

## Prevalência de genótipos e de mutantes pré-core A-1896 do vírus da hepatite B e suas implicações na hepatite crônica, em uma população da Amazônia oriental

Prevalence of hepatitis B virus genotypes and the occurrence of precore mutation A-1896 and to correlate them with the clinical presentation of chronic hepatitis, in a population group of the Eastern Amazon region

Simone Regina Souza da Silva Conde<sup>1</sup>, Lizomar de Jesus Pereira Mória<sup>1</sup>, Maria Silvia Brito Barbosa<sup>1</sup>, Ivanete do Socorro Abarcado Amaral<sup>1</sup>, Esther Castello Branco de Mello Miranda<sup>1</sup>, Manoel do Carmo Pereira Soares<sup>2</sup>, Elizabete Maria de Figueiredo Brito<sup>2</sup>, Olgaíze do Socorro Costa Souza<sup>2</sup>, Marialva Tereza de Araújo<sup>3</sup>, Sâmia Demachki<sup>3</sup>, João Renato Pinho Rebello<sup>4</sup>, Michele Gomes Soares Mesquita<sup>4</sup>, Denis Alberto Bertollini<sup>4</sup> e Ricardo Ishak<sup>3</sup>

### RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite B apresenta amplo espectro de manifestações clínicas. Objetivando conhecer os genótipos do HBV mais prevalentes e determinar a ocorrência da mutação pré-core A-1896, em uma população da Amazônia oriental, correlacionando com o diagnóstico clínico, foram selecionados 51 pacientes portadores crônicos de HBsAg e HBV-DNA positivos e divididos em três grupos: grupo A (n=14, pacientes assintomáticos); grupo B (n=20, sintomáticos HBeAg positivos) e grupo C (n=17, sintomáticos HBeAg negativos), sendo usado o sequenciador automático ABI modelo 377 para identificação de genótipos e mutantes pré-core. Os resultados evidenciaram o genótipo A como o mais prevalente, 81,8%, 89,5% e 93,7%, nos grupos A, B e C, respectivamente. A mutação pré-core A-1896 foi encontrada em 11,5% (3/26), sendo todos assintomáticos. Concluiu-se que na população estudada o genótipo A foi o mais prevalente e houve baixa ocorrência do mutante pré-core A-1896, ambos não se constituindo fatores agravantes da doença hepática.

**Palavras-chaves:** Hepatite B crônica. Genótipos. Mutação pré-core. Epidemiologia. Clínica.

### ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection presents itself with a variety of clinical manifestations. The present work aims to describe the prevalence of HBV genotypes and the occurrence of precore mutation A-1896 in a population group of the Eastern Amazon region of Brazil and to correlate them with the clinical presentation of chronic HBV infection. 51 HBsAg carriers (HBV-DNA positive) were selected and divided into three groups: A (14 asymptomatic subjects), B (20 HBeAg positive symptomatic patients) and C (17 HBeAg negative symptomatic patients). Using an automa ed DNA sequencer ABI model 377 by sequencing for determined of genotypes and precore mutation. The results showed that the genotype A was the most commonly found (81,1%, 89,5% and 93,7% in groups A, B and C, respectively) and precore mutation A-1896 was described in 11,5% (3/26) of group A subjects. Genotype A of HBV was the most prevalent (89,1%) and low occurrence of precore mutation A-1896, both not associate with the worst outcome of the chronic infection of HBV.

**Key-words:** Chronic hepatitis B. Genotypes. Precore mutation. Epidemiology. Clinical.

1. Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, Belém, PA, 2. Instituto Evandro Chagas, Belém, PA, 3. Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 4. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

**Endereço para correspondência:** Dra. Simone Regina Souza da Silva Conde. Rua diogo Mória 197/901, Umarizal, 66055-170 Belém, PA.

Tel: 91 9112-8889

e-mail: conde@libnet.com.br

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) apresenta distribuição universal, reconhecendo-se a existência de 350 milhões de portadores crônicos, sendo responsável por um milhão de óbitos por ano<sup>11</sup>. O estudo da história natural da hepatite B evidenciou manifestações clínicas variáveis, na dependência de fatores relacionados ao hospedeiro e ao próprio vírus, sendo descritos quadros agudos assintomáticos ou oligossintomáticos ou ictericos, possibilidade de hepatite fulminante, cronificação e desenvolvimento de portadores inativo, cirrose hepática e hepatocarcinoma<sup>5 18</sup>.

O HBV é o protótipo da família *Hepadnaviridae* e em seu genoma composto por DNA de fita dupla incompleta se reconhece quatro principais regiões de transcrição (*ORF*): a) o gene *P* que codifica a polimerase viral; b) o gene pré-*C/C* (core) responsável pela codificação do HBeAg e de outra proteína não estrutural, o HBeAg; c) o gene pré-*S1/S2* e *S* (superfície) codificante do HBsAg e das proteínas conhecidas como L e M, e d) o gene *X* que através de sua transcrição produz a proteína *X*<sup>12</sup>. O seqüenciamento da região *S* do genoma do HBV revelou a presença de sete genótipos do HBV, de A a G<sup>33 34 41</sup>, os quais possuem uma distribuição geográfica peculiar.

A presença do HBeAg no soro é epidemiologicamente relacionado com a replicabilidade e contagiosidade do vírus. Porém, em estudos pioneiros Carman *et al*<sup>1</sup> e Okamoto *et al*<sup>5</sup> identificaram mutantes que não sintetizavam o HBeAg, não interferindo, porém, no ciclo replicativo do mesmo, surgindo o termo mutação pré-core. A principal causa desta mutação deve-se à substituição da G (guanina) pela A (adenina) na posição do nucleotídeo (nt) 1896, e mais raramente no nt 1899, modificando o códon TGG específico para o aminoácido triptofano para um códon de parada precoce TAG, principalmente nos genótipos que possuem a timina (T) no nt 1854, portanto no B, C, D e E, e raro no A genótipo<sup>9 14</sup>.

Vários estudos tentam correlacionar os diferentes genótipos com a maior ou menor gravidade dos quadros clínicos resultantes da infecção crônica pelo HBV<sup>20 43 44 45</sup>, assim como a presença da mutação pré-core. Nesta última situação, os resultados ainda são mais controversos, visto que a prevalência destes mutantes em hepatopatas crônicos é elevada nas regiões do Mediterrâneo<sup>4 14 38</sup>, no Oriente Médio<sup>23</sup> e no leste asiático<sup>13 24 28 32</sup>, porém baixa ao norte europeu, EUA e Brasil<sup>8 29 39</sup>; e ainda são identificados mutantes em portadores inativos do vírus<sup>15 32 36</sup>.

Sendo a região Amazônica considerada uma área de alta prevalência do HBV e a falta de estudos sobre a prevalência de genótipos e mutantes pré-core nesta população, o presente trabalho objetiva conhecer os genótipos mais prevalentes do HBV e a descrição da prevalência de mutação pré-core A-1896 entre os pacientes portadores de hepatite crônica B, em uma população da Amazônia oriental, assim como correlacionar com as características epidemiológicas, clínicas e virológicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

**População de estudo.** Selecionou-se 51 pacientes portadores crônicos do HBsAg (HBV-DNA positivo) atendidos no Programa de Hepatopatias Crônicas do Hospital da

Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, localizado na cidade de Belém. Excluíram-se do estudo pacientes com infecção simultânea pelo vírus da hepatite C (HCV), delta (HDV) ou vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou os que utilizaram qualquer tipo de tratamento antiviral prévio. O total de pacientes selecionados foi dividido em três grupos: grupo A formado por pacientes assintomáticos HBeAg positivos e negativos (n: 14); grupo B, por aqueles pacientes sintomáticos HBeAg positivos (n: 20); e grupo C, por pacientes sintomáticos HBeAg negativos e anti-HBe positivos (n: 17). Estes foram submetidos a exames clínicos, laboratoriais, sorológicos, ultra-sonográficos, endoscópicos e, quando indicado, a biópsias hepáticas para estadiamento. Após a identificação destes grupos, procedeu-se a genotipagem de todos os espécimes e o seqüenciamento da região pré-core nos portadores do HBV com HBeAg negativo, tanto assintomáticos quanto sintomáticos.

**Testes sorológicos e de pesquisa do HBV-DNA.** Para os exames sorológicos das hepatites B, C e D foram utilizados EIE, tipo ELISA, com *kits* comerciais. Todos os soros foram examinados para a presença de HBsAg (Organon Teknika®, Holanda), anti-HBe (Organon Teknika®, Holanda), anti-HBs (Abbott®, EUA) e anti-HCV (Ortho Clinical Diagnostics®, Alemanha). Nas amostras positivas para o HBsAg foi efetuada a pesquisa do HBeAg, anti-HBe, anti-HBe IgM e anti-HD (Organon Teknika®, Holanda).

O HBV-DNA foi pesquisado do modo qualitativo e quantitativo utilizando-se kits comerciais do laboratório Roche® (AMPLICOR HBV MONITOR™), que utiliza a PCR para a amplificação e hibridização do DNA.

**Genotipagem do HBV.** Para detecção da região S do HBV-DNA no soro por PCR, foi empregada a técnica de extração desenvolvida por Kaneko *et al*<sup>9</sup> e por Kwok & Higuchi<sup>25</sup> com poucas modificações. A extração do DNA viral se procedeu pelo NaOH e os *primers* utilizados nas PCR foram o FHBS1 (GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTC), o RHBS1, para a primeira reação e o FHBS2 (CGT GGT GGA CTT CTC TCA ATT TTC) e RHBS2 (GCC ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC) para a segunda.

A análise do produto de PCR se procedeu com a aplicação em gel de agarose, submetido à corrente elétrica de 150 V por 35 minutos e revelada a reação com a utilização de uma fonte de ultravioleta (UV). O produto foi fotografado com máquina tipo *Polaroid*. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram uma banda de 450pb, quando comparadas ao padrão. As amostras positivas foram seqüenciadas por PCR, derivada da metodologia de Sanger *et al*<sup>27</sup> utilizando-se didesoxinucleotídeos (dNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o *kit* ABI Prism® BigDye™ Terminator (PE Applied Biosystems).

A análise dos genótipos foi realizada por meio da comparação das seqüências obtidas com as já conhecidas dos diferentes genótipos de HBV. Para esta análise foram utilizados os programas EditSeq e Megalign do pacote DNASTar (Lasergene Inc, USA).

**Seqüenciamento da região Pré-core do HBV.** O seqüenciamento da região pré-core do HBV foi efetuado nas

amostras HBeAg negativas dos grupos A e C. A extração do DNA viral se procedeu com a utilização da solução de isotiocianato de guanidina (solução GT) e os *primers* para a primeira e segunda PCR foram o EP1.1 (TCA TGG AGA CCA CCG TGA AC) e EP1.2 (GGA AAG AAG TCA GAA GGC AA) e o EP2.1 (CAT AAG AGG ACT CTT GGA CT) e EP2.2 (GGC AAA AAA GAG AGT AAC TC), respectivamente. Após a colocação do produto em gel de agarose a 1% e submetido a corrente elétrica, revelou-se a reação com a utilização de uma fonte de ultravioleta (UV), fotografando com máquina tipo *Polaroid*, sendo consideradas positivas quando apresentaram uma banda de 300pb.

Os produtos das reações de amplificação foram aplicados em gel de poliacrilamida e submetidos à eletroforese no sequenciador automático, modelo ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer). As seqüências da região pré-core foram alinhadas a uma seqüência conhecida da mesma região, livre de mutações, utilizando-se para isto os programas EditSeq e Megalign do pacote DNASTar (Lasergene Inc, USA). Posteriormente, analisou-se os pontos das seqüências que foram marcados por serem diferentes da seqüência consenso, visando o encontro de mutações A-1896 e A-1899, além de outras citadas em publicações científicas.

Para a análise estatística foram utilizados os programas EPIINFO 6.04 b e Biostat 2.0<sup>3</sup>. Utilizaram-se testes estatísticos paramétricos da ANOVA de um e de dois critérios e os não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Kolmogorov-Smirnov, nos casos de análise de variância de mais de duas amostras. Para duas amostras independentes, os testes não paramétricos empregados foram o qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Estabeleceu-se em 0,05 (5%) o nível de rejeição da hipótese de nulidade (valor de  $p \leq 0,05$ ).

O presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética Médica da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, e os pacientes selecionados foram conscientizados sobre os objetivos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, permitindo assim a realização da investigação.

## RESULTADOS

Os três grupos formados se caracterizaram por um predomínio total do sexo masculino, cada um dos quais apresentando apenas um paciente do sexo feminino. A média das idades foram de  $32,4 \pm 12,3$  anos (variação de 10-60 anos) para o grupo A,  $41,6 \pm 26,3$  anos (variação de 1-84 anos) para o B e  $52,3 \pm 15,3$  anos (variação de 6-72 anos) para o C. A diferença destas médias se mostrou estatisticamente significativa entre os grupos A e C, com valor de  $p$  igual a 0,028.

As complicações clínicas em decorrência da doença hepática, ocorridas em 7/20 (35%) pacientes do grupo B e em 9/17 (53%) do grupo C, e a letalidade de 15% (3/20) dos pacientes do grupo B e 35,2% (6/17) do C não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Nas dosagens de AST, ALT, bilirrubina total, FA, GGT e globulinas, o grupo A apresentou menores valores do que no grupo B ( $p: 0,005$ ) e C ( $p: 0,001$ ). As médias das dosagens

de albumina e atividade protrombínica foram menores nos grupos B e C em relação ao A (Tabela 1) e a diferença mostrou-se estatisticamente significativa ( $p: 0,001$  e  $p: 0,007$ , respectivamente).

Tabela 1 - Exames laboratoriais complementares dos pacientes dos grupos A, B e C.

	Grupo A média ± DP	Grupo B média ± DP	Grupo C média ± DP	
ALT (08-54 iu/l)	33,2 ± 22,0	135,5 ± 223,7	115,1 ± 137,9	$p: 0,002^*$
Bilirrubina total (0,4-1,4 mg/dl)	0,7 ± 0,3	3,1 ± 3,8	3,0 ± 3,0	$p: 0,041^*$
GGT (08-63 IU/L)	34,3 ± 28,9	122,0 ± 220,1	98,6 ± 73,9	$p: 0,020^*$
Fosfatase alcalina (36-55 g/dl)	61,1 ± 30,6	181,0 ± 142,5	155,3 ± 82,3	$p: 0,001^*$
Albumina (3,5-5,5 g/dl)	4,7 ± 0,6	3,2 ± 1,0	3,6 ± 1,1	$p: 0,001^*$
AP (> 70%)	90,8 ± 14,6	67,9 ± 29,5	53,1 ± 24,8	$p: 0,007^*$

DP: desvio padrão. ( ): valores normais e unidades de referência. ns: não significante ( $p > 0,05$ ). \* significância estatística entre os grupos A e B e entre A e C, porém não entre os grupos B e C.

Com relação às cargas virais, o grupo B apresentou níveis superiores às do A e C, com valor de  $p$  igual a 0,004 (Figura 1). Ressalta-se que o único indivíduo HBeAg positivo do grupo A possuía carga viral de 7,332 ( $\log_{10}$ ), muito acima dos demais membros deste mesmo grupo.

O diagnóstico final dos pacientes do grupo B e C encontram-se expostos na Tabela 2. Não foi possível demonstrar diferença estatística entre eles.

**Genotipagem do HBV.** Das 51 amostras de soro de pacientes processadas para genotipagem, conseguiu-se êxito em 11 (79%) do grupo A, 19 (95%) do grupo B e 17 (94%) do grupo C. As amostras que não se conseguiu efetuar a

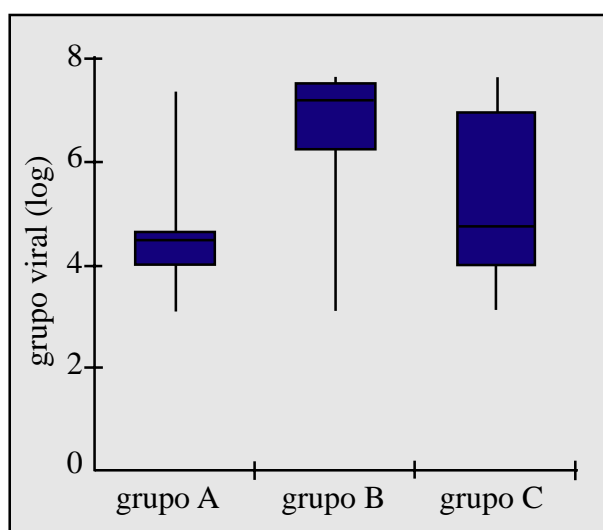


Figura 1 - Mediana e quartis das cargas virais (em  $\log_{10}$ ) do HBV dos grupos A, B e C.

Tabela 2 - Diagnóstico final (clínico e/ou histopatológico) dos pacientes dos grupos B e C.

Diagnóstico	Grupo B (20)		Grupo C (17)		
	nº	%	n	%	
Hepatite crônica	8	40,0	5	29,5	ns
Cirrose hepática	9	45,0	7	41,0	ns
Hepatocarcinoma	3	15,0	5	29,5	ns

ns: não significante ( $p > 0,05$ )

extração do ácido nucléico apresentaram carga viral baixa, inferior a 2.500 cópias/mL (Figura 2).

A genotipagem das 46 amostras positivas revelou a presença do genótipo A na grande maioria dos pacientes, 89,1% (41/46), seguido dos genótipos F em 8,7% (4/46) e D em 2,2% (1/46). A distribuição dos genótipos encontrados nos grupos estudados está resumida na Tabela 3.

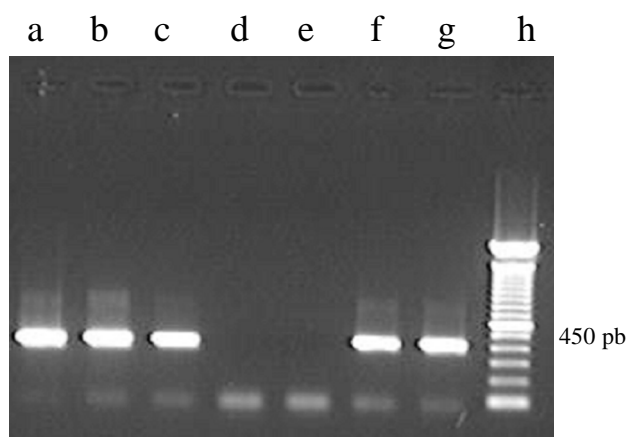


Figura 2 - Detecção por eletroforese em gel de agarose a 1% do produto de amplificação da região S do HBV (450 pb). Lanes a, b, c, f e g: amostras positivas; lane d: controle negativo; lane e: amostra negativa, lane h: padrão.

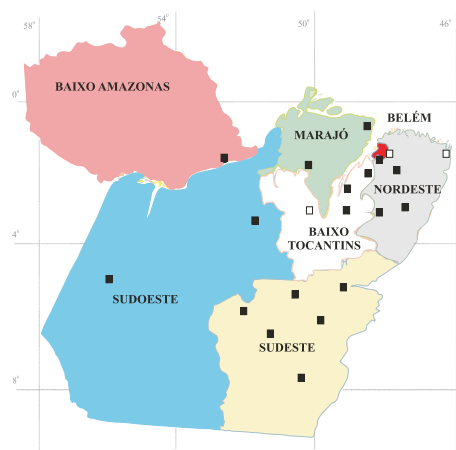
Tabela 3 - Distribuição dos genótipos do HBV nos grupos A, B e C.

Grupos	Nº	Genótipos			
		A	%	D	F
A	11	9	81,8	1	9,1
B	19	17	89,5	0	2
C	16	15	93,7	0	1
Total		41	89,1	1	4

Quando à procedência destes pacientes (Figura 3), observou-se que a maior parte dos pacientes com genótipo A, 68,3% (28/41), procediam da região metropolitana de Belém e da região sudeste do Pará. O paciente com genótipo D procedeu de Belém, assim como dois outros com genótipo F. Deste último genótipo, um terceiro paciente era oriundo de Cametá (Baixo Tocantins) e o quarto, de Vizeu, nordeste do Estado do Pará.

As características demográficas dos pacientes (Tabela 4) não mostraram diferenças estatísticas, quando distribuídas de acordo com o genótipo encontrado.

A presença do HBeAg entre os indivíduos portadores do genótipo A foi de 43,9% (18/41), taxa semelhante a encontrada nos do genótipo não A.



ESTADO DO PARÁ

Procedência	■ Genótipo A (41)	□ Genótipo não A (05)
Belém	20	3
Nordeste	3	1
Marajó	2	0
Baixo Tocantins	3	1
Sudeste	9	0
Sudoeste	3	0
Baixo Amazonas	1	0

Figura 3 - Procedência dos pacientes com genótipo A e não A do HBV.

Tabela 4 - Características demográficas dos pacientes com genótipos A e não A (D e F).

Características	Genótipo A (41)	Genótipo não A (D: 1 e F: 4)	
Sexo M/F	39 / 2	5 / 0	ns
Idade (anos) média ± DP	44 + 22,6	33 + 11,6	ns
Cor (%)			ns
branca	13,5	25,0	
negra	5,4	0	
parda	78,4	75,0	
amarela	2,7	0	

ns: não significante ( $p > 0,05$ )

A média da carga viral (em  $\log_{10}$ ) das 41 amostras com genótipo A, 7.008 cópias/mL, e a dos cinco pacientes com genótipos não A, 6.716 cópias/mL não apresentaram diferença estatística significativa (Figura 4).

O caso de genótipo D encontrava-se na condição de assintomático. Nos quatro indivíduos com genótipo F, cada grupo de diagnóstico, assintomático, hepatite crônica, cirrose

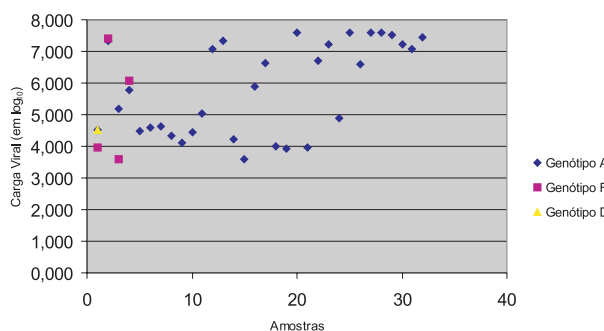


Figura 4 - Distribuição da carga viral (em  $\log_{10}$ ) das amostras de genótipos A, F e D.

hepática e hepatocarcinoma, recebeu um representante. Os representantes do genótipo A eram em 22% (9/41) assintomáticos, em 26,8% (11/41) portadores de hepatite crônica, 36,6% (15/41) portadores de cirrose hepática e, finalmente, 14,6% (6/41) portadores de CHC (Tabela 5).

Tabela 5 - Presença do HBeAg, dosagem da carga viral e o diagnóstico dos casos com genótipo A e dos genótipos não A (D e F).

	Genótipo A (41)	Genótipo diferente de A (D: 1 e F: 4)	
HBeAg positivo	18	2	ns
Média da carga viral (log <sub>10</sub> ) ± DP (cópias/mL)	7,008 ± 7,156	6,716 ± 7,040	ns
Diagnóstico			ns
assintomático	9	2	
hepatite crônica	12	1	
cirrose hepática	14	1	
hepatocarcinoma	6	1	

ns: não significante ( $p > 0,05$ )

**Mutação pré-core A-1896/ A-1899 do HBV.** No total de amostras testadas, 11,5% (3/26) mostraram-se positivas para as mutações pesquisadas (Tabela 6). No grupo A (Figura 5), a presença de mutação pré-core foi encontrada em três (25%) amostras, sendo uma do tipo A-1896, uma do tipo A-1899 e uma do tipo combinado A-1896 com A-1899. No grupo C, não foi possível evidenciar tal mutação. Ainda assim, o resultado não mostrou diferença estatística entre os dois grupos analisados (valor de  $p$  igual a 1).

Tabela 6 - Prevalência de mutação pré-core A-1896 e A-1899 nos pacientes dos grupos A e C HBeAg negativos.

	Grupo A (12)	Grupo C (14)	Total
Positivo (n) %	(3) 25,0*	0	(3) 11,5
Negativo (n) %	(9) 75,0	(14) 100,0	(23) 88,5
Total	(12) 100,0	(14) 100,0	(26) 100,0

\* Um caso de mutação A-1896, um de A-1899 e um caso de associação da A-1896 e A-1899.

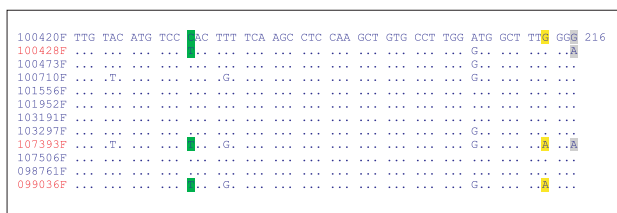


Figura 5 - Sequências nucleotídicas da região pré-core do HBV de 12 amostras dos pacientes do grupo A. (-): nucleotídeos. (■): nt 1854. (■): nt 1896. nt(■): nt 1899. ●: cepa selvagem. ●: cepa com mutação pré-core A-1899/A-1896 e 1899/A-1896.

A presença do mutante pré-core foi observada em dois casos de genótipo A, nos quais também a mutação T-1858 estava presente, e em um caso de genótipo D. Contudo, outras mutações também foram encontradas, entre as quais destacam-se a T-1762 e a A-1764 (Tabela 7).

Os três indivíduos portadores do HBV mutante pré-core A-1896/ A-1899 eram do sexo masculino, procedentes da região metropolitana de Belém e com idades de 22, 34 e 29

Tabela 7 - Relação de tipos de mutações pré-core encontradas nos grupos A e C.

Tipo de mutação	Grupo A (12)		Grupo C (15)		Total (27)	
	nº	%	nº	%	nº	%
T-1858, A-1896	1	8,3	0	-	1	3,7
T-1762, A-1764, T-1858, A-1899	1	8,3	0	-	1	3,7
T-1762, A-1764, T-1858, A-1896, A-1899	1	8,3	0	-	1	3,7
T-1762, A-1764	5	41,8	8	53,2	13	48,2
C-1814	1	8,3	1	6,7	2	7,4
T-1762, A-1764, C-1814	2	16,7	2	13,3	4	14,8
T-1762	0	-	1	6,7	1	3,7
T-1762, A-1764, T-1858	0	-	1	6,7	1	3,7
Sem mutações	1	8,3	1	6,7	2	7,4

anos e assintomáticos. As médias das cargas virais (em log<sub>10</sub>) dos três indivíduos 4,735 cópias/mL, e a do restante dos 23 sem mutação pré-core A-1896/A-1899, 4,922 cópias/mL, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si, com  $p: 0,399$ .

## DISCUSSÃO

Na caracterização dos grupos estudados, observou-se um predomínio do sexo masculino e da faixa etária adulta nos três. Contudo, o grupo A possuía média de idade inferior aos demais, com significância estatística em relação ao grupo C. Este dado se assemelha com os trabalhos de Mangia *et al*<sup>9</sup> e Niituma *et al*<sup>2</sup>, em que os pacientes portadores assintomáticos do HBV eram mais jovens em relação aos doentes crônicos HBeAg negativos. O grupo B, composto de pacientes HBeAg positivos, foi o que apresentou a maior média de carga viral (em log<sub>10</sub>), com valores significativamente maiores do que os encontrados nos grupos A e C ( $p: 0,004$ ). Chu *et al*<sup>0</sup> ao analisarem 79 pacientes com hepatite crônica B, todos comprovados histologicamente, encontraram níveis séricos do HBV-DNA por dot-blot de 944 pg/mL nos HBeAg positivos, sendo maior do que os 58pg/mL encontrados nos anti-HBe positivos. A média de idade e a carga viral se mostraram inversamente proporcionais no grupo B e foi menor do que nos pacientes do grupo C.

A genotipagem das amostras do HBV mostrou que 89,1% pertenciam ao genótipo A, 8,7% ao F e 2,2% ao D. Os estudos de genotipagem descrevem uma ocorrência variada de genótipos de acordo com a situação geográfica examinada.

O genótipo A é o mais prevalente no norte europeu, na África (seguido em menor proporção pelo D e E), EUA e em descrições de prevalência de populações urbanas com alto fluxo migratório de países da América do Sul<sup>27 30 33 34 39</sup>.

A genotipagem das amostras provenientes de cinco países da América Central (Nicarágua, Costa Rica, Guatemala, El Salvador e Honduras) detectou a presença do genótipo F em 79% das amostras, além de 14% do genótipo A, 6% do D e 1% do C 2, sugerindo ser o F o genótipo nativo da região<sup>2</sup>. Moraes *et al*<sup>1</sup> demonstrando uma técnica de PCR específica para genotipar amostras de HBV, identificou em 54 espécimes provenientes de Manaus (AM) e Macapá (AP) 69% de genótipo

A, 31% de D e 7,4% de E, e sugeriu que em outros estudos houve uma superestimação do genótipo F. Em trabalho recente, Bertolini *et al*<sup>6</sup> demonstraram em três comunidades indígenas da região Amazônica o predomínio total do genótipo F e em uma quarta 100% dos pesquisados pertenciam ao genótipo A, sendo que esta comunidade mantinha um alto grau de aculturação e contato com populações tri-híbridas.

O genótipo D é o predominante no sul da Europa e parte do Oriente Médio. Ao norte e sudoeste do continente asiático se destacam os genótipos B e C<sup>27 33 34</sup>. Trabalhos realizados com aborígenes australianos evidenciaram a presença do genótipo C<sup>1</sup>.

Ao descreverem o genótipo G, em pacientes norte-americanos e franceses cronicamente infectados pelo HBV, Stuyver *et al*<sup>1</sup> observaram que o genótipo A também era o mais prevalente, com 54% do total de casos, seguido do D (19%), C (12%), G (11%), B (3%) e E (1%). Neste estudo, o genótipo F não foi encontrado.

Como se pode observar, a extensão geográfica do Brasil, as diferenças regionais de cultura, diferenças de poder aquisitivo, composição étnica, padrões de conforto, educação, dentre outros, conseguem influenciar na grande variabilidade não só da prevalência do HBV<sup>40</sup>, como também de seus genótipos de acordo com a classificação atual no seqüenciamento da região S<sup>6 31 39</sup>.

Comunidades epidemiologicamente fechadas conseguem ter introduzido um genótipo e mantê-lo como o único circulante, enquanto que aqueles grupos em que acontece a circulação de vários genótipos, as freqüências de ocorrência são variadas e não existe, aparentemente, algum fator biológico do vírus que favoreça o predomínio de um ou outro genótipo. A maior influência, provavelmente, se dá pelos fatores associados à transmissão do HBV.

No presente trabalho, não foi possível mostrar a influência de possíveis variações genotípicas com as manifestações clínicas e a gravidade da doença hepática crônica pelo HBV, como já proposto em outros estudos<sup>20 21 43 45</sup>.

A procura da mutação pré-core A-1896 e/ou A-1899 nos pacientes HBeAg negativos, grupos A e C, mostrou que nos 12 seqüenciamentos dos pacientes assintomáticos, três (25%) possuíam esta mutação, enquanto que em 14 pacientes do grupo sintomático HBeAg negativo, em nenhum foi possível mostrar a mutação. A baixa prevalência desta mutação, 11,5% (3/26) já era esperada devido a alta prevalência do genótipo A nos grupos estudados.

A mutação pré-core A-1896 em pacientes assintomáticos HBeAg negativos foi descrita por diversos autores<sup>15 23 29 32</sup> em uma proporção extremamente variável, de 17,6% a 57,2%, de acordo com a região estudada. Nos locais onde predominam os genótipos B, D ou C, nos pacientes hepatopatas crônicos HBeAg negativos, a mutação pré-core é encontrada em 35% a 100% dos casos<sup>14 16 23 38 46</sup>, enquanto nos países de maior prevalência do genótipo A, a mutação A-1896 se situa entre 28,5% a 45,2%, encontrada principalmente em pacientes com genótipos diferentes do A, nestas populações<sup>29 39 45</sup>.

A presença da mutação mesmo em uma freqüência baixa era esperada no grupo C. Por outro lado, a diferença entre

os grupos A e C não foi estatisticamente significativa, denotando não ser este um fator influenciador na evolução clínica dos pacientes em questão.

No presente trabalho, outras mutações nas regiões promotoras do core e pré-core também foram identificadas. Merecem destaque as mutações T-1762 e A-1764, as quais foram encontradas em 76,9% dos casos, incluindo os três grupos. A presença dessas mutações foi descrita por Takahashi *et al*<sup>2 43</sup> e Karasawa *et al*<sup>2</sup>, os quais associaram a combinação das mesmas com a mutação A-1896 e descreveram a possibilidade das mutações influenciarem na evolução clínica dos pacientes infectados pelo HBV.

Estudos futuros com casuísticas maiores deverão ser efetuados para se buscar uma análise mais abrangente sobre a influência dos genótipos e mutação pré-core do HBV na evolução clínica dos pacientes cronicamente infectados, na Amazônia oriental, assim como o significado da presença das mutações promotora do core, T-1762 e A-1764.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alestig E, Hannoun C, Horal P, Lindh M. Hepatitis B virus genotypes in Mongols and Australian Aborigines. *Archives of Virology* 146: 2321-2329, 2001.
2. Arauz-Ruiz P, Norder H, Visoná KA, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of small s gene. *The Journal of Infectious Diseases* 176: 851-858, 1997.
3. Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AS. BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Brasília, 2000.
4. Barbera C, Calvo P, Coscia A, Perugini L, Dastoli G, Randone A, Bonino F, Brunetto M. Precore mutant hepatitis B virus and outcome of chronic infection and hepatitis in hepatitis B e antigen-positive children. *Pediatric Research* 36: 347-350, 1994.
5. Beasley RP, Lin CC, Hwang LL, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B. A prospective study of 22.707 men in Taiwan. *The Lancet* 21: 1129-1133, 1981.
6. Bertolini DA, Moreira RC, Soares M, Bensabath G, Lemos MF, Mello IMVGC, Pinho JRR. Genotyping of hepatitis B virus in indigenous populations from Amazon region, Brazil. *Reviews & Research* 5 (supl 1): 101, 2000.
7. Carman WF, Hadziyannis S, McGarvey MJ, Jacyna MR, Karayiannis P, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 2:588-591, 1989.
8. Castro LD, Niel C, Gomes SA. Low frequency of mutations in the core promoter and precore regions of hepatitis B virus in anti-HBe positive Brazilian carriers. *BMC Microbiology* 1: 10, 2001.
9. Chan HLY, Hussain M, Lok ASF. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology* 29: 976-984, 1999.
10. Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJF, Monjardino J, Liaw YF, Thomas HC. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: studies on hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 5: 431-434, 1985.
11. Davey S. State of the world's vaccines and immunization. World Health Organization, Geneva. p.76-82, 1996.
12. Don G. *Hepadnaviridae* and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia. p.2701-2738, 1996.
13. Ehata T, Chung WL, Omata M. Mutations of hepatitis B virus liver disease. *Gastroenterology Japonica* 28 (sup 4):7-11, 1993.
14. Frias FR, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, Guardia J. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 22: 1641-1647, 1995.

15. Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Chuang WL, Imezeki F, Saisho H, Omata M. The two different states of hepatitis B virus DNA in asymptomatic carriers HBe-antigen-positive versus anti-HBe-positive asymptomatic carriers. *Digestive Diseases and Sciences* 43: 368-376, 1998.
16. Hamasaki K, Nakata K, Nagayama Y, Ohtsuru A, Daikoku M, Taniguchi K, Tsutsumi T, Sato Y, Kato Y, Nagataki S. Changes in the prevalence of HBeAg-negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic hepatitis B. *Hepatology* 20: 8-14, 1994.
17. Hasegawa K, Huang J, Wands JR, Obata H, Liang TJ. Association of hepatitis B viral precore mutations with fulminant hepatitis B in Japan. *Virology* 185: 460-463, 1991.
18. Hoofnagle JH, Seeff LB. Natural history of chronic type B hepatitis. *In: Popper H, Schaffner F (eds) Progress in Liver Diseases*. Grune and Stratton, New York. p. 469-479, 1982.
19. Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using polymerase chain reaction technique. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 1930-1933, 1989.
20. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118: 554-559, 2000.
21. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1207-1209, 2002.
22. Karasawa T, Shirasawa T, Okawa Y, Kuramoto A, Shimada N, Aizawa Y, Zeniya M, Toda G. Association between frequency of amino acid changes in core region of hepatitis B virus (HBV) and the presence of precore mutation in Japanese HBV carriers. *Journal of Gastroenterology* 32: 611-622, 1997.
23. Kaspar RT, Klein A, Aharonson S. Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with a range of disease severity. *Hepatology* 16: 1338-1342, 1992.
24. Kim WH, Kim KH, Chung JP, Kang JK, Park IS. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver diseases. *Yonsei Medical Journal* 34: 158-165, 1993.
25. Kwok R, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-238, 1989.
26. Liaw YF, Tai DI, Chu CM, Lin DY, Sheen IS, Chen IJ, Pao CC. Early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic B hepatitis. A prospective study. *Gastroenterology* 90: 263-267, 1986.
27. Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus – large-scale analysis using a new genotyping method. *Journal of Infectious Diseases* 175: 1285-1293, 1997.
28. Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal G. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in east asian hepatitis B virus carriers. *Journal of Infectious Diseases* 179: 775-782, 1999.
29. Mangia A, Chung YH, Hoofnagle JH, Birkenmeyer L, Mushawar I, Di Bisceglie A. Pathogenesis of chronic liver disease in patients with chronic hepatitis B virus infection without serum HBeAg. *Digestive Diseases and Sciences* 41: 2447-2452, 1996.
30. Mbayed VA, Lopez JL, Telenta PFS, Palacios G, Badia I, Ferro A, Galoppo C, Campos R. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 3362-3365, 1998.
31. Moraes MTB, Niel C, Gomes SA. A polymerase chain reaction-based assay to identify genotype F of hepatitis B virus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 45-49, 1999.
32. Niitsuma H, Ishii M, Saito Y, Miura M, Kobayashi K, Ohori H, Toyoto T. Prevalence of precore defective mutant of hepatitis B virus in HBV carriers. *Journal of Medical Virology* 46: 397-402, 1995.
33. Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198: 489-503, 1994.
34. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Mitsunobu I, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *Journal General of Virology* 69: 2575-2583, 1988.
35. Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane TY, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infect hosts along seroconversion to the antibody against e antigen. *Journal of Virology* 64: 1298-1303, 1990.
36. Raimondo G, Gianmichele M, Sardo MA, Rodino G, Salvatore C, Vecchi M, Pernice M, Rumi G, Tatarella M, Franchis R. Persistence of “wild-type” and “e-minus” hepatitis B virus infection in chronic healthy HBsAg/anti-HBe positive carriers. *Journal of Hepatology* 20: 148-151, 1994.
37. Sanger, F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 54-63, 1977.
38. Santantonio T, Jung MC, Miska S, Pastore G, Pape GR, Will H. Prevalence and type of pre-C HBV mutants in anti-HBe positive carriers with chronic liver disease in highly endemic area. *Virology* 183: 840-844, 1991.
39. Sitnik R, Pinho JRR, Silva LC, Fonseca LEP, Carrilho FJ, Bernardini AP. Genótipos do vírus da hepatite B e mutações na região pré-core (VHB) em pacientes brasileiros com hepatite crônica B. *In: Resumo na Gastroenterologia Endoscopia Digestiva* 18 (supl 1): S25, 1999.
40. Souto FJD. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *Gastroenterologia Endoscopia Digestiva* 18: 143-150, 1999.
41. Stuyver L, Gendt S, Geyt CV, Zoulim F, Fried M, Schinazi R, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology* 81: 67-74, 2000.
42. Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, Yoshizawa H, Mishiro S. The precore/core promoter mutant (T1762/A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and easy method for detection. *Journal of General Virology* 76: 3159-3164, 1995.
43. Takahashi K, Ohta Y, Kanai K, Akahane Y, Iwasa Y, Hino K, Ohno N, Yoshizawa H, Mishiro S. Clinical implications of mutations C-to-T1653 and T-to-C/A/G1753 of hepatitis B virus genotype C in chronic liver disease. *Archives of Virology* 144: 1299-1308, 1999.
44. Thakur V, Gupta RC, Kazin SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver diseases patients in the Indian subcontinent. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17: 165-170, 2002.
45. Tillmann H, Trautwein C, Walker D, Michitaka K, Böker K, Manns M. Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. *Gut* 37: 568-573, 1995.
46. Tu H, Xiong SD, Trepo C, Wen YM. Frequency of hepatitis B virus e-minus mutants varies among patients from different areas of China. *Journal of Medical Virology* 51: 85-89, 1997.