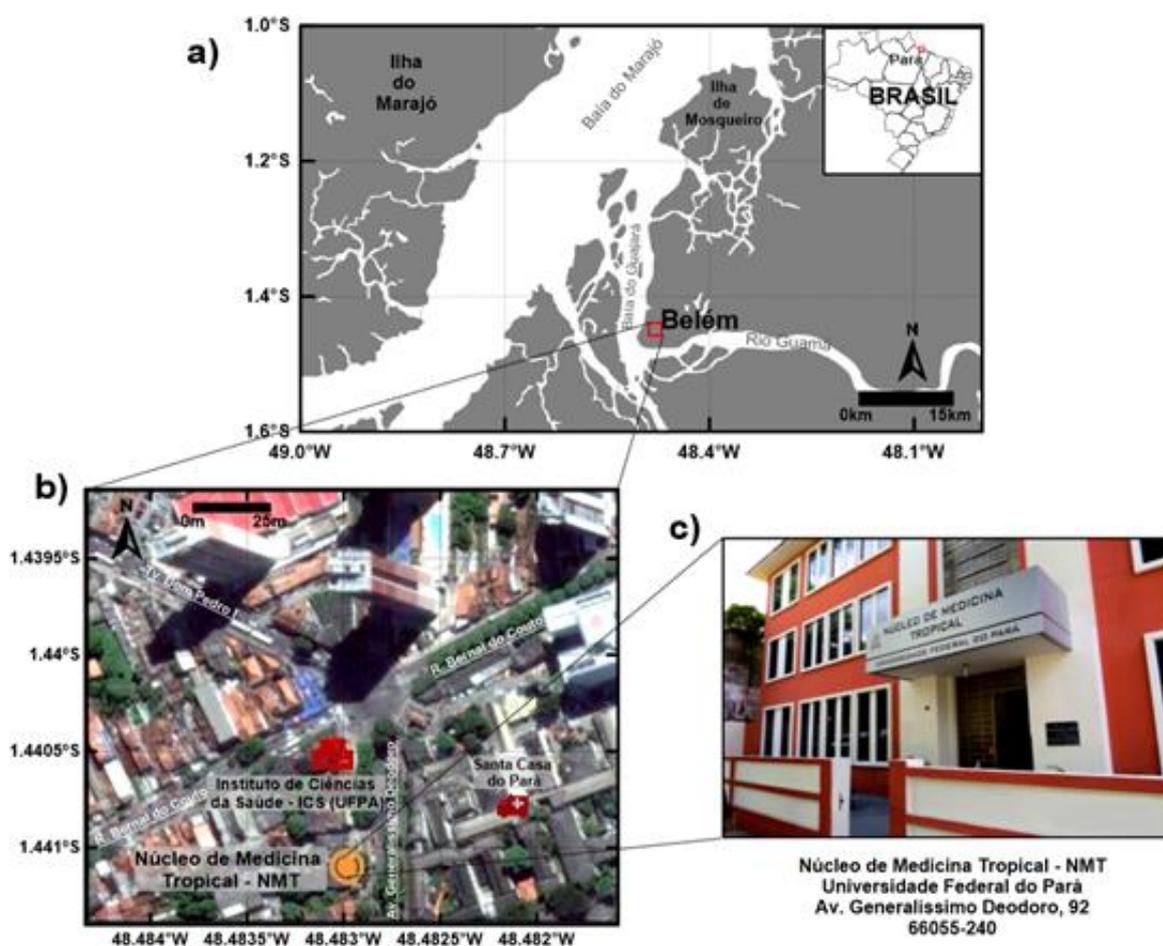
#### **4.1.3 Caracterização da amostra**

Possíveis doadores de sangue triados pelo hemocentro do estado com reatividade em um ou mais marcadores sorológicos para hepatite B (HBsAg, Anti-HBc total e Anti-HBs) são encaminhados ao programa de hepatites virais do NMT-UFPA para confirmação do diagnóstico sorológico.

Dentro deste universo amostral, foi analisado a positividade dos marcadores sorológicos HBsAg e Anti-HBc total nos 1274 pacientes atendidos no NMT-UFPA

dentro do período de Janeiro de 2011 a Dezembro de 2015, sendo identificado um total de 222 pacientes, de ambos os sexos, com sorologia reagente para os marcadores HBsAg e/ou anti-HBc total.

Figura 9. Localização geográfica do Núcleo de Medicinal Tropical da UFPA.



Legenda: A) Localização do município de Belém, capital do Estado do Pará, no norte do Brasil. B) Imagem georeferenciada da localização do NMT-UFPA C) Fotografia ilustrativa do NMT-UFPA com logradouro.

Fonte: DO AUTOR, 2016.

#### 4.1.4 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical - UFPA com a numeração 138.638. (Anexo 1).

Todos os participantes do estudo receberam esclarecimento verbal sobre a pesquisa e sua importância, assinando assim o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1), conforme preconiza a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Somente após a assinatura foi aplicado um questionário epidemiológico (Apêndice 2) e coletada a amostra de sangue.

#### **4.1.5 Riscos e Benefícios**

A participação no estudo acarretou em riscos mínimos ao paciente, referente a coleta de 10 mL de sangue por punção venosa periférica que foi realizada por um profissional capacitado, seguindo as normas de biossegurança para a coleta sanguínea. Como benefício determinou-se à frequência do vírus entre os pacientes, servindo os dados para o planejamento de medidas de intervenção. O paciente teve acesso aos laudos de diagnóstico, que auxiliaram no encaminhamento para atendimento médico nos casos com resultados positivos para detecção do vírus da hepatite B.

#### **4.1.6 Critérios de Inclusão e Exclusão**

Para a participação neste estudo o voluntário deveria ser maior de idade, ter sido atendido pelo programa de hepatites virais no Núcleo de Medicina Tropical - UFPA, apresentar sorologia não reagente para o marcador sorológico Anti-HBs, residir na região metropolitana de Belém.

Pacientes com algum tipo de deficiência mental, co-infectados (VHB/VHC; VHB/HIV) ou que já realizaram algum tipo de tratamento para o VHB foram excluídos desta pesquisa.

### **4.2 METODOS LABORATORIAIS**

#### **4.2.1 Obtenção da amostra biológica**

A coleta por punção venosa foi realizada por um profissional habilitado seguindo todas as normas de biossegurança. Foi coletado aproximadamente 10ml de sangue sem adição de anticoagulante para obtenção do soro. As amostras sanguíneas foram centrifugadas por cinco minutos a 3.000 RPM e o soro recolhido e

colocado em frasco devidamente identificado, armazenado a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior uso.

Estas amostras foram utilizadas para os testes sorológicos e moleculares dos pacientes.

#### **4.2.2 Diagnóstico sorológico da hepatite B**

O processamento das amostras foi realizado no laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais no Núcleo de Medicina Tropical – UFPA, onde todas foram submetidas ao teste imunoenzimático pelo método de ELISA, sendo testados marcadores específicos para o VHB (HBsAg, anti-HBc total e anti-HBs), utilizando kits imunoenzimáticos comerciais (Diasorin, Itália), conforme as instruções de uso recomendadas pelo fabricante do kit.

Para todos os *kits* utilizados, as placas necessárias para as reações foram retirados da geladeira com antecedência de uma hora e deixados à temperatura ambiente, e os reagentes homogeneizados rapidamente no vórtex. A identificação da placa foi feita em uma folha de dados para teste de ELISA. A absorbância foi medida por espectrofotometria (Leitora para microplaca TP Reader ThermoPlate) utilizando o filtro de 450/630nm.

Esses testes possuem caráter qualitativo classificando os indivíduos como reativos ou não reativos. Os procedimentos básicos para a realização dos ensaios enzimáticos para a detecção dos marcadores sorológicos a partir do soro dos indivíduos estão descritos abaixo.

##### ***4.2.2.1 Procedimentos para a determinação do antígeno de superfície HBsAg – Kit ETI-MAK-4 (Diasorin, Itália).***

Na placa, foi realizada a distribuição das amostras, controles e calibradores em seus respectivos poços, e, em seguida, a placa foi incubada em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Após foi realizado o ciclo de lavagem (cinco vezes) para retirada do excesso de antígenos não ligados. Foi adicionado o conjugado enzimático e a placa passou por mais uma incubação na estufa por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Decorrido o tempo outro ciclo de lavagem (cinco vezes) foi realizado e após a lavagem foi adicionado o Cromógeno/Substrato, sendo este aplicado sem a incidência direta da luz. A

incubação foi realizada em temperatura ambiente por 30 minutos, e passado o tempo, foi acrescentada na reação a solução de paragem para finalizar a mesma e em seguida feita a leitura por absorbância. O cálculo do valor de corte foi determinado pela adição de 0,030 à absorbância média do controle negativo. As amostras com valores de absorbância acima do valor de corte são consideradas reagentes e as com valores abaixo do valor de corte como não reagentes.

#### ***4.2.2.2 Procedimentos para a determinação dos anticorpos Anti-HBc total – Kit ETI-AB-COREK PLUS (Diasorin, Itália).***

Primeiramente foi feita a distribuição do tampão de incubação em todos os poços exceto no branco e em seguida a colocação das amostras, controles e calibradores em seus respectivos poços, seguido da distribuição da solução de neutralização nos poços exceto no branco. A incubação da placa foi em câmara úmida a 37<sup>0</sup>C durante 2 horas. Após foi realizado o ciclo de lavagem (cinco vezes) para retirada do excesso de anticorpos não ligados e adicionado o conjugado enzimático diluído. A placa foi incubada em câmara úmida por 1 hora a 37<sup>0</sup>C. Decorrido o tempo outro ciclo de lavagem (cinco vezes) foi realizado e após foi adicionado o Cromógeno/Substrato, sendo este aplicado sem a incidência direta da luz. A incubação foi realizada em temperatura ambiente por 30 minutos, e após o tempo estabelecido, foi acrescentada na reação a solução de paragem para finalizar a mesma e em seguida feita a leitura por absorbância. Cálculo do valor de corte foi determinado pela multiplicação da absorbância média dos calibradores por 0,300. As amostras com valores de absorbância acima do valor de corte são consideradas não reagentes e as com valores abaixo do valor de corte como reagentes.

#### ***4.2.2.3 Procedimentos para a determinação dos anticorpos Anti-HBs – Kit ETI-AUK-3 (Diasorin, Itália)***

Foi feita a distribuição do tampão de incubação em todos os poços exceto no branco e em seguida a colocação das amostras, controles e calibradores em seus respectivos poços. A incubação da placa foi em estufa a 37<sup>0</sup>C durante duas horas. Passado foi feito a ciclo de lavagem (cinco vezes) para retirada do excesso de anticorpos não ligados. Após foi adicionado o conjugado enzimático diluído e a placa passou por mais uma incubação por 1 hora a 37<sup>0</sup>C na estufa. Decorrido o tempo

outro ciclo de lavagem (cinco vezes) foi realizado e após foi adicionado o Cromógeno/Substrato, sendo este aplicado sem a incidência direta da luz. A incubação foi realizada em temperatura ambiente por 30 minutos, e passado o tempo, foi acrescentada na reação a solução de paragem para finalizar a mesma e em seguida feita a leitura por absorbância. O valor de corte foi determinado pela média das absorbâncias do calibrador 1. As amostras com valores de absorbância acima do valor de corte são consideradas reagentes e as com valores abaixo do valor de corte como não reagentes.

#### **4.2.3 Diagnóstico molecular**

Todas as amostras com sorologia reagente para os marcadores HBsAg e Anti-HBc total foram submetidas ao teste de PCR para detecção do DNA viral. Para as amostras em que foi detectada a presença do DNA viral foi realizado a genotipagem. Para caracterizar os subgenótipos as amostras genotipadas foram submetidas a reações de sequenciamento.

##### ***4.2.3.1 Extração e isolamento do ácido nucléico***

Para a extração do DNA do VHB foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Alemanha). Os procedimentos para as extrações foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo 2).

##### ***4.2.3.2 Reação em cadeia da polimerase da região do Core do VHB para detecção do DNA viral***

Na realização da PCR para detecção do VHB-DNA, amplificando a região do Core, foi utilizado 3µl de DNA (30-50ng), na mistura da reação onde foram adicionados 12µl de *GoTaq Green* (Promega, EUA), 8µl de água ultrapura livre de DNase e RNase, 1µl (10nM) de cada oligonucleotídeos iniciadores HBVS e HBVA (ThermoFisher, Alemanha) (Tabela 2) obtendo um volume final de 25µl de reação.

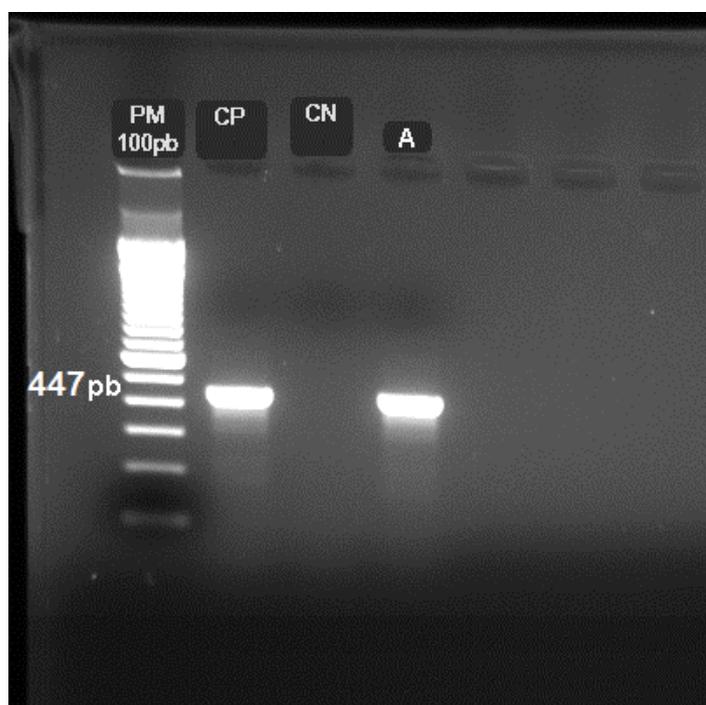
A reação foi submetida a um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos) e um ciclo final de extensão a 72°C por 3 minutos. Para a amplificação foi utilizado o termociclador *Amplitherm Thermalcyclers®*.

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio (1µg/ml) e submetidos à eletroforese com tampão TBE 1X, nas condições de 100V, 200A por 60 minutos, com posterior visualização do padrão de banda de 447 pares de bases (pb) através do transiluminador com fonte de luz ultravioleta. (Figura 10).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na detecção do VHB-DNA para amplificação da região do Core nos pacientes.

Oligo	Posição	Sequência 5' → 3'	Referência
REGIÃO C			
HBV S	2401- 2381	TCT GCG AGG CGA GGG AGT TCT	García et al., 1995
HBV A	1955 - 1974	TTG CCT TCT GAC TTC TTT CC	

Figura 10. Caracterização do padrão de banda para detecção do DNA do VHB. Foto do gel de agarose a 1,5% com a positividade do VHB-DNA.



Legenda: PM: peso molecular de 100pares de bases(pb); CP: controle positivo; CN: Controle negativo; A: Amostra.

Fonte: DO AUTOR, 2016

### 4.2.3.3 Genotipagem do vírus VHB

Todas as amostras que apresentaram amplificação na região do *Core* foram submetidas à genotipagem do vírus pela técnica de multiplex baseado na técnica de Farazmandfar e colaboradores (2012), utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos (ThermoFisher, Alemanha) denominados SET 1 e SET 2 (Tabela 3).

Tabela 3. Sequencia de oligonucleotídeos utilizados para a determinação de 8 genótipos do VHB (A-H) utilizando a reação em cadeia da polimerase multiplex.

OLIGO	SEQUENCIA 5' → 3'	POSIÇÃO	TAMANHO DO PRODUTO
<b>SET 1</b>			
Common2-F	CGT GTG CAC TTC GCT TCA CC	nt 1576-1595 direto	
B2-R	ACA GAA TAG CTT GCC TTA GTG CC	nt 2059-2081 reverso	506pb
C2-R	GCA TTT GGT GGT CTG TAA GCG AT	nt 2288-2310 reverso	735pb
F2-R	TCG ATC CAG GTC ATT GAC CAT C	nt 1678-1699 reverso	124pb
G2-R	AGG CCA TAT GGC AAA GTT GTT C	nt 1908-1929 reverso	354pb
<b>SET2</b>			
Common 1-F	AGT ATT CCT TGG ACT CAT AAG GTG G	nt 2457-2481 direto	
A1-R	GGC AGG AGG AGG AAT TGT TGA	nt 3118-3138 reverso	682pb
D1-R	AGG TGT CCT TGT TGG ATT GTA A	nt 2948-2970 reverso	518pb
E1-R	CTA GGG GCA AAT ATT TCG TAG AGA	nt 2659-2682 reverso	232pb
H1-R	GTC CCA TGC CCC TTC TCG C	nt 2869-2887 reverso	437pb

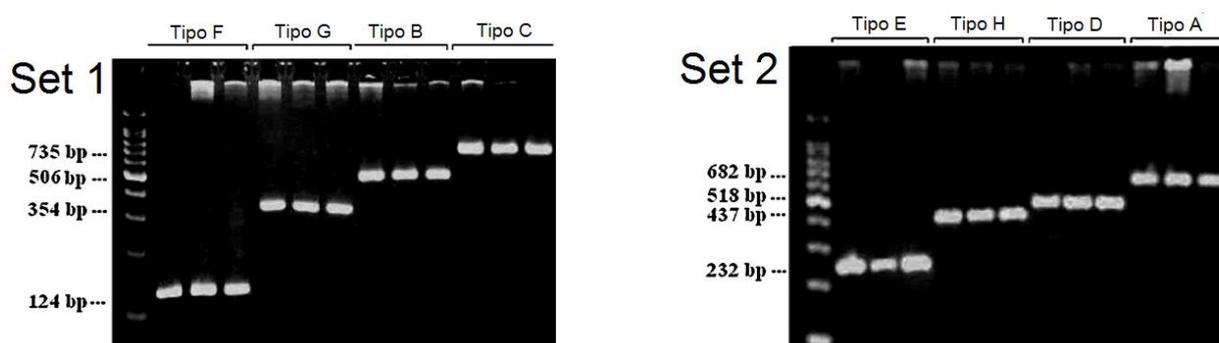
Fonte: Farazmandfar et al, 2012 (adaptado).

Para a preparação da solução de trabalho correspondente a uma amostra para cada SET (SET 1 e SET 2), foi utilizado 3µl de DNA (30-50ng), na mistura da reação onde foram adicionados 12µl de *GoTaq Green* (Promega, EUA), 8 µl de água ultrapura livre de DNase e RNase, 1µL (10nM) de cada conjunto de oligonucleotídeos (SET1 e SET2), obtendo-se um volume final de 25µL de reação.

A reação foi submetida a um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de amplificação (95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto) e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Para a amplificação foi utilizado o termociclador *Amplitherm Thermalcyclers®*.

O produto da amplificação foi aplicado em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (1µg/ml) e submetidos à eletroforese com tampão TBE 1X, nas condições de 100V, 200A por 60 minutos. Os resultados foram visualizados através do transiluminador com fonte de luz ultravioleta. Cada genótipo apresenta um tamanho de fragmento de banda correspondente ao número de pares de bases conforme demonstrado na figura 11.

Figura 11. Padrões de bandas para a genotipagem do VHB com o conjunto de oligonucleotídeos SET 1 e SET 2.



Fonte: FARAZMANDFAR et al, 2012 (adaptado)

#### **4.2.3.4 Amplificação parcial do gene S do vírus da hepatite B para a reação de sequenciamento.**

Foram submetidas ao sequenciamento as amostras que apresentaram positividade na genotipagem do VHB. Para isso foram submetidas a uma Nested-PCR utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos sendo os externos FHBS1

(Eurofins, Alemanha) e RHBS1 (Eurofins, Alemanha) utilizados na primeira rodada de amplificação e os internos FHBS2 (ThermoFisher, Alemanha) e RHBS2 (ThermoFisher, Alemanha) utilizados na reamplificação do produto inicial. Ambos estão relacionados na tabela 4. Estes oligonucleotídeos selecionados corresponderam a regiões conservadas entre os diferentes genótipos, rodeando regiões heterogêneas entre eles, permitindo a distinção dos genótipos do VHB (SITNIK et al, 2004).

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene S do VHB para a reação de sequenciamento. Posição dos iniciadores no *GenBank*: V00866.

Oligo	Posição	Sequência 5' → 3'	Referência
<b>REGIÃO S</b>			
FHBS1	244 a 267	GAGTCTAGACTGGTGGTGGACTTC	
RHBS1	668 a 691	AAATKGCAGTCTAGTTAACT	Sitnik et al., 2004
FHBS2	255 a 278	CGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTC	
RHBS2	648 a 671	GCCARGAGAAACGGRCTGAGGCC	

Fonte: SITNIK et al, 2004.

Para a preparação da reação de trabalho correspondente a uma amostra, os oligonucleotídeos FHBS1 e RHBS1, foram utilizados, com os seguintes reagentes: 12µL de *GoTaq Green* (Promega, EUA), 8µL de água ultrapura livre de DNase e RNase, 1µL (10nM) de cada um dos oligonucleotídeos citados e 3µL de DNA (30-50ng), apresentando um volume final de 25µL de reação.

Assim, as amostras foram submetidas à PCR com a mistura da reação descrita acima, sendo submetida a um ciclo de desnaturação inicial de 94<sup>0</sup>c por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação (94<sup>0</sup>C por 20 segundos, 57<sup>0</sup> C por 20 segundos, 72<sup>0</sup> C por 20 segundos) e um ciclo final de extensão a 72<sup>0</sup>C por 1 minuto.

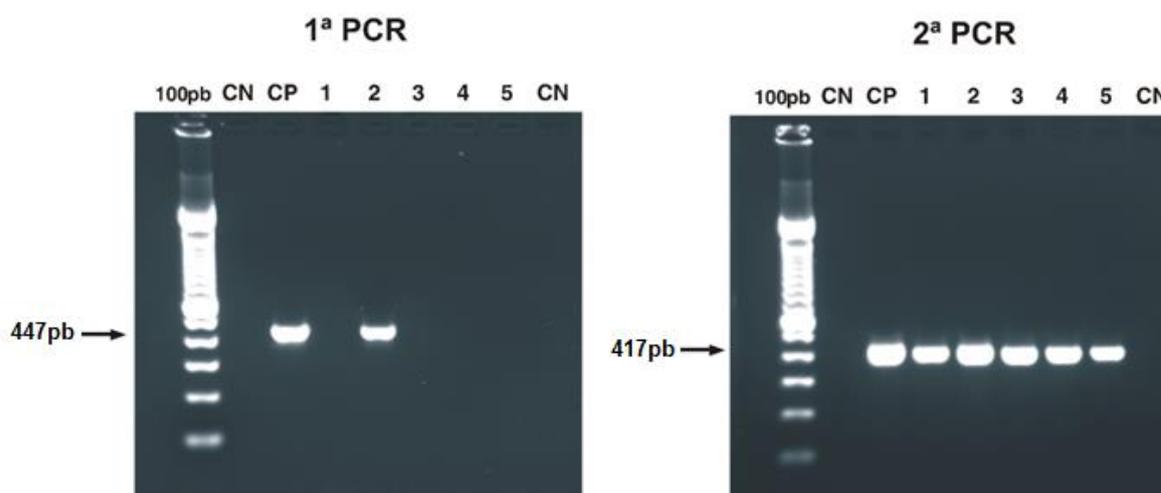
A solução para a segunda reação contou as seguintes quantidades de reagentes: 12µL de *GoTaq Green* (Promega, EUA), 8µL de água ultrapura livre de DNase e RNase, 1µL (10nM) de cada um dos oligonucleotídeos (FHBS2 e RHBS2 -

10nM) e 3 $\mu$ L do produto da primeira amplificação, apresentando um volume final de 25 $\mu$ L de reação.

As amostras foram submetidas a amplificação, sendo submetida a um ciclo de desnaturação inicial de 94 $^{\circ}$ C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação (94 $^{\circ}$ C por 20 segundos, 57 $^{\circ}$  C por 20 segundos, 72 $^{\circ}$  C por 20 segundos) e um ciclo final de extensão a 72 $^{\circ}$ C por 1 minuto.

Foi preparado um gel de agarose à 1,5%, corado com brometo de etídio (1 $\mu$ g/ml) e submetido a eletroforese em tampão TBE 1X nas condições de 100V, 200A por 1 hora, com posterior visualização do padrão de banda através do transiluminador com fonte de luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos encontrado foi de 447pares de base na primeira PCR e o tamanho de 417 pares de base na segunda PCR. As amostras VHB-DNA positivas foram usadas como controle positivo e água ultrapura foi usada como controle negativo a fim de excluir reagentes contaminados (Figura 12).

Figura 12. Foto do gel de agarose a 1,5% mostrando a 1 $^{\circ}$  PCR e 2 $^{\circ}$  PCR para a amplificação parcial do gene S do VHB com as mesmas amostras.



Legenda: 100pb: Peso molecular de 100 pares de base; CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1 – 5: Amostras dos pacientes.

Fonte: DO AUTOR, 2016.

#### **4.2.3.5 Purificação do gel de agarose**

Os produtos de amplificação correspondentes foram extraídos a partir do gel de agarose à 1,5% e purificados utilizando o *PureLink® Quick Gel Extraction Kit* (ThermoFisher, Alemanha). A solução final de produtos de PCR purificados foi de 20µL. Os procedimentos para as purificações foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo 3).

#### **4.2.3.6 Reações de sequenciamento**

Para caracterizar as estirpes do vírus, os produtos de reamplificação parcial do gene S foram submetidos a um ciclo de PCR visando à incorporação de dideoxynucleotídeos terminal com kit Big Dye *terminator Cycle Sequencing V3*, de acordo com as instruções do fabricante em eletroforese capilar no sequenciador ABI 3500 XL (ThermoFisher, CA). As sequências foram analisadas em ambas as direções (*forward* e *reverse*) usando os oligonucleotídeos FHBS2 e RHBS2 (ThermoFisher, Alemanha).

#### **4.2.3.7 Análise das sequências**

A identificação dos genótipos e subgenótipos só foi possível nas sequências cujo o eletroferograma apresentou um nível de qualidade superior a 80%. A análise da qualidade do eletroferograma foi realizada pelo programa *online Electropherogram quality analysis* (TOGAWA et al, 2006) disponível em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>.

Para confirmar os genótipos virais circulantes, as sequências obtidas foram analisadas pela ferramenta *Genotyping* disponível no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>). Subsequentemente, as sequências foram editadas utilizando o programa GENEIOUS 9.0.5 (Biomatters) e alinhadas com sequências de outros vírus isolados disponíveis no banco de dados do *GenBank* (Tabela 5), utilizando o programa MEGA versão 6.06 (TAMURA, 2013).

O modelo de *Máxima Verossimilhança* foi utilizado para a construção da árvore filogenética. As distâncias genéticas foram estimadas utilizando o modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HASEGAWA et al, 1985) e sua significância estatística foi testado pelo método *bootstrap* (1.000 repetições).

Tabela 5. Sequências referências dos genótipos e subgenótipos relacionadas com seus respectivos número de acesso no GenBank.

<b>Genótipos</b>	<b>Número de Acesso no GenBank</b>
A	HM772994; AY344098; AM180623; FJ692600; HQ646069; AM184126; HQ646098; AY344107
B	AB010290; DQ463797
C	X75656; AB241109; HQ622095
D	JF754597; GQ205389; AB493846; GU456684; FJ904438; JF815643; JF815611; JQ246026; HM101101; HQ646076; HM101105
E	X75664
F	EU366132; JN792920; DQ899150; X69798; HM101130; HM101096
G	AP007264; EF464097
H	AB516394
J	AB486012
VHB macaco	AF046996

FONTE: DO AUTOR, 2016

## 5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos através dos questionários foram inseridos em planilha no programa Microsoft Excel 2010.

Foi realizada a análise descritiva por meio de tabelas de frequência para variáveis categóricas.

Foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (AYRES, et al, 2012) para a realização dos testes estatísticos Qui-quadrado, Teste G, quando necessário, para verificar associação ou comparar proporções.

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

## 6. RESULTADOS

Foram analisados 1274 pacientes atendidos no programa de hepatites virias do NMT-UFPA. Destes 222 apresentaram positividade nos marcadores sorológicos HBsAg e/ou Anti-HBc total.

A tabela abaixo demonstra o quantitativo de pacientes ao qual foram solicitados os marcadores da hepatite B, distribuídos por cada ano do período, bem como o quantitativo por ano dos pacientes com o perfil de inclusão neste estudo. (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação entre o número de solicitações de exames para hepatite B e pacientes com o perfil sorológico para compor o estudo.

<b>ANO</b>	<b>EXAMES SOLICITADOS</b>	<b>COM PERFIL SOROLÓGICO</b>
2011	322	43
2012	306	53
2013	270	48
2014	192	38
2015	184	40
<b>TOTAL</b>	<b>1274</b>	<b>222</b>

Fonte: DO AUTOR, 2016.

Entre os pacientes que apresentavam o perfil sorológico de inclusão nesse estudo foi observada uma faixa etária de 18 anos a 71 anos com média de idade de 38 anos. Quanto as características sócio demográficas desses participantes foi observado que a maioria era do sexo masculino, 64,4% (143/222) paraenses, com nível de escolaridade entre nove e doze anos de estudo. Na análise do estado civil, 54,5% declaram-se casados e 45,5% solteiros. Além das variáveis já citadas, também foi analisada a vacinação para o VHB, demonstrando que a maioria dos participantes desse estudo não havia realizado o esquema de vacinação para a hepatite B. A tabela 7 demonstra o perfil sócio demográfico dos participantes desse estudo.

Tabela 7. Descrição do perfil sócio demográfico encontrado nos pacientes do estudo.

VARIÁVEIS	N (222)	%	X <sup>2</sup>	p valor
<b>Gênero</b>				
Masculino	143	64,4	17,8	< 0,01
Feminino	79	35,6		
<b>Estado civil</b>				
Casado	121	54,5	1,6	0,20
Solteiro	101	45,5		
<b>Escolaridade em anos</b>				
Nenhum	2	0,9	226,4	<0,01
≤ 9	54	24,3		
≤ 12	147	66,3		
> 12	19	8,5		
<b>Declararam imunização</b>				
Não	164	73,8	287,8	<0,01
1 dose	33	14,8		
2 doses	12	5,4		
3 doses	13	5,8		

Legenda: X<sup>2</sup> (Qui-quadrado).

Fonte: Do autor, 2016.

Na análise dos fatores de riscos na população estudada foi observada que a maioria declarou possuir até um parceiro sexual, não utilizar o preservativo durante as relações sexuais, não possuíam tatuagens, nem *piercing* e nem realizaram consumo de drogas ilícitas. Quanto ao compartilhamento de material perfuro cortante, levou-se em consideração o uso de aparelhos ou lâminas de barbear e materiais para procedimentos de manicure, sendo que a maioria declarou realizar o compartilhamento destes equipamentos. (Tabela 8).

Tabela 8. Fatores de risco para aquisição do VHB encontrados entre os pacientes atendidos no NMT pelo programa de hepatites virais no período de 2011 a 2015.

<b>FATORES DE RISCO</b>	<b>N (222)</b>	<b>%</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>p valor</b>
<b>Múltiplos parceiros</b>				
0 a 1	120	54,1		
2	44	19,8	44,2	< 0,01
+2	58	26,1		
<b>Uso de preservativos</b>				
Sim	48	21,6		
Algumas vezes	70	31,5	21,5	<0,01
Não	104	46,9		
<b>Manicure</b>				
Sim	124	55,8	2,8	0,09
Não	98	44,2		
<b>Compartilhamento de material perfurocortante</b>				
Sim	116	52,3	0,36	0,54
Não	106	47,7		
<b>Tatuagem</b>				
Sim	47	21,2	72,6	< 0,01
Não	175	78,8		
<b>Piercing</b>				
Sim	19	8,5	150,8	< 0,01
Não	203	91,5		
<b>Uso de drogas</b>				
Sim	4	1,8	204,3	< 0,01
Não	218	98,2		

Realizando a análise quanto à naturalidade destes pacientes foi encontrado que 83% eram do estado do Pará, seguido de 8,1% naturais do estado do Maranhão e 2,75% do estado do Amapá. A tabela 9 demonstra os demais estados de origem dos pacientes estudados na pesquisa.

Tabela 9. Naturalidades identificadas entre os pacientes atendidos no NMT pelo programa de hepatites virais no período de 2011 a 2015.

<b>ESTADO DE ORIGEM</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Alagoas	1	0,45
Amapá	6	2,75
Amazonas	2	0,9
Bahia	1	0,45
Ceará	4	1,8
Maranhão	18	8,1
Minas Gerais	1	0,45
Pará	185	83,3
Piauí	1	0,45
Rio de Janeiro	3	1,35
<b>TOTAL</b>	<b>222</b>	<b>100</b>

Fonte: DO AUTOR, 2016.

Das 222 amostras submetidas aos testes imunoenzimáticos, 24,3% (54/222) apresentaram HBsAg reagente e 86,5% (192/222) o Anti-HBc reagente. Analisando o perfil sorológico dos pacientes, 12,1% (27/222) apresentaram o perfil sorológico sugestivo de fase aguda da hepatite B, enquanto que 74,3% (165/222) apresentaram o perfil sugestivo de hepatite oculta. A tabela 10 demonstra todos os perfis sorológicos encontrados neste estudo.

Tabela 10. Perfil sorológico encontrado nos pacientes atendidos no NMT-UFGA no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015.

<b>MARCADORES ISOLADOS</b>			
<b>Marcadores estudados</b>		<b>Testes Sorológicos</b>	
		N (222)	%
<b>HBsAg</b>	HBsAg +	54	24,3
	HBsAg -	165	74,3
	Indeterminado	3	1,4
<b>Anti-HBc</b>	Anti-HBc +	192	86,5
	Anti-HBc -	30	13,5

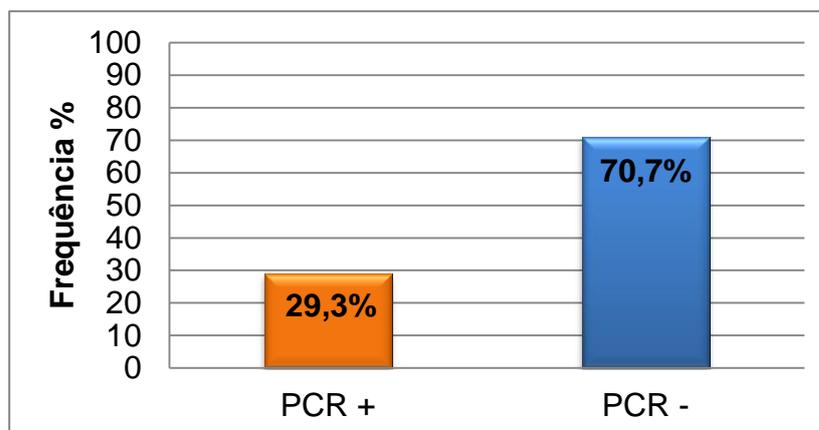
<b>PERFIL SOROLÓGICO</b>			
<b>Marcadores associados</b>		<b>Testes Sorológicos</b>	
		N (222)	%
HBsAg +; Anti-HBc + (fase aguda)		27	12,1
HBsAg +; Anti-HBc – (incubação)		27	12,1
HBsAg -; Anti-HBc + (sugestivo de HBO)		165	74,3
HBsAg (Ind); Anti-HBc - (convalescência)		3	1,4
HBsAg (Ind); Anti-HBc + (convalescência)		0	0

Legenda: HBsAg + (HBsAg reagente); HBsAg – (HBsAg não reagente); HBsAg (Ind) (HBsAg Indeterminado); Anti-HBc + (Anti-HBc reagente); Anti-HBc - (Anti-HBc não reagente). HBO (Hepatite B oculta).

Fonte: DO AUTOR, 2016.

Nas 222 amostras foi realizado o teste de PCR para a detecção do material genético viral, onde 29,3% (65/222) apresentaram positividade (Figura 13). Das 157 amostras negativas na PCR, foram selecionadas aleatoriamente cinco amostras de cada ano do período (25 amostras no total) e encaminhadas para a reação de sequenciamento a fim de confirmar a negatividade da PCR. Nas amostras negativas sequenciadas não foi detectado o material genético do VHB.

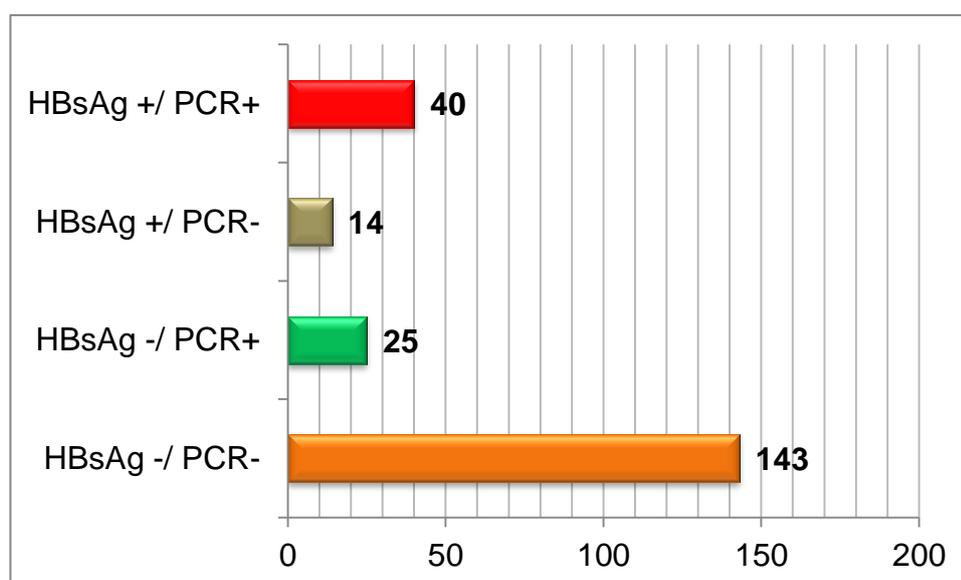
Figura 13. Frequência de positividade na PCR das amostras analisadas no estudo.



Fonte: DO AUTOR, 2016.

Para a comparação entre sorologia reagente para o marcador HBsAg e positividade para o teste de PCR, foram encontrados 18% (40/222) dos pacientes com positividade em ambos os testes. Entre as amostras analisadas, 11% (25/222) apresentaram HBsAg não reagente com positividade na PCR o que sugere um quadro de hepatite oculta. (Figura 14).

Figura 14. Análise do marcador sorológico HBsAg e do teste de PCR nos pacientes estudados.

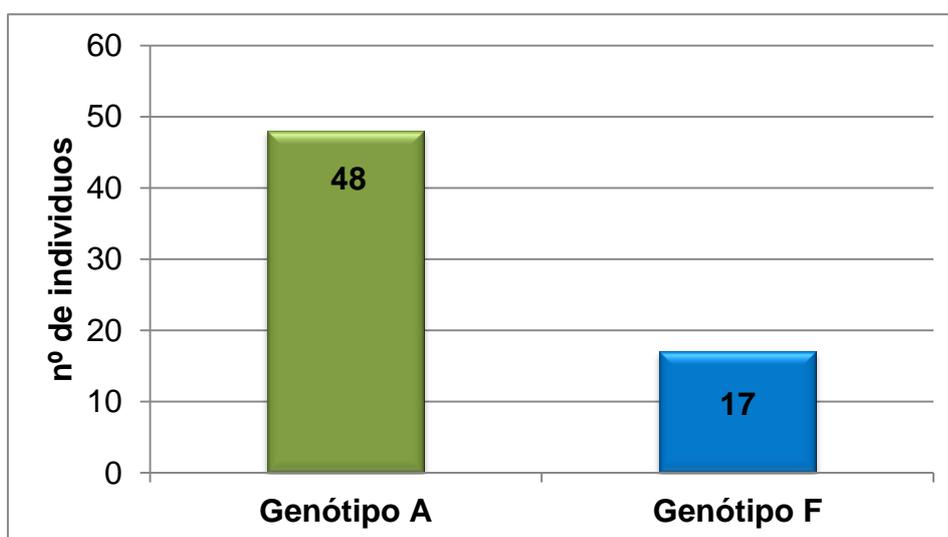


Legenda: HBsAg + (HBsAg reagente); HBsAg - (HBsAg não reagente); PCR + (PCR positiva); PCR- (PCR negativa).

Fonte: DO AUTOR, 2016.

As amostras que apresentaram positividade na PCR (65/222) foram testadas para a identificação dos diferentes genótipos do VHB, sendo realizado a genotipagem por PCR multiplex utilizando oligonucleotídeos específicos. Nas amostras analisadas foi detectado o material genético viral, sendo encontrado apenas os genótipos A e F (Figura 15).

Figura 15. Genótipos do vírus da hepatite B encontrados em pacientes atendidos no NMT-UFPA na cidade de Belém entre 2011 a 2015.

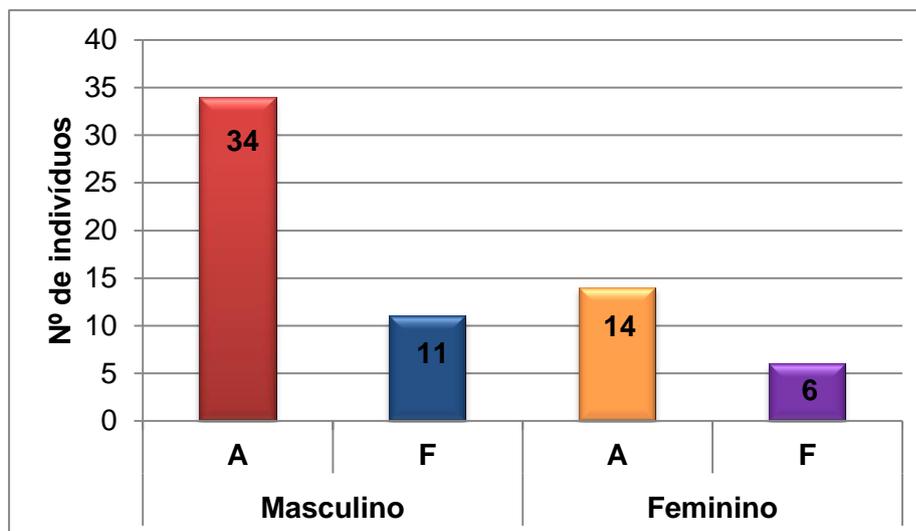


Fonte: DO AUTOR, 2016.

A figura 16 demonstra a relação da frequência dos genótipos do VHB encontrados na pesquisa e os gêneros dos pacientes analisados. 70,8% (34/48) do genótipo A foi encontrado em pacientes do gênero masculino, enquanto que o genótipo F foi detectado em 64,7% (11/17) destes pacientes. Aplicando análise estatística os resultados não mostram associação estatística significativa (Teste G: 0,21  $p$ : 0,6).

Correlacionando os genótipos encontrados com a naturalidade dos pacientes, detectou-se que o genótipo A estava presente em 81,2% dos paraenses. Os demais estados apresentaram 18,7% de genótipo A e 23,5% de genótipo F (Figura 17). Aplicando análise estatística (Teste G: 0,17  $p$ : 0,6), os resultados não mostram associação estatística significativa entre os genótipos e a naturalidade dos pacientes.

Figura 16. Gráfico demonstrativo correlacionando os genótipos encontrados com os gêneros dos pacientes atendidos.

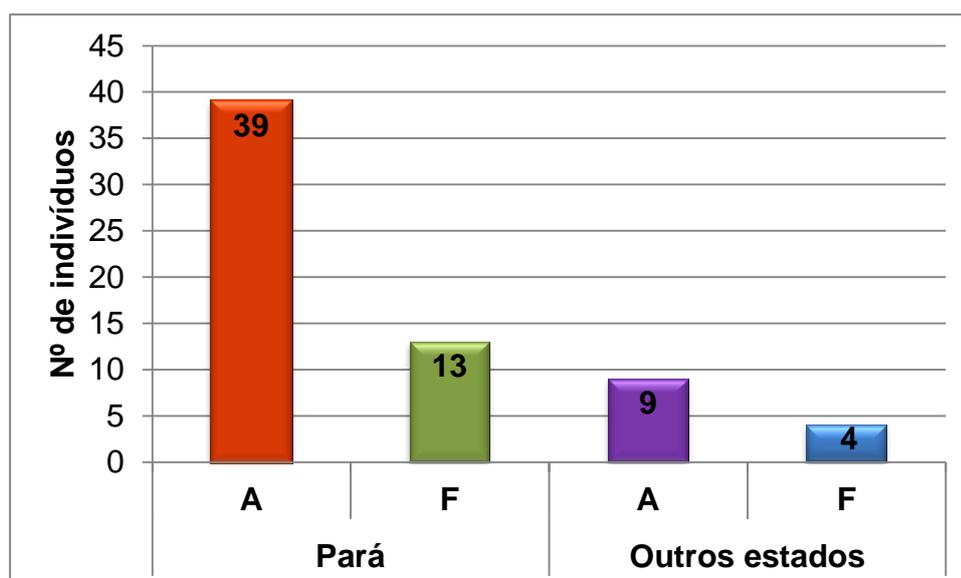


Legenda: A (Genótipo A); F (Genótipo F).

Fonte: DO AUTOR, 2016

Figura 17. Gráfico demonstrativo correlacionando os genótipos encontrados com os naturalidade dos pacientes atendidos.

naturalidade.

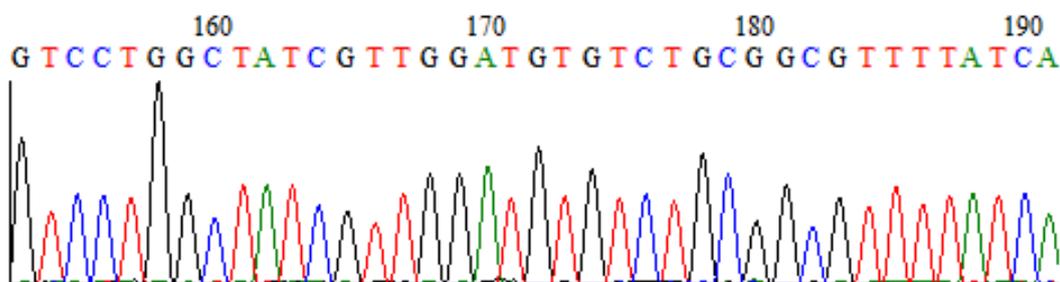


Legenda: A (Genótipo A); F (Genótipo F).

Fonte: DO AUTOR, 2016.

Para confirmação dos genótipos e a análise dos subgenótipos, as 65 amostras foram submetidas à reação de sequenciamento. Após a análise da qualidade dos eletroferogramas (Figura 18), foram obtidos apenas 63 resultados satisfatórios após a realização da técnica de sequenciamento. As leituras obtidas foram comparadas com as sequências de consenso do VHB obtidas pelo *GenBank*.

Figura 18. Eletroferograma da sequência de DNA da região S do VHB com qualidade de superior a 80%, referente a uma amostra de paciente do estudo.



Legenda: G (guanina); T (timina); C (citosina); A (adenina)

Fonte: Do AUTOR, 2016.

Comparando as sequências da região do gene S do vírus da hepatite B obtidas neste estudo com sequências desta mesma região retiradas do *GenBank* (Figura 19), foi possível analisar que as amostras positivas encontradas entre os pacientes atendidos no programa de hepatites virais do NMT-UFPA foram identificadas como sendo 73% de genótipo A (46/63), onde 78,3% pertencem ao subgenótipo A1(36/46) e 21,7% foram caracterizados como subgenótipo A2 (10/46). O outro genótipo encontrado foi o F (17/63), representando 27% das amostras, sendo encontrado apenas o subgenótipo F2 (17/17). (Figura 20).

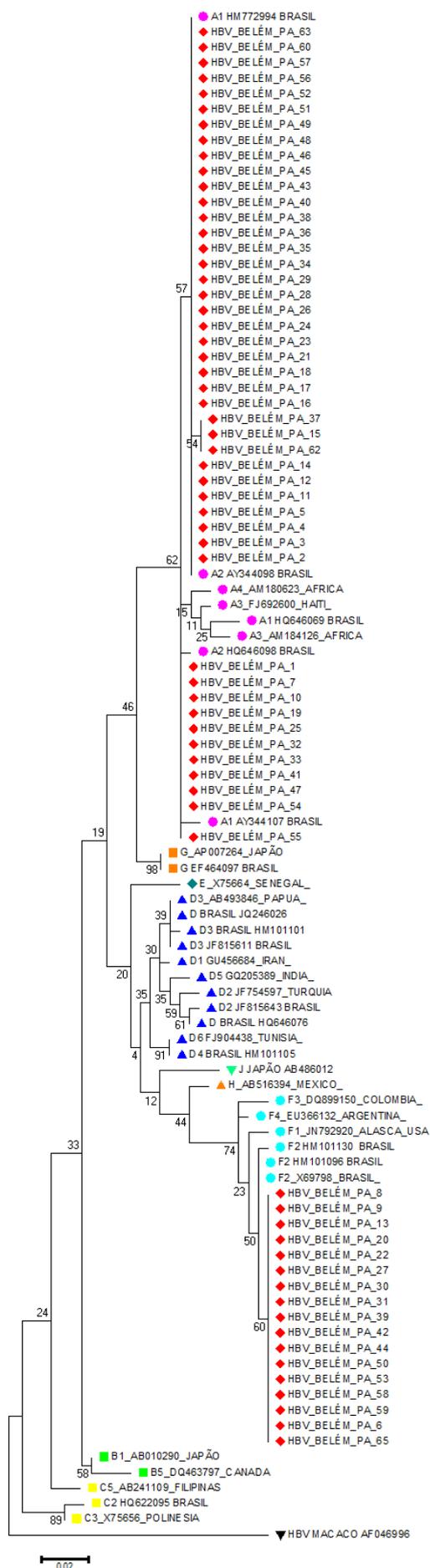
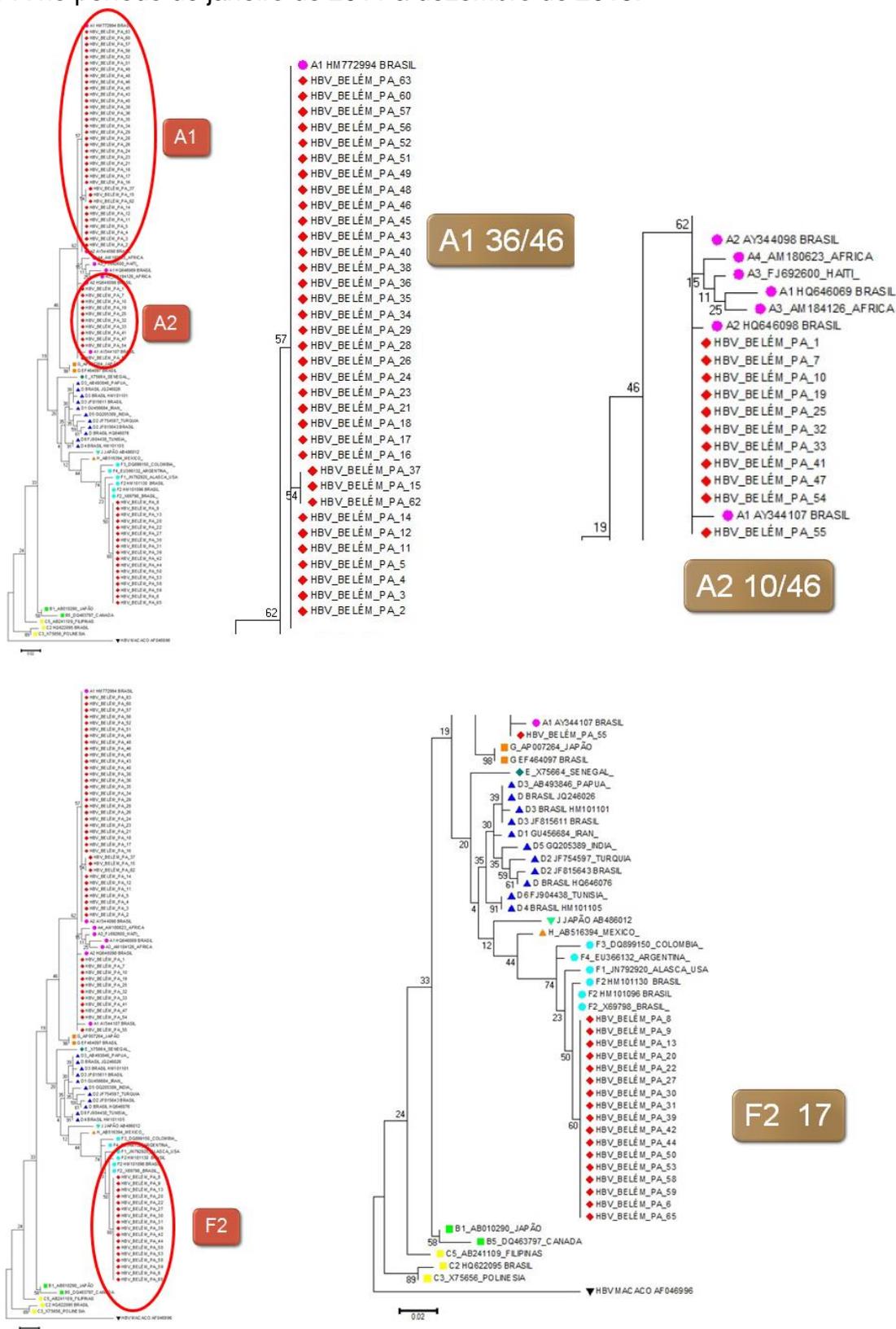


Figura 19. Dendrograma a partir do sequenciamento da região do gene S do VHB entre os pacientes atendidos no NMT-UFPA no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015, utilizando o método de Máxima Verossimilhança.

Figura 20. Análise da proximidade filogenética entre as sequências obtidas da região do gene S para os genótipos A e F do VHB entre os pacientes atendidos no NMT-UFGPA no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015.



Fonte: Do Autor, 2016.

## 7. DISCUSSÃO

Os dados sócios demográficos desta pesquisa são semelhante a outras realizadas nas regiões norte e nordeste, onde foi relatada uma predominância de pacientes do sexo masculino com idade entre 30 e 40 anos (DE OLIVEIRA et al, 2011; ALVARADO-MORA et al, 2011; CASTILHO et al, 2012; DE ALMEIDA et al, 2012; DA SILVA CONDE et al, 2013; BARROS et al, 2014; CRISPIM et al, 2014).

Em relação à escolaridade, a maioria da população (66,3%) relatou até 12 anos de estudo. Segundo o IBGE em 2014, 30,1% da população brasileira na faixa etária de 25 anos ou mais declararam ter de 11 a 14 anos de estudo.

Dos pacientes analisados 5,8% (13/222) declaram ter realizados o esquema vacinal completo para a hepatite B, que consiste na aplicação das três doses da vacina. Contudo não foi detectado nestes pacientes o marcador sorológico vacinal, que é caracterizado pela presença isolada do Anti-HBs. Analisando este fato percebe-se que ocorre uma divergência de informação e isso pode ser explicado pelo fato de que o paciente possa ter realizado recentemente a vacinação e portanto ainda não houve soroconversão, ou mesmo o paciente relatar no formulário que realizou sem ter feito a vacinação o que caracteriza um viés nesta análise que ficou comprovado pela não detecção do marcador Anti-HBs. O cenário para o conhecimento epidemiológico da condição vacinal dos indivíduos portadores da hepatite B encontra-se prejudicado nas investigações epidemiológicas, uma vez, que não é obrigatório o fornecimento da carteira de vacinação para o preenchimento da ficha de investigação (MARTINS, COSTA, 2015).

O programa nacional de imunização introduziu a vacina para o VHB em 1988 no Brasil sobre forma de campanha, iniciando pela Amazônia Legal (BRASIL 2010; MARTINS, COSTA, 2015). Atualmente encontra-se disponível nos serviços de saúde pública para faixas etárias específicas, como menores de um ano de idade, crianças e adultos com menos de 29 anos de idade, bem como para indivíduos com maior chance de exposição ou em casos de acidente com materiais contaminados (BRASIL, 2008; BRASIL 2010).

Em relação aos fatores de risco foi encontrado no estudo, com uma significância estatística ( $p < 0,01$ ), quando analisado a não utilização de preservativo durante as relações sexuais (46,9%). A exposição ao VHB está associada a

comportamentos de risco adquiridos ao longo da vida, tanto relacionados à transmissão sexual, como ao uso de drogas ilícitas (MARINHO 2013). Como referido, a via sexual tem sido apontada como uma das principais formas de transmissão do VHB (KAO, 2011; MARINHO 2013)

No presente estudo foi detectado um percentual de 24,3% para o HBsAg entre os pacientes analisados. Esta elevação no marcador sorológico deve estar relacionada com a pré-seleção realizada nestes pacientes, pois a população do estudo trata-se de pessoas encaminhadas ao NMT-UFPA com suspeita de hepatite B. Segundo o Ministério da Saúde, o Pará em 2010 apresentou 14,1% de casos confirmados para hepatite B (BRASIL, 2012). Estudo realizado na cidade de Tucuruí, no Pará, em uma população ribeirinha detectou 1,95% de reatividade para o marcador HBsAg (DE ALMEIDA et al, 2012). Em Belém, um estudo analisou amostras de pacientes encaminhado ao Laboratório Central do Estado do Pará – LACEN no período de 2002 a 2005, sendo detectado 3,6% da presença do marcador viral HBsAg nessas amostras (AQUINO et al, 2008). Analisando uma população rural no estado do Amazonas (CASTILHO et al, 2012) e uma comunidade quilombola no estado do Maranhão (ALVARADO-MORA et al, 2011) pesquisadores demonstraram a presença de reatividade para o HBsAg em 10,2% e 12,5% respectivamente. No estado do Amazonas Dias e colaboradores (2012) encontraram na população um total de 16,8% de reatividade para o HBsAg entre os seus pacientes analisados.

Em 11% (25/222) das amostras que apresentaram HBsAg não reagente foi detectada a presença do material genético do VHB, o que sugere um quadro de hepatite oculta. A literatura descreve o significado clínico da hepatite B oculta a ausência do marcador HBsAg com presença do DNA viral (ALBUQUERQUE et al, 2012; MINUK et al, 2012; RASTEGARVAND et al, 2015). Várias razões tem sido propostas para a presença do DNA do VHB em pacientes HBsAg não reagentes, tais como integração do material genético viral no cromossomo do hospedeiro, variações genéticas do VHB que suprimem a expressão do gene S, existência de uma janela imunológica após a infecção aguda pelo VHB, entre outros (RAIMONDO et al, 2008; CANDOTTI et al, 2012; RASTEGARVAND et al, 2015).

A amplificação do material genético do viral foi detectada em 29,3% (65/222) das amostras analisadas entre os pacientes do NMT-UFPA. Pacientes cujo DNA do

vírus não foi detectável pelo método utilizado, provavelmente apresentavam carga viral abaixo do limite de detecção da técnica. Realizando um estudo em pessoas selecionadas aleatoriamente de uma região com alta prevalência do norte do Brasil, Castilho e colaboradores (2012) identificou a presença do DNA do VHB em 65,2% (15/23) de suas amostras. Estudo realizado em na população do estado de Alagoas detectou 70,6% (84/119) de suas amostras a presença do VHB-DNA (ELOY et al, 2013). Dias e colaboradores (2012) em estudo na população da Amazônia identificou a presença do material genético do VHB em 45,3% (39/86) das suas amostras.

Relacionando a PCR negativa e o marcador HBsAg positivo, este estudo detectou 6,3% (14/222) desta associação nas amostras. O VHB apresenta partículas virais sem a presença do material genético, sendo denominadas de partículas não infecciosas. São formadas por envelope lipoprotéico, e pelo antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), não são infecciosas e estão presentes em grande quantidade no soro (TONETTO, 2006; DE ALMEIDA, 2012).

Neste estudo utilizou-se a técnica de PCR multiplex por oligonucleotídeos específicos (FARAZMANDFAR et al, 2012) a fim de detectar de maneira mais rápido e menos onerosa os genótipos do VHB. A literatura relata como metodologia padrão ouro para a identificação dos genótipos a amplificação e o sequenciamento do genoma do VHB seguido de análise filogenética (TONETTO, 2006, POURKARIM et al, 2014). Estes métodos ainda apresentam um custo relativamente alto e consomem um tempo excessivo, além da necessidade de programas altamente específicos para a análise e interpretação dos algoritmos.

A análise filogenética também pode ser realizada em genes individuais em vez de o genoma completo (POURKARIM et al, 2014). Neste estudo, foi utilizada uma técnica que possibilita a amplificação e análise de sequências da região “S” do genoma do VHB a fim de identificar os genótipos e subgenótipos do vírus.

Este estudo determinou a frequência dos genótipos e subgenótipos do VHB nos paciente atendidos no ambulatório de hepatites virais do NMT-UFGA. O ambulatório realiza atendimento a pacientes com hepatite B aguda. Os genótipos encontrados neste estudo foram similares às demais regiões do Brasil, sendo encontrados genótipos A seguido de genótipo F (BECKER et al, 2010; ALVARADO-MORA et al, 2011; BARROS et al, 2014; SANTOS et al, 2014).

Em estudo realizado por Da Silva Conde e colaboradores (2013) em pacientes com hepatite crônica, no estado do Pará, foi encontrada uma frequência de 95% do genótipo A, sendo encontrados os subgenótipos A1 (92,1%) e A2(7,9%). Alvarado-Mora e colaboradores (2011) detectou em uma comunidade quilombola no estado do Maranhão o subgenótipo A1 em todas as suas amostras (4/9), justificando ser este o genótipo prevalente nos afrodescendentes brasileiros. Na mesma região Barros e colaboradores (2014) detectaram 67% de prevalência do genótipo A (80/119) sendo todos do subgenótipo A1. Neste mesmo estudo ainda foi detectado uma prevalência de 5% do genótipo F (6/119), sendo todos do subgenótipo F2.

Até hoje o genótipo A e os subgenótipos A1 e A2 são os mais prevalentes no Brasil em todas as regiões brasileiras, sendo que em alguns estudos o subgenótipos A1 é isoladamente encontrado ou apresenta maior prevalência quando comparado com os demais subgenótipos (MELLO et al., 2007; BERTOLINI et al., 2012; MOURA et al., 2013; BARROS et al, 2014; SANTOS et al 2014).

A composição genética da população da Amazônia brasileira é heterogênea, apresentando conjunto de genes europeus (47%), ameríndios (41%) e populações africanas (12%) (SANTOS et al, 1995; DA SILVA CONDE et al, 2013). Esta heterogeneidade pode ter contribuído para o desequilíbrio na distribuição dos genótipos e subgenótipos do VHB. A predominância relativa de A1 em relação A2 nos estudos das regiões brasileiras reforça a conclusão de Campos e colaboradores (2005) que relata o papel do comercio de escravos africanos entre o século XVI e XVIII, como uma via para a transferência do vírus para o continente.

O presente estudo detectou uma frequência de 27% (17/63) do genótipo F entre os pacientes analisados. Outros estudos realizados na região Norte também encontraram a presença do genótipo F em suas amostras (CASTILHO et al, 2012; CRISPIM et al, 2014), sendo detectado o subgenótipo F2 (MOURA et al, 2013; BARROS et al, 2014), o mesmo encontrado com predominância no presente estudo. O genótipo F do VHB é detectado entre a população indígena do continente americano assim como no Brasil (ALVARADO-MORA et al, 2013; CRISPIM et al, 2014). A região sul e sudeste do Brasil, a prevalência do genótipo F é relativamente baixa quando comparada com os genótipos A e D (SANTOS et al, 2014).

No Brasil, tendo em vista a diversidade populacional e de prevalência da hepatite B, a identificação dos genótipos circulantes torna-se de grande relevância,

pois contribui para o conhecimento da epidemiologia do VHB no país (MARINHO, 2013). O padrão de distribuição de genótipos do VHB no Brasil pode ser um reflexo do padrão migratório e intensa miscigenação da população brasileira (MOURA et al, 2013; BARROS et al, 2014).

## 8. CONCLUSÃO

Dos 222 pacientes analisados no NMT-UFPA, na cidade de Belém, estado do Pará, verificou-se que:

A média de idade entre os paciente foi de 38 anos, com predominância do sexo masculino, sendo a maioria dos pacientes naturais do estado do Pará.

Alguns fatores de risco foram identificados entre a população estudada, sendo a não utilização de preservativo durante as relações sexuais o mais predominante, porém esta variável é justificada quando se analisa que a maioria dos pacientes declara-se casados e indicando ter de zero a um parceiro sexual durante o período de três anos.

Foi detectado nas amostras analisadas positividade para o marcador sorológico HBsAg e presença do material genético viral o que indica presença da circulação viral entre os pacientes atendidos pelo programa de hepatites virais.

Ao se comparar a presença do DNA viral com a sorologia para o marcador HBsAg, fica evidenciado um quadro que sugerem a presença de hepatite oculta entre os pacientes atendidos.

Entre os pacientes atendidos no NMT-UFPA os genótipos detectados foram o genótipo A seguido do genótipo F. Entre os subgenótipos foi demonstrado a presença do A1, A2 e F2, através dos resultados do sequenciamento e após a comparação com sequencias do VHB obtidas no *GenBank*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, R. S. **Universidade Federal de Goiás**: Infecção pelo vírus da hepatite B em pacientes com tuberculose em hospital de referência em Goiânia-Goiás. 2011. 87f. Tese (doutorado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiás, 2011.

ALBUQUERQUE, A. C. C.; COELHO, M. R. C. D.; LEMOS, M. F.; MOREIRA, R. C. Occult hepatitis B vírus infection in hemodialysis patients in Recife, state of Pernambuco, Brazil. **Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.45, n.5, p.558-562. 2012.

ALVARADO-MORA, M. V.; BOTELHO, L.; GOMES-GOUVEA, M. S; DE SOUZA, V. F.; NASCIMENTO, M. C; PANUTTI, C. S; CARRILHO, F. J.; PINHO, J. R. R. Detection of Hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhão, Brazil. *Virology Journal*. v.8, n.415, p.1-6. 2011.

ALVARADO-MORA, MV; BOTELHO-LIMA, LS; SANTANA, RA; SITNIK, R; FERREIRA, PA; MELLO, F do A; MANGUEIRA, CP; CARRILHO, FJ; PINHO, JRR. Distribution of Hepatitis B vírus subgenotype F2a in São Paulo, Brazil. **BMC Research Notes**. V.6, n.423, p.2-5. 2013

AQUINO, J.A; PEGADO, K.A; BARROS, L.P; MACHADO, L.F.A. Soroprevalência de infecções por vírus da hepatite B e vírus da hepatite C em indivíduos do estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.4, p.334-357, jul-ago. 2008.

ARAÚJO, N. M.; WAIZBORT, R.; KAY, A. Hepatitis B vírus infection from an evolutionary point of view: How viral, host and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. **Infections, genetics and Evolution**. v.11, p.1199-1207. 2011.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L. e SANTOS, A. S. **Bioestat 5.0: Aplicações Estatísticas na Área de Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: Soc. Civil Mamirauá, 2012. 384 p.

BARROS, L. M. F; GOMES-GOUVEA, M. S; KRAMVIS, A; MENDES-CORREA, M. C. J; DOS SANTOS, A; SOUZA, L. A. B; SANTOS, M. D. C; CARRILHO, F. J; DOMICINI, A. de J; PINHO, J. R. R; FERREIRA, A. de S. P. High prevalence of hepatitis B vírus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v.24, p.68-75. 2014.

BECKER, C. E; KRETZMANN, N. A; DE MATTOS, A. A; VEIGA, A. B. G. Melting curve analysis for the screening of hepatitis B virus genotypes A, D and F in patients from a general hospital in southern Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**. v.50. n.3 p. 219-225. jul./set. 2013.

BECKER, C.E; MATTOS, A.A; BOGO, M.R; BRANCO, F; STINIK, R; KRETZMANN, N.A. Genotyping of hepatitis b virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, south of Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.47, n.1, p.13-17, jan-mar. 2010.

BENSABATH G; BOSHELL J. Presence of Australian (Au) antigen in population groups of the interior of the State of Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.15, p. 284-288. 1973.

BERTOLINI, D. A.; DE GOMES-GOUVEA, M. S.; CARVALHO-MELO, I. M. V. G.; SARACENI, C. P.; SITNIK, R.; GRAZZIOTIN, F. G.; LAURINDO, J. P.; FAGUNDES, N. J. R.; CARRILHO, F. J.; PINHO, J. R. R. Hepatitis B vírus genotype from european origin explains the high endemicity found in some áreas from Southern Brazil. **Infections , Genetics and Evolution**. v.12, p.1295-1304. 2012.

BLUMBERG B.S. Hepatitis B: The hunt for a killer virus. **Princeton University Press**, New Jersey, 2003.

BLUMBERG B.S. The Curiosities of Hepatitis B Virus, Prevention, Sex Ratio, and Demography. **The Proceedings of the American Thoracic Society**, v.3, n.1, p.14-20, mar. 2006.

BRASIL, L.M; DA FONSECA, J.C; DE SOUZA, R.B; BRAGA, W.S; TOLEDO, L.M. Prevalence of hepatitis B virus markers within household contacts in the state of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p: 565–570. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**, 6. ed. Brasília, (Série B. Textos Básicos de Saúde). 320 p. 2005. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_bolso\\_5ed2.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_bolso_5ed2.pdf).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Nota técnica nº 89/2010CGPNIDEVEP/SMS/MS. **“Ampliação da oferta da vacina hepatite B para faixa etária de 20 a 29 anos de idade.”** 2010. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/legislacao/2012/51047>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: o Brasil está atento**. Ministério de Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de vigilância Epidemiológica. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde - (Série B. Textos Básicos de Saúde). 62 p. 2008

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Boletim epidemiológico - Hepatites virais**. Ministério de Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde - (Série B. Textos Básicos de Saúde). 29 p. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. Ano III nº1. Brasília, MS, 2012.

BRECHOT, C.; THIERS, V.; KREMSDORF, D.; NALPAS, B.; POL, S.; PATERLINI-BRECHOT, P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"?. **Hepatology**. v. 34, n. 1, p. 194-203, 2001.

CAMPOS, R. H.; MBAYED, V. A.; PINEIRO, Y.; LEONE, F. G. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. **Journal of Clinical Virology**, v.34, Suppl 2, p: S8-8S13. 2005.

CANDOTTI, D.; LIN, C. K.; BELKHIRI, D.; SAKULDAMRONGPANICH, T.; BISWAS, S.; LIN, S.; TEO, D.; AYOB, Y.; ALLAIN, J. P. Occult hepatitis B infection in

blood donors from South East Asia: Molecular characterization and potential mechanisms of occurrence. **GUT Hepatology**. V.61,p.1744-1753. 2012.

CASTILHO, M. da C.; DE OLIVEIRA, C. M. C.; GIMAQUE, J. B. de L.; LEÃO, J. D. T.; BRAGA, W. S. M. Epidemiology and molecular characterization of Hepatitis B virus infection in isolated villages in the western Brazilian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v87, n.4, p.768-774. 2012.

CHANG, M. L.; LIAW, Y. F. Hepatitis B flares in chronic hepatitis B: Pathogenesis, natural course, and management. **Journal of Hepatology**. v. 61, n. 6, p. 1407 – 1417, 2014.

CHEN, J; CHEN,W; LIU, L; LIN, W; JIAO, B; WU, Y; LIN, J; LIN, X. Hepatitis B Spliced protein (HBSP) generated by a spliced hepatitis B virus RNA binding to fibrinogen  $\gamma$  chain. **Journal of Medical Virology**. V.82, p.2019-2026. 2010.

CRISPIM, M. A.; FRAJI, N. A.; CAMPELLO, S. C.; SCHRIEFER, N. A.; STEFANI, M. M.; KIESSLICH, D. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 94, p.1–9. 2014.

DA SILVA CONDE, S. R. S.; PINHEIRO, L. M.; DE LEMOS, J. A. R.; DEMACHKI, S.; DE ARAUJO, T.; SOARES, M. do C. P.; NUNES, H. M.; ISHAK, R.; VALLINOTO, A. C. R. Prevalence of genotypes and sub-genotypes of hepatitis B virus in a population of the Brazilian Amazon region (Pará State). **Journal of Antivirals & Antiretrovirals**, v. 5, n.5, p:108-112, 2013.

DE ALMEIDA, M. K. C.; DOS SANTOS, K. N; FECURY, A. A.; DE OLIVEIRA, C. S. F.; FREITAS, A. da S.; QUARESMA, J. A. S.; FUZII, H. T.; MARTINS, L. C. Prevalence of viral Hepatitis B and C in Riverside communities of the Tucuruí dam, Pará, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v.84, p.1907-1912. 2012.

DE ALMEIDA, M.K.C. **Universidade Federal do Pará**: Soroepidemiologia das hepatites virais B e C nas comunidades ribeirinhas residentes na região do lago da usina hidrelétrica de Tucuruí, estado do Pará. 2012. 82f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Belém – Pará, 2012.

DE OLIVEIRA, C. S. F.; E SILVA, A. V.; DOS SANTOS, K. N.; FECURY, A. A.; DE ALMEIDA, M. K. C.; FERNANDES, A. P.; DA COSTA, C. A.; FREITAS, A. S.; CORVELO, T. C. O.; MARTINS, L. C. Hepatitis B e C vírus infection among Brazilian Amazon riparians. **Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.44, n.5, p.546-550. 2011.

DENY, P; ZOULIM, F. Hepatitis B vírus: From diagnostic to treatment. **Pathologie Biologie**, v.58, n.4, p.245-253, aug. 2010.

DEVESSA, M.; PUJOL, F. H. Hepatitis B vírus genetic diversity in Latin American. **Virus Research**. v.127, p.177-184. 2007.

DIAS, ALB; OLIVEIRA, CM da C; CASTILHO, M da C; DA SILVA, M do P da; BRAGA, WSM. Molecular characterization of hepatitis B vírus in autochthones and endogenous populations in the Western Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.45, n.1, p.9-12. 2012.

ELGOUHARI, H. M.; TAMIMI, T. I. A.; CAREY, W. D. Hepatitis B virus infection: Understanding its epidemiology, course, and diagnosis. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. v.75, n.12, p.881-889. 2008.

ELOY, A. M. X.; MOREIRA, R.C.; LEMOS, M. F.; SILVA, J. F. A.; COELHO, M. R. C. D. Hepatitis B vírus in the state of Alagoas, Brazil: genotypes characterization and mutations of the precore and basal core promoter regions. **The Brazilian Journal of Infections Diseases**. V.17, n.6, p.704-706. 2013.

FARAZMANDFAR, T; HAGHSHENAS, M.R; JANBABAI, G; AZADEH, H; SHARIFIAN, R; TAGHIPOUR, M. A rapid and reliable genotyping method for hepatitis B virus genotypes (A–H) using type-specific primers. **Journal of Virological Methods**. v.181, p.114– 116, 2012.

FERREIRA, C.T; SILVEIRA, T.R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.4, 473-487, dez. 2004.

FILHO, H. P. da S. **Universidade Federal da Bahia**: Estudo molecular dos vírus B e C das Hepatites nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. 2010. 177f. Tese

(Doutorado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Bahia, 2010.

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

FONSECA, J.C.F. Eradication of Hepatitis B vírus infection in the State of Amazonas. **Newsletter of World Gastroenterology Organization**, p.1-2, may. 2007.

FRANCO, E.; BAGNATO, B.; MARINO, M. G.; MELELEO, C.; SERINO, L.; ZARATTI, L. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries. **World Journal of Hepatology**.v.4, n.3, p.74-80. 2012.

GARCÍA, F. JR.; GARCÍA, F.; BERNAL, M. C.; LEYVA, A.; PIEDROLA, G.; MAROTO, M. C. Evaluation of enzyme immunoassay for hepatitis B virus DNA based on anti-double-stranded DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 413 – 415, 1995.

GERLICH, WH. Medical virology of hepatitis B: How it began and where we are now? **Virology Journal**. V.10, n.239, p.1-25. 2013.

HANNACHI, N. FREDJ, N. B.; BAHRI, O.; THIBAUT, V.; FERJANI, A.; GHARBI, J.; TRIKI, H.; BOUKADIDA, J. Molecular analysis of HBV genotypes and subgenotypes in the central-East region of Tunisia. **Virology Journal**. v.7, p.302. 2010.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v 22, p:160-174. 1985.

HOLLINGER, F. B. Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays. **Journal of Viral Hepatitis**. v.14, p.11–15. 2007.

HUY, TTT; NGOC, TT; ABE, K. New complex recombination genotype of Hepatitis B vírus identified in Vietnam. **Journal of Virology**. V.82, n.11, p.5657-5663. 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=15&search=para>. Acessado em Março de 2015.

JONAS, M. M. Hepatitis B and pregnancy: an underestimated issue. **Liver International**. v.29, s1, p.133–139. 2009.

KAO, J. Molecular epidemiology of hepatitis B vírus. **Koren Journal International Medical**. V.26, p.255-261. 2011.

KRAMVIS, A.; KEWA, M.; FRANÇOIS, G. Hepatitis B virus genotypes. **Vaccine**. v. 23, p.2409–2423. 2005.

KRUGMAN, S. Experiments at the Willowbrook State School. **The Lancet**, v. 1, n.7706, p.966-967, may. 1971.

KWON, S. Y.; LEE, C.H.. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. **Korean Journal of Hepatology**. v.17, p.87-95. 2011.

LOBATO, C.; TAVARES-NETO, J.; RIOS-LEITE, M.; TREPO, C.; VITVITSKI, L.; PARVAZ, P.; ZOULIM, F.; D'OLIVEIRA, A. Jr; PARANÁ, R. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study. **Journal Gastroenterology and Hepatology**, v.21, p: 863–868. 2006.

LOU, X. L; HOU, Y. Q; LIANG, D. Y. Effects of hepatitis B virus X protein on human T cell cytokines. **Canadian Journal of Microbiology**, v.59, n.9, p.620-626. 2013.

MAGNIUS, L.O; ESPMARK, J.A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v.80B, n.2, p.335-337, set. 1972.

MARINHO, T. A. **Universidade Federal de Goiás**. Infecção pelo vírus da hepatite B em catadores de materiais recicláveis em Goiânia – Goiás. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiás, 2013.

MARINHO, T. A.; LOPES, C. L. R.; TELES, S. A.; DE MATOS, M. A.; DE MATOS, M. A.; KOZLOWSKI, A. G.; DE OLIVEIRA, M. P.; E SILVA, A. M. DA C.; MARTINS, R. M. B. Epidemiology of hepatitis B virus infection among recyclable waste collectors in central Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.47, n.1, p.18-23. 2014.

MARTINS, M. M. F; COSTA, E. A. M. Aspectos epidemiológicos e estado vacinal para hepatite B no município de Salvador, Bahia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 14, n. 2, p. 160-164, mai./ago. 2015

McMAHON, B.J. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. **Hepatology International**, v.3, n.2, p.334-342, jun. 2009.

MELLO, F. C. A.; SOUTO, F. J. D.; NABUCO, L. C.; NOGUEIRA, C. A. V; COELHO, H. S. M; FRANZ, H. C. F; SARAIVA, J. C. P; VIRGOLINO, H. A; CASTRO, A. R. C. M; MELO, M. M. M; MARTINS, R. M. B; GOMES, S. A. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiology**. v.7, p.103. nov. 2007.

MINUK, G. Y.; KPWALEC, K.; CAQUETTE, S.; LARKE, B.; OSIOWY, C. The Prevalence and Long Term Outcome of Occult Hepatitis B Virus Infections in Community Based Populations. **Journal of Medical Virology**, v.84, p.1369-1375. 2012.

MORAES, T. C. **Universidade Federal de Goiás**. Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B em uma população institucionalizada portadora de doença mental. 2013. 85f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiás, 2013.

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

NUNES, H.M; MONTEIRO, M.R. de C.C; SOARES, M. do C.P. Prevalência dos marcadores sorológicos dos vírus das hepatites B e D na área indígena Apyterewa,

do grupo Parakanã, Pará, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.27, n.11, p.2756-66, nov. 2007.

OLINGER, C.M; JUTAVIJITTUM, P; HUBSCHEN, J; YOUSUKH, A; SAMOUNTRY, B; THAMMAVONG, T; TORIYAMA, K; MULLER, C.P. Possible new hepatitis B virus genotype, Southeast Asia. **Emerging Infection Diseases**. v.14, n.11, p.1777-1780. 2008.

OSIOWY, C; KAITA, K; SOLAR, K; MENDONZA, K. Molecular characterization of hepatitis B virus and 9-year clinical profile in patient infected with genotype I. **Journal of Medical Virology**, v.82, p.942-948. 2010.

PARK, YM. Clinical utility of complex mutations in the core promoter and proximal precore regions of the Hepatitis B virus genome. **World of Hepatology**. V.7, n.1, p113-120. 2015.

PAULA, V.S; ARRUDA, M.E; VITRAL, C.L; GASPAR, A.M.C. Soroprevalence of Viral Hepatitis in Riverine Communities from the Western Region of the Brazilian Amazon Basin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.96, n.8, p.1123-1128, nov. 2001.

POURKARIM, M. R.; AMINI-BAVIL-OLYAEI, S.; LEMEY, P.; MAES, P.; RANST, M. V. Are hepatitis B virus "subgenotype" defined accurately? **Journal of Clinical Virology**, v.47, p, 356-360. 2010.

POURKARIM, M. R; VERGOTE, V; OLYACE, S. A. B; SHARIFI, Z; SIJMONS, S; LEMEY, P; MAES, P; ALAVAIN, S. M; RANST, M. V. Molecular characterization of hepatitis B virus (HBV) strains circulating in the Northern Coast of Persian Gulf and its comparison with worldwide distribution of HBV subgenotype D1. **Journal of Medical Virology**, v.86, p.745-757. 2014.

QUARLERI, J. Core promoter: a critical region where the hepatitis B virus makes decisions. **World Journal of Gastroenterology**. v.20, n.2, p.425-435. 2014.

RAHMAN, A.; HAKIM, F.; AHMED, M.; AHSAN, C. R.; NESSA, J.; YASMIN, M. Prevalence of genotypes and subgenotypes of hepatitis in Bangladeshi population. **Springer Plus**. V.5, p.278. 2016.

RAIMONDO, G.; NAVARRA, G.; MONDELLO, S.; COSTANTINO, L.; COLLOREDO, G.; CUCINOTTA, E.; DI VITA, G.; SCISCA, C.; SQUADRITO, G.; POLLICINO, T. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease. **Journal of Hepatology**. v.48, n.5, p.743 – 746, 2008.

RASTEGARVAND, N.; MAKVANDI, M.; SAMARBAFZADEH, A.; RASTI, M.; NEISI, N.; POUREMAMALI, A.; TEIMOORI, A.; SHABANI, A. Molecular characterization of pre-core/core and S region of Hepatitis B virus in hemodialysis patients with occult hepatitis B infection. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v.8, n.10, p.23686. 2015.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Immunology**. n.5, p.215-219. 2005

SALZANO, F.M; BLUMBERG, B.S. The Australia antigen in Brazilian healthy persons and in leprosy and leukemia patients. **Journal of Clinical Pathology**, v.23, n.1, p.39-42, feb. 1970.

SANTOS, A. K; ISHAK, M. O; SANTOS, S. E; GUERREIRO, J. F; ISHAK, R. A possible correlation between the host genetic background in the epidemiology of hepatitis B virus in the Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 4, p.435-442. 1995.

SANTOS, A. P de T; LEVI, J. E; LEMOS, M. F; CALUX, S. J; OBA, I. T; MOREIRA, R. C. Identification of hepatitis B virus genotypes in the state of São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.60, n.5, p.424-427. 2014.

SAYED, S. K.; KOBEISY, M. A. The relationship between core promoter mutation of hepatitis B virus, viral load and hepatitis B e antigen status in chronic hepatitis B patients. **Cellular Immunology**. 2012.

SCHAEFER, S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. **World Journal of Gastroenterology**. v.13, n.1, p.14-21. 2007.

SITNIK, R.; PINHO, J. R.; BERTOLINI, D. A.; BERNARDINI, A. P.; DA SILVA, L. C.; CARRILHO, F. J. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in

Brazilian patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 6, p. 2455 – 2460, 2004.

SUH, S. J.; BAE, S.; KIM, J. H.; KANG, K.; YEON, J. E.; BYUN, K. S. Clinical Implications of the Titer of Serum Hepatitis B Surface Antigen During the Natural History of Hepatitis B Virus Infection. **Journal of Medical Virology**. v.86, p.117–123. 2014.

SUNBUL, M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. **World Journal of Gastroenterology**. v.20. n.18, p. 5427-5434, May. 2014.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p:2725-2729. 2013.

TAROCCHI, M; POLVANI, S; MARROCINI, G; GALI, A. Molecular mecanismo of hepatitis B vírus-induced hepatocarcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**. V.20, n.33, p.11630-11640. 2014.

TESHALE, E.H; RAMACHANDRAN, S; XIA, G; ROBERTS, H; GROEGER, J; BARRY, V; HU, D.J; HOLMBERG, S.D; HOLTZMAN, D; WARD, J.W; TEO, C; KHUDYAKOV, Y. Genotypic distribution of hepatitis B virus (HBV) among acute cases of HBV infection, selected United States Counties, 199-2005. **Clinical Infectious Diseases**, v.53, n.8, p.751-756, out. 2011.

TOGAWA, R.C.; BRIGIDO, M.M.; SANTOS, C.M.R.; JÚNIOR M.T. The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in *Musa acuminata*. XXXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) - Aguas de Lindoia - SP - Brazil - 2006

TONETTO, P. A. **Universidade Estadual de Campinas**: Análise molecular dos genótipos do vírus da hepatite B em pacientes do estado de São Paulo, sudeste do Brasil. 2006. 91f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, São Paulo, 2006.

VAN DE KLUNDERT, M. A.A.; CREMER, J.; KOOTSTRA, N. A.; BOOT, H. J.; ZAAIJER, H. J. Comparison of the hepatitis b virus core, surface and polymerase gene substitution rates in chronically infected patients. **Journal of Viral Hepatitis**. v.19, p.e-34-e40. 2012.

WANG, B.; FENG, Y.; LI, Z.; DUAN, H.; ZHAO, T.; ZHANG, A.; LIU, L.; BALOCH, Z.; XIZ, X. Distribution and Diversity of Hepatitis B Virus Genotypes in Yunnan, China. **Journal of Medical Virology**. v.86, p.1675–1682. 2014.

WHO - World Health Organization: Hepatitis B. Fact Sheet 204 (Revised July 2015) World Health Organization. Disponível em:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>. Acessado em 24 de Agosto de 2015.

XU, H; ZHAO, M; LOU, G; ZHENG, M; CAO, Q; CHEN, Z. New point mutations in surface and core genes of hepatitis B virus associated with acute on chronic liver failure identified by complete genomic sequencing. **PLOS ONE**. v.7, p.1-13. 2015.

YU, H; YUAN, Q; GE, S.X; WANG, H.Y; ZHANG, Y.L; CHEN, Q.R; ZHANG, J; CHEN, P.J; XIA, N.S. Molecular and Phylogenetic Analyses Suggest an Additional Hepatitis B Virus Genotype “I” . **PLOS ONE**. V.5, n.2, p.1-9. 2010.

ZAIDAN, A. M. E. **Universidade Federal de Pernambuco**: Caracterização genética do vírus da hepatite B em Alagoas, Brasil. 2009. 121f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Pernambuco, 2009.

## APENDICE

**APENDICE 1:** Termo de consentimento livre e esclarecido utilizado no estudo.



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

**PROJETO:** CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES ATENDIDOS NO PROGRAMA DE HEPATITES VIRAIS DO NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL – UFPA, BELÉM-PARÁ.

Esta pesquisa possui como principal objetivo estudar a ocorrência dos genótipos do vírus da hepatite B em pacientes atendidos no ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical - UFPA na cidade de Belém, através do programa de hepatites virais. Com essa finalidade prestamos os seguintes esclarecimentos:

1- Será realizado exames de sangue para pesquisar o vírus causador da hepatite B.

2- A pesquisa oferece riscos mínimos para o participante, referente à coleta de sangue que será feita por profissional treinado e qualificado.

3- O benefício para quem participa é a realização dos exames que auxiliarão no diagnóstico e tratamento da doença.

4- Os exames realizados pela pesquisa são gratuitos.

5- Os resultados dos exames serão usados como dados da pesquisa, não sendo revelada a identidade do participante.

6- Somente o pesquisador responsável e o médico ficarão sabendo da participação no estudo.

7- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá se retirar dela no momento que desejar, sem qualquer prejuízo pessoal.

8- O material colhido será usado somente para o diagnóstico laboratorial, sendo que após o término da pesquisa serão guardados por um período de 2 anos, para análises futuras adicionais, caso seja necessária a realização de outros exames para confirmação do diagnóstico das hepatites virais.

Solicitamos assim, a sua autorização para efetuarmos o referido exame e realizarmos uma entrevista, sendo que a mesma é confidencial; para desenvolvermos o estudo em questão.

### CONSENTIMENTO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus benefícios. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a colheita de material para exame.

\_\_\_\_\_

Assinatura do participante

Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisador responsável: MSc. Marcella Kelly Costa de Almeida e Carla de Castro Sant' Anna. Fone: 3201-6812. Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92.

**APÊNDICE 2** : formulário epidemiológico utilizado no estudo.

Nº DE CADASTRO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**

**PROJETO:** CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES ATENDIDOS NO PROGRAMA DE HEPATITES VIRAIS DO NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL – UFPA, BELÉM-PARÁ.

**I - IDENTIFICAÇÃO**

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Masc. ( ) Fem. Naturalidade: \_\_\_\_\_

Data de nascimento \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Residência atual \_\_\_\_\_

Tempo \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ Residência: \_\_\_\_\_

Telefones: \_\_\_\_\_

**II – ESTILO DE VIDA**

Estado Marital: ( ) Solteiro ( ) Casado ( ) União estável

Uso de preservativo: ( ) Sempre ( ) Algumas vezes ( ) Nunca

Uso de álcool: ( ) Frequentemente ( ) Eventualmente ( ) Nunca

Fumo: ( ) Frequentemente ( ) Eventualmente ( ) Nunca

Uso de drogas: ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

Injetável ( ) Seringa compartilhada ( ) Sim ( ) Não Inalada ( ) Sim ( ) Não

Idade da primeira relação sexual \_\_\_\_\_ Nº de parceiros nos últimos dois anos \_\_\_\_\_

Já teve alguma DST? ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

Manicure ( ) Sim ( ) Não Alicate próprio ( ) Sim ( ) Não

Usa piercing ( ) Sim ( ) Não Tatuagem ( ) Sim ( ) Não

**III – CONDIÇÃO DE SAÚDE**

Já realizou exame de endoscopia? ( ) Não ( ) Sim Quando e quantas vezes? \_\_\_\_\_

Transfusão sanguínea? ( ) Não ( ) Sim Quando e quantas vezes? \_\_\_\_\_

Transplantes de órgãos? ( ) Não ( ) Sim Quando e quantas vezes? \_\_\_\_\_

Hemodiálise ( ) Não ( ) Sim Quando e quantas vezes? \_\_\_\_\_

Internação hospitalar ( )Não ( )Sim Quando e quantas vezes? \_\_\_\_\_

Vacina contra HBV ( )Não ( )Sim ( )1° Dose ( )2° Dose ( )3° Dose

Toma algum medicamento controlado? ( )Não ( )Sim  
Qual? \_\_\_\_\_

#### IV- ANTECEDENTES FAMILIARES:

1- Algum familiar já teve hepatite? ( )Sim ( )Não ( )Quem e qual?  
\_\_\_\_\_

#### V - CONDIÇÕES HABITACIONAIS

Saneamento: ( ) Bom ( ) Razoável ( ) Ruim

Abastecimento de água: ( ) Encanada ( ) Poço ( ) Rios e lagos

Fossa: ( ) Sanitária ( ) Fossa Negra

Número de pessoas na casa: \_\_\_\_\_ Adultos ( ) Crianças ( )

Número de cômodos da casa: \_\_\_\_\_

#### VI – CONDIÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS

GRAU DE INSTRUÇÃO:

Analfabeto/Semianalfabeto		Ens médio completo (1 a 3)	
Fund. completo (1 a 4)		Ens Médio incompleto(1 A 3)	
Fund. Incompleto(1 A 4)		Ens. Superior completo	
Fund. Completo (5 a 8)		Ens. Superior incompleto	
Fund. Incompleto (5 a 8)		Pós Graduação	

PROFISSÃO: \_\_\_\_\_

SALÁRIO FAMILIAR:

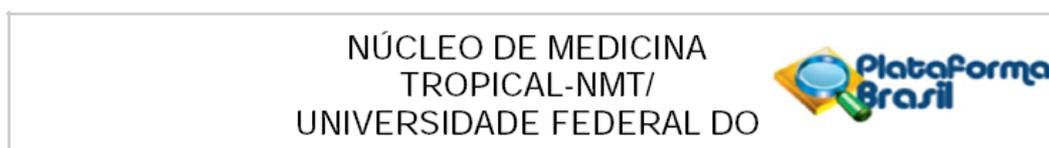
( ) < que 1 mínimo ( ) 1 mínimo ( ) 2 mínimos

( ) 3 a 5 mínimos ( ) 5 a 10 mínimos ( ) > que 10 mínimos

**Responsável pela colheita:** \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável: MSc. Marcella Kelly Costa de Almeida e Carla de Castro  
Sant' Anna. Fone: 3201-6812. Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92.

## ANEXO

**ANEXO 1:** Formulário de autorização do comitê de ética em pesquisa do NMT-UFPA.**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES ATENDIDOS NO PROGRAMA DE HEPATITES VIRAIS DO NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, BELÉM-PARÁ.

**Pesquisador:** MARCELLA KELLY COSTA DE ALMEIDA

**Área Temática:** Área 9. A critério do CEP.

**Versão:** 3

**CAAE:** 02627412.9.0000.5172

**Instituição Proponente:**

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 138.638

**Data da Relatoria:** 30/10/2012

**Apresentação do Projeto:**

A Hepatite B é um problema de saúde pública de importância mundial. Aproximadamente 350 milhões de pessoas são portadores crônicos e um terço da população mundial tem estado em contato com este vírus. Portadores crônicos são expostos ao desenvolvimento de complicações decorrentes da hepatite B, resultando em cirrose hepatocelular carcinoma falha, o fígado ou morte (HADDAD et al, 2010). Estudos epidemiológicos mostram que a hepatite B é responsável por 2 milhões de mortes por ano em todo o mundo e no Brasil, o

Ministério da Saúde estima que pelo menos, 15% da população já tenham sido contaminados pelo vírus da hepatite B, e os casos crônicos correspondem a cerca de 5% - 10% da população brasileira. (BECKER et al, 2010). Historicamente, o diagnóstico de hepatite HBV concentra-se em marcadores sorológicos, porém a tecnologia molecular tem feito grandes avanços, e agora é possível avaliar o DNA do HBV qualitativa e quantitativamente, e também para identificar os genótipos e seus subtipos (BECKER et al, 2010). Estudos de distribuição de genótipos do HBV têm sido largamente realizado entre pacientes com hepatite B crônica. Esses estudos têm associado a infecção por genótipos específicos com resultados de hepatite crônicas pelo vírus B, como a progressão para cirrose hepática e/ou câncer, e com resposta à terapia antiviral (TESHALE et al, 2011). A prevalência da infecção tem grandes variações geográficas, sendo de 3% na América do sul, e no Brasil, a distribuição é heterogênea sendo considerada na região amazônica, uma alta prevalência (FIGUEIREDO et.al, 2008; DÉNY e ZOULIM, 2010). Apesar deste fato, os estudos

**Endereço:** Av. Generalíssimo Deodoro, 92

**Bairro:** Umarizal

**UF:** PA

**Telefone:** (91)3201-6857

**Município:** BELEM

**CEP:** 66.055-240

**E-mail:** cepbel@ufpa.br

NÚCLEO DE MEDICINA  
TROPICAL-NMT/  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



identificando

quais os genótipos e seus subtipos circulando entre a população no Pará são inexistentes. Apresentando uma diversidade viral complexa, o HBV apresenta diferentes genótipos e subgenótipos. Inicialmente, quatro genótipos (A-D), do HBV, foram identificados comparando-se 18 seqüências de genomas completos, baseados em diferenças >8% (intergenotípica) e 4% (intra-genotípicas). Em seguida, outros quatro genótipos foram

identificados (E-H). Atualmente, o HBV é dividido em oito genótipos (A, B, C, D, E, F, G, H) que estão associados com diferentes mutações nas regiões dos genes pré-core e promotor core basal (KIDD et al, 2002; TONETTO, 2006; SUNG et al, 2008; YAN et al, 2008). Além disso, os genótipos são subdivididos em subgenótipos, cuja nomenclatura utiliza números (1, 2, 3, etc). Estudos recentes sugerem que os genótipos possam influir na gravidade da doença e na resposta ao tratamento (LOK e McMAHON, 2007; McMAHON, 2009). No Brasil os

genótipos A, D e F são mais prevalentes, porém a caso reportados dos genótipos B, C, E e G. (SITNIK et al, 2010). No Brasil, o Ministério da saúde criou, em 5 de fevereiro de 2002, o programa Nacional para prevenção e o controle das hepatites virais, com o intuito de contribuir para o aprimoramento de ações de saúde relacionadas às hepatites virais (FERREIRA e SILVEIRA, 2004).

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Identificar quais os genótipos e seus subtipos presentes na população de Belém, estado do Pará.

Objetivo Secundário:

Determinar a prevalência dos marcadores sorológicos para o HBV (HBsAg, Anti-HBc e Anti-HBs) entre os pacientes atendidos.

Determinar a prevalência dos genótipos e subtipos encontrados na população.

Determinar a prevalência dos casos de hepatite B oculta. Identificar os fatores de risco a qual a população está exposta.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

A participação nesse estudo trará riscos mínimos ao paciente, referente a coleta de 10 mL de sangue por punção venosa periférica que será realizada por um profissional capacitado, seguindo as normas de biossegurança para a coleta sanguínea.

Benefícios:

Como benefício será conhecida a frequência da doença na população que auxiliará no

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92  
Bairro: Umarizal  
UF: PA Município: BELEM  
Telefone: (91)3201-6857

CEP: 66.055-240

E-mail: cepbel@ufpa.br

NÚCLEO DE MEDICINA  
TROPICAL-NMT/  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



planejamento de medidas de intervenção. O paciente terá acesso aos laudos de diagnóstico, que auxiliarão no encaminhamento para atendimento médico dos casos com resultados positivos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto será realizado no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais no Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, onde serão feitos testes através de ensaio imunoenzimático (metodologia ELISA) para os marcadores HBsAg, Anti-HBC total e Ant-HBS. As

amostras reagentes para HBsAg e Anti-HBC total serão analisadas para o marcador HBeAg.

Para a análise de todos os marcadores será utilizado kit comercial e as instruções de uso serão as indicadas pelo fabricante.

Todas as amostras reagentes para HBsAg e HBeAg serão testadas por biologia molecular.

Para análise de dados serão empregados testes estatísticos adequados para detectar ou não a diferença entre

as proporções de amostra entre os grupos objeto. Os dados obtidos através dos questionários serão inseridos

em planilha no software Microsoft Excel 2010 e posteriormente transportados para o Programa BioEstat 5.0, sendo realizada uma avaliação descritiva e analítica utilizando os testes adequados para a análise. A significância estatística será aceita ao nível de 95%.

O questionário a ser utilizado está de acordo, assim como as referências bibliográficas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE está de acordo com as normas, apresentando linguagem acessível. A folha de rosto se apresenta assinada e o cronograma está adequado.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as pendências foram atendidas

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

BELEM, 05 de Novembro de 2012

Assinador por:  
Hellen Thais Fuzii  
(Coordenador)

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92  
Bairro: Umarizal  
UF: PA Município: BELEM  
Telefone: (91)3201-6857

CEP: 66.055-240

E-mail: cepbel@ufpa.br

**ANEXO 2:** Protocolo de extração utilizado no estudo.

Universidade Federal do Pará - Núcleo de Medicina Tropical  
Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais - LPCTD

**PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO VIRAL****Kit: QiAamp DNA Blood Mini Kit****PREPARAÇÃO DOS REAGENTES****❖ Preparação da Protease**

1 Adicionar 5,5ml solvente de Protease (*protease resuspension buffer*). Misture cuidadosamente para evitar formação de bolha e até a completa dissolução da protease.

OBS: Estocar a solução a -20°C. Fazer alíquotas para o armazenamento.  
Validade: 2meses

**❖ Tampão AW1:**

Adicionar 130ml de etanol (96-100%) no tampão AW1 concentrado. Anotar no frasco que o etanol já foi adicionado e armazenar em temperatura ambiente. A solução é estável por 1 ano.

**❖ Tampão AW2:**

Adicionar 160ml de etanol (96-100%) no tampão AW2 concentrado. Anotar no frasco que o etanol já foi adicionado e armazenar em temperatura ambiente. A solução é estável por 1 ano.

**PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEICO VIRAL**

Ligar o banho-maria a 56°C. Identificar os tubos de microcentrifuga (1,5ml) e pipetar 20 µl da Protease em cada tubo. Adicionar 200µl da amostra (plasma ou soro). Pipetar 200µl tampão AL em cada tubo. Fazer um pulso no vórtex por 15 segundos. Incubar a 56°C por 10 minutos em um termobloco. Centrifugar rapidamente o tubo para remover partículas dispersas. Adicionar 200µl de etanol (96-100%) na amostra e homogeneizar no vórtex por 15 segundos. Centrifugar rapidamente o tubo para remover partículas dispersas. Identificar devidamente as colunas. Cuidadosamente transferir todo o lisado para as colunas sem molhar a borda. Centrifugar a 8.000 RPM por 1 min. Descartar a **parte de baixo** (eluído) e ficar só com a **COLUNA** para encaixar em outro tubo coletor. Adicionar com 500µl de tampão de lavagem AW1 e centrifugar por 1 min a 8.000 RPM. Manter a coluna e descartar a parte de baixo (tubo coletor). Lavar com 500µl de tampão de lavagem AW2 e centrifugar por 3 min a 14.000 RPM. Manter a coluna e descartar a parte de baixo (tubo coletor). Colocar a coluna em um tubo de microcentrifuga (1,5ml). Adicionar 200µl de tampão AE ou água destilada. Incubar em temperatura ambiente (15° a 25°) por 5 minutos. Centrifugar a 8.000 RPM por 1 min. Descartar a coluna e guardar o tubo (congelar).

**ANEXO 3:** Protocolo de purificação do gel de agarose 2% utilizado no estudo.

**Universidade Federal do Pará - Núcleo de Medicina Tropical  
Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais - LPCTD**

**PROTÓCOLO DE PURIFICAÇÃO DO GEL DE AGAROSE****PREPARAÇÃO DAS FATIAS DO GEL**

Pesar todos os tubos *ependorf* vazio e anotar o valor. Após cortar a área do gel contendo o fragmento de DNA desejado usando uma lamina ou bisturi limpos, minimizado a quantidade de agarose em torno do fragmento de DNA. Pesar a fatia do gel contendo o fragmento de DNA. Em seguida coloque em um tubo de microcentrifuga de 1,5ml.

OBS: A fatia não deverá pesar mais do que 400mg por tubo. Se a fatia tiver um peso superior a 400mg, deve-se cortar o gel em fatias menores, de modo que não exceda 400mg. Coloque a sobra do gel em um *ependorf* separado.

**DISSOLVENDO O GEL – Para géis de agarose <2%**

Adicione nos tubos contendo a fatia do gel 1,2ml de tampão de solubilização (L3) e coloque o tubo no banho maria ou termobloco a 50°C durante 10 minutos. Inverter a mão a cada 3 minutos para misturar e assegurar a dissolução do gel. Depois do gel dissolvido, incubar o tubo por mais 5 minutos.

**PURIFICAÇÃO DO DNA**

Preparar o tampão de lavagem (W1) adicionando 64ml de etanol 96-100% no tampão de lavagem. Marque no rotulo do tampão para indicar que foi adicionado o etanol. Armazene o tampão de lavagem (W1) em temperatura ambiente.

Identificar as colunas. Pipetar o DNA dissolvido para o centro das colunas previamente identificadas. Centrifugar a 12.000 RPM durante 1 minuto. Descarte o tubo e coloque a coluna em um novo tubo. Adicionar 500µl do tampão de lavagem (W1) na coluna. Centrifugar a 12.000 RPM durante 1 minuto. Descarte o tubo e coloque a coluna em um novo tubo. Centrifugar novamente a 12.000 RPM durante 1 a 2 minutos para remover qualquer resíduo de tampão e etanol. Descarte o tubo e coloque a coluna em um novo tubo. Adicionar 50µl do tampão de eluição (E5) no centro da coluna. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 12.000 RPM durante 1 minuto. Os tubos contem o DNA Purificado. Descarta a coluna.

**ARMAZENAMENTO DO DNA PURIFICADO**

Armazenar o DNA purificado a 4°C para utilização imediata ou aliquotar e armazenar a -20°C para estocagem por longo prazo. Evitar descongelamentos repetitivos.