



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

CARLA DE CASTRO SANT' ANNA

**PREVALÊNCIA DA HEPATITE B OCULTA NOS PACIENTES ATENDIDOS NO  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ,  
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

BELÉM - PARÁ

2016

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

CARLA DE CASTRO SANT' ANNA

**PREVALÊNCIA DA HEPATITE B OCULTA NOS PACIENTES ATENDIDOS NO  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ,  
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

ORIENTADOR: Prof.<sup>a</sup> Dra. Luisa Caricio Martins.

BELÉM – PARÁ

2016

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

---

Sant Anna, Carla de Castro, 1987-  
Prevalência da hepatite B oculta nos pacientes  
atendidos no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade  
Federal do Pará, Amazônia Brasileira / Carla de Castro  
Sant Anna. - 2016.

Orientadora: Luisa Carcio Martins.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical,  
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais,  
Belém, 2016.

1. Hepatite B. 2. Biologia molecula. 3.  
Genótipos. I. Título.

CDD 22. ed. 616.3623

---

**CARLA DE CASTRO SANT' ANNA**

**PREVALÊNCIA DA HEPATITE B OCULTA NOS PACIENTES ATENDIDOS NO  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ,  
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Data da Defesa: 15/03/2016

Banca examinadora:

---

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Luisa Carício Martins.  
Núcleo de Medicina Tropical – NMT/UFPA

---

Profa. Dra. Hellen Fuzii  
Núcleo de Medicina Tropical – NMT/UFPA

---

Prof. Dr. Aldemir Branco de Oliveira Filho  
Instituto de Estudos Costeiros – IECOS/UFPA

---

Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa  
Núcleo de Medicina Tropical – NMT/UFPA

---

Profa. Dra. Fabiola Elizabeth Villanova - Suplente  
Núcleo de Medicina Tropical – NMT/UFPA

Dedico este trabalho aos meus pais José Antônio e Zilene por me encorajar em todos os meus planos e sonhos. E a minha filha Isabella por ser minha maior incentivadora. Eu devo tudo à vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e especialmente a Deus, pelo seu amparo e conforto nas horas difíceis e pelos momentos maravilhosos e presentes em minha vida. Sem Ele eu nada sou!

Aos meus pais, José Antônio e Zilene por sempre me incentivarem a continuar sem medir esforços para esta realização. O apoio de vocês foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Minha eterna gratidão. Aos meus irmãos, Sophia e Felipe por estarem do meu lado sempre que preciso, pela ajuda com a Isabella, pelas horas divertidas, pelos momentos maravilhosos em família com o Matheus, José Guilherme e Samuel. À minha filha amada, Isabella, que apesar da pouca idade já é tão madura e compreensível. Você é minha fonte de energia inesgotável e o maior presente que pude ganhar dessa vida!

À Dra Luisa Carício Martins pela acolhida, pelos ensinamentos, orientação, por sempre estar presente e disposta a ajudar em qualquer momento. O meu muito obrigado por permitir que eu fizesse parte deste maravilhoso grupo de pesquisa e pela oportunidade de fazer eu me apaixonar ainda mais por essa área. E que venham mais quatro anos de doutorado, mais ansiosa e disposta do que nunca. Muito obrigada, Dra!

À família LPCDT, pelos ensinamentos passados, risadas, momentos de angústia e vitórias comemoradas juntas: Dona Fátima, Seu Silvio, Joseane, Roseane, Inês, Cristovão, Andrea, Andrey, Adriana, Amanda e especialmente a Marcella e Patrícia pela amizade, paciência, aprendizado e todo o conhecimento passado. Vocês fizeram do trabalho árduo mais leve e prazeroso. Rafaela Baraúna pela SUPER ajuda com o sequenciamento, ao Akim Nobre pela paciência e disponibilidade de tirar as dúvidas em relação as análises.

Ao meu amor, pela dedicação e paciência de todos os anos juntos, pelo companheirismo incondicional. Esse trabalho tem muito de você. Obrigada pela ajuda com figura e tantas outras coisas. E agora com essa etapa concluída eu respondo a você: Simbora para o doutorado, juntos mais uma vez!

Às minhas amigas de todas as horas: Alyne, Luciana, Débora, Juliana, Thaise, Denise e Luana. Pelos momentos de diversão, amizade, risadas compartilhadas e de parceria sem igual.

À todos os professores e funcionários do Núcleo de Medicina Tropical.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”

(Charles Chaplin)

“ A cooperação é a convicção plena de que ninguém pode chegar à meta se não chegarem todos”

(Virginia Burden)

## RESUMO

A infecção pela hepatite B oculta (HBO) é caracterizada pela ausência do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em ensaios imunoenzimáticos comerciais, apesar da persistência do HBV-DNA no soro e/ou tecido hepático. Os escassos trabalhos desta forma clínica no Brasil, principalmente na Região Amazônica, tida como uma área endêmica para o vírus da hepatite B (HBV), dificultam as análises para identificar o perfil epidemiológico do local. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência da hepatite B oculta nos pacientes atendidos no ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical – Universidade Federal do Pará, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015, além de caracterizar os genótipos virais circulantes e identificar os principais fatores de risco para a aquisição desta forma clínica. Quatrocentos e sessenta e cinco amostras de soro foram submetidas aos ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*) para detecção dos marcadores sorológicos do HBV (HBsAg, anti-HBc e anti-HBs). Um total de 181 pacientes resultaram no HBsAg não reagente, anti-HBc reagente e anti-HBs não reagente. Essas amostras foram investigadas com uma técnica de PCR para a identificação do HBV-DNA. Subsequentemente, as amostras positivas foram sequenciadas para identificar os genótipos e mutações. Das 181 amostras, 26 (14,36%) tinham o HBV-DNA no soro, demonstrando a infecção pela HBO. A média de idade foi de 39 anos, 53,45% (14/26) eram casados e 50% (13/26) eram homens. O genótipo A foi encontrado em 88,46% (23/26), com o subgenótipo A1 mais prevalente com 78,26% (18/23) e o subgenótipo A2 com 21,73% (5/23). O genótipo F foi encontrado em apenas 11,53% (3/26), com a presença do subgenótipo F2 em todas as amostras. Quanto aos fatores de risco, apenas o compartilhamento de alicate de unha foi estatisticamente significativo ( $p < 0,03$ ). Algumas substituições de aminoácidos foram identificadas nas amostras de pacientes com HBO em comparação com as amostras HBsAg reagentes, porém, nenhuma mutação foi identificada. O estudo detectou uma alta prevalência da hepatite B oculta nos pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical – UFPA. Estudos moleculares do HBV são de fundamental importância para a identificação de pacientes que são considerados saudáveis, mas que possuem a infecção, podendo ser um potencial transmissor da doença.

**Palavras-chave:** Biologia molecular. Hepatite B oculta. Prevalência. Genótipos.

## ABSTRACT

Infection with hepatitis B occult (OBI) is characterized by absence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in commercial immunoassays, despite the persintência HBV DNA in the serum and / or liver tissue. The few studies of this clinical form in Brazil, mainly in the Amazon region, seen as an endemic area for hepatitis B virus (HBV), hamper the analysis to identify the epidemiological profile of the site. The objective of study was to determine the prevalence of hepatitis B occult in patients attended at the Tropical Medicine Center outpatient - Federal University of Pará, from January 2011 to December 2015, characterization of circulating viral genotypes and identify the main risk factors for the acquisition of this clinical form. Four hundred and sixty-five serum samples were submitted to ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) for detection of serological markers of HBV (HBsAg, anti-HBc and anti-HBs). Total 181 patients resulted in a non-reactive HBsAg, anti-HBc reactive and anti-HBs nonreactive. These were screened with a PCR assay for identification of HBV-DNA. Subsequently, the positive samples were sequenced to identify the genotypes and mutations. Of the 181 samples, 26 (14,36%) had serum HBV-DNA, demonstrating the infection by OBI. The average age of 39 years, 53.45% (14/26) were married and 50% (13/26) were male. The genotype A was found in 88.46% (23/26), with the most prevalent subgenotype A1 with 78.26% (18/23) and genotype A2 with 21.73% (5/23). The genotype F was found in only 11.53% (3/26), in the presence of F2 genotype in all samples. As for risk factors only the nail pliers share was statistically significant. Some amino acid substitutions were identified in samples of patients with HBO compared with the HBsAg samples reagentes, but no mutation was identified. The study found a high prevalence of hepatitis B occult in patients treated at the Tropical Medicine Center – UFPA. HBV molecular studies are of fundamental importance for the identification of patients who are considered healthy, but they do have the infection and can be a transmitter disease potential.

**Keywords:** Molecular biology. Hepatitis B occult. Prevalence. Genotypes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagem do Baruch Blumberg, descobridor do HBV (1965).....	19
<b>Figura 2.</b> Tipos de partículas virais do HBV e imagem de microscopia eletrônica correspondente as formas do HBV.....	21
<b>Figura 3.</b> Modelo Estrutural do HBV.....	22
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do genoma do HBV. ....	23
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática de glicoproteínas produzidas pelo HBV. ....	24
<b>Figura 6.</b> Esquema ilustrativo da Polimerase do HBV e seus respectivos domínios. ....	25
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do ciclo de replicação do HBV.....	27
<b>Figura 8.</b> Prevalência mundial do marcador HBsAg do HBV. ....	29
<b>Figura 9.</b> Distribuição geográfica dos genótipos do HBV no mundo. ....	30
<b>Figura 10.</b> Mutações do genoma associadas com o desenvolvimento da infecção pela HBO. ....	35
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática das possíveis implicações clínicas relatada na HBO.	37
<b>Figura 12.</b> A) Localização do município de Belém, capital do Estado do Pará, no norte do Brasil. B) Imagem georeferenciada da localização do NMT (Fonte: Google Earth). C) Fotografia ilustrativa do NMT com logradouro. ....	44
<b>Figura 13.</b> Foto do gel de agarose a 1,5% com a positividade do HBV-DNA.....	47
<b>Figura 14.</b> Foto do gel de agarose a 1,5% mostrando a primeira PCR e a segunda PCR com as mesmas amostras. ....	48
<b>Figura 15.</b> Árvore filogenética a partir do sequenciamento da região S do HBV. A análise foi realizada utilizando o método de Neighbor-Joining. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura-2 parâmetros. Os valores apresentados nos ramos representam “bootstrap” obtidos com 1.000 replicações. ....	58
<b>Figura 16.</b> Frequência dos genótipos encontrados em pacientes com HBO e frequência dos subgenótipos encontrados do genótipo A.....	59
<b>Figura 17.</b> Representação esquemática do alinhamento das sequências de aminoácidos (93 aa) da região S das amostras referências de pacientes HBsAg reagentes e dos pacientes HBO, todos com genótipos A.....	61
<b>Figura 18.</b> Representação esquemática do alinhamento das sequências de aminoácidos (93 aa) da região S das amostras referências de pacientes HBsAg reagentes e de pacientes HBO, todos com genótipos F. ....	62

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Marcadores sorológicos e moleculares para o HBV em diferentes estados de persistência. ....	40
<b>Quadro 2.</b> Primers utilizados na detecção do HBV-DNA.....	46
<b>Quadro 3.</b> Primers utilizados nas ampliações do gene S do HBV. Posição dos iniciadores no GenBank: V00866. ....	47
<b>Quadro 4.</b> Sequências referências dos genótipos a partir do número de acesso do GenBank.	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos pacientes com o perfil do estudo para HBO por sexo, grupo etário, estado civil e que se declaram vacinados atendidos no NMT-UFPA, Pará, Brasil.....	52
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos pacientes HBV-DNA positivos e HBV-DNA negativos por grupo etário, sexo, estado civil e que se declaram vacinados atendidos no NMT-UFPA, Pará, Brasil..	53
<b>Tabela 3.</b> Descrição dos dados socioeconômicos dos pacientes com a presença do HBV-DNA e sem a presença do HBV-DNA.....	55
<b>Tabela 4.</b> Possíveis fatores de risco para aquisição da HBO relacionados ao comportamento sexual em pacientes com o HBV-DNA e pacientes sem o HBV-DNA. ....	56
<b>Tabela 5.</b> Possíveis fatores de risco para aquisição da HBO relacionados ao uso de alicate, tatuagem e/ou piercing e transfusão sanguínea em indivíduos com o DNA viral e sem o DNA viral. ....	57
<b>Tabela 6.</b> Genótipos do HBV relacionados a características dos pacientes infectados.....	60

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AgAu - Antígeno Austrália.

Anti-HBe – Anticorpo contra o antígeno e do vírus B.

Anti-HBs - Anticorpo contra o antígeno no vírus B.

cccDNA - DNA fechado covalentemente.

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

DHC - Doença hepática crônica.

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.

HBC - Hepatite B crônica.

HBcAg – Antígeno do núcleo do vírus da hepatite B.

HBeAg – Antígeno e do vírus da hepatite B.

HBV - Vírus da hepatite B.

HCV - Vírus da hepatite C.

HBsAg - Antígeno de superfície da hepatite B.

HBxP – Proteína viral X.

HCC - Carcinoma hepatocelular.

HIV – Vírus da imunodeficiência humana.

HBIg – Imunoglobulina hiperimune da hepatite B.

HBO - Hepatite B oculta.

LPCDT – Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais.

MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*.

MHR – Grande Região Hidrofílica (*Major Hydrophilic Region*).

mRNA – RNA mensageiro.

NMT – Núcleo de Medicina Tropical.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

OR – *Odds Ratio*.

ORF – Sequência de leitura aberta (*Open reading frames*).

PCR – Reação de cadeia da polimerase (*Reaction Chain Polymerase*).

pgRNA – RNA pré-genômico.

PM – Peso Molecular

RCF – Força centrífuga relativa.

RNA – Ácido ribonucleico.

RT – Transcriptase reversa.

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido.

UFPA- Universidade Federal do Pará.

UV – Ultravioleta.

WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*).

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Grau Célsius.

IU – Unidade Internacional.

Kb – Kilobase.

Kd – *Kilodaltons*

μL – Microlitro.

ml – Mililitros.

Ng – nanograma.

Nm – Nanômetro.

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2. <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
2.1 HISTÓRICO DA HEPATITE B.....	19
2.2 CLASSIFICAÇÃO E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO HBV .....	20
2.3 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HBV .....	22
2.4 CICLO DE REPLICAÇÃO DO HBV .....	26
2.6 EPIDEMIOLOGIA DO HBV .....	28
2.6.1 Epidemiologia molecular dos genótipos do HBV .....	30
2.7 HEPATITE B OCULTA .....	32
2.7.1 HISTÓRICO DA HEPATITE B OCULTA.....	32
2.7.2 MUTAÇÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À HEPATITE B OCULTA .....	34
2.7.3 IMPACTO CLÍNICO DA HEPATITE B OCULTA .....	36
2.7.4 FATORES DE RISCO PARA TRANSMISSÃO DA HEPATITE B OCULTA ....	37
2.7.5 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE B OCULTA.....	38
2.7.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE B OCULTA.....	39
3. <b>JUSTIFICATIVA</b> .....	41
4. <b>OBJETIVOS</b> .....	42
5. <b>METODOLOGIA</b> .....	43
5.1 CASUÍSTICA .....	43
5.1.1 Desenho do Estudo.....	43
5.1.2 Caracterização da amostra.....	43
5.1.3 Obtenção dos dados sócio-epidemiológicos .....	43
5.1.4 Critérios de inclusão e exclusão .....	43
5.1.5 Local do estudo .....	44
5.1.6 Aspectos Éticos .....	44
5.2 MÉTODOS LABORATORIAIS .....	45
5.2.1 Obtenção do material biológico .....	45
5.2.2 Diagnóstico sorológico das hepatites virais .....	45
5.2.3 Detecção por biologia molecular dos ácidos nucleicos virais.....	45
5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
6. <b>RESULTADOS</b> .....	51
7. <b>DISCUSSÃO</b> .....	62
8. <b>CONCLUSÃO</b> .....	69
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite B (HBV) é um dos agentes patogênicos humanos mais comuns, sendo esta infecção pandêmica, com uma distribuição mundial. Estima-se que cerca de dois bilhões de pessoas em todo o mundo foram infectadas pelo HBV e 240 milhões de pessoas com infecção crônica e em risco de doenças graves levando a óbito por cirrose e/ou carcinoma hepatocelular (HCC), doenças que causam mais de 780 mil mortes a cada ano devido às complicações da infecção pelo HBV (DIENSTAG, 2008; LOZANO et al., 2012; WHO, 2015).

O HBV pode ser transmitido por via perinatal (transmissão vertical – de mãe para filho), por via percutânea, via sexual ou por transmissão horizontal, presumivelmente através de cortes ou feridas abertas, além do contato com sangue contaminado (BAUER et al., 2011).

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 e uma taxa de mortalidade de 0,6 por 100.000 habitantes (FERREIRA et al., 2006).

A literatura relata à região Sul do Brasil como uma área de baixa endemicidade, exceto pela região Oeste do estado de Santa Catarina que é considerado uma área de alta endemicidade. As regiões Centro-Oeste, Sudeste, com exceção do estado do Espírito Santo, considerado endêmico para o HBV e a Região Nordeste são tidas como endemicidade intermediária. A região Amazônica, no Norte do país, é considerada uma região com uma alta prevalência da infecção pelo HBV (BECKER et al., 2010; CARRILHO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006).

O diagnóstico da infecção pelo HBV é feito através do marcador sorológico HBsAg (antígeno de superfície da hepatite B). Este marcador reagente nos primeiros seis meses de infecção é caracterizado pela hepatite B aguda. A persistência do HBsAg reagente por mais de seis meses e/ou a presença do HBV-DNA no soro e/ou tecido hepático é caracterizada pela hepatite B crônica (HBC) (SAID, 2011; ZOBEIRI, 2013).

A introdução de testes de detecção do DNA do HBV a 20 anos mostrou um maior conhecimento da variabilidade genética deste vírus e demonstrou que a infecção pelo HBV apresenta um amplo aspecto de padrões sorológicos associados com a persistência do HBV-DNA (BRECHOT et al., 2001). Assim, novos avanços na compreensão da história natural, a imunopatogênese da hepatite B, além da permissão da detecção de uma nova forma clínica denominada como hepatite B oculta (HBO) (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).

Embora a HBO ocorra no mundo todo, sua prevalência pode refletir na endemecidade do HBV em várias regiões geográficas e em diferentes populações (RAIMONDO et al., 2007). Deste modo, a infecção oculta pelo HBV parece estar estreitamente relacionada com a infecção por HBV (ALENCAR et al., 2007). Assim, há uma necessidade de estudos com esta forma clínica na região da Amazônia, devido ser a área mais prevalente da hepatite B no país (BRASIL, 2008).

Evidências emergentes da importância clínica da HBO são responsáveis pelo crescente interesse da comunidade científica, pois de fato, a HBO pode ter impactos clínicos sobre a transmissão acidental da infecção através de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, risco de reativação relacionado a imunossupressão de indivíduos, contribuição para a progressão de doenças hepáticas graves, como doenças crônicas do fígado e carcinoma hepatocelular (HCC) (BIANCO, DODD, 2013; BRECHOT et al., 2001; DE MITRI et al, 2010; HOLLINGER, SOOD, 2010; RAIMONDO et al, 2010; YUEN et al., 2008) e relacionada com a hepatite crônica criptogênica (CHAN et al., 2002; CHEMIN et al., 2001).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 HISTÓRICO DA HEPATITE B

Foram relatados surtos de icterícia na Babilônia há mais de 2.500 anos (FONSECA, 2010; REUBEN, 2002). Escritos de Hipócrates, que viveu provavelmente 300 a 400 anos antes de Cristo, revelam que a icterícia seria provavelmente de origem infecciosa e o problema poderia estar relacionado primariamente no fígado. O acúmulo de líquido no abdome (ascite) poderia ser causado por alguma doença crônica nesse órgão (HOLLINGER, 1994).

Antes do início do século XIX, os relatos sobre a história das hepatites no Brasil são escassos (FONSECA, 2010). Somente em 1895, a existência de uma forma de hepatite provavelmente transmitida por via parenteral foi documentada cientificamente (ALTER, 2003; FONSECA, 2010; HOLLINGER, 1994).

Em 1965, o geneticista americano Baruch Blumberg (Figura 1) descobriu acidentalmente no soro de um aborígine Australiano, um antígeno que reagia com o soro de dois doentes hemofílicos politransfundidos, ao qual se nomeou antígeno Austrália (AgAu). O AgAu foi renomeado e chamado atualmente de antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). Este achado foi marco no estudo das hepatites virais (ALTER; 2003; BLUMBERG, ALTER, 1965; BLUMBERG et al., 1967; PURCELL, 1993; SCARBOROUGH, 2010).

**Figura 1.** Imagem do Baruch Blumberg, descobridor do HBV (1965).



Fonte: FONSECA, 2010.

No mesmo ano, um americano pertencente a equipe de Bumberg chamado Bayer analisou por microscopia eletrônica o soro de um portador crônico do antígeno Austrália e observou numerosas partículas, sendo algumas esféricas e outras tubulares (Figura 2). Tais partículas são invólucros virais vazios não infectantes (BLUMBERG, 2003; FONSECA, 2010).

Poucos anos depois, Almeida e colaboradores (1971) caracterizaram o que chamaram de partícula de Dane, que corresponde ao pacote viral completo do vírus da hepatite B (HBV), sendo este descoberto pelo pesquisador australiano Dane em 1970 (ALMEIDA et al.; 1971; BLUMBERG, 2003; DANE et al., 1970).

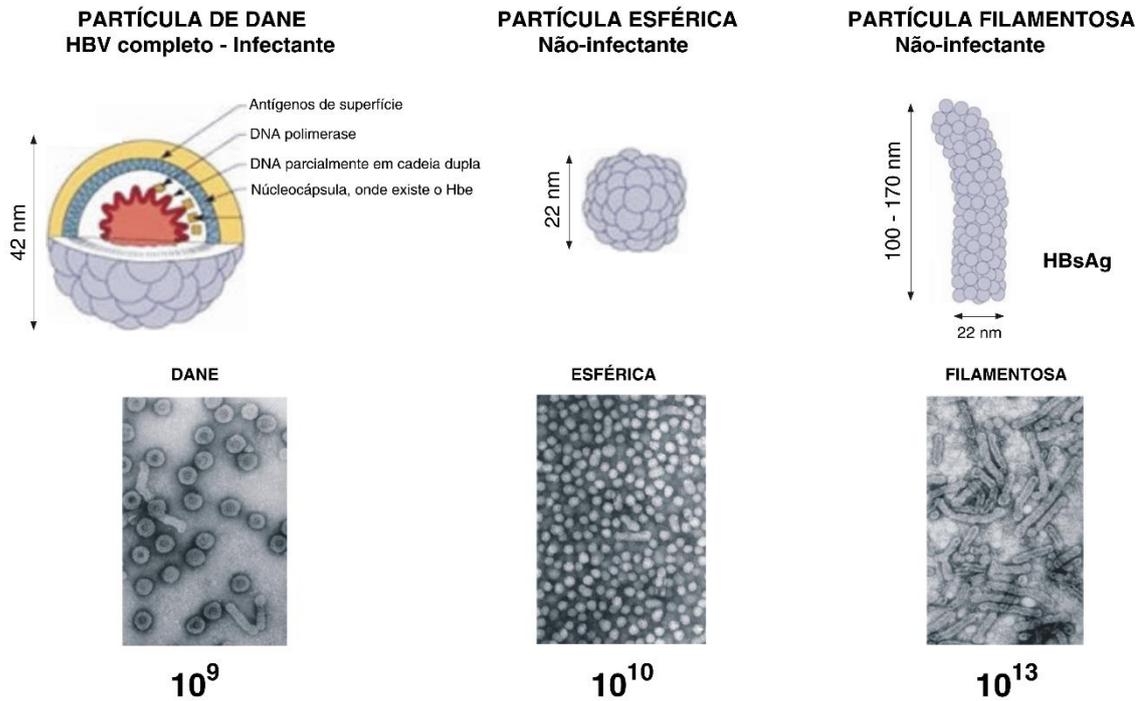
Em 1972, foi descrito um novo antígeno distinto do HBsAg, sendo denominado de antígeno “e” do vírus da hepatite B (HBeAg) e seu anticorpo correspondente anti-HBe (MAGNIUS, ESPMARK, 1972).

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO HBV

O HBV é um vírus envelopado contendo DNA pertencente à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*, capaz de causar infecções agudas e crônicas tendo tropismo por células hepáticas. (BALMASOVA et al., 2014; KIDD-LJUNGGREN et al., 2002; SEEGER, MASON, 2000). Apesar dos *Hepadnavirus* possuírem preferência pelas células hepáticas, partículas de DNA foram observadas nos rins, pâncreas e células mononucleares (KIDD-LJUNGGREN et al., 2002).

Este vírus produz três tipos de partículas virais: (i) as partículas incompletas esféricas medindo cerca de 22 nm, (ii) partículas filamentosas ou tubulares medindo em média 150 nm de comprimento (BLUMBERG, 2003) e (iii) partículas virais infecciosas esféricas, de 42-47 nm de diâmetro e constituem o vírion completo (DANE et al., 1970), ou seja, com o invólucro externo, que corresponde ao HBsAg e um núcleo (Figura 2) (ALMEIDA et al., 1971).

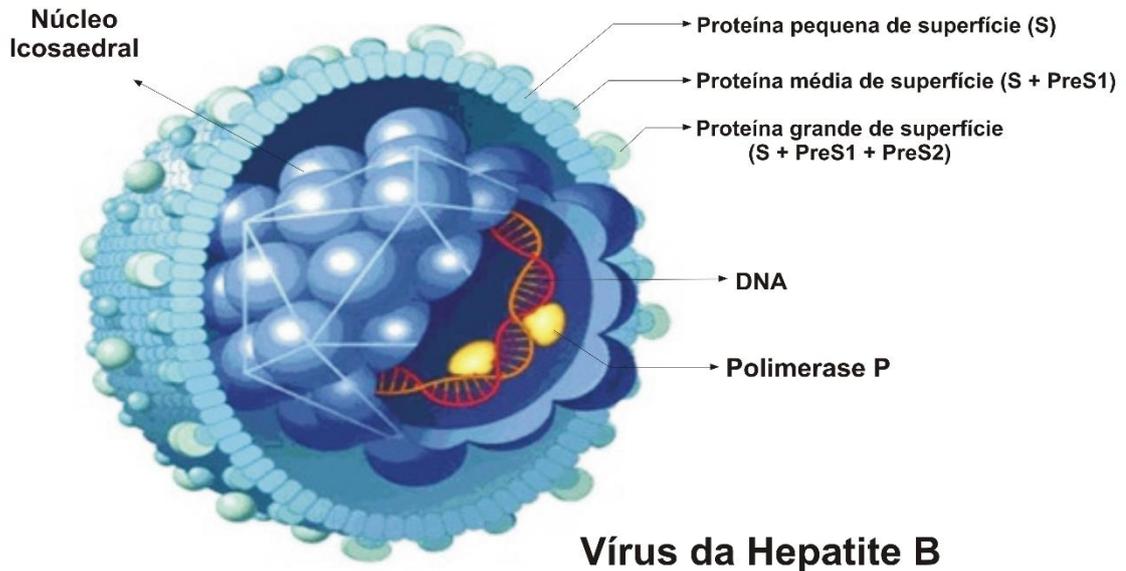
**Figura 2.** Tipos de partículas virais do HBV e imagem de microscopia eletrônica correspondente as formas do HBV.



Fonte: ALMEIDA et al., 2006; GERLICH, 2013 (Adaptado).

O vírus é circundado por um envelope externo proteico (invólucro) que contém os três antígenos de superfície HBsAg-S; HBsAg-M, com sua sequência adicional pré-S2; HBsAg-L, com suas sequências adicionais pré-S1 e pré-S2. O HBs-S é o componente principal na estrutura do vírion. A camada interna, denominada nucleocapsídeo é um icosaedro totalmente constituído por proteínas do cerne (HBcAg) que circundam o genoma viral e a enzima DNA polimerase (Figura 3) (TIOLLAIS et al., 1985).

**Figura 3.** Modelo Estrutural do HBV.



Fonte: PERKINS, 2002 (Adaptado).

### 2.3 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HBV

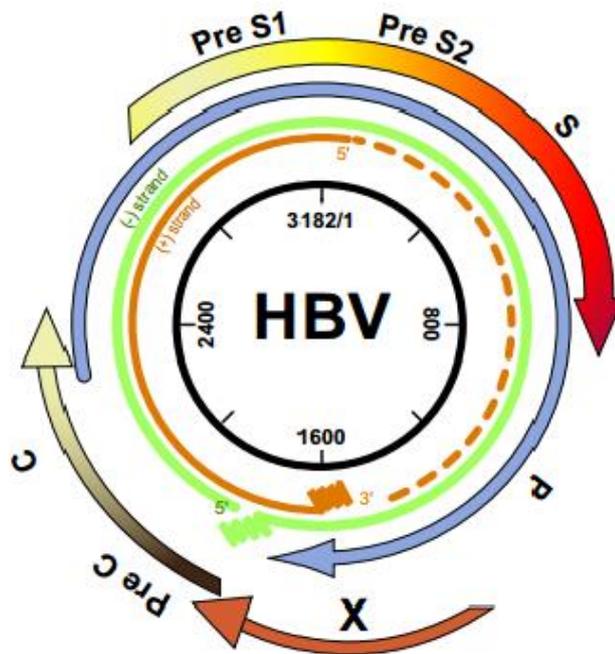
O primeiro vírus humano patogênico a ser sequenciado foi o HBV (BLUMBERG, 2003). O genoma viral contém cerca de 3.2 kb de comprimento (peso molecular), onde seu material genético é uma molécula de DNA circular de fita dupla parcial, no qual é rodeada por uma bicamada lipídica atravessada por complexos de glicoproteínas virais (SEEGER, MASON, 2000).

A cadeia negativa externa é de 15% a 45% mais longa do que a cadeia positiva interna e tem uma proteína ligada covalentemente ao seu final, a polimerase viral (GERLICH, ROBINSON, 1980), já a cadeia mais curta tem um RNA anexo à sua extremidade (MOLNAR-KIMBER et al., 1983). Assim, a fita longa detém toda a informação genética. A fita curta tem sequências que cruzam com as terminações da fita longa sem necessidade de ligações covalentes, levando a uma configuração circular (ALVARIZ, 2006).

As moléculas de DNA são posicionadas em uma proteína do capsídeo com uma estrutura antigênica designado como antígeno do núcleo do vírus da hepatite B (HBcAg), que mede cerca de 28 nm de tamanho e está envolvida na embalagem do genoma viral, há também

a proteína precore “e” da hepatite B denominado antígeno HBeAg (Figura 4) (ALVARIZ, 2006).

**Figura 4.** Representação esquemática do genoma do HBV.



Fonte: POLLICINO et al, 2014.

O genoma do HBV possui 4 sobrepostos quadros de leitura aberta, a ORF (*open reading frames*), onde as proteínas do vírus são codificadas dentro deste quadro, onde possui os genes S, C, P e X (SEEGER, MASON, 2000). A ORF permite que o HBV produza 50% mais proteínas do que seria previsto, devido ao pequeno tamanho do genoma (MELLO et al., 2007).

O gene S e as regiões pré-S1 e pré-S2. São responsáveis pela síntese das três proteínas do envelope. A maior delas é codificada pelo gene S em conjunto com as duas regiões resultando na formação da maior proteína (L – *large* 368 aa). A tradução do gene S e da região pré-S 2 dão origem a uma proteína de tamanho intermediário (M – *middle* 281 aa). A menor proteína é codificada apenas pela sequência de nucleotídeos do gene S e representa o principal componente estrutural do envelope (S – *small* 226 aa) (Figura 5). Esta região S codifica proteínas de superfície do envelope do vírus (HBsAg) (SEEGER, MASON, 2000).

**Figura 5.** Representação esquemática de glicoproteínas produzidas pelo HBV.



Fonte: LAZAR et al., 2007 (Adaptado).

A fase de leitura aberta C contém a região C e pré-C. Essas regiões codificam duas RNA transcriptases: mRNA pré-genômico (pgRNA) e RNAm pré-core. O pgRNA é traduzido na proteína do HBcAg, que está presente no core do vírus em células hepáticas infectadas, contudo não é detectado no soro mas expressa na membrana do hepatócito e constitui um importante mediador da resposta imunológica à presença do HBV (TONG et al., 2005).

O HBeAg é derivado destas mesmas regiões: core e pré-core do HBV. Este antígeno é o produto da secreção produzida pelo HBcAg (KIDD-LJUNGGREN et al., 2002). Assim, o HBeAg e HBcAg são dois indicadores de replicação viral ativa (SHEN, YAN, 2014).

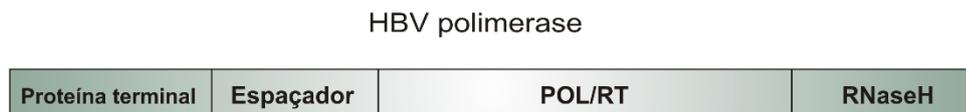
O gene P codifica a DNA polimerase viral. A polimerase dos *Hepadnavírus* é composta de quatro domínios, que incluem a proteína terminal-N (TP), uma região de espaço, um domínio de RT e um domínio de RNase H do terminal C (Figura 6) (CHANG et al., 1990; HU, SEEGER, 1996).

A polimerase viral está relacionada aos processos de incorporação do nucleocapsídeo e replicação do genoma do HBV. A qual também funciona como uma transcriptase reversa (RT) e atividade de RNase H para a degradação do pgRNA (RNA pré-genômico) durante a síntese de DNA (LANFORD et al., 1997; SUMMERS, MASON, 1982).

A RT polimerase viral é uma propensa enzima de erro, pois não tem capacidade de leitura de prova, resultando em erros frequentes que são incorporados a uma nova cadeia de DNA. A taxa de erro de transcrição com a RT polimerase é elevado ( ~ 1 por 100 bases) durante uma infecção altamente ativa produzindo uma mistura de tipos virais mutantes e selvagem. Portanto, mutações ocorrem frequentemente e podem ser selecionadas durante a

terapia antiviral (COLEMAN, 2006; GHANY, LIANG, 2007), ou seja, substituições de aminoácidos neste domínio conferem resistência a análogos de núcleos(t)ídeos (KWON, LOK, 2011).

**Figura 6.** Esquema ilustrativo da Polimerase do HBV e seus respectivos domínios.



Fonte: KWON, LOK, 2011.

O gene X codifica a proteína X. Com 154 aminoácidos, pode ser encontrada tanto no núcleo como no citoplasma do hepatócito. Sua função parece estar relacionada à regulação gênica, mas permanece ainda pouco conhecida. Este gene codifica o HBxAg, uma proteína potencialmente oncogênica, modulando a ativação da transcrição de genes de regulação do crescimento celular (BIRRER et al., 2003; HUSSAIN, LOK, 2001).

O HBsAg possui uma imunogenicidade complexa com um determinante antigênico comum às diversas variantes, designado como “a” e com dois pares de alelos mutuamente exclusivos de diferentes subdeterminantes: d/y e o w/r, que possibilita a formação de quatro subtipos principais: adw, ayw, adr e ayr (ALVARIZ, 2006; FONSECA, 2010). Assim, a heterogeneidade é causada por mutações pontuais, deleções e por recombinação gênica com genes pré-S de estirpes diferentes de HBV (GUNTHER et al., 1999).

As mutações na região determinante “a” do HBV resultam nos genótipos, onde são classificados em dez genótipos (A-J) (ZHANG, CAO, 2011), com base nas divergências de mais de 8% das sequências nucleotídicas do genoma completo (ARAUJO et al., 2011; KRAMVIS et al., 2008; OKAMOTO et al., 1988). Quanto aos subgenótipos, este devem divergir, em pelo menos 4%, em relação ao genoma (KRAMVIS et al., 2005).

Indivíduos infectados pelo HBV com a vacina contra a hepatite B ou portadores de HBs, que desenvolvem anticorpos protetores anti-HBs, pode evocar mutantes de HBV que codificam HBsAg com um alterado do determinante “a” ou subtipo atípico determinantes (HINO et al., 1995; KARTHIGESU et al., 1994). Tais mutantes podem escapar das respostas imunitárias do hospedeiro (ABDELNABI et al., 2014).

## 2.4 CICLO DE REPLICAÇÃO DO HBV

O HBV tem rigoroso tropismo pelos tecidos do fígado. Os hepatócitos infectados com vírus produzem grande quantidade de partículas de HBsAg que não contém DNA que são liberadas para o sangue e tecidos, estas partículas não infectantes de HBsAg podem ser detectadas no soro, sendo o principal marcador de infecção pelo HBV (HORVAT, 2011).

Normalmente, o HBV não é citopático em si, em vez disso, em caso de doença crônica de hepatite B, o dano hepático ocorre por causa da fase de depuração imunológica do hospedeiro contra hepatócitos infectados pelo HBV (LOK, MACMAHON, 2009).

O curso natural da infecção crônica pelo HBV, em geral, pode ser dividido em três fases: (i) imunotolerante; (ii) imunoativa; (iii) não replicativa. Existe uma divergência com relação se há ou não uma quarta fase. Para alguns autores, como Brandão-Mello (2008), a quarta fase seria a reativação, contudo para Fonseca (2007) e para Ferreira e Borges (2007) esta reativação do HBV não é considerada como uma quarta fase e sim como um fenômeno biológico característico dos *Hepadnavírus*.

Após a infecção, a deslocação do nucleocapsídeo viral para dentro da célula entra no núcleo, transportando o genoma nuclear viral (MARTIN, HELENIUS, 1991). Após a entrada, o vírus fica sem revestimento no citoplasma da célula hospedeira (SHEPARD et al., 2006; YIM, LOK, 2006). No núcleo, a síntese da fita positiva do DNA é completada e o DNA viral é convertido em cadeia dupla para DNA circular covalentemente fechado (cccDNA). O cccDNA serve como molde para a transcrição dos RNAs mensageiros, que são transportados para o citoplasma, onde proporciona a tradução do nucleocapsídeo viral e antígenos precore C (C, pré-C), polimerase (P), envelope grande (L), médio (M), pequeno (S), e proteínas de transcrição transativação (X) (Figura 7) (LEVRERO et al., 2009).



HBV-DNA detectáveis no soro. Assim, a integração do HBV-DNA representa um mecanismo fundamental subjacente a infecção oculta pelo HBV, principalmente após vários anos de infecção crônica pelo HBV (RAIMONDO et al., 1988).

A utilização da transcrição reversa de um pré-genoma intermediário, em uma das fases da replicação, faz com que o HBV, nesse processo, se assemelhe aos retrovírus (SUMMERS, MASON, 1982; TIOLLAIS et al., 1985; TIOLLAIS et al., 1981).

## 2.6 EPIDEMIOLOGIA DO HBV

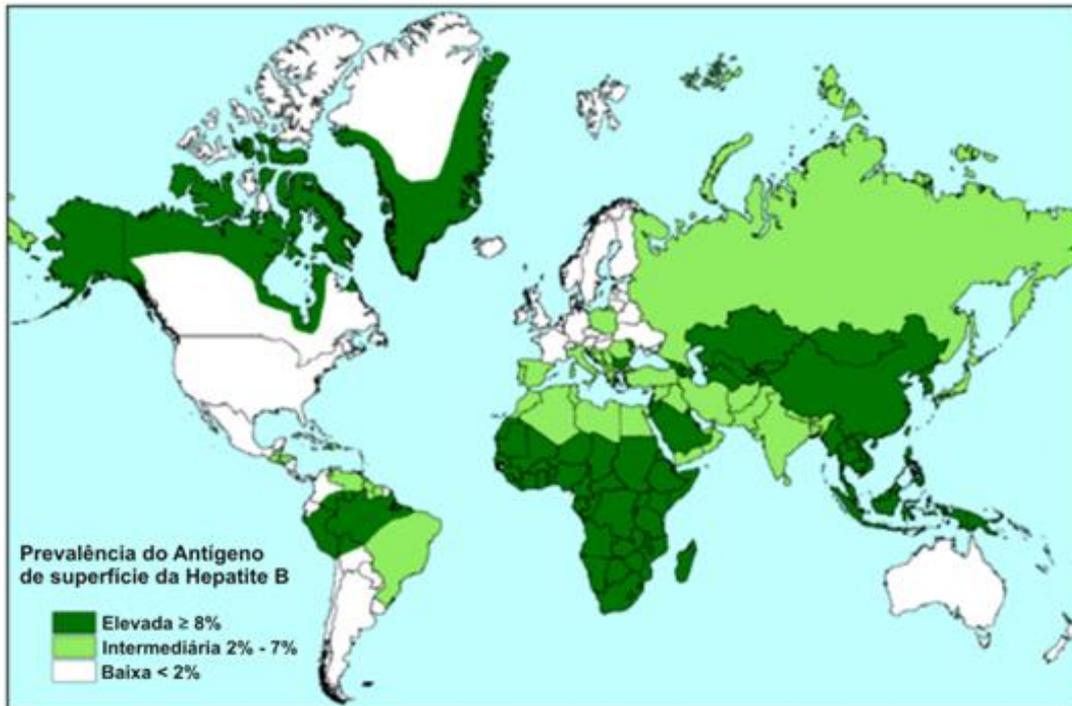
A epidemiologia da infecção pelo HBV é distinta e diversificada em todo o mundo, diferem amplamente de uma área geográfica para outra e a prevalência do HBsAg é classificado por áreas de baixa endemicidade (<2%), endemicidade intermediária (2-7%) e alta endemicidade (> 8%) em diferentes países (Figura 8) (HOU et al., 2005; SAGNELLI et al., 2014).

Nos países em desenvolvimento com maior população (Sudeste da Ásia, África subsaariana, China, Indonésia, Nigéria e da Bacia Amazônica), há maior prevalência de endemicidade (maior ou igual a 8% da presença do HBsAg). Nessas áreas de mundo, cerca de 70% - 95% da população apresenta marcadores sorológicos presentes ou passados contra HBV (COLIN et al., 2006; MARGOLIS et al., 1991).

A zona endêmica intermediária de infecção pelo HBV, como o Oriente Médio, Leste europeu e a bacia do Mediterrâneo, com taxa entre 2%-8% de infecção pelo HBV (WHO, 2002).

A zona de HBV de menor endemicidade inclui países mais desenvolvidos, como Austrália, América do Norte e do Norte e Europa Ocidental, sendo a prevalência do HBsAg inferior a 2% (WHO, 2002).

**Figura 8.** Prevalência mundial do marcador HBsAg do HBV.



Fonte: CDC, 2008 (Adaptado).

A prevalência do HBV é maior na África subsaariana e na Ásia Oriental, onde, entre 5-10% da população adulta está cronicamente infectada. Altas taxas de infecções crônicas também são encontrados na Amazônia e as regiões do sul da Europa Central e Oriental. No Oriente Médio e do subcontinente indiano, estima-se que 2-5% da população em geral é cronicamente infectada. Menos do que 1% da população na Europa Ocidental e na América do Norte é cronicamente infectada (WHO, 2015).

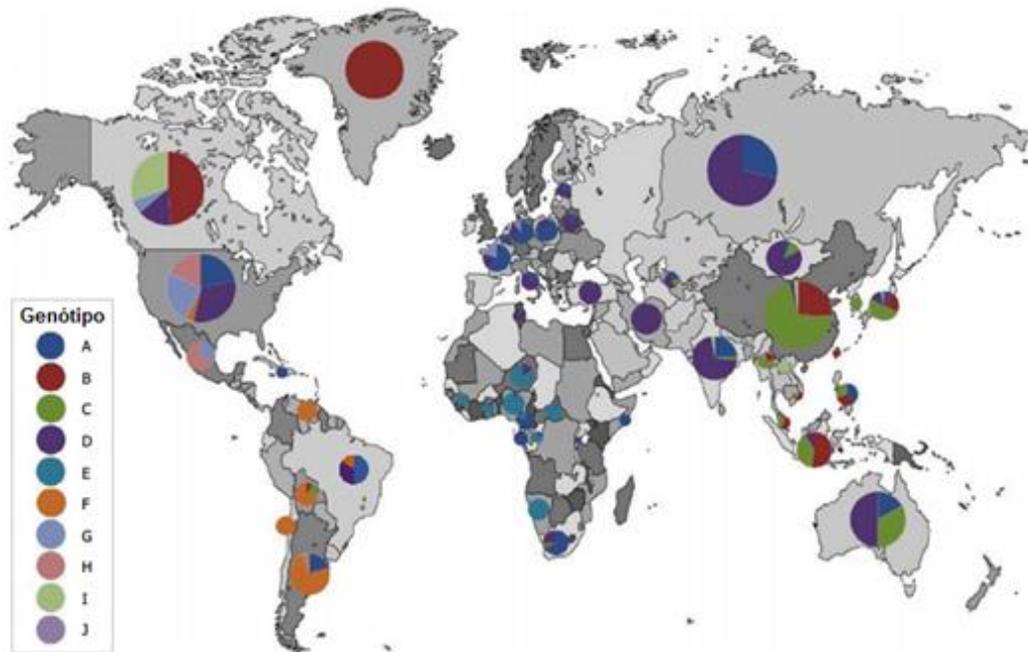
No Brasil, alguns estudos do final da década de 80 e início de 90 sugeriram uma tendência crescente do HBV, em direção à região Sul e a região Norte. Com isso, a região Amazônica, algumas áreas do estado do Espírito Santo e oeste do estado de Santa Catarina apresentam uma alta endemicidade do HBV. As regiões Nordeste, Centro-Oeste com endemicidade intermediário. Na região Sul do Brasil é considerado uma baixa endemicidade. Sendo assim, o país apresenta um comportamento heterogêneo entre suas regiões (SOARES et al., 1994).

### 2.6.1 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DOS GENÓTIPOS DO HBV

Pelo menos oito genótipos diferentes (A-H) foram identificados que diferem entre si em mais do que 8% do genoma na sua sequência de nucleotídeos, com uma distribuição geográfica distinta (LINDH et al., 1997). Além dos genótipos, existem quatro principais subtipos sorológicos de HBV classificados fenotipicamente de acordo com o determinante do antígeno de superfície (HBsAg): adw, ayw, adr e ayr, estes subgenótipos diferem em pelo menos 4% da sua sequência de nucleotídeos (BANCROFT et al., 1972; KRAMVIS et al., 2005; OKAMOTO et al., 1988; ZEKRI et al., 2007).

Muitos estudos têm relatado que os diferentes genótipos e subgenótipos possuem diferentes distribuições geográficas (Figura 9) e estão relacionados com a progressão da doença, a gravidade clínica, resposta ao tratamento antiviral e prognóstico (NORDER et al., 2004; SUNBUL, 2014).

**Figura 9.** Distribuição geográfica dos genótipos do HBV no mundo.



Fonte: SUNBUL, 2014. (Adaptado).

Todos os genótipos, exceto para E, G e H são divididos em subgenótipos e distribuídos em vários locais (CONDE et al., 2013; SCHAEFER, 2007).

O genótipo A é distribuído globalmente e é o principal genótipo encontrado na Europa, América do Norte, África e Índia (CAVINTA et al., 2009; KURBANOV et al.,

2008). Este genótipo é dividido em sete subgenótipos A1 a A7, onde o A3 (HANNOUN et al., 2005; KURBANOV et al., 2005), A4 e A5 (OLINGER et al., 2006), A6 (ALVARADO-MORA et al., 2013; POURKARIM et al., 2010) e A7 (HUBSCHEN et al., 2011) foram identificados em indivíduos africanos. Os subgenótipos A1 é de origem africana, encontrado principalmente na África subsaariana e no continente indiano, enquanto que o A2 é predominante na Europa e América do Norte (BOWYER et al., 1997; KRAMVIS et al., 2002; LAGO et al., 2014).

O genótipo B é frequentemente observado em duas principais localizações geográficas, na Ásia e no Japão (KAO et al., 2000; NI et al., 2004). Este genótipo é classificado em seis subgenótipos distintos (B1-B6). O subgenótipo B1 é encontrado principalmente no Japão, os subgenótipos B2-B5 na Ásia Oriental e o subgenótipo B6 encontrado em populações indígenas do Ártico e Groelândia (MCMAHON, 2009; SUGAUCHI et al., 2002).

O genótipo C é mais associado com o pior prognóstico relacionado a doenças no fígado, ou seja, há uma tendência maior para o desenvolvimento de cirrose e HCC, sendo encontrado frequentemente na Ásia, observado principalmente no Sudeste Asiático (CAVINTA et al., 2009; KURBANOV et al., 2008). O genótipo C é dividido do C1 a C5 (ALVARADO-MORA et al., 2013; MCMAHON, 2009)

O genótipo D é encontrado principalmente no Oriente Médio, Ásia, Europa e em países mediterrânicos. Este genótipo tem uma distribuição mundial, mas é predominante em algumas regiões, enquanto menor em outras (CAVINTA et al., 2009; KURBANOV et al., 2008; NORDER et al., 2004). Os subgenótipos são D1 a D5 (MCMAHON, 2009).

A história evolutiva do genótipo E ainda é incerta. Este genótipo é largamente difundido na África Ocidental e novos trabalhos indicam a introdução deste genótipo na África Central (ANDERNACH et al., 2009). Também já foi observado na Europa Central e Oriental (DETERDING et al., 2008) e na Colômbia (ALVARADO-MORA et al., 2010).

O genótipo F, o que constitui o grupo mais divergente (MIYAKAWA, MIZOKAMI, 2003) é originário das Américas e é o principal genótipo circulando na Argentina (FRANÇA et al., 2004; TELENTA et al., 1997), Venezuela (BLITZ et al., 1998; DEVESA et al., 2004), Bacia Amazônica Peruana (CASEY et al., 1996) e países da América Central, incluindo Costa Rica, El Salvador e Nicarágua (ARAUZ-RUIZ et al., 1997). Dois subgenótipos são propostos para este genótipo, F1 e F2, porém, há uma subdivisão em cinco conjuntos (1a, 1b, II, III, IV) com base nas comparações entre as sequências do gene S (MBAYED et al., 2001; NORDER et al., 2003). Grupos Ia e Ib associados ao subgenótipo F1, encontrados na América Central e

Argentina, respectivamente. O subgenótipo F2 com o grupo II encontrado na Nicaraguá, Venezuela e Brasil, grupo III no Panamá, Venezuela e Colômbia e IV na Argentina e Bolívia (CAMPOS et al., 2005; MELLO et al., 2007).

O genótipo G foi inicialmente identificado em estudos realizados na França, em 2000, porém também já foi descrito nos Estados Unidos e México (SAKAMOTO et al., 2006).

O genótipo H é comumente encontrado na América do Sul e Central (CAMPOS et al., 2005; WEBER, 2006).

Recentemente, por meio de análises filogenéticas, um novo genótipo foi caracterizado no Vietnã e Laos e designado como genótipo I. Além de outro novo genótipo, J, que também foi identificado, mas ainda há dúvidas sobre esta descoberta, sendo estes alvos de interesse para futuras pesquisas (HANNOUN et al., 2000; OLINGER et al., 2008; SUNBUL, 2014; STUYVER et al., 2000; YU et al., 2010). O genótipo I foi noticiado recentemente no Vietnã e Laos (OLINGER et al., 2008), enquanto que o genótipo J, foi identificado nas Ilhas Ryukyu no Japão (KRAMVIS, 2014; NORDER et al., 2004).

Os genótipos do HBV vigentes no Brasil são A, D e F (MELLO et al., 2007). A alta taxa de genótipo D na região Sul poderia estar relacionada com o fluxo de imigrantes da Europa Central (especialmente Alemanha e Itália). A distribuição equilibrada dos genótipos A e D na região Centro-Oeste pode ser explicada pela ocupação atrasada da área de migração da população (BECKER et al., 2010). Os genótipos B e C, já foram identificados em alguns indivíduos brasileiros, todos de origem asiática (RIBEIRO et al., 2006; SITNIK et al., 2004). Genótipo G também já foi observado também já foi observado no país (SILVA et al., 2010). O genótipo F é originário de populações ameríndias (TORRES et al., 2011) e, como esperado, é o mais prevalente na população indígena na Amazônia (DEVESA et al., 2008).

## 2.7 HEPATITE B OCULTA

### 2.7.1 HISTÓRICO DA HEPATITE B OCULTA

O HBV-DNA foi detectado pela primeira vez no tecido hepático de pacientes HBsAg negativos com doença hepática crônica (DHC) no início de 1980 (BRÉCHOT et al., 1985; BRECHOT et al., 1981). Posteriormente, quando os métodos baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR) tornaram-se disponível, HBO foi encontrada em indivíduos afetados e não afetados por doenças hepáticas em diferentes partes do mundo (BRECHOT et al., 2001; HU, 2002; TORBERSON, THOMAS, 2002).

Um estudo feito em 1999 e publicado no *The New England Journal of Medicine* levantou o interesse da comunidade científica desta entidade clínica, onde foi testada biópsias de fígado de uma grande série de pacientes HBsAg negativos com DHC para genomas de HBV (CACCIOLA et al., 1999). Este estudo proporcionou uma nova visão em ambos os aspectos virológicos e as possíveis implicações clínicas da HBO (RAIMONDO et al., 2008).

A infecção crônica pelo HBV é geralmente identificada pela detecção do HBsAg no soro. Contudo, o advento de técnicas moleculares de alta sensibilidade revelou a persistência de genomas de HBV em indivíduos HBsAg negativos com ou sem marcadores sorológicos da infecção anterior, ou seja, anticorpos para o HBsAg (anti-HBs) e/ou ao anticorpo contra as proteínas do core (anti-HBc). Este tipo de infecção crônica é usualmente denominado de HBO (RAIMONDO et al., 2007; TORBERSON, THOMAS, 2002). Assim, a HBO é caracterizada pela presença do HBV-DNA no soro ou no fígado na ausência de HBsAg (HOU et al., 2001; HU, 2002). O nível de HBV no soro é geralmente inferior a  $10^3$  cópias/ml, ou seja, baixos títulos de genomas de HBV (aproximadamente 200 IU/mL) (RAIMONDO et al., 2008). Apesar da HBO ter sido identificada em pacientes com doença hepática crônica, há duas décadas (BRECHOT et al., 1981), a sua prevalência exata continua indefinida (HOU et al., 2005).

Pacientes infectados com HBO podem ser soropositivos ou soronegativos. A HBO soropositiva é caracterizada pela positividade do anti-HBc com ou sem a presença do anti-HBs, enquanto que soronegativos são caracterizados pela ausência de ambos anticorpos. A HBO soropositiva constitui a maioria da infecção oculta (80%) que pode ser explicada por uma maior proporção de infecção solucionada por HBV (TORBERSON, THOMAS, 2002). A diferença em termos de impacto clínico entre indivíduos soropositivos e soronegativos é desconhecida (RAIMONDO et al., 2007; ZERBINI et al., 2008).

Mecanismos imunopatogênicos da HBO são pouco compreendidos. Várias possibilidades têm sido sugeridas, incluindo: a interferência da replicação de HBV por outros vírus (como no caso de co-infecção pelo HCV, HIV), integração do HBV-DNA nos cromossomos da célula hospedeira, a formação de complexos imunes circulantes contendo HBV, que não são detectados por ensaios de rotina de HBsAg, que determinam as respostas imunitárias do hospedeiro alteradas levando a manutenção da infecção por HBV em estado latente até que a transmissão de um outro indivíduo ocorra (principalmente no caso de terapia imunossupressora), diferentes mutações em sequência do HBV-DNA e potenciais mutações associadas à HBO (DE LA FUENTE et al., 2011; RAIMONDO et al., 2013; SAID, 2011).

A replicação viral é geralmente suprimida em indivíduos com HBO e o HBV-DNA circula em níveis extremamente baixos ou mesmo indetectáveis no soro. Apesar disso, a HBO está associada com doenças hepáticas crônicas e o risco HCC. Para explicar este paradoxo, deve notar-se que longa persistência do vírus no fígado pode causar uma necroinflamação muito leve, mas progressiva (BLACKBERG, KIDD-LJUNGGREN, 2000; YUKI et al., 2003).

Variantes HBsAg são um sério problema de saúde, não só porque eles não são detectáveis por alguns ensaios imunoenzimáticos comerciais, mas também porque podem infectar indivíduos vacinados. Assim, o surgimento de variantes de HBsAg com novas mutações devem ser monitorados entre populações dentro de áreas endêmicas para HBV (KIM, KIM 2015).

Evidências têm demonstrado que a HBO é altamente prevalente, particularmente em áreas endêmicas para o HBV (HUANG, HOLLINGER, 2014; SQUADRITO et al., 2013). Tais evidências mostram a importância clínica da HBO, no qual são responsáveis pelo crescente interesse nesta condição. O impacto da aquisição desta forma clínica são vários, desde a possibilidade da transmissão da infecção, o risco de reativação da infecção, a contribuição para a progressão de doenças hepáticas graves, como fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC), além de poder estar relacionada com doença hepática crônica criptogênica, ou seja, sem etiologia conhecida (CHAN et al., 2002; CHEMIM et al., 2001).

Considerando todos os dados mencionados acima, a clínica leva em consideração a presença de HBO em várias categorias de pacientes, como os indivíduos imunodeprimidos e cirróticos com HBO, que têm um risco muito elevado de reativação viral e desenvolvimento das doenças hepáticas, respectivamente (SQUADRITO et al., 2014).

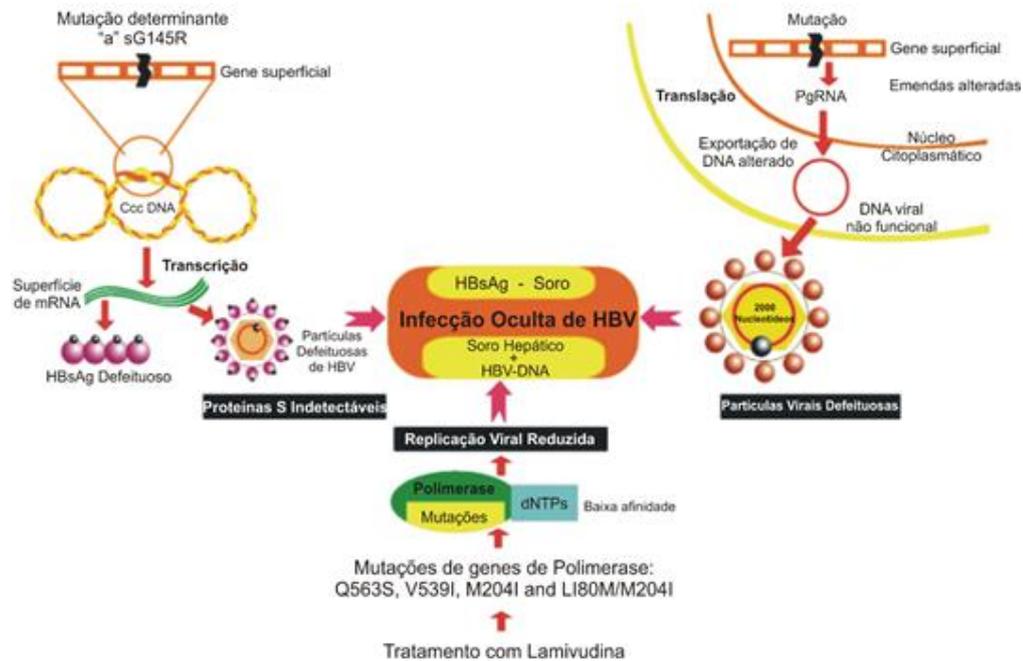
### 2.7.2 MUTAÇÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À HEPATITE B OCULTA

Seguindo os avanços nas técnicas moleculares, a classificação baseada nos sorotipos do HBV foi estabelecida com base nas variantes na grande região hidrofílica (MHR) (POURKARIM et al., 2014). A presença de mutantes de escape nesta região dá a variantes do HBV uma vantagem de sobrevivência distinta, permitindo que o vírus mutante escape do sistema imunológico (SUPPIAH et al., 2014).

As alterações estruturais em HBsAg induzidas por meio de mutações no determinante “a” ou em outro local, levam a uma redução na afinidade dos anticorpos em ensaios de diagnóstico de HBV (SAMAL et al., 2012). As mutações no determinante “a” do gene S

ocorrem com frequência em infecção por HBO são um risco potencial para a segurança do sangue (Figura 10) (ALLAIN et al., 2013; GERLICH et al., 2010).

**Figura 10.** Mutações do genoma associadas com o desenvolvimento da infecção pela HBO.



Fonte: MORALES-ROMERO et al., 2014 (Adaptado).

As mutações pontuais no gene S resultam em substituições de aminoácidos do determinante antigênico comum “a”, que se encontra entre os aminoácidos 124 - 147, podendo alterar epítipo de células B contra o HBsAg, levando a variantes que escapam da resposta imune do hospedeiro induzida por infecção anterior. Assim, a sugestão de um aumento na área de investigação na região S para incluir toda a MHR, que compreende aminoácidos 99 a 169 estão sendo avaliados (HSU et al., 1997).

Uma das mutações observadas é a presença de timina no nucleotídeo (nt) 1858, que forma um par de bases com a adenina no nt 1896, cria um sinal de encapsidação do RNA pré-genômico mais forte, aumentando a eficiência da replicação viral apesar dos anticorpos contra o HBV (ELOY et al., 2013).

A mutação comumente encontrada nos pacientes com HBO é uma substituição de G para A no nt 1896, que impede a produção íntegra de HBsAg, através de um códon de parada prematuro no quadro de leitura aberta (ORF) da região do pré-core (BRUNETTO et al., 1990;

CARMAM et al., 1989). Também deleções no promotor da região preS/S foram observados em vários estudos sobre HBO, causando uma parada precoce, causando uma proteína S truncada (CHAUDHURI et al., 2004).

A mutação G145R foi encontrada em pacientes pós vacinação, mas não em pré vacinação, sugerindo um mutante de escape de vacina, sendo a mutação mais frequente e estável (HSU et al., 2004). Esta mutação é associada a resistência ao anti-HBs onde há uma substituição de Glicina para Arginina na posição 139 a 147 do aminoácido (CARMAM et al., 1990; CHEN et al., 2011; YAMAMOTO et al., 1994).

Em um recente estudo feito em doadores de sangue infectados com HBO, o polimorfismo L217R no gene da polimerase foi significativamente maior do que em indivíduos HBsAg positivos, indicando um bom marcador molecular (OLUYINKA et al., 2015).

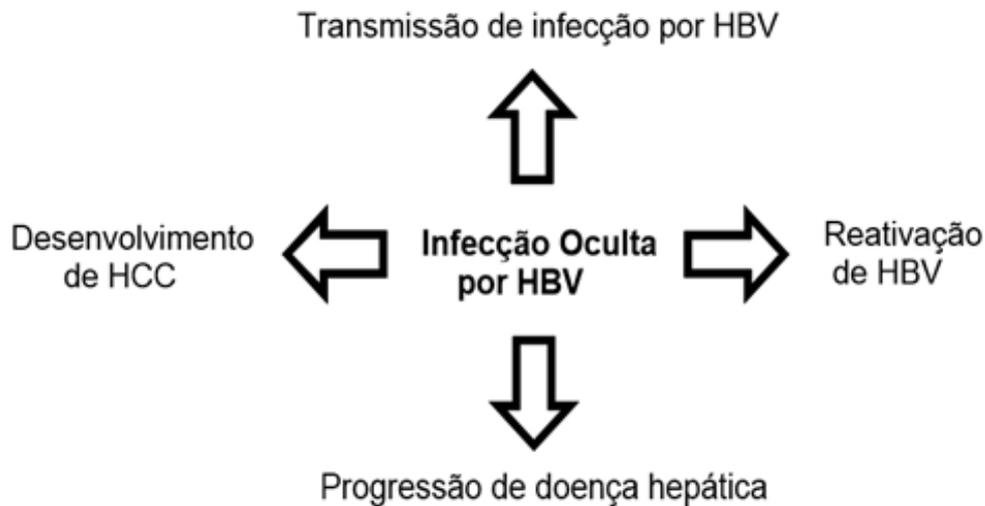
Em outra pesquisa foi observado que as frequências de mutações na região do HBsAg foram significativamente maiores em indivíduos com infecção oculta pelo HBV, com as mutações I / T126N / S dentro do determinante “a” e W182L acarretando em um códon de parada fora da MHR, causando uma proteína S truncada e não reconhecida por ensaios imunoenzimáticos comerciais (KIM, KIM, 2015).

Algumas destas mutações já foram detectadas em pacientes imunocomprometidos e responsáveis também pela reativação do HBV escapar do anti-HBs. Algumas destas mutações no HBsAg podem resultar na falha de detecção do vírus no rastreio de rotina (CALIGIURI et al., 2016).

### 2.7.3 IMPACTO CLÍNICO DA HEPATITE B OCULTA

As implicações clínicas da HBO envolvem diferentes contextos clínicos da seguinte forma: (1) abrigando risco potencial de transmissão do HBV através de hemodiálise, transfusão de sangue e transplante de órgãos; (2) causando doença hepática criptogênica; (3) contribuindo para a progressão da doença hepática ou mesmo HCC; e (4) afetando a resposta à terapia antiviral para pacientes com infecção crônica por HCV (Figura 11) (COVOLO et al., 2013; HASEGAWA et al., 2005).

**Figura 11.** Representação esquemática das possíveis implicações clínicas relatada na HBO.



Fonte: SQUADRITO et al., 2014 (Adaptado).

Diferentes estudos demonstraram que portadores de mutações de escape do HBV reduziram a afinidade de ligação de anticorpos anti-HBs com o HBsAg, incluindo anticorpos gerados da vacina, o que pode permitir a infecção apesar da vacinação (CARMAM et al., 1990; CHANG, 2010; KARTHIGESU et al., 1994; KOMATSU et al., 2012; LOCARNINI, YUEN, 2010; MELE et al., 2001).

As mutações pontuais, deleções e splicings alternativos têm sido associadas com a HBO, mas não está claro se essas mutações são uma causa ou uma consequência da HBO. Muitas destas infecções associadas a mutações ocultas ocorrem no gene e/ou regiões que regulam a expressão do gene S, mas também têm sido documentadas para genes da polimerase (P) e genes do núcleo (C) (HEMERT et al., 2008).

Com isso, a HBO pode exercer atividade oncogênica através de mecanismos diretos e indiretos, e pode afetar a progressão da doença hepática e carcinogênese hepática em pacientes com outras causas virais, particularmente HCV, bem como naqueles com doenças hepáticas independentes (NISHIKAWA, OSAKI, 2013).

#### 2.7.4 FATORES DE RISCO PARA TRANSMISSÃO DA HEPATITE B OCULTA

O risco de transmissão da HBO em doadores que são HBsAg negativo e anti-HBc positivo é muito baixo após o transplante de rim, coração ou de medula óssea, porém, mais

elevado em transplante de fígado (17-90%), especialmente se o destinatário é negativo para todos marcadores sorológicos HBV (DE LA FUENTE et al., 2011; TABOR et al., 1979).

A HBO é a principal causa de infecção pelo HBV pós transfusão nos países ocidentais e em países como a Índia e Taiwan, com maior risco de transmissão do que para HCV ou HIV (LIU et al., 2006; REGAN et al., 2000).

Populações de alto risco para infecções com transmissão parenteral têm sido amplamente investigados para HBO (TORBENSON et al., 2004).

A transmissão do HBV em indivíduos com HBO pode ocorrer via transplante de órgãos ou transfusão de sangue (GERLICH et al., 2007). Uma pesquisa ressaltou a necessidade de verificar a presença do HBV-DNA no soro, especialmente em casos de HBsAg negativo no sangue antes da transfusão (HEMERT et al., 2008).

#### 2.7.5 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE B OCULTA

A prevalência global de HBO varia de acordo com a região geográfica, mas também depende muito da especificidade e sensibilidade dos testes sorológicos ou testes de ácidos nucleicos (NAT) de rotina, das diferentes populações estudadas e dos critérios de inclusão e exclusão (MORALES-ROMERO et al., 2014; RAIMONDO et al., 2008), com a endemecidade da HBO variando 0% - 89,5% (HOFER et al., 1998; NUNES et al., 2002).

A taxa de HBO estimada em pacientes anti-HBc positivos varia em torno de 4% - 25% (LIU et al., 2006). A HBO está prevista para ser uma forma difundida em todo o mundo, onde a prevalência é maior em populações com alto risco de infecções transmitidas parentericamente e geralmente dependente do nível de endemecidade de HBV nas diferentes áreas geográficas (RAIMONDO et al., 2007; TORBENSON, THOMAS, 2002). Com isso, o HBV-DNA é detectável em cerca de um terço dos portadores do HCV, HBsAg-negativos na Bacia do Mediterrâneo e em mais de 50% em países do Extremo Oriente da Ásia (TORBENSON, THOMAS, 2002).

Um total de 20% dos casos HBO são negativos para todos os marcadores sorológicos da infecção pelo HBV, exceto o HBV-DNA. Isto levanta um cenário muito importante de subdiagnóstico da HBO, especialmente nos países latino-americanos (MORALES-ROMERO et al., 2014).

Estudos realizados nos EUA em doentes de origem caucasiana submetidos a transplante de fígado para cirrose relacionada com HCV mostrou que 50% destes indivíduos tinham HBO (SHETTY et al., 2008). A prevalência da HBO nos EUA varia de 0-45% com as

taxas mais elevadas em pacientes co-infectados com HIV e/ou HCV (TORBENSON et al., 2004). Estes dados são particularmente surpreendentes e relevantes, tendo em conta que a prevalência do HBV na população americana branca é um dos mais baixos do mundo (SHOUVAL, 2008).

Minuk e colaboradores (2005) detectaram uma prevalência de HBO em 18% daqueles com evidência sorológica de infecção pelo HBV anterior (anti-HBc reagente) e 8% dos HBV soronegativos (todos os marcadores negativos). Kim e colaboradores (2007) encontraram HBV-DNA em 16% dos indivíduos saudáveis coreanos com os valores normais de transaminases e que estavam HBV/HCV negativos.

Ainda há poucos estudos sobre a presença da HBO no Brasil (ALENCAR et al, 2007). Silva e colaboradores (2005) encontraram uma prevalência de HBO em 3,3% entre doadores de sangue reativos para anti-HBc em Porto Alegre, no sul do Brasil, enquanto Arraes e colaboradores (2003) observaram 2,7% de HBO entre os doadores de sangue anti-HBc reativos em Recife. Enquanto em um estudo recente feito em um banco de sangue no Estado do Amazonas, revelou a prevalência de 1% (6/291) da HBO, estes 6 doadores tinham anti-HBs  $100 \text{ mIU} \geq / 1$  (MORESCO et al., 2014).

#### 2.7.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE B OCULTA

O padrão de ouro para o teste HBO é a análise da extração de DNA a partir de tecidos de fígado realizados através da utilização de técnicas altamente sensíveis e específicas, como a PCR ou qPCR (em tempo real). Este padrão se tornou possível por meio de testes de amplificação de ácidos nucleicos (NATs) (RAIMONDO et al., 2008).

No entanto, amostras de tecido do fígado estão disponíveis apenas em uma minoria dos casos, uma vez que a biópsia de fígado não pode ser executada na maioria dos indivíduos. Assim, a análise das amostras de soro ou plasma é a abordagem mais comum para identificar os casos infectados pela HBO (RAIMONDO et al., 2008).

A definição da HBO foi padronizada em 2008, na cidade de Taormina, Itália. As recomendações para detecção da HBO foram a utilização de iniciadores oligonucleotídeos específicos para regiões genômicas diferentes do HBV e serão complementares as sequências conservadas de nucleótidos (RAIMONDO et al., 2008). Estes marcadores podem ser observados na tabela 1.

**Quadro 1.** Marcadores sorológicos e moleculares para o HBV em diferentes estados de persistência.

	HBV DNA	HBsAg	anti-HBc total	HBeAg	anti- HBe
<b>Hepatite B crônica</b>	+++	+	-	+	-
<b>Hepatite B crônica (variações pré-núcleo)</b>	++	+	-	-	+ / -
<b>Portador saudável</b>	< 10 <sup>6</sup> IU/mL	+	-	-	+
<b>HBO soropositivo</b>	< 1000 IU/mL	-	+ / -	+ / -	+ / -
<b>HBO soronegativo</b>	< 1000 IU/mL	-	-	-	-

Fonte: OCANA et al, 2011

### 3. JUSTIFICATIVA

A infecção crônica pelo HBV é um grande problema de saúde pública em todo o mundo por causa do risco substancial de suas complicações para o progresso em direção à doenças hepáticas (CHANG, 2010; HUANG, HOLLINGER, 2014). É observado uma grande frequência de morbidade e mortalidade em relação ao HBV, especialmente nos países em desenvolvimento (FERNANDES et al., 1999; LIN et al., 2005; WANG et al., 2007). Cerca de 10% -30% dos pacientes com infecção crônica pelo HBV estão em maior risco de desenvolver uma doença hepática progressiva (DENG et al., 2012; JANSSEN et al., 2004).

Apesar do número crescente de pesquisas que avaliam a prevalência da infecção pelo HBV e a introdução de vacinas profiláticas contra o vírus no início da década de 80, ainda há questões cruciais para elucidar o vírus e a infecção, que continuam sendo um dos mais graves problemas de saúde (ALMEIDA et al., 2006; GUIRGIS et al., 2010; LIANG, 2009; SHI et al., 2010; VALENTE et al., 2005).

No Brasil, aproximadamente 15% da população já esteve em contato com o HBV, e de 1 a 3% da população está infectada cronicamente (FERNANDES et al., 1999). O caráter endêmico da HBV no Brasil é bastante heterogêneo, sendo esta infecção mais prevalente na região Norte do país, que engloba a Amazônia brasileira (FERNANDES et al., 1999; KAO, CHEN, 2002).

Vários estudos têm indicado que a infecção de HBO, caracterizada pela ausência do marcador HBsAg nos exames imunoenzimáticos em pacientes com hepatite crônica podem levar à cirrose e/ou desenvolvimento posterior do HCC. (SAGNELLI et al., 2008; CHAMORRO et al., 2005).

Atualmente, há uma escassez de pesquisas científicas na região relacionadas a hepatite B oculta. Assim, faz-se de grande necessidade o conhecimento da prevalência em nosso meio para melhor compreensão do seu papel patogênico e suas repercussões clínicas (BARROS JÚNIOR et al., 2008).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar a prevalência da hepatite B oculta nos pacientes HBsAg negativos, anti-HBc positivos e anti-HBs negativos, atendidos no NMT-UFPA entre 2011 a 2015.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença do HBV-DNA em amostras HBsAg e anti-HBs não reagente e anti-HBc reagente.
- Determinar os genótipos virais circulantes em indivíduos com HBO.
- Analisar possíveis mutações em uma região do gene S relacionadas ao ocultismo do HBV.
- Descrever perfil epidemiológico dos pacientes com hepatite B oculta atendidos no NMT-UFPA.
- Identificar os principais fatores de risco para aquisição da infecção pela hepatite B oculta a que esta população se encontram expostas.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1 CASUÍSTICA**

#### **5.1.1 DESENHO DO ESTUDO**

O estudo é do tipo transversal analítico, com amostras obtidas por conveniência, onde foi estimado a prevalência da infecção pelo HBV, verificando a presença da hepatite B oculta nos pacientes atendidos no ambulatório do NMT-UFPA.

#### **5.1.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

O estudo compreendeu um total de 181 indivíduos, de ambos os sexos, atendidos no NMT-UFPA, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015, com sorologia negativa para HBsAg e sorologia positiva para anti-HBc.

#### **5.1.3 OBTENÇÃO DOS DADOS SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICOS**

A obtenção dos dados epidemiológicos foi realizada através de formulários epidemiológicos (Apêndice 1), que coletou informações, tais como, idade, gênero, uso de drogas, número de parceiros sexuais, transfusões sanguíneas, condições socioeconômicas.

#### **5.1.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO**

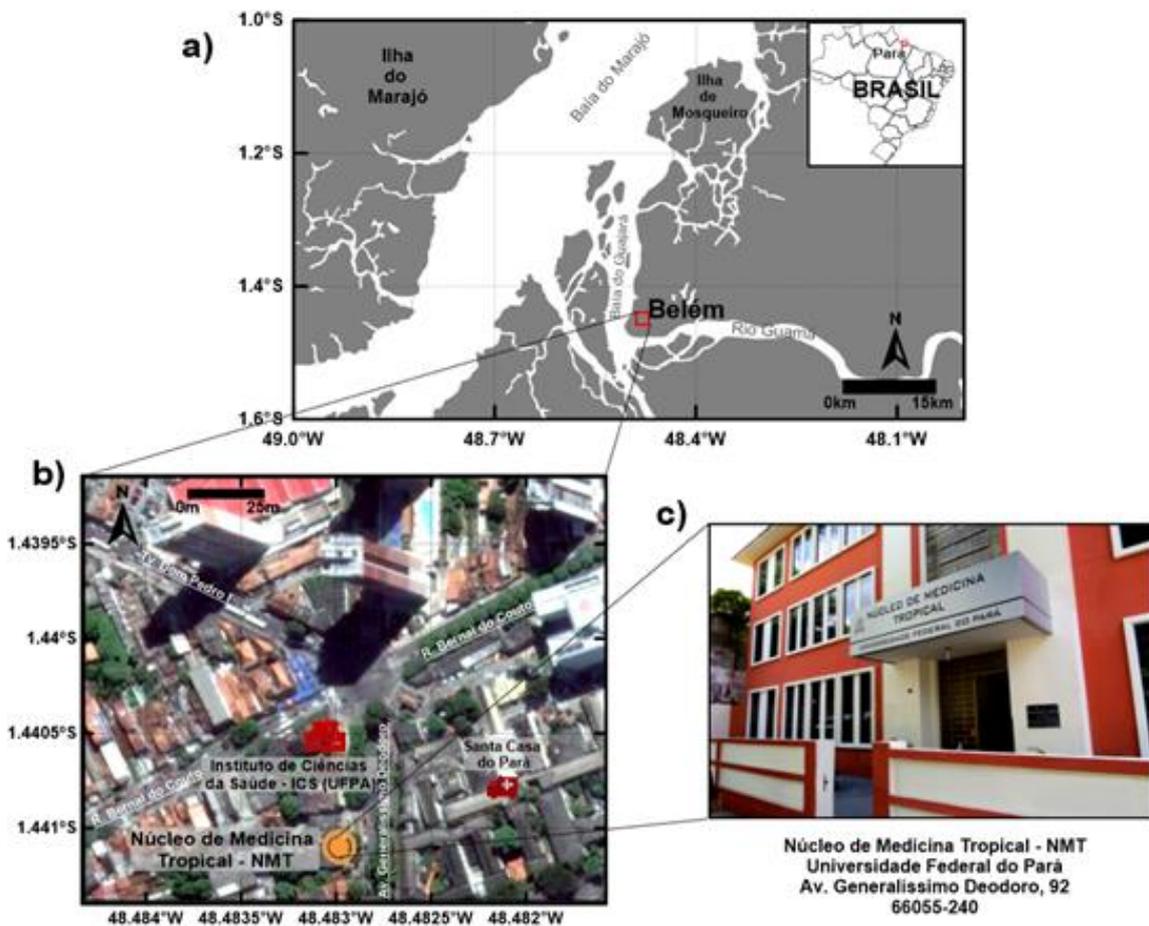
Critério de inclusão: Idade igual ou acima de 18 anos, ter sido atendido no Núcleo de Medicina Tropical (NMT-UFPA), ter sorologia negativa para o marcador HBsAg e anti-HBs, sorologia positiva para o marcador anti-HBc e livre concordância em participar do estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A).

Critério de exclusão: Ser portador de deficiência mental aparente, possuir dados incompletos.

### 5.1.5 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no ambulatório do NMT-UFPA, onde os procedimentos laboratoriais foram feitos no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais (LPCDT). A localização do NMT pode ser observada na figura 12.

**Figura 12.** A) Localização do município de Belém, capital do Estado do Pará, no norte do Brasil. B) Imagem georeferenciada da localização do NMT (Fonte: Google Earth). C) Fotografia ilustrativa do NMT com logradouro.



Fonte: Google Maps, 2015.

### 5.1.6 ASPECTOS ÉTICOS

Esse estudo é um subprojeto de um projeto de pesquisa maior intitulado “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”. Possuindo parecer do CEP do Núcleo de Medicina Tropical, sob o número do parecer 138.638 (Anexo B).

Todos os participantes do estudo receberam esclarecimento sobre a pesquisa e sua importância, que foi mediante a assinatura do TCLE, conforme preconiza a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

## 5.2 MÉTODOS LABORATORIAIS

### 5.2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Foi coletado de cada participante aproximadamente 10 ml de sangue periférico através de punção venosa. As amostras sanguíneas foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rcf e o soro recolhido e colocado em frasco devidamente identificado, armazenado a temperatura de -80°C para posterior uso.

### 5.2.2 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS HEPATITES VIRAIS

Um total de 465 amostras foram submetidas ao teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), sendo testados marcadores específicos para o HBV (HBsAg, anti-HBc total e anti-HBs), utilizando kit imunoenzimático comercial (DiaPro, Itália), utilizados de acordo com as instruções de uso recomendadas pelo fabricante do kit.

### 5.2.3 DETECÇÃO POR BIOLOGIA MOLECULAR DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS VIRAIS

Foram realizados testes de biologia molecular em 181 pacientes dos quais apresentavam os seguintes resultados na sorologia: HBsAg não reagente, anti-HBc reagente e anti-HBs não reagente.

#### 5.2.3.1 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO ÁCIDO NUCLÉICO

A extração do HBV-DNA foi feita a partir de 200 µL do soro dos pacientes utilizando kits comerciais QIAamp DNA mini kit, (Qiagen, Alemanha). Os procedimentos para as extrações foram realizados de acordo com as normas do fabricante (Anexo C).

### 5.2.3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DO DNA VIRAL

Para a realização da PCR para detecção do HBV-DNA (região C) foi utilizado 2µL de DNA, na mistura da reação: 12,5 µL de Taq Green (Promega, EUA), 8,5 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase, 1 µL de cada oligonucleotídeos iniciadores HBVS (5' TCT GCG AGG CGA GGG AGT TCT 3' - sense) e HBVA (5' TTG CCT TCT GAC TTC TTT CC 3' - antisense) (Tabela 2), para um volume final de 25 µL.

**Quadro 2.** Primers utilizados na detecção do HBV-DNA.

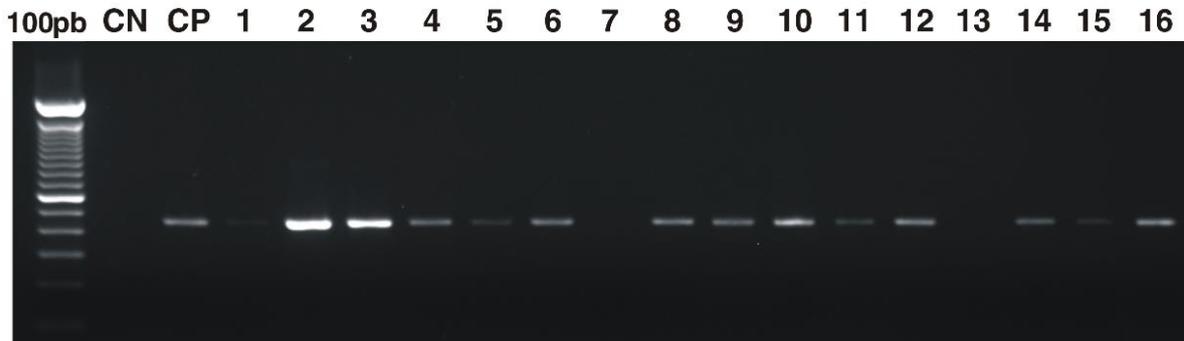
<i>Primer</i>	<i>Posição</i>	<i>Sequência 5' → 3'</i>	<i>Referência</i>
<b>REGIÃO C</b>			
HBV S	2401 - 2381	TCT GCG AGG CGA GGG AGT TCT	García et al., 1995
HBV A	1955 - 1974	TTG CCT TCT GAC TTC TTT CC	

Fonte: GARCÍA et al., 1995.

A reação foi submetida as seguintes temperaturas: 94<sup>0</sup> C por 3 minutos para a desnaturação inicial, 94<sup>0</sup> C por 30 segundos, 55<sup>0</sup> C por 30 segundos e 72<sup>0</sup> C por 30 segundos, com uma extensão final de 72<sup>0</sup> C por 3 minutos seguida de 35 ciclos. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% (1,5 g de agarose e para 100 mL de tampão TBE 1X) corado com 1,5 µL de Brometo de Etídio e submetidos à corrente elétrica (100 V, 500 A) durante 60 minutos para que ocorresse a migração dos fragmentos.

Os resultados foram visualizados em transiluminador através de luz UV (ultravioleta) e as imagens dos géis foram capturadas com o sistema de fotodocumentação L-Pix STi (Loccus Biotecnologia, Brasil). Foi utilizado o peso molecular (PM) para auxiliar na identificação do tamanho dos fragmentos, no qual foi visto o padrão de 447 pares de bases (pb) (Figura 13).

**Figura 13.** Foto do gel de agarose a 1,5% com a positividade do HBV-DNA.



Fonte: Arquivo do LPCDT. Legenda: PM: peso molecular (100pb), CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1-16 amostras dos pacientes com HBsAg e anti-HBs negativos e anti-HBc positivos.

### 5.2.3.3 AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE S - *NESTED-PCR*

Os pacientes positivos para a PCR do HBV-DNA foram submetidos a uma nova PCR utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores, FHBS1 (Eurofins, Alemanha) e RHBS1 (Eurofins, Alemanha) na primeira reação de amplificação e reamplificação do produto amplificado com os iniciadores FHBS2 (Invitrogen, Alemanha) e RHBS2 (Invitrogen, Alemanha) na segunda reação, conforme são observados na tabela 3.

**Quadro 3.** Primers utilizados nas amplificações do gene S do HBV. Posição dos iniciadores no GenBank: V00866.

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

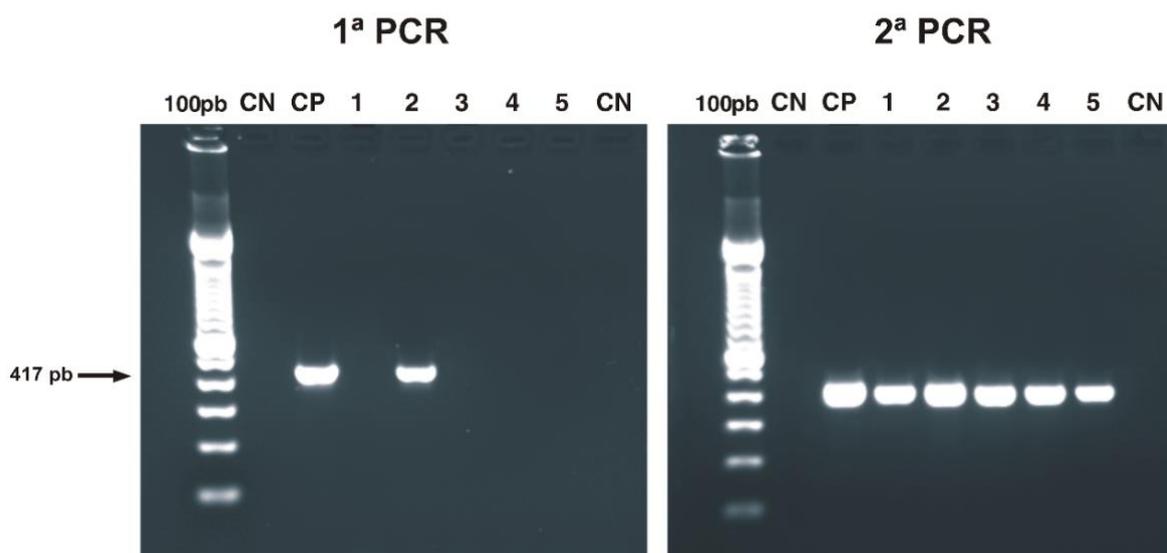
Fonte: SITINIK et al, 2004. F: foward; R: reverse. Legenda: foward: Para frente, reverse: reverso.

Estes oligonucleotídeos iniciadores selecionados corresponderam a regiões conservadas entre os diferentes genótipos, permitindo a distinção dos genótipos do HBV (SITNIK et al, 2004).

Para a preparação da reação, os oligonucleotídeos FHBS1 e RHBS1, foram utilizados, com os seguintes reagentes e concentrações: 12,5 µL de Taq Green (Promega, EUA) 8 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase, 1 µL de cada oligonucleotídeos e 3 µL de DNA, para um volume final de 25 µL. Para a segunda reação foram utilizadas a mesma quantidade de reagentes, substituindo os oligonucleotídeos por FHBS2 e RHBS2. As reações foram submetidas as seguintes temperatura: 94° por 20 segundos para uma desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos de 94° C por 20 segundos, 57° C por 20 segundos e 72° C por 20 segundos, com uma extensão final de e 72° C por 1 minuto.

O produto da reação foi apliado em um gel de agarose à 1,5% (1,5 g de agarose para 100 mL de TBE 1X) corado com 1,5 µL de Brometo de Etídio e submetido a eletroforese (100 V, 500 A) durante 60 minutos, com visualização do fragmento de amplificação de 417 pb através do transiluminador L-Pix STi (Loccus Biotecnologia, Brasil) de luz ultravioleta. As amostras HBV-DNA positivas foram usadas como controle positivo e uma reação sem o DNA foi usada como controle negativo afim de excluir reagentes contaminados (Figura 14).

**Figura 14.** Foto do gel de agarose a 1,5% mostrando a primeira PCR e a segunda PCR com as mesmas amostras.



Fonte: Arquivo do LPCDT. Legenda: PM (peso molecular): 100pb. CP: controle positivo. CN: controle negativo. Amostras 1 – 5.

#### 5.2.3.3 PURIFICAÇÃO DO GEL DE AGAROSE

Os produtos de amplificação correspondentes a segunda reação da *nested*-PCR foram extraídos a partir do gel de agarose à 2% e purificados utilizando o kit PureLink® Quick Gel Extration kit (Invitrogen, Alemanha). A solução final de produtos de PCR purificados foi de 20 µL. Os procedimentos para as purificações foram realizados de acordo com as normas do fabricante (Anexo D).

#### 5.2.3.4 REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

Para caracterizar as estirpes do vírus, os produtos de reamplificação parcial do gene S foram submetidos a um ciclo de PCR linear visando a incorporação de didexonucleotídeos terminal com kit BigDye *terminator Cycle Sequencing V3*, de acordo com as instruções do fabricante e eletroforese no sequenciador ABI 3500 XL (Applied Biosystem, CA) com as concentrações de DNA com 200-500 ng.

As sequências foram analisadas em ambas as direções (*foward* e *reverse*) usando os oligonucleotídeos FHBS2 e RHBS2.

#### 5.2.3.5 EDIÇÃO E ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

Para confirmar as cepas virais circulantes, 26 sequências obtidas analisadas utilizando a ferramenta BLAST do GenBank. Subsequentemente, as sequências foram editadas utilizando o programa GENEIOUS 9.0.5 (Biomatters) e alinhadas com sequências de outros vírus disponíveis no banco de dados do Genbank (Tabela 4), utilizando o programa MEGA versão 6.06 (TAMURA, 2013).

**Quadro 4.** Sequências referências dos genótipos a partir do número de acesso do GenBank.

<b>Genótipos</b>	<b>Número de Acesso no GenBank</b>
A	AY934768, AB014370, AJ692600
B	AB010290, DQ46397
C	X75656, AB241109
D	FJ04438, GU456684, AB493846, JF754597, CQ205389
E	75664
F	EU66132, JN792920, DQ899150, X69798
G	AF369533
H	AB516394

Fonte: Do autor.

O modelo de Neighbor-Joining (NJ) foi utilizado para a construção da árvore filogenética. As distâncias genéticas foram estimadas utilizando o método Kimura dois parâmetros (KIMURA, 1980) e sua significância estatística foi testada pelo método bootstrap (1.000 repetições).

#### 5.2.3.6 ANÁLISES NUCLEOTÍDICAS DE POSSÍVEIS MUTAÇÕES

As sequências nucleotídicas obtidas pelo sequenciamento foram alinhadas e comparadas com sequências obtidas no GenBank onde o marcador sorológico HBsAg era reagente, para possíveis observações de substituições de nucleotídeos e mutações no gene S.

O número de acesso no GenBak do genótipo A são: AY934768, AB014370, AJ692600, LC034913, AB191389, DQ459086 e EU304333. Do genótipo F, as amostras do GEnBank de referência são: EU66132, JN792920, DQ899150, X69798 e DQ121370.

### 5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos através dos questionários foram inseridos em planilha no Excel 2010 e posteriormente transportados para o Programa BioEstat 5.0 (AYRES, et al, 2012), onde foi aplicado os testes G de Williams e *Odds Ratio* (OR).

Foi empregado OR para duas amostras independentes, usado para calcular a vantagem ou desvantagem de um dos eventos em relação ao outro (sucesso ou insucesso), que podem indicar

ou não a associação entre os pacientes com a presença do HBV-DNA em relação aos pacientes sem a presença do HBV-DNA. O teste G de Williams foi utilizado para a amostras independentes com mais de duas variáveis. A significância estatística aceita foi de 5% (valor de  $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

Um total de 465 pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical foram analisados para a soroprevalência dos marcadores para o HBV (HBsAg, anti-HBc e anti-HBs). Deste total, 49,03% (228/465) eram homens e 50,96% (237/465) eram mulheres. A média de idade foi de 38,86 anos.

Baseado nos resultados sorológicos, apenas 181 pacientes apresentavam o perfil sorológico HBsAg não reagente, anti-HBc reagente e anti-HBs não reagente, marcadores de interesse para o estudo para a detecção do HBV-DNA (Tabela 1).

**Tabela 1.** Distribuição dos pacientes com o perfil do estudo para HBO por sexo, grupo etário, estado civil e que se declaram vacinados atendidos no NMT-UFPA, Pará, Brasil.

<b>Características</b>	<b>N %</b>
<b>Nº de pacientes</b>	
Homens	103 (56,90%)
Mulheres	78 (43,09%)
<b>Faixa etária (anos)</b>	
18 - 28	26 (14,36%)
29 - 39	65 (35,91%)
40 - 50	49 (27,07%)
51 - 61	29 (16,02%)
62 - 72	9 (4,97%)
>73	3 (1,65%)
<b>Estado civil</b>	
Casados	111 (61,32%)
Solteiros	70 (38,67%)
<b>Declaram imunização</b>	
Vacinados	48 (26,51%)
Não vacinados	133 (73,48%)

Fonte: Do autor.

Com relação aos pacientes que apresentavam o perfil do estudo para HBO, a prevalência foi de 56,9% de homens em comparação as mulheres, com 43,09%. A média de idade foi de 41 anos, com a faixa etária mais predominante dos 29 anos aos 50 anos, com 63% dos indivíduos. Ressalta-se que os entrevistados declarados divorciados e viúvos no formulário foram agrupados entre os indivíduos solteiros. Os pacientes que se declararam imunizados, cerca de 26,51% com o HBV-DNA e 73,48% sem o HBV-DNA, não possuíam o marcador sorológico correspondente a vacinação, o anti-HBs. Deste modo, nenhum dos pacientes do estudo estavam imunizados contra o vírus.

Após a realização dos testes moleculares, encontrou-se uma prevalência em torno de 14% (26/181), dos indivíduos com PCR positiva para o DNA viral. A média de idade encontrada foi de 39 anos. Foi observado uma grande frequência de ambos os grupos (com e sem HBV-DNA) para a faixa etária entre 31 a 56 anos, com 61,53% dos pacientes HBO e 67,74% dos pacientes saudáveis nesta faixa etária. Na tabela 2, podemos observar a distribuição por sexo, faixa etária, estado civil, e que se declaram imunizados nos grupos com a presença do HBV-DNA e pacientes com a ausência do HBV-DNA, não sendo observada diferença entre eles em nenhuma das variáveis.

**Tabela 2.** Distribuição dos pacientes HBV-DNA positivos e HBV-DNA negativos por grupo etário, sexo, estado civil e que se declaram vacinados atendidos no NMT-UFPA, Pará, Brasil.

<b>Características</b>	<b>HBV-DNA positivos N (%)</b>	<b>HBV-DNA negativos N (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>P</b>
<b>Nº de Pacientes</b>				
Homens	13 (50%)	88 (56,77%)	0,76	0,66
Mulheres	13 (50%)	67 (43,22%)	(0,33 – 1,74)	
<b>Estado civil</b>				
Casados	14 (53,84%)	97 (62,58%)	1,43	0,52
Solteiros	12 (46,15%)	58 (37,41%)	(0,62 – 3,31)	
<b>Faixa etária (anos)</b>				
18 – 30	7 (26,92%)	30 (19,35%)		
31 – 43	11 (42,30%)	60 (38,71%)	1,62	0,39
44 – 56	5 (19,23%)	45 (29,03%)	(0,66 – 3,96)	
> 57	3 (11,53%)	20 (12,9%)		
<b>Declaram Imunização</b>				
Vacinados	6 (23%)	42 (27,09%)	0,80	0,88
Não vacinados	20 (77%)	113 (72,9%)	(0,30 – 2,14)	

Fonte: Do autor.

As variáveis socioeconômicas dos pacientes do estudo foram descritas na tabela 3. Em relação ao grau de instrução, a taxa encontrada para maioria dos indivíduos com grau de instrução até o ensino médio incompleto foi de 58%, nos pacientes com a presença do HBV-DNA. A taxa encontrada nos pacientes saudáveis foi de 64,51% com o grau de instrução até o ensino médio incompleto, onde há uma baixa escolaridade encontrada em ambos os grupos, não havendo diferença significativa em relação a esta variável.

**Tabela 3.** Descrição dos dados socioeconômicos dos pacientes com a presença do HBV-DNA e sem a presença do HBV-DNA.

<b>Variáveis</b>	<b>HBV-DNA positivos</b>	<b>HBV-DNA negativos</b>	<b>G-Williams (P valor)</b>
<b>Escolaridade</b>			
Semianalfabeto	1 (3,85%)	3 (1,93%)	
Fundamental incompleto	8 (30,77%)	51 (32,9%)	
Fundamental completo	3 (11,53%)	20 (12,9%)	
Médio incompleto	3 (11,53%)	26 (16,78%)	1,42
Médio completo	8 (30,77%)	44(28,38%)	(0,96)
Superior incompleto	2 (7,69%)	9 (5,8%)	
Superior completo	1 (3,85%)	2 (1,3%)	
<b>Profissão</b>			
Do lar	4 (15,38%)	33 (21,3%)	
Professora	1 (3,85%)	2 (1,29%)	
Analista jurídico/Administrativo	1 (3,85%)	3 (1,93%)	
Autônomo	5 (19,23%)	20 (12,9%)	6,42
Estudante	2 (7,69%)	6 (3,87%)	(0,59)
Servente	2 (7,69%)	8 (5,16%)	
Téc. Radiol/ Enfermagem	1 (3,85%)	4 (2,58%)	
Vigilante	2 (7,69%)	2 (1,29%)	
Outras profissões	8 (30,76%)	77 (49,67%)	
<b>Renda Familiar</b>			
< 1 salário mínimo	2 (7,69%)	13 (8,38%)	
1 salário mínimo	11 (42,30%)	46 (29,68%)	
2 salários mínimos	11 (42,30%)	59 (38,06%)	7,11
3 a 5 salários mínimos	1 (3,85%)	36 (23,22%)	(0,13)
6 a 10 salários mínimos	1 (3,85%)	1 (0,65%)	

Fonte: Do autor.

As profissões encontradas dos pacientes com HBO e os pacientes saudáveis foram semelhantes. A prevalência das ocupações mais comuns como donas de casa, autônomos e serventes foram, em conjunto 42,3% nos pacientes com HBV-DNA. Com base nas mesmas ocupações, foi observada uma prevalência de 39,36% nos indivíduos saudáveis. Profissionais como auxiliar de produção, encanador, feirante, garçom, lavadora, pintor, costureira, cozinheira foram inseridos na opção “outras profissões”.

Quanto a renda familiar mensal, a maior proporção encontrada entre os pacientes com HBO foi de 1 e 2 salários mínimos, que em conjunto formam 84,6% do total. Nos pacientes apenas com o perfil sorológico de acordo com os critérios de inclusão do estudo, mas sem o HBV-DNA, 1 e 2 salários mínimos equivaleram a 64,74% do total. Nenhuma dessas variáveis apresentou diferença entre os grupos analisados.

Avaliando os possíveis fatores de risco para infecção pelo HBV relacionados ao comportamento sexual dos indivíduos positivos e negativos para o DNA viral e os comparando entre si, não houveram diferenças estatísticas com relação ao uso de preservativo, número de parceiros e DST comparando os pacientes com o DNA viral e os pacientes sem o DNA viral (Tabela 4).

**Tabela 4.** Possíveis fatores de risco para aquisição da HBO relacionados ao comportamento sexual em pacientes com o HBV-DNA e pacientes sem o HBV-DNA.

Variáveis	HBV-DNA positivos N (%)	HBV-DNA negativos N (%)	OR (IC 95%)	P
<b>Preservativo</b>				
Fazem uso	7 (27%)	23 (14,83%)	2,11 (0,79 – 5,59)	0,21
Não fazem uso	19 (73%)	132 (85,16%)		
<b>Nº de parceiros nos últimos dois anos</b>				
1 parceiro	19 (73%)	87 (56,12%)	2,12 (0,84 – 5,33)	0,15
2 ou mais parceiros	7 (27%)	68 (43,87%)		
<b>Já tiveram alguma DST</b>				
Sim	4 (15,38%)	25 (16,12%)	0,94 (0,29 – 2,94)	0,84
Não	22 (84,61%)	130 (83,87%)		

Na tabela 5, observam-se os possíveis fatores de risco para aquisição do HBV pelo compartilhamento do uso de alicate de unha (material perfurocortante). Os indivíduos com HBV-DNA em comparação com os indivíduos sem HBV-DNA, demonstraram uma frequência maior do uso compartilhado de alicate de unha. Em relação ao compartilhamento de alicates, foi observado uma diferença significativa dos pacientes com HBO em comparação com os pacientes saudáveis ( $p < 0,03$ ). A prevalência dos indivíduos com tatuagem e/ou piercing foram semelhantes nos dois grupos.

Foi observado que indivíduos HBO se submeteram a maior taxa de transfusão sanguínea comparados aqueles indivíduos sem a HBO, porém, não houve diferença estatística entre os grupos.

**Tabela 5.** Possíveis fatores de risco para aquisição da HBO relacionados ao uso de alicate, tatuagem e/ou piercing e transfusão sanguínea em indivíduos com o DNA viral e sem o DNA viral.

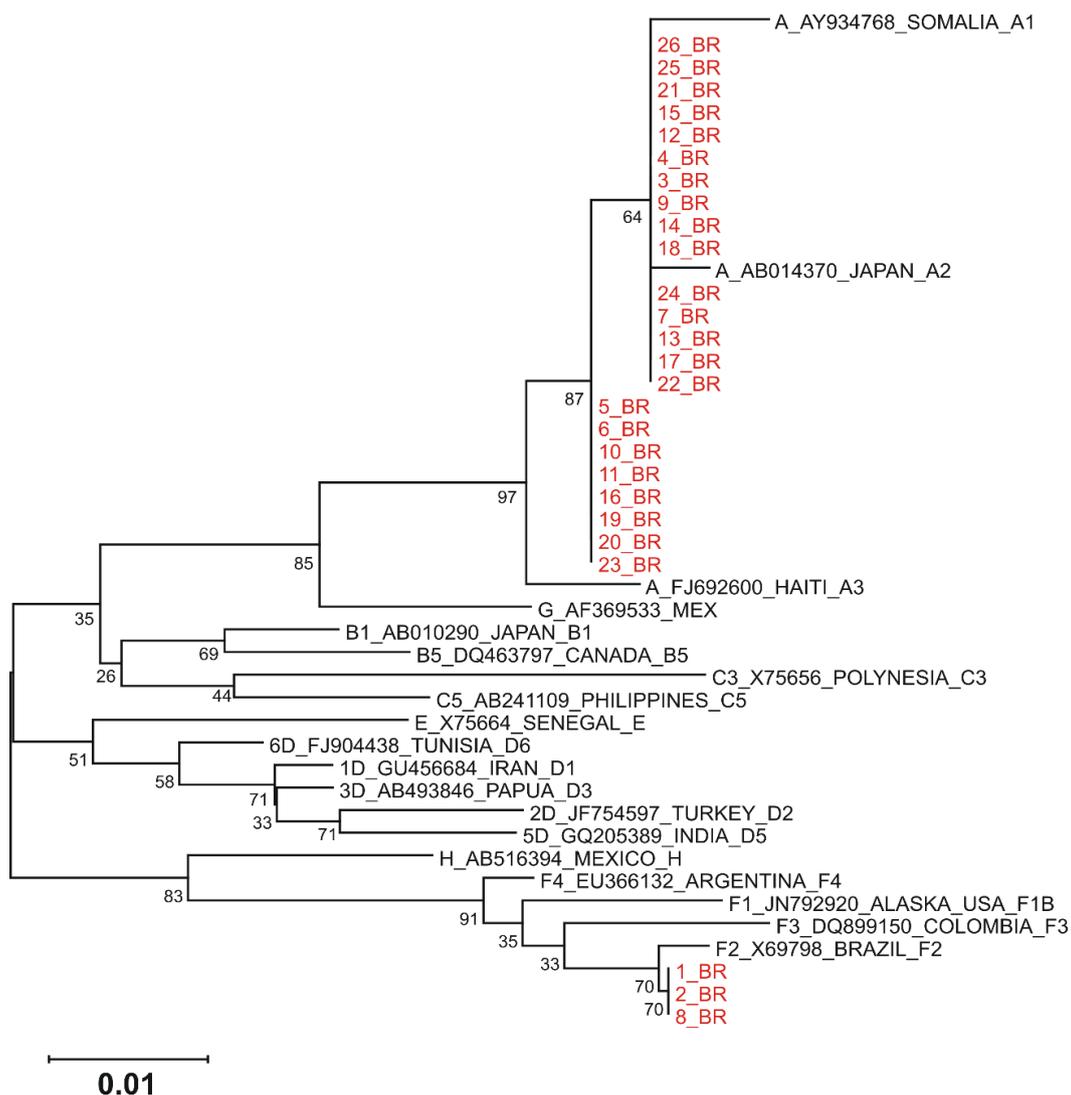
<b>Variáveis</b>	<b>HBV-DNA positivos N (%)</b>	<b>HBV-DNA negativos N (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>P</b>
<b>Alicate próprio</b>				
Sim	5 (19,23%)	59 (38,06%)	3,47	<b>0,03</b>
Não	21 (80,76%)	96 (61,93%)	(0,09 – 0,87)	
<b>Tatuagem/piercing</b>				
Sim	3 (11,53%)	26 (16,77%)	0,64	0,70
Não	23 (88,46%)	129 (83,22%)	(0,18 – 2,31)	
<b>Transfusão Sanguínea</b>				
Sim	4 (15,38%)	13 (8,38%)	1,98	0,44
Não	22 (84,61%)	142 (91,61%)	(0,59 – 6,64)	

Fonte: Do autor.

Estes indivíduos com a presença do HBV-DNA foram submetidos ao sequenciamento de uma região parcial do gene S do genoma do vírus. O produto da amplificação do gene foi de 447 pb, porém por ruídos e qualidade do primer *reverse*, foi perdido 166 nucleotídeos, resultando em um produto final de 281 pb para as análises da árvore e mutação.

Foi realizada a genotipagem das amostras com sequência de referência de outros estudos com número de acesso no GenBank mostradas ao lado do genótipo na árvore, totalizando 26 sequências correspondentes ao paciente com HBO. O resultado desta investigação pode ser visto na figura 15.

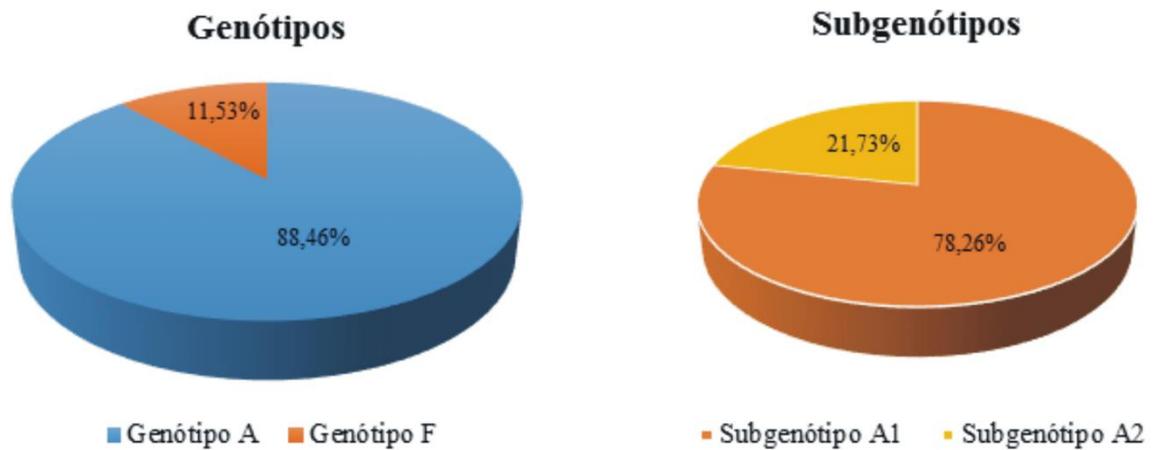
**Figura 15.** Árvore filogenética a partir do sequenciamento da região S do HBV. A análise foi realizada utilizando o método de Neighbor-Joining. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura-2 parâmetros. Os valores apresentados nos ramos representam “bootstrap” obtidos com 1.000 replicações.



Fonte: Do autor

Na genotipagem por sequenciamento direto, os genótipos A e F foram encontrados (Figura 15). As frequências genotípicas podem ser observadas na figura 16. O subgenótipo mais prevalente foi o A1 (18/23), seguido do A2 (5/23). O subgenótipo F2 foi observado em 100% (3/3) das amostras com o genótipo F.

**Figura 16.** Frequência dos genótipos encontrados em pacientes com HBO e frequência dos subgenótipos encontrados do genótipo A.



Em relação a idade, sexo, estado civil, origem, de acordo com os genótipos podem ser observados na tabela 6.

**Tabela 6.** Genótipos do HBV relacionados a características dos pacientes infectados.

<b>Genótipos</b>	<b>Total %</b>	<b>Idade</b>
<b>A</b>		
Homens	21 (91,30%)	Média de idade de 37 anos
Mulheres	2 (8,69%)	
Casados	12 (52,17%)	
Solteiros	11 (47,82%)	
Origem Pará	22 (95,65%)	
Outra Região	1 (4,34%)	
<b>F</b>		
Homens	0	
Mulheres	3 (100%)	
Casados	0	Média de idade de 23 anos
Solteiros	3 (100%)	
Origem Pará	3 (100%)	

Fonte: Do autor.

A maioria dos pacientes estudados eram de origem do próprio Estado do Pará. Quanto aos indivíduos infectados com o genótipo A, sendo a maioria casado e do sexo masculino. Os pacientes do genótipo F são todos do sexo feminino e solteiras.

Com base na análise das sequências de aminoácidos, as amostras de pacientes com HBO foram comparadas com sequências referências obtidas pelo GenBank de indivíduos com infecção pelo HBV, com o HBsAg reagentes. As amostras com o genótipo A foram analisadas juntamente com a 7 amostras referências (Figura 17).

**Figura 17.** Representação esquemática do alinhamento das sequências de aminoácidos (93 aa) da região S das amostras referências de pacientes HBsAg reagentes e dos pacientes HBO, todos com genótipos A.

A_AY934768_SOMALIA	SLDVSAAFYH	IPLHPAAMPH	LLIGSSGLSR	YVARLSSNSR	IHNQYWTLQ	NLHDSCSRQL	YGSMLLYKI	YGWKLHLYSH	PIILGFRKIP	MGV
A_AB014370_JAPÃO	.....	.....	.....	.....	.N...G.M.	.....	.V.....	.....	.V.....	.....
A_FJ692600_HAITI	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....	.V.....Q.	.R.....	.....?	.....
A_DQ459086_ALEMANHA	.....	.....	.....	.....	.N.H..G.M.	.....	.V.....	.Q.....	.V.....	.....
A_LC034913_JAPÃO	.....	.....	.....	.....	.N...G.M.	.....	.V.....	.....	.V.....	.....
A_RB191389_JAPÃO	.....	.....	.....	.....	.N...G.M.	.....	.V.....	.....	.V.....	.....
A_EU304333_ARGENTINA	.....	.....	.....	.....	.N...G.M.	.....	.V.....	.....	.V.....	.....
HBV_3_BelémPA	-.....	.?.....	.....	.....	.....	.....	.V.....	.....	.....	.....
HBV_4_BelémPA	-.....	.....	.....	.?..G.?	.....	.....	.V.....	.....	.V?	.....
HBV_5_BelémPA	-.....	.....	.....?	.....	.....	.....	.V.....	.R.....	.....	.....
HBV_6_BelémPA	-.....	.?.....	.....	.....	.G....	.....	.V.....	.R.....	.....	.....
HBV_7_BelémPA	-?.....	.?.....	.....?	.....	.G....	.....	?V.....	.....	.?	.....
HBV_9_BelémPA	-?.....	.....	.....?	.....	.G....	.....	?V.....	.....	.?	.....
HBV_10_BelémPA	-.....	.....	.....?	.....	.G....	.....	.V.....	.R.....	.....	.....
HBV_11_BelémPA	-.....	.....	.....?	.....	.G....	.....	.V.....	.R.....	.....	.....
HBV_12_BelémPA	-.....	.....	.....	.....	.G....	.....	.V.....	.....	.....	.....
HBV_13_BelémPA	-.....	.....	.....	.....	.G....	.....	.V.....	.....	.....	.....
HBV_14_BelémPA	-.....	.....	.....	.?..G.?	.....	.....	.V.....	.....	.V?	.....
HBV_15_BelémPA	-.....	.....	.....	.....	.G....	.....	.V.....	.....	.....	.....
HBV_16_BelémPA	-.....	.?.....	.....	.....	.G....	.....	.V.....	.R.....	.....	.....
HBV_17_BelémPA	-.....	.?.....	.....	.....	.G....	.....	.V.....	.....	.....	.....
HBV_18_BelémPA	-.....	.....	.....?	.....	.G.?	.....	.V.....	.....	.V?	.....
HBV_19_BelémPA	-.....	.?.....	.....	.....	.G....	.....	.V.....	.R.....	.....	.....
HBV_20_BelémPA	-.....	.?.....	.....	.....	.G....	.....	.V.....	.R.....	.....	.....
HBV_21_BelémPA	-.....	.?.....	.....	.....	.G....	.....	.V.....	.....	.....	.....
HBV_22_BelémPA	-.....	.....	.....	.?..G.?	.....	.....	.V.....	.....	.V?	.....
HBV_23_BelémPA	-.....	.....	.....?	.....	.G....	.....	.V.....	.R.....	.....	.....
HBV_24_BelémPA	-?.....	.?.....	.....?	.....	.G....	.....	?V.....	.....	.?	.....
HBV_25_BelémPA	-?.....	.?.....	.....?	.....	.G....	.....	?V.....	.....	.?	.....
HBV_26_BelémPA	-.....	.?.....	.....	.....	.G....	.....	.V.....	.....	.....	.....

Fonte: Do autor.

Foi observada algumas substituições de aminoácidos quando comparadas as amostras referências com as amostras do estudo. Na posição 42, todas as amostras com HBO apresentam Histidina, enquanto que a maioria das amostras do GenBank apresentam Asparagina. Na posição 44 acontece o inverso, as amostras HBO têm Asparagina e as amostras referências tem Histidina. Na posição 47, todas as amostras com HBO e a maioria das amostras do GenBank apresentam Glicina, com apenas uma amostra referência produzindo Triptofano. Leucina foi observada em toda as amostras com HBO, porém, a maioria das amostras do genBank produziam Metionina na posição 49. Na posição 62, todos as amostras apresentam Valina, exceto uma amostra referência que produz Glicina. Algumas amostras com HBO produzem Triptofano enquanto outras produzem Arginina, isto acontece também nas amostras do GenBank, na posição 73. Esta variação acontece também na posição 83, onde, tanto as amostras referências quanto as amostras com HBO divergem na produção de aminoácidos, com umas expressando Isoleucina enquanto outras expressam Valina.

Esta análise das variações de aminoácidos expressadas tanto pelas amostras de pacientes com o genótipo F com HBO tanto com as amostras referências obtidas pelo GenBank de indivíduos HBsAg reagentes, com este mesmo genótipo (Figura 18).

**Figura 18.** Representação esquemática do alinhamento das sequências de aminoácidos (93 aa) da região S das amostras referências de pacientes HBsAg reagentes e de pacientes HBO, todos com genótipos F.

```

F_DQ899150_COLOMBIA_F3      SLDVSAAFYH LPLHPAAMPH LLVSGCGLSR YVARLSSTSR IHDHQHRIMQ DLHNSCSRNL YVSLLLLFQT LGRKHLHLYSH PIILGFRKIP MGV-
F_EU366132_ARGENTINA_F4    .....S.....N...Y...G...N.....-
F_JN792920_ALASKA_USA_F1B  .....S.....V...G...N.....-
F_X69798_BRASIL_F2        .....S.....G.L.N...T...-
F_DQ121370_BRASIL         .....S.....G.L.N...T...C...S...G
HBV_1_BelémPA              -.....S...G.....G.L.N...T...K.....-
HBV_2_BelémPA              -.....S...G.....G.L.N...T...K.....-
HBV_8_BelémPA              -.....S...G.....G.L.N...T...K.....-

```

Fonte: Do autor.

Na posição 26 podemos observar a produção de Serina em todas as amostras, exceto em uma amostra referência que produz Cisteína. Na posição 30, todas as amostras referências produzem Arginina, enquanto que as amostras com HBO produzem Glicina. Na posição 47 todos as amostras expressam Glicina, com exceção de uma amostra referência que expressa Arginina. Leucina é produzida em todas as amostras com HBO e em duas amostras referências que são do Brasil, as outras amostras referências de outras localidades expressam Metionina na posição 49. Todas as amostras comparadas expressam Asparagina, com exceção de uma amostra referência que produz Ácido Aspártico na posição 51. Apenas as amostras referência do Brasil e as amostras dos pacientes com HBO que produziam Treonina, enquanto as outras produziam Serina na posição 57. Apenas as amostras com HBO expressavam Lisina ao invés de Glutamina, como todas as outras amostras na posição 69.

## 7. DISCUSSÃO

Estudos sobre a prevalência exata da HBO continuam sendo difíceis definir por várias razões. Embora a Região Amazônica seja endêmica para o HBV e o cenário epidemiológico favorável para a emergência de estudos da HBO (MORESCO et al., 2014), ainda há poucos dados sobre o mapa epidemiológico da região sobre esta forma de infecção.

Os resultados deste estudo contribuem para a informação sobre a prevalência da HBO, distribuição dos genótipos e análises de possíveis mutações. Estudos sobre a epidemiologia molecular que podem revelar aspectos da entrada do vírus no Estado, contribuindo para compor o mapa epidemiológico da Região Amazônica.

Em nosso estudo, pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical, no Estado do Pará, Brasil, foi observado uma alta prevalência da HBO em 14,36% (26/181) dos indivíduos, onde 50% dos pacientes eram do homens e 50% mulheres. A média de idade dos indivíduos infectados foi de 39 anos.

Estes dados divergem de uma coorte realizada na Austrália, que observou uma baixa prevalência desta forma infecção, em apenas 0,69% dos pacientes. Este resultado pode ter se dado ao fato de que país possui um baixo índice de prevalência do HBV (MARTINEZ et al., 2015). Escobedo-Melendez e colaboradores (2014) investigaram a HBO e genótipos do HBV em crianças no México, onde 87,5% foram positivas para HBO. O genótipo H foi o mais observado, em 71% das crianças, seguido do genótipo G (8%) e o genótipo A (4%), refletindo a predominância dos mesmos no país. Cardona e colaboradores (2011) sugerem que a HBO parece não estar restrito a um determinado genótipo específico.

No Brasil, um estudo feito em pacientes hemodialisados, foi encontrado uma taxa de 15% da HBO, onde seis dessas amostras foram sequenciadas e constatado a presença apenas do genótipo A/subgenótipos A1 (MOTTA et al., 2010). No Estado do Amazonas, uma pesquisa avaliou o risco de transmissão da HBO em doadores de sangue, foi encontrada a frequência do HBV-DNA em 2,7% (MORESCO et al., 2014). Esses dados diferem de outra pesquisa feita na região, na Fundação de Medicina Tropical, no Amazonas, em que foi observada uma alta taxa, onde 17% dos indivíduos tinham a presença do HBV-DNA e ausência do HBsAg (BARROS JÚNIOR et al., 2008), dados estes que se assemelham aos nossos resultados.

Ferrari e colaboradores (2014) investigaram a prevalência da infecção por HBO em pacientes submetidos a transplante de fígado em um centro de referência no Sudeste do Brasil, onde foi a HBO foi diagnosticada em 4,4% dos transplantados, sendo dois destes pacientes com todos os marcadores sorológicos negativos.

No trabalho de Albuquerque e colaboradores (2012), a prevalência da HBO em indivíduos fazendo hemodiálise em Recife, no Nordeste brasileiro foi de 1,5%, compreendendo os genótipos A (33%) e D (66%), onde nenhuma mutação foi encontrada. A sequência amplificada neste estudo foi a mesma utilizada para nossas amostras submetidas ao sequenciamento. Estes mesmos oligonucleotídeos iniciadores também foram utilizados em outro estudo brasileiro, com amostras de pacientes de várias regiões brasileiras onde foi observado os genótipos A, B, C, D e F. Sendo o A o mais prevalente, seguido do D e depois o F. Os genótipos B e C foram encontrados em pacientes asiáticos, sendo que em dois desses pacientes foram encontradas mutações no epítipo na região “a”. No genótipo B a mutação T126S associada a resistência da HBIg e no genótipo C a mutação T11A associada a resistência a vacina (SITNIK et al., 2004).

A genotipagem por sequenciamento direto, realizado em nosso trabalho, revelou uma frequência genotípica de 88,46% (23/26) em relação ao genótipo A. A maioria do sexo masculino 91,3% (21/23). A média de idade foi de 37 anos e apenas 4,34% (1/23) com origem na região Nordeste do Brasil. O subgenótipo mais prevalente foi o A1 com 78,26% (18/23) seguido do subgenótipo A2 com 21,73% (5/23). No trabalho de Conde e colaboradores (2013) realizado no Estado do Pará, o genótipo A foi predominante acarretando 95% dos indivíduos. O subgenótipo A1 foi o mais prevalente com 92,1%, seguido do A2 com 7,9%.

Em relação a clínica da doença relacionada aos subgenótipos, o A1 tem um resultado clínico mais grave em comparação ao subgenótipo A2, como já foi observado (LIVINGSTON et al, 2007). Pacientes europeus infectados com o subgenótipo A2 tiveram um resultado clínico mais brando e mais chances de perder o HBsAg e HBV-DNA (SÁNCHEZ-TAPIAS et al., 2002). Alguns estudos no Brasil demonstraram que a frequência do subgenótipo A1 é maior do que o A2 (MELLO et al., 2007; MOURA et al., 2013; SANTOS et al., 2010).

Quanto ao genótipo F no nosso estudo, a prevalência encontrada foi de 11,53% (3/26) dos indivíduos, do sexo feminino, com idade média de 23 anos e com origem no Estado do Pará. Estas pacientes eram solteiras e relataram que não faziam uso de preservativo. Estes resultados se assemelham ao de Mello e colaboradores (2007) que mostrou uma baixa prevalência deste genótipo no Brasil (13%), mesmo na região Norte, onde a população indígena nativa compreende a uma fração maior da população brasileira, indicando a menor contribuição da população indígena para a população como um todo. O subgenótipo F2 foi observado em 100% dos indivíduos infectados com o genótipo F. Esses resultados se assemelham ao de Alvarado-Mora (2013) feito no Estado de São Paulo com amostras de várias regiões do Brasil, onde foi

identificado o subgenótipo F2 sendo o mais prevalente dos subgenótipos do genótipo F em indivíduos do Estado de São Paulo, Rio de Janeiro e Bacia Amazônica.

Atualmente, o subgenótipo F2 foi encontrada principalmente na Venezuela e tem sido considerado como sendo proveniente de região Amazônica, pesquisas vão elucidando as diferentes entradas em regiões tão diversas deste subgenótipo (ALVARADO-MORA et al., 2013).

Em um estudo feito no Alasca, Livingston e colaboradores (2007) encontraram uma associação significativa entre o genótipo F e a ocorrência de HCC nos povos nativos, em comparação com o genótipo A, B, C ou D. Além disso, esses indivíduos infectados com o genótipo F eram mais jovens no momento do diagnóstico de HCC do que em relação aos outros genótipos (22,5 vs. 60 anos, respectivamente). Estas descobertas devem ser de grande interesse para a comunidade científica, especialmente nestas regiões onde o genótipo F é frequente (TANAKA, MIZOKAMI, 2007).

Em muitos casos, HBO está associada com vírus mutantes (mutantes S-escape) que não podem ser detectados por ensaios comerciais de HBsAg, mas também é frequentemente causada pelos mecanismos hospedeiros que produzem uma forte supressão da replicação de HBV e a expressão gênica (HOLLINGER, SOOD, 2010; RAIMONDO et al., 2002). Isto poderia ser uma das explicações de níveis baixo de viremia que são geralmente detectadas em portadores de HBO (SQUADRITO et al., 2014).

Este estudo concentrou-se em uma parte da região genômica do HBV, a sequência S parcialmente amplificada, assim, houve uma limitação na detecção das mudanças na sequência de pacientes com a HBO e a qualidade final do sequenciamento reduziu ainda mais o tamanho do fragmento. Estas sequências de pacientes com HBO foram analisadas comparando com pacientes HBsAg positivos e as modificações da expressão de aminoácidos produzidos podem modificar a proteína do envelope. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no nosso trabalho correspondeu a uma região conservada entre os diferentes genótipos, mas em torno de regiões heterogêneas entre eles, permitindo a distinção de genótipos do HBV. Esta região abrange um *loop* de aminoácidos que corresponde a, d/y e w/r e mutações relacionadas com HBIg, anti-HBs e resistência a vacina (SITNIK et al., 2004).

O resultado do nosso trabalho apresentou algumas substituições na expressão de aminoácidos na região sequenciada de indivíduos com HBO em comparação com os pacientes HBsAg reagentes. Como foi observado, duas substituições na expressão de aminoácidos ocorreram nas amostras de pacientes com HBO, na posição 30 onde há uma produção de Glicina ao invés de Arginina, como acontece com todas as outras amostras HBsAg reagentes e outra substituição

na posição 69 onde há uma produção de Lisina nas amostras do estudo enquanto que nas amostras referências há uma produção de Glutamina. Estas alterações nos aminoácidos produzidos podem indicar alguma mutação no gene S, onde pode haver alteração no produto da proteína final. Outros estudos, como de Mello e colaboradores (2007) que sequenciaram amostras do genótipo F, onde a maioria havia um padrão específico, enquanto que uma amostra apresentou uma substituição incomum de isoleucina por leucina na posição. Com isso, outros estudos precisam acontecer para a análise genótipo F observando se as substituições de aminoácidos estão associadas ao seu efeito fenotípico, HBsAg negativo/anti-HBc positivo nessas amostras.

Na China, Fang e colaboradores (2004) que pacientes com HBO não possuíam substituições de aminoácidos incomuns ou em torno do determinante “a”, atribuídas ao genótipo C. Estes dados se assemelham ao nosso resultado, onde não foi detectado nenhuma mutação específica descrita nas amostras HBO, apenas substituições de aminoácidos característicos dos genótipos.

A circulação da mutação pré-core G1896A do genótipo A é rara e mostra uma relação com a presença de citosina no nucleotídeo 1858 (SITNIK et al., 2004; SCHAEFER, 2005). No trabalho de Sitnik e colaboradores (2004) e Zaidan (2009) mostraram uma prevalência semelhante a mutação BCP A1762T/G1764A encontrada no genótipo A, com 62% de positividade relacionada a indivíduos acarretados com este genótipo. Há também uma clara associação entre o genótipo F e a mutação do códon de paragem pré-core (34/48; 70,8%) encontrada durante a investigação de amostras de doadores de sangue argentinos. Assim, cepas argentinas do HBV genótipo F estavam mais próximos aos observados na América Central em relação ao pré-core códon. Com isso, diferenças de sequência de nucleótidos entre estirpes do genótipo F ter sido detectado, mesmo quando as estirpes foram isoladas a partir de locais vizinhos (FRANÇA et al., 2004).

No nosso estudo não foi detectado nenhuma mutação que originaria uma parada prematura da sequência do genótipo F. Uma provável explicação para este fato, seria de que houveram poucas amostras HBV-DNA positivas para as sequências nucleotídicas, além de que foi amplificada somente uma parte da região genômica S do HBV, enquanto outros estudos sequenciaram mais de uma região genômica (MARTINEZ et al., 2015; KIM, KIM, 2015; ZHANG et al., 2016) ou o todo genoma viral (HUANG et al., 2014). Assim, o número pequeno de amostras analisadas e a curta sequência genômica disponível para estudo não permitiram analisar amplamente as mutações envolvidas nestes pacientes com HBO.

Zhang e colaboradores (2016) analisaram a clonagem do gene S em pacientes HBO e seus familiares HBsAg positivos. Seus resultados revelaram que as substituições de aminoácidos ou variações de proteínas S não foi significativamente alterado na maioria dos clones isolados de pacientes HBO, indicando que estas variações na proteína S podem não desempenhar um papel tão fundamental na patogênese da HBO.

O estudo que realizamos, permitiu a identificação de características de pacientes na região Amazônica, no Estado do Pará. Estudos filogenéticos que corroboram com o fato de que a origem da população brasileira pode ser traçada a partir de três fontes principais: ameríndios, sendo os principais portadores do genótipo F (CASEY et al., 1996; CRISPIM et al., 2014), os colonizadores europeus, responsáveis pela entrada de genótipos A2 e D na América Latina (BERTOLINI et al., 2012; BRICHLER et al., 2013), e os escravos africanos, que teriam sido portadores A1 quando chegaram no Brasil entre os séculos 16 e 19 (ARAUJO et al., 2004; MELLO et al., 2007). Assim, quando combinada com a análise filogenética, sequências de nucleótidos dos genes individuais, em particular o gene S, podem ajudar a elucidar a epidemiologia molecular de HBV (CAMPOS et al., 2005; NORDER et al., 1992).

Como podemos observar, a distribuição genotípica varia em função da composição étnica da população de estudo, refletindo o modo de colonização e a expansão do território brasileiro, com a redução da população indígena. Ressaltando também a influência das correntes migratórias que favorecem novos contatos étnicos e culturais (ZAIDAN, 2009).

Quanto ao fator de risco associado ao ocultismo do HBV, foi relacionado neste estudo o único fator de risco estatisticamente significativo, o compartilhamento de alicate de unha ( $p < 0,03$ ). Esses pacientes com HBV-DNA não possuíam um material próprio para este tipo de atividade.

Em um estudo feito no Sudeste do Brasil foi realizado um estudo sobre a prevalência do HBV em manicures, que resultou em uma prevalência de 8% do HBV entre estas profissionais, com insuficiência das práticas de biossegurança (OLIVEIRA et al., 2011). Em outro estado, foi feita uma pesquisa sobre a ocorrência de acidentes com materiais perfurocortantes em manicures/pedicures, onde foi relatado que 38,1% já se acidentaram durante atendimento, conferindo um risco biológico dos profissionais com esta atividade (GARBACCIO, OLIVEIRA, 2013).

Infecções ocultas pelo HBV criam grandes preocupações de saúde pública, porque portadores assintomáticos podem ser doadores de sangue, onde devemos nos precaver com o marcador sorológico anti-HBc que identifica uma infecção anterior pelo HBV, podendo ser reativado ou transmitido para outras pessoas (SQUADRITO et al., 2014) horizontalmente ou

verticalmente através de mutações estáveis no genoma do vírus (THIERS et al., 1988; LOCARNINI, 2004; THUY et al., 2005). Além disso, a HBO parece manter propriedades tumorgênicas típicas da infecção evidente, um importante fator para o desenvolvimento de HCC (SQUADRITO et al., 2014).

No Brasil, ainda são escassos os trabalhos contemplando mutações em pacientes com HBO associadas a genótipos, sendo este o primeiro trabalho em Belém, Brasil. Os resultados do estudo contribuem para ampliar informações sobre genótipos circulantes na região e servindo de referência para novas investigações, principalmente em relação a mutações desses indivíduos com HBO, mostrando a necessidade de conhecer as características genéticas do genoma do HBV.

## 8. CONCLUSÃO

- Os pacientes atendidos no NMT-UFPA apresentaram alta prevalência da hepatite B oculta, com 14,36%.
- O sequenciamento direto do HBV mostrou a predominância do genótipo A com 88,46%. O subgenótipo A1 sendo o mais prevalente com 78,26%, seguido do A2 com 21,73% entre os pacientes atendidos. O genótipo F apresentou baixa prevalência com 11,53%, todos com o subgenótipo F2.
- Não foi observada mutações na região S, amplificada parcialmente.
- O único fator de risco associado estatisticamente a infecção oculta pelo HBV foi o compartilhamento de material perfuro-cortante (alicate de unha não próprio).
- A distribuição da infecção, genótipos e características genéticas podem variar dentro do país, inclusive dentro das próprias regiões, dependendo da endemicidade do HBV, fatores de risco, histórico da população.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNABI, Z.; SALEH, N.; BARAGHITHI, A. S.; GLEBE, D.; AZZEH, M. Subgenotypes and Mutations in the S and Polymerase Genes of Hepatitis B Virus Carriers in the West Bank, Palestine. **Plos One**. v. 9, n. 12, e 113821, p. 1 – 16, 2014.
- ALBUQUERQUE, A. C. C.; COELHO, M. R. C. D.; LEMOS, M. F.; MOREIRA, R. C. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 45, n. 5, p. 558 – 562, 2012.
- ALENCAR, R. S.; GOMES, M. M.; SITNIK, R.; PINHO, J. R.; MALTA, F. M.; MELLO, I. M.; MELLO, E. S.; BACCHELLA, T.; MACHADO, M. C.; ALVES, V. A.; CARRILHO, F. J. Low occurrence of occult hepatitis B virus infection and high frequency of hepatitis C virus genotype 3 in hepatocellular carcinoma in Brazil. **Brazilian Journal of Medicine Biology Research**. v. 41, n. 3, p. 235 – 240, 2007.
- ALLAIN, J. P.; MIHALJEVIC, I.; GONZALEZ-FRAILE, M. I.; GUBBE, K.; HOLM-HARRITSHOJ, L.; GARCIA, J. M.; BROJER, E.; ERIKSTRUP, C.; SANIEWSKI, M.; WERNISH, L.; BIANCO, L.; ULLUM, H.; CANDOTTI, D.; LELIE, N.; GERLICH, W. H.; CHUDY, M. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. **Transfusion**. v. 53, n. 7, p. 1405 – 1415, 2013.
- ALMEIDA, D.; TAVARES-NETO, J.; VITVITSKI, L.; ALMEIDA, A.; MELLO, C.; SANTANA, D.; TATSCH, F.; PARANÁ, R. Serological markers of hepatitis A, B and C viruses in rural communities of the semiarid Brazilian northeast. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.10, n. 5, p. 317 – 321, 2006.
- ALMEIDA, J. D.; RUBENSTEIN, D.; STOTT, E. J. New antigen-antibody system in Australia antigen positive hepatitis. **Lancet**. v. 2, n. 7736, p. 1224 – 1227, 1971.
- ALTER, H. J. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. **Journal of Hepatology**. v. 39, n. 2, p. 149 – 152, 2003.
- ALVARADO-MORA, M. V., BOTELHO-LIMA, L. S., SANTANA, R. A., SITNIK, R., FERREIRA, P. A., MELLO, F. A., MANGUEIRA, C. P., CARRILHO, F. J., PINHO, J. R. R. Distribution of hepatitis B virus subgenotype F2a in São Paulo, Brazil. **BMC Research Notes**. v. 6, n. 423, p. 1 – 5, 2013.
- ALVARADO-MORA, M. V.; PINHO, J. R. Distribution of HBV genotypes in Latin America. **Antiviral Therapy**. v. 18, n. 3, p. 459 – 465, 2013.

ALVARADO-MORA, M. V.; ROMANO, C. M.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; GUTIERREZ, M. F.; CARRILHO, F. J.; PINHO, J. R. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. **The Journal of General Virology**. v. 91, n.Pt2, p. 501 – 508, 2010.

ALVARIZ, R. C. Hepatite crônica pelo vírus B (HBV). **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v. 5, n. 1, p. 17 – 34, 2006.

ANDERNACH, I. E.; HUBSCHEN, J. M.; MULLER, C. P. Hepatitis B vírus: The genotype E pluzze. **Reviews Medical Virology**. v. 19, n. 4, p. 231 – 240, 2009.

ARAÚJO, N. M.; MELLO, F. C.; YOSHIDA, C. F.; NIEL, C.; GOMES, A. S. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of hepatitis B virus. **Archives of Virology**. v. 149, n. 7, p.1383 – 1395, 2004.

ARAÚJO, N. M.; WAIZBORT, R.; KAY, A. Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: how viral, host and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 11, n. 6, p. 1199 – 1207, 2011.

ARAÚZ-RUIZ, P.; NORDER, H.; VISONA, K. A.; MAGNIUS, L. O. Genotype F prevails in HBV infected patients of hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. **Journal of Medical Virology**. v. 51, n. 4, p. 305 – 312, 1997.

ARRAES, L. C.; XIMENES, R.; ANDRIEU, J. M.; LU, W.; BARRETO, S.; PEREIRA, L. M.; CASTELO, A. The biological meaning of anti-HBc positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 45, n. 3, p. 137 – 140, 2003.

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.

BALMASOVA, I. P.; YUSHCHUK, N. D.; MYNBAEV, O. A.; ALLA, N. R.; MALOVA, E. S.; SHI, Z.; GAO, C. L. Immunopathogenesis of chronic hepatitis B. **World Journal of Gastroenterology**. v. 20, n. 39, p. 14156 – 14171, 2014.

BANCROFT, W. H.; MUNDON, F. K.; RUSSELL, P. K. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. **Journal of Immunology**. v. 109, n. , p. 842 – 848, 1972.

BARROS JÚNIOR, G. M.; BRAGA, W. S.; OLIVEIRA, C. M.; CASTILHO, M. D. A. C.; ARAÚJO, J. D. E. R. Occult hepatitis B: prevalence and clinical characteristics in a population with high endemicity of hepatitis B infection in the western Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n. 6, p. 596 – 601, 2008.

BAUER, T.; SPRINZL, M.; PROTZER, U. Immune control of hepatitis B virus. **Digestive Diseases**. v. 29, n. 4, p. 423 – 433, 2011.

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

BECKER, C. E.; MATTOS, A. A.; BOGO, M. R.; BRANCO, F.; SITNIK, 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, 2010.

BERTOLINI, D. A.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; GUEDES DE CARVALHO MELLO I. M.; SARACENI, C. P.; SITNIK, R.; GRAZZIOTIN, F. G.; LAURINO, J. P.; FAGUNDES, N. J.; CARRILHO, F. J.; PINHO, JR. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 12, n. 6, p. 1295 – 1304, 2012.

BIANCO, C.; DODD, R. Y. Infectivity of occult hepatitis B from two different points of view. **Transfusion**. v. 53, n. 7, p. 1379 – 1381, 2013.

BIRRER, R. B.; BIRRER, D.; KLAVINS, J. V. Hepatocellular carcinoma and hepatitis virus. **Annals of Clinical and Laboratory Science**. v. 33, n. 1, p. 39 – 54, 2003.

BLACKBERG, J.; KIDD-LJUNGGREN, K. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. **Journal of Hepatology**. v. 33, n. 6, p. 992 – 997, 2000.

BLITZ, L.; PUJOL, F. H.; SWENSON, P. D.; PORTO L.; ATENCIO, R.; ARAUJO, M.; COSTA, L.; MONSALVE, D. C.; TORRES, J. R.; FIELDS, H. A.; LAMBERT, S.; VAN GEYT, C.; NORDER, H.; MAGNIUS, L. O.; ECHEVARRÍA, J. M.; STUYVER L. Antigenic diversity of hepatitis B vírus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. **Journal of clinical microbiology**. v. 36, n. 3, p. 648 – 651, 1998.

BLUMBERG, B. S. Hepatitis B: The hunt for a killer virus. **Princeton University Press**, New Jersey. 2 ed, 2003.

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

BLUMBERG, B.S; GERYSTLEY, B.J.S; HUNGERFORD, D.A.; LONDON, W.T.; SUTNICK, A.I. A serum antigen (Australia antigen) in Down’s syndrome, leukemia and hepatitis. **Annals of International Medicine**. v. 66, n. 5, p. 924 – 931, 1967.

BOWYER, S. M.; VAN STADEN, L.; KEW, M. C.; SIM, J. G. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. **Journal of General Virology**. v. 78, n. 7, p. 1719 – 1729, 1997.

BRANDÃO-MELLO, C. E. História natural da infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) em Indivíduos Imunocompetentes e Imunodeficientes. In: ARAUJO, E. S. A. de (Ed.). 2008, **O**

**aBc das Hepatites: manual clínico para o manuseio e prevenção da Hepatite B.** São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008. p. 38 – 64.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: O Brasil está atento.** Brasília, MS, 2008.

BRECHOT, C.; HADCHOUEL, M.; SCOTTO, J.; DEGOS, F.; CHARNAY, P.; TREPO, C.; TIOLLAIS, P. Detection of hepatitis B virus DNA in liver and serum: a direct appraisal of the chronic carrier state. **The Lancet.** v. 2, n. 8250, p. 765 – 768, 1981.

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.

BRICHLER, S.; LAGATHU, G.; CHEKARAOU, M. A.; LE GAL, F.; EDOUARD, A.; DÉNY, P.; CÉSAIRE, R.; GORDIEN, E. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. **Journal of General Virology.** v. 94, n. 10, p. 2318 – 2329, 2013.

BRUNETTO, M. R.; STEMLER, M.; BONINO, F.; SCHODEL, F.; OLIVERI, F.; RIZZETTO, M.; VERME, G.; WILL, H. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology.** v. 10, n. 2, p. 258 – 261, 1990.

CACCIOLA, I.; POLLICINO, T.; SQUADRITO, G.; CERENZIA, G.; ORLANDO, M.E.; RAIMONDO, G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. **The New England Journal of Medicine.** v. 341, n. 1, p. 22 – 26, 1999.

CALIGIURI, P.; CERRUTI, R.; ICARDI, G.; BRUZZONE, B. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. **World Journal of Gastroenterology.** v.22, n. 1, p. 145 – 154, 2016.

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, n.2, p. 8 – 13, 2005.

CARDONA, N. E.; LOUREIRO, C. L.; GARZARO, D. J.; DUARTE, M. C.; GARCÍA, D. M.; PACHECO, M. C.; CHEMIN, I.; PUJOL, F. H. Unusual presentation of hepatitis B serological markers in an Amerindian community of Venezuela with a majority of occult cases. **Virology Journal.** v. 9, n. 8, p. 1 - 7, 2011.

CARMAN, W. F.; JACYNA, M. R.; HADZIYANNIS, S.; KARAYIANNIS, P.; MCGARVEY, M. J.; MAKRIS, A.; THOMAS, H. C. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. **Lancet.** v. 2, n. 8663, p. 588 – 591, 1989.

CARMAN, W. F.; ZANETTI, A. R.; KARAYIANNIS, P.; WATERS, J.; MANZILLO, G.; TANZI, E.; ZUCKERMAN, A. J.; THOMAS, H. C. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. **Lancet.** v. 336, n. 8711, p. 325 – 329, 1990.

CARRILHO, F. J.; MORAES, C. R.; PINHO, J. R.; MELLO, I. M.; BERTOLINI, D. A.; LEMOS, M. F.; MOREIRA, R. C.; BASSIT, L. C.; CARDOSO, R. A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; DA SILVA, L. C. Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. **BMC Public Health**. v. 4, n. 13, p. 1 – 11, 2004.

CASEY, J. L.; NIRO, G. A.; ENGLE, R. E.; VEJA, A.; GOMEZ, H.; MCCARTHY, M.; WATTS, D. M.; HYAMS, K. C.; GERIN, J. L. Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. **Journal of Infectious Diseases**. v.174, n. 5, p. 920 – 926, 1996.

CAVINTA, L.; CAO, G.; SCHAEFER, S. A new isolate of hepatitis B virus from the Philippines possibly representing a new subgenotype C6. **Journal Medicine of Virology**. v. 81, n. 6, p. 983 – 987, 2009.

CENTERS OF DISEASES CONTROL AND PREVENTION – CDC. Disponível em: <http://folk.uib.no/mihr/Fredskorpset/FK082006.html#dis9>. Acessado em: 04/01/2015.

CHAMORRO, A. J.; CASADO, J. L.; BELLIDO, D.; MORENO, S. Reactivation of hepatitis B in an HIV-infected patient with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**. v. 24, n. 7, p. 492 – 494, 2005.

CHAN, H. L.; TSANG, S. W.; LEUNG, N. W.; TSE, C. H.; HUI, Y.; TAM, J. S.; CHAN, F. K.; SUNG, J. J. Occult HBV infection in cryptogenic liver cirrhosis in an área with high prevalence of HBV infection. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 97, n. 5, p. 1211 – 1215, 2002.

CHANG, L. J.; HIRSCH, R. C.; GANEM, D.; VARMUS, H. E. Effects of insertional and point mutations on the functions of the duck hepatitis B virus polymerase. **Journal of Virology**. v.64, n. 11, p. 5553 – 5558, 1990.

CHANG, M. H. Breakthrough HBV infection in vaccinated children in Taiwan: surveillance for HBV mutants. **Antiviral Therapy**. v. 15, n. 3, p. 463 – 469, 2010.

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.

CHAUDHURI, V.; TAYAL, R.; NAYAK, B.; ACHARYA, S. K.; PANDA, S.K . Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. **Gastroenterology**. v. 127, n. 5, p. 1356 – 1371, 2004.

CHEMIN, I.; ZOULIM, F.; MERLE, P.; ARKHIS, A.; CHEVALLIER, M.; KAY, A.; COVA, L.; CHEVALLIER, P.; MANDRAND, B.; TRÉPO, C. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. **Journal of Hepatology**. v. 34, n. 3, p. 447 – 454, 2001.

COLEMAN, P. F. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, n. 2, p. 198–203, 2006.

COLIN, W. S.; SIMARD, E. P.; FINELLI, L.; FIORE, A. E.; BELL, B. P. Hepatitis B virus infection. *Epidemiology and Vaccination*. **Epidemiology Reviews**. v. 28, n. 1, p. 112 – 125, 2006.

CONDE, S. R. S.; PINHEIRO, L. M.; DE LEMOS, J. A. R.; DEMACHKI, S.; DE ARAÚJO, M. T.; SOARES, M. C. O.; NUNES, H. M.; ISHAK, R.; VALLINOTO, A. C. R. **Prevalence of Genotypes and Sub-Genotypes of the 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.

COVOLO, L.; POLLICINO, T.; RAIMONDO, G; DONATO, F. Occult hepatitis B virus and the risk for chronic liver disease: A meta-analysis. **Digestive and Liver Disease**. v. 45, n. 3, p. 238 – 244, 2013.

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.

DANE, D. S.; CAMERON, C. H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. **Lancet**. v. 1, n. 7649, p. 695 – 698, 1970.

DE LA FUENTE, R. A.; GUTIÉRREZ, M. L.; GARCIA-SAMANIEGO, J.; FERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, C.; LLEDÓ, J. L.; CASTELLANO, G. Pathogenesis of occult chronic hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**. v. 17, n. 12, p.1543 – 1548, 2011.

DE MITRI, M. S.; CASSINI, R.; BERNARDI, M. Hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis: molecular oncogenic potential of clear or occult infections. **European Journal of Cancer**. V. 46, n. 12, p. 2178 – 2186, 2010.

DENG, L.; LI, X.; SHI, Z.; JIANG, P.; CHEN, D.; MA, L. Maternal and perinatal outcome in cases of fulminant viral hepatitis in late pregnancy. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**. v.119, n. 2, p. 145 – 148, 2012.

DETERDING, K.; CONSTANTINESCU, I.; NEDELCU, F. D.; GERVAIN, J.; NEMECEK, V.; SRTUNECKY, O.; VINCE, A.; GRGUREVIC, I.; BIELAWSKI, K. P.; ZALEWSKA, M.; BOCK, T.; AMBROZAITIS, A.; STANCZAK, J.; TAKÁCS, M.; CHULANOV, V.; SLUSARCZYK, J.; DRAZD'ÁKOVÁ, M.; WIEGAND, J.; CORNBERG, M.; MANN, M. P.; WEDEMEYER, H. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. **Journal of Medical Virology**. v. 80, n. 10, p. 1707 – 1711, 2008.

DEVESA, M.; LOUREIRO, C.L.; RIVAS, Y.; MONSALVE, F.; CARDONA, N.; DUARTE, M. C.; POBLETE, F.; GUTIERREZ, M. F.; BOTTO, C.; PUJOL, F.H. Subgenotype diversity

of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. **Journal of Medical Virology**. v. 80, n. 1, p. 20 – 26, 2008.

DEVESA, M.; RODRIGUEZ, C.; LEON, G.; LIPRANDI, F.; PUJOL, F.H. Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. **Journal of Medical Virology**. v. 72, n. 3, p. 377 – 384, 2004.

DIENSTAG, J. L. Hepatitis B virus infection. **New England Journal of Medicine**. v. 359, n. 14, p. 1486 – 1500, 2008.

ELOY, A. M. X., MOREIRA, R. C., LEMOS, M. F., SILVA, J. L. A., COELHO, M. R. C. D. Hepatitis B virus in the State of Alagoas, Brazil: genotypes characterization and mutations of the precore and basal core promoter regions. **Brazilian Journal Infectious Diseases**. v. 17, n. 6, p. 704 – 706, 2013.

ESCOBEDO-MELENDZ, G.; PANDURO, A.; FIERRO, N. A.; ROMAN, S. High prevalence of occult hepatitis B virus genotype H infection among children with clinical hepatitis in west Mexico. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 106, n. 6, p. 728 – 737, 2014.

FANG, Z. L.; ZHUANG, H.; WANG, X. Y.; GE, X. M.; HARRISON, T. J. Hepatitis B virus genotypes, phylogeny and occult infection in a region with a high incidence of hepatocellular carcinoma in China. **Z. World Journal of Gastroenterology**. v. 10, n. 22, p. 3264 – 3268, 2004.

FERNANDES, J. V.; BRAZ, R. F.; NETO, F. V.; SILVA, M. A.; COSTA, N. F.; FERREIRA, A. M. Prevalence of serologic markers of hepatitis B virus in hospital personnel. **Revista de Saúde Pública**. v. 33, n. 2, p. 122 – 128, 1999.

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

FERREIRA, R. C.; TELES, S. A.; DIAS, M. A.; TAVARES, V. R.; SILVA, S. A.; GOMES, S. A.; YOSHIDA, C. F.; MARTINS, R. M. Hepatitis B virus infection profile in hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors, and genotypes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101, n. 6, p. 689 – 692, 2006.

FERRARI, T. C.; XAVIER, M. A.; VIDIGAL, P. V.; AMARAL, N. S.; DINIZ, P. A., RESENDE, A. P.; MIRANDA, D. M.; FARIA, A. C.; LIMA, A. S.; FARIA, L. C. Occult hepatitis B virus infection in liver transplant patients in a Brazilian referral center. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 47, n. 11, p. 990 – 994, 2014.

FONSECA, J. C. F. História Natural da Hepatite B Crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 6, p. 672-677, 2007.

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

FRANÇA, P. H.; GONZÁLEZ, J. E.; MUNNÉ, M. S.; BRANDÃO, L. H.; GOUVEA, V. S.; SABLON, E.; VANDERBORGHT, B. O. Strong Association between Genotype F and Hepatitis B Virus (HBV) e Antigen-Negative Variants among HBV-Infected Argentinean Blood Donors. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 11, p. 5015–5021, 2004.

GANEM, D.; SCHNEIDER, R. J. Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In: **Fields Virology**. 4th ed. Knipe D.M., Howley P.M.; Eds.; Lippincott Williams & Wilkins. v. 2, p. 2923 – 2969, 2001.

GARBACCIO, J. L.; OLIVEIRA, A. C. Accidents with exposure to biological stuff, vaccine coverage and procedures after accidents among manicure/pedicure professionals. **Journal of Nursing**. v. 7, n. 6., p. 4421 – 4429, 2013.

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, W. H. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. **Virology Journal**. v. 10, n. 239, p. 1 – 25, 2013.

GERLICH, W. H.; BREMER, C.; SANIEWSKI, M.; SCHUTTLER, C. G.; WEND, U. C.; WILLEMS, W. R.; GLEBE D. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. **Digestive diseases**. v. 28, n. 1, p. 116–125, 2010.

GERLICH, W. H.; GLEBE, D.; SCHUTTLER, C. G. Deficiencies in the standardization and sensitivity of diagnostic tests for hepatitis B virus. **Journal of Viral Hepatitis**. v. 14, n. 1, p. 16 – 21, 2007.

GERLICH, W. H.; ROBINSON, W. S. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. **Cell**. v. 21, n. 3, p. 801 – 809, 1980.

GERLICH, W. H.; WAGNER, F. F.; CHUDY, M.; HARRITSHOJ, L. H.; LATTERMANN, A.; WIENZEK, S.; GLEBE, D.; SANIEWSKI, M.; SCHÜTTLER, C. G.; WEND, U. C.; WILLEMS, W. R.; BAUERFEIND, U.; JORK, C.; BEIN, G.; PLATZ, P.; ULLUM, H.; DICKMEISS, E. HBsAg Non-Reactive HBV Infection in Blood Donors: Transmission and Pathogenicity. **Journal of Medical Virology**. v. 79, n. 1, p. 32 – 36, 2007.

GHANY, M.; LIANG, T. J. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. **Gastroenterology**. v. 132, n. 4, p. 1574 – 1585, 2007.

GUIRGIS, B. S.; ABBAS, R. O.; AZZAZY, H. M. E. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 14, n. 11, p. 941 – 953, 2010.

GUNTHER, S; FISCHER, L; PULT, I; STERNECK, M; WILL, H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. **Advances in Virus Research**. v. 52, n. 25 – 137, 1999.

HANNOUN, C.; NORDER, H.; LINDH, M. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. **Journal of General Virology**. v. 81, n. 89, p. 2267 – 2272, 2000.

HANNOUN, C.; SODERSTROM, A.; NORKRANS, G.; LINDH, M. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. **Journal of General Virology**. v. 86, n. 8, p. 2163 – 2167, 2005.

HASEGAWA, I.; ORITO, E.; TANAKA, Y.; HIRASHIMA, N.; SAKAKIBARA, K.; SAKURAI, M.; SUZUKI, S.; SUGAUCHI, F.; OHNO, T.; UEDA, R.; MIZOKAMI, M. Impact of occult hepatitis B virus infection on efficacy and prognosis of interferon-alpha therapy for patients with chronic hepatitis C. **Liver International**. v. 25, n. 2, p. 247 – 253, 2005.

HEMERT, F. J. V.; ZAAIJER, H. L.; BERKHOUT, B.; LUKASHOV, V. V. Occult hepatitis B infection: an evolutionary scenario. **Virology Journal**. v. 5, n. 146, p. 1 – 13, 2008.

HINO, K.; OKUDA, M.; HASHIMOTO, O.; ISHIKO, H.; OKAZAKI, M.; FUJII, K.; HANADA, H.; OKITA, K. Glycine-to-arginine substitution at codon 145 of HBsAg in two infants born to hepatitis B e antigen-positive carrier. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 40, n. 3, p. 566 – 570, 1995.

HOFER, M.; JOLLER-JEMELKA, H. I.; GROB, P. J.; LÜTHY, R.; OPRAVIL, M. Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. **European Journal of clinical microbiology & infectious diseases**. v. 17, n. 1, p. 6 – 13, 1998.

HOLLINGER, F. B. The five viruses: a perspective. **AASLD Postgraduate Course “Viral hepatitis A to F: An Update**, p. 2 – 20, 1994.

HOLLINGER, F. B.; SOOD, G. Occult hepatitis B virus infection: 2010: a covert operation. **Journal of Viral Hepatitis**. v. 17, n.1, p. 1 – 15, 2010.

HORVAT, R. T. Diagnostic and clinical relevance of HBV mutations. **Labmedicine**. v. 42, n. 8, p. 1 – 9, 2011.

HOU, J.; LIU, Z.; GU, F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. **International Journal of Medical Sciences**. v. 2, n. 1, p. 50 – 57, 2005.

HOU, J.; WANG, Z.; CHENG, J.; LIN, Y.; LAU, G.K.; SUN, J.; ZHOU, F.; WATERS, J.; KARAYIANNIS, P.; LUO, K. Prevalence of naturally occurring surface gene variants of hepatitis B virus in non-immunized surface antigen-negative Chinese carriers. **Hepatology**. v.34, n. 5, p.1027 – 1034, 2001.

HSU, H. Y., CHANG, M. H., NI, Y. H., CHEN, H. L. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. **Gut**. v. 53, n. 10, p. 1499 – 1503, 2004.

HSU, H. Y.; CHANG, M. H.; NI, Y. H.; LIN, H. H.; WANG, S. M.; CHEN, D. S. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop or chronic infections despite immunoprophylaxis. **Hepatology**. v.26, n. 3, p. 786 – 791, 1997.

HU, K. Q. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. **Journal of Viral Hepatitis**. v. 9, n. 4, p. 243 – 257, 2002.

HU, J.; SEEGER, C. Expression and characterization of hepadnavirus reverse transcriptases. **Methods in Enzymology**. v. 275, p. 195 – 208, 1996.

HUANG, F. Y.; WONG, D. K.; SETO, W. K.; ZHANG, A. Y.; LEE, C. K.; LIN, C. K.; FUNG, J.; LAI, C. L.; YUEN, M. F. Sequence Variations of Full-Length Hepatitis B Virus Genomes in Chinese Patients with HBsAg-Negative Hepatitis B Infection. **PLoS One**. v. 9, n. 6, p. 1 – 9, 2014.

HUANG, X.; HOLLINGER, F. B. Occult hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: A systematic review. **Journal of Viral Hepatitis**. v. 21, n. 3, p. 153 – 162, 2014.

HUBSCHEN, J. M.; MBAH, P. O.; FORBI, J. C.; OTEGBAYO, J. A.; OLINGER, C. M.; CHARPENTIER, E.; MULLER, C. P. Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, n. 1, p. 88 – 94, 2011.

HUSSAIN, B. K.; LOK, A. S. F. Hepatitis B virology: acute and chronic Infection – wild-type HBV and HBV Variants. In: GORDON, S. C. **Management of Chronic Viral Hepatitis**, p. 1 – 32, 2001.

JANSSEN, H. L.; VAN ZONNEVELD, M.; SCHALM, S. W. Hepatitis B. **The New England Journal of Medicine**. v. 350, n. 26, p. 2719 – 2720, 2004.

KAO, J. H.; CHEN, D. S. Global control of hepatitis B virus infection. **Lancet Infectious Diseases**. v. 2, n. 7, p. 395 – 403, 2002.

KAO, J. H.; CHEN, P. J.; LAI, M. Y.; CHEN, D. S. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterology**. v. 118, n. 3, p. 554 – 559, 2000.

KARTHIGESU, V. D.; ALLISON, L. M.; FORTUIN, M.; MENDY, M.; WHITTLE, H. C.; HOWARD, C. R. A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children. **Journal of General Virology**. v. 75, n. 2, p. 443 – 448, 1994.

KIDD-LJUNGGREN, K.; MIYAKAWA, Y.; KIDD, A. H. Genetic variability in hepatitis B viruses. **Journal of General Virology**. v. 83, n. 6, p. 1267 – 1280, 2002.

KIM, H.; KIM, B. J. Association of preS/S Mutations with Occult Hepatitis B Virus (HBV) Infection in South Korea: Transmission Potential of Distinct Occult HBV Variants. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, n. 6, p. 13595 – 13609, 2015.

KIM, S. M.; LEE, K. S.; PARK, C. J.; LEE, J. Y.; KIM, K. H.; PARK, J. Y.; LEE, J. H.; KIM, H. Y.; YOO, J. Y.; JANG, M. K. Prevalence of occult HBV infection among subjects with normal serum ALT levels in Korea. **Journal of Infectology**. v. 54, n. 2, p. 185 – 191, 2007.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. V. 16, n. 2, p. 111 – 120, 1980.

KOMATSU, H.; INUI, A.; SOGO, T.; KONISHI, Y.; TATENO, A.; FUJISAWA, T. Hepatitis B surface gene 145 mutant as a minor population in hepatitis B virus carriers. **BMC research notes**. v. 5, n. 22, p. 1 – 8, 2012.

KRAMVIS, A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. **Intervirology**. v. 57, n. 3-4, p. 141 – 150, 2014.

KRAMVIS, A.; ARAKAWA, K.; YU, M. C.; NOGUEIRA, R.; STRAM, D. O.; KEW, M. C. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. **Journal of Medical Virology**. v. 80, n. 1, p. 27 – 46, 2008.

KRAMVIS, A.; KEW, M.; FRANÇOIS, G. Hepatitis B virus genotypes. **Vaccine**. v. 23, n. 19, p. 2409 – 2423, 2005.

KRAMVIS, A.; WEITZMANN, L.; OWIREDU, W. K.; KEW, M. C. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. **Journal of General Virology**. v. 83, n. 4, p.835 – 839, 2002.

KURBANOV, F.; TANAKA, Y.; FUJIWARA, K.; SUGAUCHI, F.; MBANYA, D.; ZEKENG, L.; NDEMBI, N.; NGANSOP, C.; KAPTUE, L.; MIURA, T.; IDO, E.; HAYAMI, M.; ICHIMURA, H.; MIZOKAMI, M. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. **Journal General of Virology**. v. 86, n. 7, p. 2047 – 2056, 2005.

KURBANOV, F.; TANAKA, Y.; KRAMVIS, A.; SIMMONDS, P.; MIZOKAMI, M. When should “I” consider a new hepatitis B virus genotype. **Journal Virology**. v. 82, n. 16, p. 8241 – 8242, 2008.

KWON, H.; LOK, A. S. Hepatitis B therapy. **Nature**. v. 8, n. 5, p. 275 – 284, 2011.

LAGO, B. V.; MELLO, F. C.; KRAMVIS, A.; NIEL, C.; GOMES, S. A. Hepatitis B Virus Subgenotype A1: Evolutionary Relationships between Brazilian, African and Asian Isolates. **Plos One**. v. 9, n. 8, p. 1 – 9, 2014.

LANFORD, R. E.; NOTVALL, L.; LEE, H.; BEAMES, B. Transcomplementation of nucleotide priming and reverse transcription between independently expressed TP and RT domains of the hepatitis B virus reverse transcriptase. **Journal of Virology**. v.71, n.4, p. 2996 – 3004, 1997.

LAZAR, C.; DURANTEL, D.; MACOVEI, A.; ZITZMANN, N.; ZOULIMM, F.; DWEK, R. A.; BRANZA-NICHITA, N. Treatment of hepatitis B virus-infected cells with  $\alpha$ -glucosidase inhibitors results in production of virions with altered molecular composition and infectivity. **Antiviral Research**. v. 76, n. 1, p. 30 – 37, 2007.

LEVRERO, M.; POLLICINO, T.; PETERSEN, J.; BELLONI, L.; RAIMONDO, G.; DANDRI, M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**. v. 51, n. 3, p. 581 – 592, 2009.

LIANG, T. J. Hepatitis B: the virus and disease. **Hepatology**. v. 49, n. 5, p. 13 – 21, 2009.

LIN, C. L.; LIAO, L. Y.; WANG, C. S.; CHEN, P. J.; LAI, M. Y.; CHEN, D. S.; LAI, M. Y.; CHEN, D.S.; KAO, J. H. Basal core-promoter mutant of hepatitis B virus and progression of liver disease in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. **Liver International**. v. 25, n. 3, p. 564 – 570, 2005.

LINDH, M.; ANDERSSON, A. S.; GUSDAL, A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method. **Journal Infectious Diseases**. v. 175, n. 6, p. 1285 – 1293, 1997.

LIU, C. J.; CHEN, D. S.; CHEN, P. J. Epidemiology of HBV infection in Asian blood donors: emphasis on occult HBV infection and the role of NAT. **Journal of Clinical Virology**. v. 36, n. 1, p. 33 – 44, 2006.

LIU, C. J.; LO, S. C.; KAO, J. H.; TSENG P. T., LAI, M. Y.; NI, Y. H.; YEH, S. H.; CHEN, P. J.; CHEN, D. S. Transmission of occult hepatitis B virus by transfusion to adult and pediatric recipients in Taiwan. **Journal of Hepatology**. v. 44, n. 1, p. 39 – 46, 2006.

LIVINGSTON, S. E.; SIMONETTI, J. P.; MCMAHON, B. J.; BULKOW, L. R.; HURLBURT, K. J.; HOMAN, C. E.; SNOWBALL, M. M.; CAGLE, H. H.; WILLIAMS, J. L.; CHULANOV, V. P. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. **Journal of Infectious Diseases**. v. 195, n. 1, p. 5 – 11, 2007.

LOCARNINI, S. Molecular virology of hepatitis B virus. **Seminars in Liver Disease**. v. 24, n. 1, p. 3 – 10, 2004.

LOCARNINI, A. S.; YUEN, L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. **Antiviral Therapy**. v. 15, n. 3, p. 451 – 461, 2010.

LOK, A. S.; MCMAHON, B.J. Chronic hepatitis B: update 2009. **Hepatology**. v. 50, n. 3, p. 661 – 662, 2009.

LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FOREMAN, K.; LIM, S.; SHIBUYA, K.; ABOYANS, V.; ABRAHAM, J.; ADAIR, T.; AGGARWAL, R.; AHN, S. Y.; ALVARADO, M.; ANDERSON, H. R.; ANDERSON, L. M.; ANDREWS, K. G.; ATKINSON, C.; BADDOUR, L. M.; BARKER-COLLO, S.; BARTELS, D. H.; BELL, M. L.; BENJAMIN, E. J.; BENNETT, D.; BHALLA, K.; et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**. v. 380 , n. 9859, p. 2095 – 2128, 2012.

MAGNIUS, L. O; ESPMARK, J. A. **A new antigen complex co-occurring with Australia antigen**. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica: Section B: Microbiology and Immunology. v. 80, n. 2, p. 335 – 337, 1972.

MARGOLIS, H. S.; ALTER, M. J.; HADLER, S. C. Hepatitis B: Evolving epidemiology and implications for control. **Seminars Liver Disease**. v. 11, n. 2, p. 84 – 92, 1991.

MARTIN, K.; HELENIUS, A. Nuclear transport of influenza vírus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. **Cell**. v. 67, n.1 , p. 117 – 130, 1991.

MARTINEZ, M. C., KOK, C. C., BALERIOLA, C., ROBERTSON, P., RAWLINSON, W. D. Investigation of occult hepatitis b virus infection in Anti-HBc positive patients from a liver clinic. **Plos One**. v. 10, n. 3, p. 1 – 13, 2015.

MBAYED, V. A.; BARBINI, L.; LOPEZ, J. L.; CAMPOS, R. H. Phylogenetic analysis of the hepatitis B virus (HBV) genotype F including Argentine isolates. **Archives of Virology**. v. 146, n. 9, p. 1803 – 1810, 2001.

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, 2009.

MELE, A.; TANCREDI, F.; ROMANO, L.; GIUSEPPONE, A.; COLUCCI, M.; SANGIUOLO, A.; LECCE, R.; ADAMO, B.; TOSTI, M. E.; TALIANI, G.; ZANETTI, A. R. Effectiveness of hepatitis B vaccination in babies born to hepatitis B surface antigen-positive mothers in Italy. **Journal of Infectious Diseases**. v. 184, n. 7, p. 905 – 908, 2001.

MELLO, F. C.; ARAUJO, O. C.; LAGO, B. V.; MOTTA-CASTRO, A. R.; MORAES, M. T.; GOMES, S. A.; BELLO, G.; ARAUJO, N. M. Phylogeography and evolutionary history of hepatitis B virus genotype F in Brazil. **Virology Journal**. v.10, n. 236, p. 1 – 8, 2013.

MELLO, F. C.; SOUTO, F. J.; NABUCO, L. C.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A.; COELHO, H. S.; FRANZ, H. C.; SARAIVA, J. C.; VIRGOLINO, H. A.; MOTTA-CASTRO, A. R.; MELO, M. M.; MARTINS, R. M.; GOMES, S. A. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiology**. v. 7, n. 103, p. 1 – 9, 2007.

MINUK, G. Y.; SUN, D. F.; UHANOVA, J.; ZHANG, M.; CAOUCETTE, S.; NICOLLE, L.E.; GUTKIN, A.; DOUCETTE, K.; MARTIN, B.; GIULIVI, A. Occult hepatitis B virus

infection in a North American community-based population. **Journal of Hepatology**. v. 42, n. 4, p. 480 – 485, 2005.

MIYAKAWA, Y.; MIZOKAMI M. Classifying hepatitis B virus genotypes. **Intervirology**. v. 46, n. 6, p. 329 – 338, 2003.

MOLNAR-KIMBER, K. L.; SUMMERS, J.; TAYLOR, J. M.; MASON, W. S. Protein covalently bound to minus-strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus. **Journal of Virology**. v. 45, n. 1, p. 165 – 172, 1983.

MORALES-ROMERO, J.; VARGAS, G.; GARCÍA-ROMÁN, R. Occult HBV Infection: A Faceless Enemy in Liver Cancer Development. **Viruses**. v. 6, n. 4, p. 1590 – 1611, 2014.

MORESCO, M. N.; VIRGOLINO H. D. E. A.; DE MORAIS, M. P.; DA MOTTA-PASSOS, I.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; DE ASSIS, L. M.; AGUIAR, K.R.; LOMBARDI, S.C.; MALHEIRO, A.; CAVALHEIRO, N.DE.P, LEVI, J. E.; TORRES, K.L. Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. **Vox Sanguinis**. v. 107, n. 1, p. 19 – 25, 2014.

MOTTA, J. S.; MELLO, F. C.; LAGO, B. V.; PEREZ, R. M.; GOMES S. A.; FIGUEIREDO, F. F. Occult hepatitis B virus infection and lamivudine-resistant mutations in isolates from renal patients undergoing hemodialysis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 25, n.1, p. 101 – 106, 2010.

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. **Infectious, Genetics and Evolution**. v. 14, p. 195 – 199, 2013.

NASSAL, M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. **Gut**. v. 64, n. 12, p. 1972 – 1984, 2015.

NI, Y. H.; CHANG, M. H.; WANG, K. J.; HSU, H. Y.; CHEN, H. L.; KAO, J. H.; YEH, S. H.; JENG, Y. M.; TSAI, K. S.; CHEN, D. S. Clinical relevance of hepatitis B virus genotype in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**. v. 127, n. 6, p. 1733 – 1738, 2004.

NISHIKAWA, H.; OSAKI, Y. Clinical Significance of Occult Hepatitis B Infection in Progression of Liver Disease and Carcinogenesis. **Journal of Cancer**. v. 4, n. 6, p. 473-480, 2013.

NORDER, H.; ARAUZ-RUIZ, P.; BLITZ, L.; PUJOL, F. H.; ECHEVARRIA, J. M.; MAGNIUS, L. O. The T(1858) variant predisposing to the precore stop mutation correlates with one of two major genotype F hepatitis B virus clades. **Journal of General Virology**. v. 84, n. 8, p. 2083 – 2087, 2003.

NORDER, H.; COUROUCÉ, A. M.; COURSAGET, P.; ECHEVARRI, J. M.; LEE, S. D.; MUSHAHWAR, I. K.; ROBERTSON, B. H.; LOCARNINI, S.; MAGNIUS, L. O. Genetic

diversity of hepatitis b virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and hbsag subtypes. **Intervirolgy**. v. 47, n. 6, p. 289 – 309, 2004.

NORDER, H.; COUROUCE, A. M.; MAGNIUS, L. O. Complete genomes, phylogenic relatedness, and structural proteins of six strains of hepatitis B vírus four of which represent two new genotypes. **Virology**. v. 198. n. 2, p. 489 – 503, 1994.

NORDER, H.; HAMMAS, B.; LOFDAHL, S.; COUROUCE, A. M.; MAGNIUS, L. O. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. **Journal of General Virology**. v. 73, n. 5, p. 1201 – 1208, 1992.

NUNEZ, M.; RIOS, P.; PEREZ-OLMEDA, M.; SORIANO, V. Lack of ‘occult’ hepatitis B virus infection in HIVinfected patients. **AIDS**. v. 16, n. 15, p. 2099 – 2101, 2002.

OCANA, S.; CASAS, M.L.; BUHIGAS, I.; LLEDO, J.L. Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**. v.17, n.12, p. 1553 –1557, 2011.

OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; SAKUGAWA, H.; SASTROEWIGNJO, R.I.; IMAI, M.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **Journal of General Virology**. v. 69, n. 10, p. 2575 – 2583, 1988.

OLINGER, C. M.; JUTAVIJITTUM, P.; HÜBSCHEN, J. M.; YOUSUKH, A.; SAMOUNTRY, B.; THAMMAVONG, T.; TORIYAMA, K.; MULLER, C. P. Possible new hepatitis B vírus genotype, southeast Asia. **Emerging Infectious Diseases**. v. 14, n. 11, p. 1777 – 1780, 2008.

OLINGER, C. M.; VENARD, V.; NJAYOU, M.; OYEFOLU, A. O.; MAIGA, I.; KEMP, A. J.; OMILABU, S. A.; LE FAOU, A.; MULLER, C. P. Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. **Journal of General Virology**. v.87, n. 5, p. 1163 – 1173, 2006.

OLIVEIRA, A. C. D. S. D.; COSTA E SILVA, A. M.; SCOTA, S.; FOCCACIA, R. Study of hepatitis B and C prevalence and adherence to standards of biosecurity on manicures and/or pedicures in Brazil. **BMC Proceedings**. v. 5, n. 6, 2011.

OLUYINKA, O. O.; TONG, H. V.; BUI, T. I. E. N.S.; FAGBAMI, A. H.; ADEKANLE, O.; OJURONGBE, O.; BOCK, C. T.; KREMSNER, P. G.; VELAVAN, T. P. Occult hepatitis B virus in Nigerian blood donos and hepatitis B virus transmission risks. **Plos One**. v. 10, n. 7, p. 1 – 13, 2015.

PERKINS, J. A. Medical and Scientific illustratons. Disponível em: <http://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>. Acessado em: 15/01/2015.

POLLICINO, T.; CACCIOLA, I.; SAFFIOTI, F.; RAIMONDO, G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications. **Journal of Hepatology**. v. 61, n 2, p. 408 – 417, 2014.

POURKARIM, M. R.; AMINI-BAVIL-OLYAEI, S.; KURBANOV, F.; VAN RANST, M.; TACKE, F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/ subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. **World Journal of Gastroenterology**. v. 20, n. 23, p. 7152 – 7168, 2014.

POURKARIM, M. R.; LEMEY, P.; AMINI-BAVIL-OLYAEI, S.; MAES, P.; VAN RANST, M. Novel hepatitis B virus subgenotype A6 in African-Belgian patients. **Journal of Clinical Virology**. v. 47, n. 1, p. 93 – 96, 2010.

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

RAIMONDO, G.; ALLAIN, J.P .; BRUNETTO, M. R.; BUENDIA, M. A; CHEN, D. S, COLOMBO, M.; CRAXÌ, A.; DONATO, F.; FERRARI, C.; GAETA, G. B.; GERLICH, W. H.; LEVRERO, M.; LOCARNINI, S.; MICHALAK, T.; MONDELLI, M. U.; PAWLOTSKY, J. M.; POLLICINO, T.; PRATI, D.; PUOTI, M.; SAMUEL, D.; SHOUVAL, D.; SMEDILE, A.; SQUADRITO, G.; TRÉPO, C.; VILLA, E.; WILL, H.; ZANETTI, A. R.; ZOULIM, F. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**. v. 49, n. 4, p. 652 – 657, 2008.

RAIMONDO, G.; BURK, R. D.; LIEBERMAN, H. M.; MUSCHEL, J.; HADZIYANNIS, S. J.; WILL, H.; KEW, M. C.; DUSHEIKO, G.M.; SHAFRITZ, D.A. Interrupted replication of hepatitis B virus in liver tissue of HBsAg carriers with hepatocellular carcinoma. **Virology**. v. 166, n. 1, p. 103 – 112, 1988.

RAIMONDO, G.; CACCAMO, G.; FILOMIA, R.; POLLICINO, T. Occult HBV infection. **Seminars in Immunopathology**. v. 35, n. 1, p. 39 – 52, 2013.

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.

RAIMONDO, G.; POLLICINO, T.; CACCIOLA, I.; SQUADRITO, G. Occult hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**. v. 46, n. 1, p.1 60 – 170, 2007.

RAIMONDO, G.; POLLICINO, T.; ROMANO, L.; ZANETTI, A.R. A 2010 update on occult hepatitis B infection. **Pathologie-Biologie**. v. 58, n. 4, p. 254 – 257, 2010.

REGAN, F. A. M.; HEWITT, P.; BARBARA, J. A. J; CONTRERAS, M. Prospective investigation of transfusion transmitted infection in recipients of over 20,000 units of blood. **British Medical Journal**. v. 320, n. 7232, p. 403 – 406, 2000.

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

RIBEIRO, N. R.; CAMPOS, G. S.; ANGELO, A. L.; BRAGA, E. L.; SANTANA, N.; GOMES, M. M.; PINHO, J. R.; DE CARVALHO, W. A.; LYRA, L. G.; LYRA, A. C. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. **Liver international**. v. 26, n. 6, p. 636 – 642, 2006.

SAGNELLI, E.; PISATURO, M.; MARTINI, S.; FILIPPINI, P.; SAGNELLI, C.; COPPOLA, N. Clinical impact of occult hepatitis B virus infection in immunosuppressed patients. **World Journal of Hepatology**. v. 27, n. 6, p. 384 – 393, 2014.

SAGNELLI, E.; STROFFOLINI, T.; MELE, A.; IMPARATO, M.; ALMASIO, P. L.; ITALIAN HOSPITALS' COLLABORATING GROUP. Chronic hepatitis B in Italy: new features of an old disease- approaching the universal prevalence of hepatitis B e antigen-negative cases and the eradication of hepatitis D infection. **Clinical Infectious Diseases**. v. 46, n. 1, p. 110 – 113, 2008.

SAID, Z. N. An overview of occult hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**. v. 17, n. 15, p. 1927 – 1938, 2011.

SAKAMOTO, T.; TANAKA, Y.; ORITO, E.; CO, J.; CLAVIO, J.; SUGAUCHI, F.; ITO, K.; OZASA, A.; QUINO, A.; UEDA, R.; SOLLANO, J.; MIZOKAMI, M. Novel subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotypes B and C among chronic liver disease patients in the Philippines. **Journal of General Virology**. v. 87, n. 7, p. 1873 – 1882, 2006.

SAMAL, J.; KANDPAL, M.; VIVEKANANDAN, P. Molecular Mechanisms Underlying Occult Hepatitis B Virus Infection. **Clinical Microbiology Reviews**. v.25, n. 1, p. 142 – 163, 2012.

SÁNCHEZ-TAPIAS, J. M.; COSTA, J.; MAS, A.; BRUGUERA, M.; RODÉS, J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. **Gastroenterology**. v. 123, n. 6, p; 1848 – 1856, 2002.

SANTOS, A. O.; ALVARADO-MORA, M. V.; BOTELHO, L.; VIEIRA, D. S.; PINHO, J. R.; CARRILHO, F. J.; HONDA, E. R.; SALCEDO, J. M. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. **Virology Journal**. v.7, n. 315, p. 1– 7, 2010.

SCARBOROUGH, A. Hepatitis B. 2010. (Online). Disponível em: <<http://www.austincc.edu/microbio/2704z/hbv.htm>> Acessado em: 10 de Dezembro de 2014.

SCHAEFER, S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. **Journal of Viral Hepatitis**. v. 12, n. 2, p. 111 – 124, 2005.

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

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

SHEN, T.; YAN, X-M. Hepatitis B virus genetic mutations and evolution in liver diseases. **World Journal Gastroenterology**. v. 20, n. 18, p. 5435 – 5441, 2014.

SHEPARD, C. W.; SIMARD, E. P.; FINELLI, L.; FIORE, A. E.; BELL, B. P. Hepatitis B virus infection: Epidemiology and vaccination. **Epidemiologic Reviews**. v. 28, p. 112 – 125, 2006.

SHETTY, K.; HUSSAIN, M.; NEI, L.; REDDY, K. R.; LOK A. S. Prevalence and significance of occult hepatitis B in a liver transplant population with chronic hepatitis C. **Liver Transplantation**. v. 14, n. 4, p. 534 – 540, 2008.

SHI, Z.; LI, X.; MA, L.; YANG, Y. Hepatitis B immunoglobulin injection in pregnancy to interrupt hepatitis B virus mother-to-child transmission-a meta-analysis. **International Journal Infectious Diseases**. v. 14, n. 7, p. 622 – 642, 2010.

SHOUVAL, D. What is the clinical significance of the high prevalence of occult hepatitis B in US liver transplant patients with chronic hepatitis C?. **Liver Transplantation**. v. 14, n. 4, p. 418 – 419, 2008.

SILVA, A. C.; SPINA, A. M. M.; LEMOS, M. F.; OBA, I. T.; GUASTINI, C. F.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; PINHO, J. R. R.; MENDES-CORREA, M. C. J. Hepatitis B genotype G and high frequency of lamivudine-resistance mutations among human immunodeficiency virus/hepatitis B virus co-infected patients in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, n. 6, p. 770 – 778, 2010.

SILVA, C. M.; COSTI, C.; COSTA, C.; MICHELON, C.; ORAVEC, R.; RAMOS, A. B.; NIEL, C.; ROSSETTI, M. L. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. **Journal of Infection**. v. 51, n. 1, p. 24 – 29, 2005.

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.

SOARES, M. C.; MENEZES, R. C.; MARTINS, S. J.; BENSABATHE, G. Epidemiology of hepatitis B, C and D viroses among indigenous Parakaña tribe in the Eastern Brazilian Amazon Region. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**. v. 17, n. 2, p. 124 – 135, 1994.

SQUADRITO, G.; CACCIOLA, I.; ALIBRANDI, A.; POLLICINO, T.; RAIMONDO, G. Impact of occult hepatitis B virus infection on the outcome of chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**. v. 59, n. 4, p. 696 – 700, 2013.

SQUADRITO, G.; SPINELLA, R.; RAIMONDO, G. The clinical significance of occult HBV infection. **Annals of Gastroenterology**. v. 27, n. 1, p. 15 – 19, 2014.

STUYVER, L.; DE GENDT, S.; VAN GEYT, C.; ZOULIM, F.; FRIED, M.; SCHINAZI, R.F.; ROSSAU, R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **Journal of General Virology**. v. 81, n. 1, p. 67 – 74, 2000.

SUGAUCHI, F.; ORITO, E.; ICHIDA, T.; KATO, H.; SAKUGAWA, H.; KAKUMU, S.; ISHIDA, T.; CHUTAPUTTI, A.; LAI, C. L.; UEDA, R.; MIYAKAWA, Y.; MIZOKAMI, M. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. **Journal of Virology**. v. 76, n. 2, p. 5985 – 5992, 2002.

SUMMERS, J.; MASON, W.S. Replication of the genome of a hepatitis B like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. **Cell**. v. 29, n. 2, p. 403 – 415, 1982.

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

SUPPIAH, J.; MOHD ZAIN, R.; HAJI NAWI, S.; BAHARI, N.; SAAT, Z. Drug-resistance associated mutations in polymerase (p) gene of hepatitis B virus isolated from Malaysian HBV carriers. **Hepatitis monthly**. v. 14, n. 1, p. 1 – 7, 2014.

TABOR, E.; HOOFNAGLE, J. H.; SMALLWOOD, L. A. Studies of donors who transmit posttransfusion hepatitis. **Transfusion**. v.19, n.6, p. 725 – 731,1979.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, n. 12, p. 2725 – 2729, 2013.

TANAKA, Y.; MIZOKAMI, M. Genetic Diversity of Hepatitis B Virus as an Important Factor Associated with Differences in Clinical Outcomes. **Journal of Infectious Diseases**. v. 195, n. 1, p. 1 – 4, 2007.

TELENTA, P. F.; POGGIO, G. P.; LÓPEZ, J. L.; GONZALEZ, J.; LEMBERG, A.; CAMPOS, R.H. Increased prevalence of genotype F hepatitis b virus isolates in Buenos Aires, Argentina. **Journal of clinical microbiology**. v. 37, n. 7, p. 1873 – 1875, 1997.

THIERS, V.; NAKAJIMA, E.; KREMSDORF, D.; MACK, D.; SCHELLEKENS, H.; DRISS, F.; GOUDEAU, A.; WANDS, J.; SNINSKY, J.; TIOLLAIS, P.; BRECHOT, C. Transmission of hepatitis B from hepatitis-B-seronegative subjects. **Lancet**. v. 2, n. 8623, p.1273 – 1276, 1988.

THUY LE, T. T.; RYO, H.; VAN PHUNG, L.; FURITSU, K.; NOMURA, T. Distribution of genotype/subtype and mutational spectra of the surface gene of hepatitis B virus circulating in Hanoi, Vietnam. **Journal of Medical Virology**. v. 76, n. 2, p. 161 – 169, 2005.

TIOLLAIS, P.; CHARNAY, P.; VYAS, G. N. Biology of hepatitis B virus. **Science**. v. 213, n. 4506, p. 406 – 411, 1981.

TIOLLAIS, P.; POURCEL, C.; DEJEAN, A. The hepatitis B virus. **Nature**. v. 317, n. 6037, p. 489 – 495, 1985.

TONG, S.; KIM, K. H.; CHANTE, C.; WANDS, J.; JISU, L. Hepatitis B virus e antigen variants. **International Journal of Medical Sciences**. v. 2, n. 1, p. 2 – 7, 2005.

TORBENSON, M.; KANNANGAI, R.; ASTEMBORSKI, J. STRATHDEE S.A.; VLAHOV, D.; THOMAS, D.L. High prevalence of occult hepatitis B in Baltimore injection drug users. **Hepatology**. v. 39, n. 1, p. 51 – 57, 2004.

TORBENSON, M.; THOMAS, D. L. Occult hepatitis B. **Lancet Infectious Diseases**. v. 2, n. 8, p. 479 – 486, 2002.

TORRES, C.; PIÑEIRO Y LEONE, F. G.; PEZZANO, S. C.; MBAYED, V. A.; CAMPOS, R. H. New perspectives on the evolutionary history of hepatitis B virus genotype F. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 59, n. 1, p. 114 – 122, 2011.

TU, Z.; HAMALAINEN-LAANAYA, H. K.; NISHITANI, C.; KUROKI, Y.; CRISPE, I. N.; ORLOFF, M. S. HCV core and NS3 proteins manipulate human blood-derived dendritic cell development and promote Th 17 differentiation. **International Immunology**. v. 24, n. 2, p. 97 – 106, 2012.

VALENTE, V. B.; COVAS, D. T.; PASSOS, A. D. Hepatitis B and C serologic markers in blood donors of the Ribeirão Preto Blood Center. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, n. 6, p. 488 – 492, 2005.

WANG, Z.; TANAKA, Y.; HUANG, Y.; KURBANOV, F.; CHEN, J.; ZENG, G.; ZHOU, B.; MIZOKAMI, M.; HOU, J. Clinical and virological characteristics of hepatitis B virus subgenotypes Ba, C1, and C2 in China. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 5, p. 1491 – 1496, 2007.

WANG, G. H.; SEEGER, C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. **Cell**. v. 71, n. 4, p. 663 – 670, 1991.

WEBER, B. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. **Journal of Medical Virology**. v. 78, n. 1, p. 59 – 65, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002. Hepatitis B. Disponível em: <[http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB\\_whoedcsrlyo2002\\_2.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whoedcsrlyo2002_2.pdf)> Acessado em: 04 de Janeiro de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015. Hepatitis B. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>> (OMS, 2015). Acessado em: 16 de Novembro de 2015.

YAMAMOTO, K.; HORIKITA, M.; TSUDA, F.; ITOH, K.; AKAHANE, Y.; YOTSUMOTO, S.; OKAMOTO, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. **Journal of Virology**. v. 68, n. 4, p. 2671-2676, 1994.

YIM, H. J.; LOK, A. S. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: What we knew in 1981 and what we know in 2005. **Hepatology**. v. 43, n. 2, p. 173 – 181, 2006.

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.

YUEN, M. F.; WONG, D. K.; FUNG, J.; IP, P.; BUT, D.; HUNG, I.; LAU, K.; YUEN, J. C.; LAI, C. L. HBsAg Seroclearance in chronic hepatitis B in Asian patients: replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**. v. 135, n. 4, p. 1192 – 1199, 2008.

YUKI, N.; NAGAOKA, T.; YAMASHIRO, M.; MOCHIZUKI, K.; KANEKO, A.; YAMAMOTO, K.; OMURA, M.; HIKIJI, K.; KATO, M. Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. **Hepatology**. v. 37, n. 5, p. 1172 – 1179, 2003.

ZAIDAN, A. M. E. **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO DO VIRUS DA HEPATITE B EM ALAGOAS, BRASIL**. 2009. 121p. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará; 2009 Alagoas.

ZEKRI, A. R.; HAFEZ, M. M.; MOHAMED, N. I.; HASSAN, Z. K.; EL-SAYED, M. H.; KHALED, M. M.; MANSOUR, T. Hepatitis B virus (HBV) genotypes in Egyptian pediatric cancer patients with acute and chronic active HBV infection. **Virology Journal**. v.4, n. 74, p. 1 – 7, 2007.

ZERBINI, A.; PILLI, M.; BONI, C.; FISICARO, P.; PENNA, A.; DI VINCENZO, P.; GIUBERTI, T.; ORLANDINI, A.; RAFFA, G.; POLLICINO, T.; RAIMONDO, G.; FERRARI, C.; MISSALE, G. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. **Gastroenterology**. v. 134, n. 5, p. 1470 – 1481, 2008.

ZHANG, Q.; CAO, G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma HBV properties and hepatocarcinogenesis. **Hepatitis monthly**. v. 11, n.2, p. 86 – 91, 2011.

ZHANG, Z.; ZHANG, L.; DAI, Y.; ZHANG, Y.; LI, J.; LI, X. Occult hepatitis B virus infection: influence of S protein variants. **Virology Journal**. v. 13, n. 1, p. 1 – 11, 2016.

ZOBEIRI, M. Occult Hepatitis B: Clinical Viewpoint and Management. **Hepatitis Research and Treatment**. v. 2013, n. 259148, p. 1 – 7, 2013.

## ANEXO A

**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.

Belém, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

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

## ANEXO B

NÚCLEO DE MEDICINA  
TROPICAL-NMT/  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



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

**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 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.

NÚCLEO DE MEDICINA  
TROPICAL-NMT/  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Obj  
etiv  
o  
Sec

undário:

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

NÚCLEO DE MEDICINA  
TROPICAL-NMT/  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



HBeAg. Para a análise de todos os marcadores serão utilizados kit comercial e as instruções de uso será 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 esta 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)**

## ANEXO C

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. Val: 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

1	Ligar o banho-maria a 56°C. Identificar os tubos de microcentrifuga (1,5ml)
2	Pipetar 20 µl da Protease em cada tubo.
3	Adicionar 200µl da amostra (plasma ou soro).
4	Pipetar 200µl tampão AL em cada tubo. Fazer um pulso no vórtex por 15 segundos.
5	Incubar a 56°C por 10 minutos em um termobloco.
6	Centrifugar rapidamente o tubo para remover partículas dispersas.
7	Adicionar 200µl de etanol (96-100%) na amostra e homogeneizar no vórtex por 15 segundos. Centrifugar rapidamente o tubo para remover partículas dispersas.
8	Identificar devidamente as colunas. Cuidadosamente transferir todo o lisado para as colunas sem molhar a borda.
9	Centrifugar a 8.000 RPM por 1 min. Descartar a <b>parte de baixo</b> (eluído) e ficar só com a <b>COLUNA</b> para encaixar em outro tubo coletor.
10	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).
11	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).
12	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.
13	Centrifugar a 8.000 RPM por 1 min. Descartar a coluna e guardar o tubo (congelar)

## ANEXO D

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



### Protocolo de Purificação do gel de Agarose

#### Kit PureLink Quick Gel Extration Kit

#### PROCEDIMENTOS

Ligar o banho-maria à 50°C.

#### 1 PREPARAÇÃO DO GEL (<2,0%)

1. Preparar o gel conforme o protocolo.
2. Correr o gel com 20µL de DNA, em agarose a 1,5% por 50 minutos.
3. Identificar e pesar os tubos de 1,5ml. Anotar os resultados.
4. Cortar a fatia do gel contendo o fragmento de DNA na direção da banda.  
O peso da fatia deve ser <400mg. Colocar em tubo de 1,5ml
5. Pesar o tubo contendo a fatia do gel com fragmento de DNA. Anotar o resultado.

#### 2 DISSOLVENDO O GEL

1. Adicionar 1ml do tampão de solubilização de gel (L3) nos tubos contendo a fatia do gel.
2. Colocar em banho-maria por 10 minutos, verter a cada 3 minutos. Após aguardar mais 5 minutos no banho.

#### 3 PURIFICAÇÃO DO GEL

Antes de começar a purificação preparar o tampão de lavagem (W1) com etanol conforme orientações: (para 50 reações)

Adicionar 64ml de etanol 96-100% no tampão de lavagem. Marcar no rótulo a adição do etanol. Armazenar o tampão de lavagem em temperatura ambiente.

1. Limpar as pipetas com hipoclorito e deixar a capela em luz ultravioleta por 30 minutos.
2. Identificar os tubos e as colunas.
3. Pipetar 600 µl do gel nos tubos devidamente identificados. Centrifugar a 14,000 RPM por 1 minuto.
4. Descartar o tubo e manter a coluna. Colocar em um novo tubo.

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



5. Pipetar o restante do gel nos tubos devidamente identificados. Centrifugar a 14,000 RPM por 1 minuto.
6. Descartar o tubo e manter a coluna. Colocar em um novo tubo.
7. Adicionar 500 µl do tampão de lavagem (W1). Centrifugar a 14,000 RPM por 1 minuto.
8. Centrifugar novamente a 14,000 RPM por 2 minutos para retirada de qualquer resíduo de etanol.
9. Descartar o tubo e manter a coluna. Colocar em um novo tubo de recuperação (1,5ml).
10. Adicionar 50 µl do tampão de Eluição (E5) no centro da coluna.
11. Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto.
12. Centrifugar a 14,000 RPM por 1 minuto. O tubo de recuperação contém o DNA purificado.
13. Descartar a coluna. Guarda o DNA purificado.

**OBS:** Armazenar o DNA purificado a 4°C para a utilização imediata. Aliquotar e armazenar a -20°C (freezer) para utilização em longo prazo. Evitar descongelar várias vezes a amostra.

## APÊNDICE 1



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. Peso \_\_\_\_\_ Altura \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_

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 anticoncepcional: ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

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

**Doenças :** Diabetes ( )Não ( )Sim Hipertensão ( )Não ( )Sim

Cardiopatas ( )Não ( )Sim Distúrbio renal ( )Não ( )Sim Paciente Crônico ( )Não ( )Sim

Gravidez ( )Não ( )Sim Quantos meses: \_\_\_\_\_

Doenças infecciosas ( )Não ( )Sim Qual? \_\_\_\_\_

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

POSSE DE ITENS:

ITENS	SIM	NÃO	QUANTIDADE
TELEVISÃO EM CORES			
RÁDIO			
GELADEIRA			
FREEZER			
SOFÁ			
VIDEOCASSETE E/OU DVD			
BANHEIRO			
AUTOMÓVEL			
EMPREGADA MENSALISTA			

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