



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CARACTERÍSTICAS SUBGENOTÍPICAS, FILOGENÉTICAS E
CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DO ANTÍGENO DE
SUPERFÍCIE DO VÍRUS DA HEPATITE B E O HBV DNA (VIREMIA).
RECIFE, BRASIL.**

IZOLDA MARIA FERNANDES DE MOURA

Recife
2011

IZOLDA MARIA FERNANDES DE MOURA

**CARACTERÍSTICAS SUBGENOTÍPICAS, FILOGENÉTICAS E
CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DO ANTÍGENO DE
SUPERFÍCIE DO VÍRUS DA HEPATITE B E O HBV DNA (VIREMIA).
RECIFE, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco
como requisito parcial para obtenção de
Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Lopes.

Recife

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Tadeu Pinheiro

COORDENADOR

Prof. José Ângelo Rizzo

VICE-COORDENADOR

Prof. Edmundo Lopes

CORPO DOCENTE

Prof^a Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof^a Ângela Luzia Branco Pinto Duarte

Prof. Brivaldo Marckman filho

Prof. Dinaldo Cavalcanti Oliveira

Prof. Edgar Guimarães Victor

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

Prof^a Heloisa Ramos de Lacerda de Melo

Prof. Jair Carneiro Leão

Prof^a Jocelene Tenório de Albuquerque M Godói

Prof. José Ângelo Rizzo

Prof^a Luciane Soares de Lima

Prof Lúcio Vilar Rabelo Filho

Prof^a Magdala de Araújo Novais

Prof^a Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Prof Odwaldo Barbosa e Silva

Prof^a Simone Cristina Soares Brandão

Moura, Izolda Maria Fernandes de

Características subgenotípicas, filogenéticas e correlação entre os níveis séricos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B e o HBV DNA (viremia). Recife, Brasil. / Izolda Maria Fernandes de Moura. – Recife: O Autor, 2011.

63 folhas: il., fig. e Graf.; 30 cm.

Orientador: Edmundo Lopes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências da Saúde, 2011.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. HBV (prevalência genotípica). 2. Técnicas genéticas. 3. HBsAg. 4. HBV DNA. 5. Genótipo.
I. Lopes, Edmundo.. II. Título.

UFPE

616.3623

CDD (20.ed.)

CS2011-186



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**RELATÓRIO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE IZOLDA MARIA FERNANDES DE MOURA,
ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, TURMA
INICIADA EM 2009 (DOIS MIL E NOVE)**

Às nove horas do dia trinta e um de agosto de dois mil e onze, no Prédio das Pós-Graduações do CCS, teve início, pelo Coordenador do Curso, Prof. Dr. José Ângelo Rizzo, o trabalho de Defesa de Dissertação, da mestrandia Izolda Maria Fernandes de Moura, para obtenção do **Grau de Mestre em Ciências da Saúde** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. A Comissão Julgadora eleita pelo Colegiado do Curso e homologada pelas Câmaras de Pesquisa e Pós-Graduação foi formada pelos professores: **Drª Ana Lúcia Coutinho Domingues**, do Departamento de Medicina Clínica da UFPE, **Drª Sílvia Maria Lucena Montenegro**, do Departamento de Imunologia da UFPE, **Drª Simone Cristina Soares Brandão**, do Hospital das Clínicas da UFPE. A Dissertação apresentada versou sobre: "**Características de vírus da hepatite B em Recife, Brasil**" tendo como orientador o Profº Drº Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto, do Departamento de Medicina Clínica da UFPE. Após a explanação de 30 minutos feita pela candidata, justificando a escolha do assunto, objetivos da Dissertação, metodologia empregada e resultados obtidos, ilustrados com dispositivos, foram realizadas as arguições pela Banca Examinadora, todos no tempo regulamentar e respondido pela candidata. Ao término das arguições, a Banca avaliou em secreto e proferiu o seguinte resultado: Aprovada. Nada mais havendo a registrar, foram encerrados os trabalhos, do que, para constar, foi elaborado o presente relatório que vai assinado pelo Senhor Presidente e demais membros da Comissão Julgadora. Recife, 31 de agosto de 2011.

Profª Drª Ana Lúcia Coutinho Domingues (Presidente)

Profª Drª Sílvia Maria Lucena Montenegro

Profª Drª Simone Cristina Soares Brandão

DEDICATÓRIA

A Deus, ao Divino Mestre Jesus e aos Mensageiros de Luz nos quais eu creio e me iluminam.

Aos meus pais, Glauco (in memoriam) e Hilma, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Edmundo Lopes pela orientação, paciência e dedicação para a construção desse trabalho.

À Dr^a Monica Viviana (USP) pela gentileza e disponibilidade para execução desse trabalho.

A Epitácio Villar pelo apoio, colaboração e paciência sem limites.

Aos colegas do Setor de Sorologia: Cláudia, Nádia, Edineide, Silvana, Mônica e Wânia, cujo apoio foi fundamental para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

A Cícera pela disponibilidade em realizar as coletas sanguíneas.

A Januzi por ajudar-me sempre.

A minha amiga especial Verônica Ferreira pelas vibrações nas horas de dificuldades.

A Fernandinha, Katarina e Thoby pelo afeto incondicional.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – alanina aminotransferase.

AST – aspartato aminotransferase

Anti-HBe – anticorpo anti o antígeno e do vírus da hepatite B

BEAST - *Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*

BF – *Bayes factor*

BSL - *bayesian skyline plot*

cccDNA – *closed covalent circular DNA*

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CHB – *chronic hepatitis B*

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

ddNTPs - dideoxi nucleosídeo trifosdatos

DNA – Ácido desoxirribonucléico.

HBsAg - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBeAg – antígeno e do vírus da hepatite B

HBV – Vírus da hepatite B

HC – Hospital das Clínicas

HCV – vírus da hepatite C

INF- α – Interferon alfa

MCC – Árvore de máxima credibilidade

MCMC – *Markov Chain Monte Carlo*

Pb – Pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

POL – Polimerase

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Páginas

LISTA DE FIGURAS

Artigo original 1

Figura 1 – Árvore Filogenética	31
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Artigo original 2

Gráfico 1 – Correlação entre os níveis séricos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e os níveis de alanina aminotransferase (ALT) em 56 pacientes com infecção crônica pelo vírus B.....	51
---	----

Gráfico 2 – Correlação entre os níveis séricos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e os níveis de HBV DNA (carga viral) em 56 pacientes com infecção crônica pelo vírus B.....	51
--	----

LISTA DE TABELAS

Artigo original 1

Tabela 1: Distribuição Mundial dos genótipos do vírus da hepatite B	25
Tabela 2: Distribuição genotípica e subgenotípica do vírus da hepatite B.....	27

Artigo original 2

Tabela 1: Níveis séricos de HBsAg, HBV DNA (log), AST e ALT em 56 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B..... 49

Tabela 2: Correlação entre os níveis séricos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), das aminotransferases e carga viral (log) de 56 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B..... 50

RESUMO

Trata-se de dois estudos realizados em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B, com idade média de 50 anos, sendo 37 (66%) do sexo masculino, provenientes do ambulatório de hepatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. O primeiro estudo teve como objetivo identificar a distribuição subgenotípica do vírus da hepatite B (HBV) e elaborar estudo evolutivo através da confecção da árvore filogenética. O segundo objetivou avaliar a correlação entre os níveis séricos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e a quantificação do HBV DNA (viremia). No primeiro estudo as amostras foram submetidas à extração do DNA e um fragmento de 1306 pares de bases compreendendo parcialmente o HBsAg e as regiões codificadoras da polimerase (S/POL) foi extraído e amplificados por nested PCR. As sequências foram subgenotipadas através da reconstrução filogenética, usando sequências e referências de cada genótipo obtidas do GenBank(n=267), e submetidas à análise Bayesiana a fim de inferir a dinâmica e o tempo de evolução linhagem-específica. No primeiro estudo, identificou-se que o subgenótipo A1 foi o de maior prevalência (78%), e de acordo com a disposição dos mesmos na árvore filogenética, admite-se que provêm de uma linhagem ancestral comum. A análise Bayesiana sugere que provavelmente foi introduzido em nossa região através da imigração de escravos provenientes da África, uma vez que, esse genótipo também é prevalente no continente africano.

O segundo estudo teve como objetivo avaliar a correlação entre os níveis séricos do HBsAg e o HBV DNA (viremia) em pacientes com infecção crônica pelo HBV. As amostras foram submetidas à quantificação sérica do HBsAg por ensaio imunoenzimático por quimioluminescência com micropartículas, as aminotransferases foram quantificadas pelo método cinético automatizado e a quantificação do HBV DNA foi

realizada pelo método de PCR *real-time* (SITNIK et al, 2010). Identificou-se correlação entre os testes HBsAg quantitativo e o HBV DNA (viremia) ($p = 0,0500$), como também, entre os níveis séricos do HBsAg e os valores da alanina aminotransferase (ALT) ($p = 0,0306$). Estes dados sugerem que a quantificação do HBsAg pode ser considerada ferramenta para avaliação da replicação do vírus da hepatite B, assim como para avaliação da atividade bioquímica da infecção por este agente.

Descritores: HBV, técnicas genéticas, genótipo, HBV DNA, HBsAg.

ABSTRACT

These two studies were been conducted in hepatitis B virus chronic infection patients, with an average age of 50 years old, being 37 (66%) males from the Hepatology Clinic of the Clinic Hospital of Federal University of Pernambuco. The first study aimed to identify hepatitis B virus (HBV) subgenotypic distribution and draw up evolutionary study through the making of a phylogenetic tree. The second one aimed to assess the correlation between surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg) serum levels and HBV DNA (viremia) quantification. In the first study samples were subjected to DNA extraction and a 1306 base pairs fragment comprising partially the HBsAg and polymerase coding regions (S/POL) was extracted and amplified by nested PCR. The sequences were subgenotyped and phylogenetic reconstruction sequences were made using each genotype references obtained from GenBank (n = 267), and submitted to Bayesian analysis to infer the dynamics and evolution lineage-specific. In the first study, identified that A1 (78%) subgenotype was the most prevalent and in accordance with provision in phylogenetic tree, it is assumed that they have been came from a common ancestral lineage. The Bayesian analysis suggests that it probably was introduced in our region through African slaves immigration, since this genotype is also prevalent in African continent.

The second study aimed to evaluate the correlation between HBsAg serum levels and HBV DNA (viremia) in chronic HBV infection patients. The samples were submitted to the HBsAg test serum quantification by immuno-enzymatic chemiluminescence with micro particles method, the aminotransferases were quantified by kinetic and automated method and HBV DNA quantitation was conducted by PCR *real-time* method (SITNIK et al., 2010). Identified correlation between quantitative HBsAg testing and HBV DNA (viremia) ($p = 0,0500$), as also between the serum HBsAg levels and the alanine

aminotransferase (ALT) values ($p = 0,0306$). These data suggest that HBsAg quantification can be considered a tool for hepatitis B virus replication assessment as well as for assessing the biochemical activity infection by this agent.

Descriptors: HBV, genetic techniques, DNA, HBV genotype, HBsAg.

SUMÁRIO

Páginas

INTRODUÇÃO

1. Apresentação	16
2. Referências	20

ARTIGO ORIGINAL 1

1	<i>Distribuição subgenotípica e análise filogenética do vírus da hepatite B em Recife</i>	
	<i>Brazil</i>	22
.4.1.	Resumo	23
.4.2.	Introdução	24
.4.3.	Pacientes e métodos	28
4.3.1	Desenho do estudo	28
4.3.2	Critérios de inclusão e exclusão.....	28
4.3.3	Método	28
4.3.3.1	Extração e amplificação do HBV DNA: regiões S/Polimerase	28
4.3.3.2	Seqüenciamento de HBV DNA.....	29
4.3.3.3	Análise filogenética	29
4.3.3.4	Análise Bayesiana	30
4.4	Resultados	30
4.5	Discussão	32
4.6	Conclusão	36
4.7	Referências	38

ARTIGO ORIGINAL 2

5. *Correlação entre os níveis séricos do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg)*

<i>e a carga viral (viremia)</i>	43
5.1 Resumo.....	44
5.2 Introdução	45
5.3 Pacientes e Métodos	47
5.3.1 Desenho do estudo.....	47
5.3.2 Critérios de inclusão e exclusão	47
5.3.3 Métodos	47
5.4 Análise estatística	48
5.5 Resultados	49
5.6 Discussão	52
5.7 Conclusão.....	55
5.8 Referências	56

APÊNDICES

59

1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	59
2. Questionário para coleta de dados	61
3. Árvore filogenética	62

ANEXOS

1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos	63
2. Normas para publicação	
2.1. Journal of Viral Hepatitis	64
2.2. Journal of Virological Methods	64

INTRODUÇÃO

Apresentação

A hepatite B é uma doença provocada pelo vírus da hepatite B (HBV), o qual possui característica endêmica e está presente em todos os fluidos corpóreos do indivíduo com infecção aguda ou crônica (HEATHCOTE et al 2008).

Cerca de 2 bilhões de pessoas em todo mundo têm evidências sorológicas de infecção passada ou presente pelo HBV. Dessas, cerca de 350 milhões estão cronicamente infectadas e sob risco de desenvolverem doenças hepáticas. Cerca de 15 a 40% das pessoas cronicamente infectadas desenvolverão cirrose, falência hepática progressiva e/ou carcinoma hepatocelular (HEATHCOTE et al 2008; LOK & McMAHON, 2009).

A prevalência do HBV varia entre as diferentes regiões do mundo, identificando-se regiões de alta endemicidade, tais como, extremo Oriente, Oriente Médio, África e Bacia Amazônica. Endemicidade intermediária, tais como, Ásia, Leste e Sudeste europeu e algumas partes da América do Sul e baixa endemicidade, tais como, Estados Unidos, Nordeste da Europa, Austrália e parte da América do Sul (ALEXANDER & KOWDLEY, 2005).

A transmissão pode ser vertical, da mãe para o filho, ou horizontal entre adultos usuários de drogas injetáveis, atividade sexual de risco e profissionais de área de saúde através de acidentes com materiais perfuro-cortantes ou amostras biológicas contaminadas (ALEXANDER & KOWDLEY, 2005).

O HBV apresenta variações nas sequências de seu DNA que possibilitam a classificação em 8 diferentes genótipos que variam de A – H. Atualmente foram identificados mais dois genótipos: I e J. O genótipo I foi identificado no Nordeste da

china e o J foi identificado no Vietnam, Laos e em paciente japonês com histórico de residir nas ilhas Bornéu durante a segunda guerra mundial (TATEMATSU et al, 2009, Yu et al, 2010). As divergências de sequência ocorrem no genoma completo ou em genes específicos, de forma que variações acima de 8% no genoma total ou acima de 4% no gene do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) caracterizam diferentes genótipos. Estes têm distribuição geográfica variada e, além do aspecto epidemiológico, a heterogeneidade dos genótipos do HBV parece estar relacionada com diferenças na evolução clínica da infecção e na resposta ao tratamento antiviral. Alterações na estrutura genética do HBV, portanto, podem resultar em diferentes níveis de patogenicidade viral (RONCATO et al, 2008) .

Os genótipos posteriormente foram separados em subgenótipos quando a divergência em toda sequência nucleotídica está entre 4% e 8%. Estes também apresentam distribuições geográficas distintas e frequentemente apresentam características demográficas. Tanto os genótipos quanto os subgenótipos têm apresentado diferenças no que diz respeito à resultados clínicos, prognósticos e respostas ao tratamento antiviral. `A exemplo disso, tem-se relatos de que o genótipo A tende a causar infecção crônica em pacientes agudos, por sua vez, o subgenótipo B2 estaria associado ao carcinoma hepatocelular em jovens, na sua maioria não cirróticos, na China e Taiwan, enquanto que os subgenótipos C1 e C2 estão associados a elevado risco de carcinoma hepatocelular como também, o subgenótipo D1 estaria associado à doença hepática crônica, enquanto que os genótipos E, F e H parecem ser sensíveis ao tratamento com interferon alfa (INF- α), no entanto, o genótipo G parece estar relacionado a baixos índices de resposta a esta terapêutica (CAO, 2009).

Muitos métodos para genotipagem e subgenotipagem têm sido relatados, tais como: Análise com curva de Melting (MCA), Polimorfismo do Comprimento do

Fragmento de Restrição (RFLP), Hibridização pós-PCR ou Ensaio de Linha de Sonda, PCR com *Primers* genótipo-específico e métodos de ensaios enzimáticos ligados a *immunosorbent* (LIU et al, 2006). Atualmente tem-se como aprimoramento do método de PCR, o *Nested-PCR* que é amplamente utilizado por promover maior sensibilidade e especificidade ao método, pois os *primers* utilizados na primeira amplificação são substituídos nas amplificações subseqüentes, evitando resultados falso-positivos (<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/multiplex+PCR>).

O diagnóstico laboratorial da infecção crônica pelo HBV é realizado através da identificação do HBsAg e do anticorpo contra o antígeno core (anti-HBc) persistente por mais de 6 meses. Constituem marcadores de replicação do HBV: o antígeno “e” (HBeAg) e medições seriadas do HBV DNA (HEATHCOTE et al, 2008). Mais recentemente, a quantificação do HBsAg também vem sendo utilizada para avaliar a replicação do HBV, pois sua quantificação durante o tratamento com núcleos(t)ídeos análogos pode ser útil para monitorização da resposta ao tratamento antiviral, predizendo sua perda em pacientes que alcançam a supressão do HBV DNA. Estudos sugerem que a secreção do HBsAg é altamente dinâmica e varia quantitativamente e qualitativamente durante a infecção crônica, apontando-o como possível ferramenta diagnóstica em combinação com o HBV DNA (MOUCARI & MARCELLIN, 2010).

Embora a quantificação do HBV DNA seja o método padrão para monitorização da carga viral, é relativamente caro e não está disponível em alguns serviços. Em contraste, a técnica para quantificação sérica do HBsAg é de fácil execução e apresenta baixo custo. (LEE & AHN, 2011). A literatura é um tanto diversificada a respeito da correlação entre os níveis séricos do HBsAg e a quantificação do HBV DNA. Alguns estudos referem correlação (DEGUCHI et al, 2004; TH et al, 2011), mas outros relatam fraca correlação entre ambos (LEE et al, 2010), e ainda há os que referem não ser

possível utilizá-los como testes substitutos um do outro, por não haver correlação entre os mesmos em todas as fases da hepatite B crônica (WIEGAND et al, 2011). Em função da diversidade e da ausência de dados na literatura sobre a distribuição subgenotípica e análise filogenética em nossa região, este estudo teve como objetivos avaliar características genotípicas, subgenotípicas, análises filogenética e Bayesiana do vírus da hepatite B.

Para tanto, esta pesquisa foi dividida em dois artigos originais. O primeiro avaliou a distribuição dos genótipos e subgenótipos, além da análise filogenética e Bayesiana do vírus da hepatite B, constatando-se que o genótipo A foi o mais prevalente. Pretende-se submeter este artigo ao Journal of Viral Hepatitis, cujas normas estão nos anexos

O segundo artigo avaliou a correlação entre os níveis séricos do antígeno HBsAg e a carga viral, através da quantificação do HBV DNA, encontrando-se correlação entre estes dois marcadores de replicação do HBV. Pretende-se submeter este artigo ao Journal of Virological Methods, cujas normas estão nos anexos.

Referências

1. Alexander J & Kowdley K. Epidemiology of hepatitis B – Clinical implications: Epidemiology of HBV genotypes. www.medscape.com/view_article/521995.
2. Cao G-W. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World Journal of Gastroenterol.* 2009; **15**:5761-5769.
3. Deguchi M, Yamashita N, Kagita M, Asari S, Iwatani Y, Tsuchida T, Linuma K, Mushahwar IK. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. *J. Virol. Methods.* 2004; **115**:217-222
4. Heathcote J, Abbas Z, Alberti A, Benhamou Y, Chen C, Elewaut A, Ferenci P, Hui C, Isakov V, Janssen H, Lau G, Lim S, Okanoue T, Ono-Nita S, Piratvisuth T, Rizzetto M, Sollano I, Spearman W, Yeh C-T, Yuen M, Krabshuis J. *World Gastroenterology Practice Guideline Hepatitis B*. World Gastroenterology Organisation, 2008. <http://www.worldgastroenterology.org/hepatitis-b.html>:1-29.
5. Lee JH, Kim SJ, Ahn SH, Lee J, Park Y, Kim HS. Correlation between quantitative serum HBsAg and HBV DNA test in Korean patients who showed high level of HBsAg. *J Clin Pathol* 2010; **63**:1027-1031.
6. Lee J M & Ahn S H. Quantification of HBsAg: Basic virology for clinical practice. *World J Gastroenterol*, 2011, **21**; 17:283-289.
7. Liu W-C, Mizokami M, Buti M, Lindh M, Young K-C, Sun K-T, Chi Y-C, Li H-H, Chang T-T. Simultaneous quantification and genotyping of hepatitis B virus for genotypes A to G by real-time PCR and two-step Melting curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2006; **44**:4491-4497.

8. Lok A S F & McMahon B J. AASLD Practice Guidelines. Chronic hepatitis B: Update 2009. *Hepatology*, 2009, vol. 50, n° 3.
9. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/multiplex+PCR>
10. Moucari R & Marcellin P. Quantification of hepatitis B surface antigen: a new concept for the management of chronic hepatitis B. *Liver International*. 2011; **31**:122-128.
11. Roncato M, Ballardín PAZ, Lunge VR. Influência dos genótipos no tratamento da hepatite B. Ver *HCPA* 2008; **28**: 188-193.
12. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus Divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and Provisionally assigned to a new genotype J. *J. Virol*. 2009; **83**:10538-10547.
13. Th S, Hsu CS, Chen CL, Ch L, Huang YW, Tseng TC, Chen PJ, Lai MY, Chen DS, Kao JH. Serum hepatitis B surface antigen concentration correlates with HBV DNA level in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther*. 2010; **15**:133-139.
14. 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 analysis suggest an additional hepatitis B virus genotype I. www.plosone.org. 2010; **5**: 1-9.
15. Wiegand J, Wedemeyer H, Finger A, Heidrich B, Rosenau J, Michel G, Bock CT, Manns MP, Tillmann HL. A decline in hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) predicts Clearance, but does not correlate with quantitative HBeAg or HBV DNA levels. *Antivir Ther*. 2008; **13**:547-554.

1º Artigo Original

**Distribuição subgenotípica e análise filogenética do vírus da hepatite B em Recife,
Brasil**

Izolda F. Moura¹, Edmundo P. Lopes², Mónica Viviana Alvarado-Mora³, João Renato Pinho³, Flair Carrilho³

¹ Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

³ Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia do Instituto de Medicina Tropical e Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), Brasil

Autor Correspondente

Edmundo P. Lopes

e-mail: epalopes@uol.com.br

Fone/Fax: 55 81 2126-8517

Introdução: A história da evolução das hepatites virais na população humana inclui a origem das variantes filogenéticas denominadas genótipos virais. Muitas observações clínicas e epidemiológicas sugerem que diferenças nos genótipos virais propiciam comportamentos clínicos e biológicos diferentes. **Objetivo:** O propósito desse estudo foi avaliar a distribuição genotípica e elaborar a análise filogenética do vírus da hepatite B (HBV) de pacientes de Recife, Brasil, entre Julho de 2009 e Dezembro de 2010. **Pacientes e métodos:** Foram investigados 60 pacientes infectados pelo HBV, com idade média de 50 anos, sendo 39 (65%) do sexo masculino e 21 (35%) do feminino, dos quais 33 (55%) foram genotipados através da obtenção e amplificação de fragmento de 1306 pb, compreendendo parte da DNA polimerase e do antígeno de superfície do vírus da hepatite B. As sequências obtidas foram subgenotipadas por análise filogenética. **Resultados:** Identificou-se a seguinte distribuição subgenotípica: A1 (79%), F2a (12%), A2 (6%) e F4(3%). Verificou-se que aqueles identificados como subgenótipo A1, encontram-se no mesmo *cluster* na árvore filogenética. **Conclusão:** Neste estudo, a grande maioria dos pacientes apresentou o subgenótipo A1, sugerindo que o HBV deve proceder de uma mesma linhagem viral. Conforme a distribuição na árvore filogenética e a análise Bayesiana, possivelmente este subgenótipo foi introduzido em nossa região através de escravos provenientes da África por volta do século XVIII.

Marcadores: distribuição genotípica do HBV, análise filogenética, genótipo, prevalência genotípica, subgenótipo, Vírus da hepatite B,

Introdução

A evolução das hepatites virais na população humana inclui a origem de variantes filogenéticas denominadas genótipos virais. O genótipo caracteriza-se por diferenças nucleotídicas de 8% ou mais ao longo de toda extensão do genoma do vírus da hepatite B (HBV) ou 4% ou mais dentro do gene S do antígeno de superfície (HBsAg) viral (OSIOWY & GILES, 2003; WELZEL et al, 2006). Muitas observações clínico-epidemiológicas sugerem que diferenças nos genótipos virais promovem comportamentos clínicos e terapêuticos distintos. (RAIMONDI et al,2010).

O HBV é classificado em nove genótipos de A a I, os quais se subdividem em subgenótipos, que são caracterizados por algumas substituições de aminoácidos no determinante “a” do gene S e denominadas com algarismos A1 – A5, ... , F1 –F4 (SCHEIBLAUER et al,2010). Estes genótipos têm distribuições geográficas distintas, conforme se observa na tabela 1. (MENDEZ et al, 2007; CAO, 2009; ALCADE et al, 2009; BECKER et al,2010; YU et al,2010).

Tabela 1: Distribuição Mundial dos genótipos do vírus da hepatite B

Genótipo	Distribuição geográfica
A	América do Norte, norte da Europa, Índia e África sub Saariana, América do Sul (pandêmico)
B e C	Sudeste Asiático, China e Japão
D	Sul da Europa, África, Oriente Médio e Índia
E	Oeste e sul da África
F	América Central, América Latina e população nativa da América do Sul
G	Estados Unidos e França
H	América Central
I	Nordeste da China, Vietnã e Laos.

Adaptado de (ALCALDE et al, 2009; BECKER et al 2010; Yu et al, 2010)

A diversidade genética do HBV e a distribuição geográfica dos seus subgenótipos constituem ferramentas para a reconstrução de sua história evolutiva, como também pode auxiliar a complementação de dados genéticos para a compreensão da evolução e migrações passadas do ser humano (CAO, 2009). Vale salientar que o fluxo migratório global pode determinar modificação parcial da distribuição geográfica genotípica autóctone do HBV, com presença de alguns genótipos em áreas onde eles não eram anteriormente difundidos. De fato, países da América do Sul, como o Brasil, têm apresentado fluxo emigratório para países da Europa, como Itália, propiciando a difusão de diferentes genótipos do HBV, tais como, D e A. (PALUMBO et al, 2007^a; PALUMBO et al, 2007^b)

Admite-se ser clinicamente relevante a determinação do genótipo e subgenótipo do HBV, na medida em que se descrevem diferenças no comportamento clínico e resposta à terapia antiviral. Com efeito, pacientes infectados com o genótipo A parecem responder melhor à terapia com o interferon do que aqueles infectados com o genótipo D, já aqueles infectados com o genótipo B respondem melhor do que os infectados com o genótipo C. Similarmente, alguns relatos sugerem que diferenças genotípicas específicas influenciam na resposta terapêutica a análogos nucleosídeos ou nucleotídeos (BOWDEN & THOMPSON, 2008; RONCATO et al, 2008).

No Brasil, estudos de identificação dos genótipos e subgenótipos do HBV demonstram ocorrer grande variabilidade genética na distribuição geográfica do vírus (ALMEIDA, 2009). Em nosso país, a população é miscigenada e por isso exhibe padrão de circulação genotípica diferente das encontradas em outros países Latino Americanos (TONETTO et al, 2009). A presença dos genótipos A e D, respectivamente, sugere influência da Afro-descendência em função do período da escravidão, além da influência da colonização européia. Nas populações de origem predominantemente indígena, observa-se maior ocorrência do genótipo F (ALMEIDA, 2009).

Na tabela 2 observam-se as distribuições genotípicas e subgenotípicas do vírus da hepatite B em várias regiões do Brasil. Note-se que apenas nas últimas publicações foi possível o sequenciamento até subgenótipo.

Em virtude da escassez de dados relativos à distribuição genotípica e subgenotípica do HBV em nossa região, este estudo teve como objetivo avaliar a distribuição subgenotípica e construir árvore filogenética deste agente viral.

Tabela 2: Distribuição genotípica e subgenotípica do vírus da hepatite B

Autor(es)	Local	Amostras	Distribuição genotípica
Carrilho et al, 2004	Santa Catarina	813	D(57,1%), A (30,6%), C(12,2)
Ferreira et al, 2006	Goiás	17	D (61,5%), A (30,8%), F(7,7%)
Ribeiro et al, 2006	Bahia	96	A (84,4), F (13%), B (1,3%)
Victoria et al, 2008	Amazônia	55	A (81,82%), F(13,64), D(4,54%)
Motta-Castro et al, 2008	Mato Grosso do Sul	239	A1 (86%),A2(2%),D(10%)
Tonetto et al, 2009	São Paulo	139	A (55%), D (38%), F(4%), C (3%)
Matos et al, 2009	Goiás	11	A1 (100%)
Santos et al, 2010	Amazônia	40	A1 (37,1%), D3 (22,8%), F2a (20%), D4 (17,1%), D2 (2,8%)
Alvarado-Mora et al, 2011	Maranhão	4	A1 (100%)

Note-se que apenas nas últimas publicações foram pesquisados os subgenótipos do HBV.

Pacientes e Métodos

Desenho do estudo

Trata-se de estudo transversal descritivo, para avaliar a distribuição genotípica e subgenotípica do HBV em pacientes do ambulatório de hepatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, entre Julho de 2009 e Dezembro de 2010.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE sob registro CEP/CCS/UFPE n 363/09 (Anexo 1) e todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

Foram coletadas amostras sanguíneas dos pacientes, as quais foram levadas para o Laboratório Central do Hospital das Clínicas, onde foram centrifugadas e o soro congelado a -20°C.

Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão utilizados foram pacientes acima de 18 anos que apresentassem HBsAg e anti-HBc positivos, há mais de 6 meses. Os de exclusão foram pacientes com sorologia positiva para o vírus da hepatite C (HCV) e imunodeprimidos.

Método

Extração e amplificação do HBV DNA: regiões S/Polimerase

As amostras foram levadas, congeladas, para o Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), onde foram realizadas: genotipagem e subgenotipagem, além das análises filogenética e Bayesiana do HBV.

A extração do HBV DNA foi realizada retirando 100µL de soro de cada amostra, usando o método do ácido guanidino tiocianato / fenol/ clorofórmio (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987; KWOK & HIGUCHI, 1989). Um fragmento com 1306 pb, compreendendo parcialmente o HBsAg e as regiões codificadoras da DNA polimerase (S/Pol) foi amplificado pelo método nested PCR, usando os primers PS3132F/2920R e PS3201F/P1285R (ALVARADO-MORA et al, 2011).

Seqüenciamento de HBV DNA

O DNA amplificado foi purificado usando ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit (Invitrogen). O seqüenciamento foi realizado em ABI 3500 Automatic Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando dideoxi nucleosideo trifosfatos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes (Big Dye1 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit—Applied Biosystems).

As seqüências consenso foram obtidas através do alinhamento de ambas as fitas seqüenciadas (sentido e anti-sentido) usando o SEQUENCHER software (Gene Codes Corporation Ann Arbor, Michigan, United States of America).

Análise filogenética

As seqüências foram genotipadas através de reconstrução filogenética usando seqüências e referência de cada genótipo obtidas do GenBank (n=267). As seqüências foram alinhadas usando Muscle software e editadas com SE-AL software. A análise filogenética foi conduzida usando a simulação Markov Chain Monte Carlo (MCMC) implementada no BEAST (Bayesian evolutionary analysis by sampling trees) v.1.5.3. Foram rodadas 10 milhões de gerações as quais foram suficientes para obter a

convergência dos parâmetros. A árvore de máxima credibilidade (MCC) foi obtida resumizando as 10.000 árvores de substituição e em seguida, foram removidos 10% do burn-in usando Tree Annotator v.1.5.3 (DRUMMOND & RAMBAULT, 2007)

Análise Bayesiana

Do total de sequências obtidas, 24 do subgenótipo A1 agruparam-se em único “cluster” com grande suporte. Em seguida foi realizada análise coalescente utilizando o BEAST v 1.5.4. O bayesian skyline plot (BSL) foi realizado usando o melhor modelo de substituição nucleotídica (GTR+G+I), obtido previamente no Modeltest (POSADA & CRANDALL, 1998). A taxa previa de 2.6×10^{-4} s/s/y obtida através da análise bayesiana usando a região recombinante do HBV (ZHOU & HOLMES, 2007). Dez milhões de gerações foram suficientes para convergir todos os parâmetros (Effective sampling size >200). O relógio molecular com melhor resultado foi escolhido por comparação do Bayes Factor (BF).

Resultados

Durante o período do estudo foram avaliados 60 pacientes, sendo que em 27 (45%) não foi possível identificar os subgenótipos.

Foram, portanto, avaliados 33 pacientes infectados pelo HBV, com idade média de 50,6 anos, sendo, 65% do sexo masculino e 35% do feminino. As amostras destes pacientes revelaram a seguinte distribuição genotípica: 28 A (85%), e 5 F (15%). A análise subgenotípica revelou a seguinte distribuição: 26 A1 (79%), 4 F2a (12%), 2 A2 (6%) e 1 F4 (3%).

Na árvore filogenética estão posicionados os subgenótipos identificados neste estudo.

Figura 1: Árvore Filogenética



O primeiro estudo sobre subgenotipagem e análise filogenética realizada no Nordeste em comunidade Afro-decendente, antigo quilombo, no estado do Maranhão foi recentemente publicado (ALVARADO-MORA et al, 2011). Este é o segundo estudo com descrição do subgenótipo e análise filogenética em pacientes de grande cidade da região Nordeste do Brasil. O subgenótipo A1 foi o de maior prevalência (79%), salientando-se que a disposição subgenotípica na árvore filogenética indica que a maioria deles provavelmente procede de uma única linhagem em comum, possivelmente de Afro-descendentes.

De fato, estudo realizado em comunidade Afro-brasileira, composta por 219 descendentes de escravos com HBsAg positivos, no estado de Mato Grosso do Sul, detectou o HBV DNA em 59 amostras (25%), em 32 (15%) não foi realizada avaliação pela biologia molecular e as demais 128 (58%) foram negativas para o HBV DNA. Das 59 amostras HBV DNA positivas, 50 foram viáveis à subgenotipagem, cuja distribuição foi de 44 amostras (88%) para o genótipo A, sendo 43 (86%) subgenótipo A1, 1 (2%) subgenótipo A2 e 5 (10%) pacientes foram identificados como genótipo D. O subgenótipo A1 do HBV tem demonstrado ser bastante comum nas populações brasileira e africana, provavelmente em função do comércio de escravos que ocorreu durante três séculos (MOTTA-CASTRO et al, 2008).

Estudo epidemiológico para hepatite A, B e C realizado na comunidade de Kalunga, Goiás, considerada uma das maiores comunidade Afro-Brasileiras isoladas, avaliou 878 indivíduos dos quais 16 (1,8%) foram positivos para o HBsAg e 19 (2,2%) foram positivos para o anti-HBc. Dentre os 16 HBsAg positivos, o HBV DNA foi detectado em 12 (75%) amostras, das quais 11 (91,7%) foram genotipadas e todas foram identificadas como genótipo A, subgenótipo A1. De acordo com a disposição

desses subgenótipos na árvore filogenética, este achado sugere o deslocamento da população Africana durante o tráfico de escravos entre os séculos XVI e XIX (MATOS et al, 2009).

De fato, estudo realizado em antigo quilombo, atualmente, comunidade de Frechal, no estado do Maranhão, entre 72 amostras analisadas, 9 (12,5%) foram positivas para o HBsAg, dessas, 6 foram positivas pelo *nested* PCR para o fragmento S (416 pb) e dentre essas, 4 foram amplificadas nas regiões S/POL (1406 pb) e identificadas como subgenótipo A1 agrupadas em um mesmo *cluster* na árvore filogenética, sugerindo que o mesmo é de origem Africana (ALVARADO-MORA et al, 2011).

Similarmente, estudo realizado em comunidade rural de região semi-árida do Nordeste, na aldeia de Cavunge, Bahia, em população de 1.476 indivíduos, constatou que 38 (2,6%) apresentavam infecção crônica pelo HBV, destes, 9 indivíduos (23,6%) tiveram a pesquisa do HBV DNA positiva e todos foram identificados como genótipo A. Estes dados indicam que esse genótipo é de ampla prevalência no Brasil, especialmente em nossa região (ALMEIDA et al, 2006).

Estudo genotípico envolvendo 40 pacientes com infecção crônica pelo HBV, realizado em Rondônia, revelou subgenótipo A1 (37,1%), subgenótipo D3 (22,8%), subgenótipo F2a (20,0%), subgenótipo D4 (17,1%) e subgenótipo D2 (2,8%) (SANTOS et al, 2010). Diferentemente do nosso, o HBV encontrado neste estudo, de acordo com a análise filogenética, não procedia de uma única linhagem comum, sugerindo que ocorreram diferentes entradas desses subgenótipos nesta região da Amazônia. Houve identificação de subgenótipos F2a mesmo que em baixa prevalência, como no nosso estudo, o que provavelmente está relacionado à influência nativa Sul-Americana. Adicionalmente, esse genótipo foi primariamente encontrado nas populações indígenas

da América do Sul, sobretudo da Venezuela, Colômbia e Brasil (DEVESA et al, 2008; ALVARADO-MORA et al, 2011).

Estudo evolutivo descritivo sobre a caracterização do subgenótipo A1 do HBV refere que este subgenótipo foi primeiramente identificado no sul da África, tais como: África do Sul, Malawi, Uganda, Tanzânia, Somália, e Yemen. Como também na Índia, Nepal e Filipinas. Identificaram ainda que as divergências nucleotídicas dentro deste subgenótipo sugerem que o mesmo possui longa história natural nos locais onde apresentam alta endemicidade (KIMBI et al, 2004; KRAMVIS & KEW, 2007).

Os estudos filogenéticos realizados por HANNOUN et al, 2005, comparando as diferenças entre os subgenótipos A1 do HBV encontrado na África, Europa e Ásia, sugerem que o genótipo A é de origem africana. Ainda, que a correlação filogenética entre as linhagens da Somália e Ásia sugerem que o subgenótipo A1 atualmente encontrado no continente asiático é de fato de origem Africana.

Similarmente, estudo realizado no Quênia com 80 amostras positivas para o HBsAg, 52 foram seqüenciadas e identificaram a seguinte distribuição genotípica: A (88,5%), E (7,7%) e D (3,8%), nas demais amostras não foi possível o sequenciamento (MWANGI et al, 2008).

Em estudo realizado em Luanda, Angola, para caracterização epidemiológica e molecular do HBV, envolvendo 508 indivíduos, entre profissionais de saúde, visitantes e pacientes de hospitais públicos, 77 pessoas (15,1%) apresentaram o HBsAg positivo. Dentre estes, o HBV DNA foi detectado em 41 (53%), dos quais 40 indivíduos foram genotipados, obtendo-se a seguinte distribuição genotípica: E (87,5%), A (10%), e 1 genótipo D (OSIOWY & GILES, 2003). Vale salientar, que o subgenótipo A1 tem sido prevalente em países da África sub-Saariana, tais como, África do Sul, Zimbabwe e Malawi, sugerindo que esse subgenótipo está relacionado à população nativa. Estudos

prévios sugerem que o genótipo A tem longa história natural na África, mais que os genótipos D e E, e que a maioria dos genótipos A Africanos são sequenciados como subgenótipo A1 (VALENTE et al, 2010).

Diferentemente do subgenótipo A1, o genótipo E do HBV foi descrito pela primeira vez em 1993 e salvo nos casos de africanos que vivem no norte da Europa, este genótipo não tem sido encontrado fora do continente africano. Apesar da pequena diversidade na sequência genômica do genótipo E (1,67%), o mesmo tem se disseminado crescentemente entre o Senegal e Angola. Isto sugere que este genótipo tem curta história evolutiva em humanos. Esta afirmativa pode ser justificada pelo índice de evolução relacionado à distância genética entre as regiões S e pré-S. Portanto, supondo-se que o genótipo E do HBV tenha sido introduzido em um único evento, levaria cerca de 200 anos para o mesmo apresentar uma taxa de diversidade de 1,67%. Por outro lado, a introdução do HBV a partir de outras espécies de hospedeiros em primatas, incluindo humanos, estima-se ter ocorrido cerca de 6000 anos atrás. (MULDERS et al, 2004).

O processo migratório tem grande influência na distribuição genotípica de cada região, a exemplo disso, estudo realizado em 67 portadores crônicos da infecção pelo HBV, em Porto Alegre, constatou que 53 amostras (79%) foram positivas para o HBV DNA. A maior frequência foi do genótipo D em 32 pacientes (60%) seguida do genótipo A em 18 amostras (34%) e do genótipo F em 3 amostras (5,4%) da população. A justificativa desse achado se dá pelo fato de que a população do Rio Grande do Sul é predominantemente de ancestralidade européia, o que poderia explicar a menor prevalência do genótipo A. (BECKER et al, 2010).

É importante salientar que após a extração do DNA viral, as amostras são inicialmente amplificadas, a fim de se obter fragmento de 416 pb da região S, que

recobre parcialmente o HBsAg para confirmação da presença e quantificação de DNA viral. Porém, para caracterização dos subgenótipos deve-se, posteriormente, amplificar um fragmento maior, com 1306 pb das regiões S/POL, usando-se o nested PCR. Em função disso, em nosso estudo foi possível apenas a caracterização dos subgenótipos de 55% das amostras, provavelmente em função da baixa carga viral ou sequenciamento inferior a 1300 pb.

De fato, estudo de distribuição subgenotípica no estado de Rondônia, das 40 amostras analisadas pela mesma metodologia utilizada em nosso estudo, em 35 (87%) foi possível identificar o subgenótipo (SANTOS et al, 2010). Do mesmo modo, estudo genotípico do HBV em 67 pacientes, 53 (79,1%) amostras tiveram seus subgenótipos identificados (BECKER et al, 2010). Similarmente, estudo realizado com 22 portadores crônicos de infecção pelo HBV, do estado de São Paulo, o DNA viral foi positivo em 15 (68%) amostras, o genótipo foi identificado em todas que apresentaram carga viral detectável. Em sete casos, a carga viral do HBV DNA foi indetectável pelo método de PCR quantitativa, sugerindo que a causa da não amplificação foram os baixos níveis de HBV DNA viral nas amostras (ALCALDE et al, 2009).

Conclusão

Neste estudo foi observado que a maioria dos pacientes estava infectada com o genótipo A (85%) do HBV, sendo o subgenótipo A1 (79%) o mais encontrado. A análise filogenética indica que a contaminação ocorreu pela mesma linhagem viral e a análise Bayesiana sugere que a introdução deste subgenótipo em nossa região ocorreu pela vinda de escravos Africanos por volta do século XVIII.

A pesar dos nossos achados estarem concordantes com a literatura, trata-se de estudo-piloto, portanto, futuros estudos com amostragem mais ampla serão necessários para confirmar esses resultados.

Referências

1. Alcalde R Melo FL, Nishiya A, Ferreira SC, Langhi Júnior MD, Fernandes SS, Marcodes LA, Duarte AJS, Casseb J. Distribution of hepatitis B vírus genotypes and viral load levels in Brazilian chronically infected patients in São Paulo city. *Rev. Inst. Med. Trop. S Paulo* 2009; **51**: 269-272.
2. 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. *BJID* 2006; **10**:317-321.
3. Almeida D. Importância clínica dos genótipos do vírus B. *Gazeta Médica da Bahia* 2009; **79**: 39-40.
4. Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Carrilho FJ, Pinho JRR. Molecular epidemiology and genétic diversity of hepatitis B vírus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. *J Gen Virol.* 2010; **91**:501-508.
5. Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, Pinho JRR. Molecular characterization of the hepatitis B virus genotypes in Colômbia: A Bayesian inference on the genotype F. *Infection, Genetics and Evolution* 2011; **11**:103-108.
6. Alvarado-Mora MV, Gomes-Gouveia MS, Nascimento MC, Carrilho FJ, Pinho JRR. Detection of hepatitis B vírus subgenotype A1 em a Quilombo community from Maranhão, Brazil. *Virol. J.* 2011; **8**:415 (*in press*).
7. Becker CE, Mattos AA de, Bogo MR, Branco F, Sitnik R, Kretzmann NA. Genotyping of hepatitis B vírus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil. *Arq. Gastroenterol* 2010; **47**:13-17.

8. Bowden DS & Thompson AJ. New developments in HBV molecular diagnostics and quantitative serology. *Hepatol Int* 2008; **2**:S3-S11.
9. Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol* 2009; **15**:5761-5769.
10. Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JRR, Mello IMVGC, Bertolini DA, Lemos MF, Moreira RC, Bassit LC, Cardoso RA, Ribeiro-dos-Santo G, Silva LC da. Hepatitis B vírus infection in haemodialysis centers from Santa Catarina state, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health* 2004, **4**:13 <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/4/13>
11. Chomczynski P & Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*1987; **162**:156-159,
12. Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, Poblete F, Gutierrez MF, Botto C, Pujol FH. Subgenotype Diversity of hepatitis B vírus American genotype F in Amerindians from Venezuela and general population of Colômbia. *J. Med. Virol.* 2008; **80**:20-26.
13. Drummond AJ & Rambaut A. BEAST:Bayesian Evolutionary Analysis by Sample Trees. *BMC Evolutionary Biology*. 2007, **7**:214.
14. Ferreira RC, Teles SA, Dias MA, Tavares VR, Silva SA, Gomes SA, Yoshida CFT, Martins RMB. Hepatitis B vírus infection profile in hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors and genotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006; **101**:689-692.
15. Hannoun C, Söderström 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. *J. Gen. Virol.* 2005; **86**: 2163-2167.
16. Kimbi GC, Kramvis A, Kew MC. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. *J. Gen. Virol.* 2004; **85**: 1211-1220.
 17. Kramvis A, Kew MC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatol. Res.* 2007; **37**:S9-19.
 18. Kwok S & Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. [*Nature*](#).1989; **339**:237-238.
 19. Matos MAD, Reis NRS, Kozlowski AG, Teles AS, Motta-Castro ARC, Mello FCA, Gomes AS, Martins RMB. Epidemiological study of hepatitis A, B and C in the largest Afro-Brazilian isolated community. *The Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 2009; **103**:899-905.
 20. Mendez DKM, Barboza L, Valles RCH. Genótipos de hepatitis B: Importância clínica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol* 2007; **27**:1-7.
 21. Motta-Castro ARC, Martins RMB, Araujo NM, Niel C, Facholi GB, Lago BV, Mello FCA, Gomes SA. *Arch Virol* 2008; **153**:2197-2205.
 22. Mulders MN, Venard V, Njayou M, Etorh PA, Oyefolu AOB, Kehinde MO, Tamfum J-JM, Nèbie YK, Maïga I, Ammaerlaan W, Fack F, Omilabu AS, Le Faou A, Mullar CP. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E through West Africa. *JID* 2004; **190**:400-408.
 23. Mwangi J, Nganga Z, Songok E, Kinyua J, Lagat N, Muriuki J, Lihana R, Khamadi S, Osman S, Lwembe R, Kiptoo M, Mwau M, Chirchir R, Mpoke S, Nyamongo J, Okoth , Yamada R, Kageyama S, Ichimura H. Molecular genetic diversity of hepatitis B virus in Kenya. *Intervirol.* 2008; **51**:417-421.

24. Osiowy C & Giles E. Evaluation of the INNO-LIPAHBV Genotyping assay for determination of hepatitis B virus genotype. *J. Clin. Microbiol.* 2003; **41**:5473-5477.
25. Palumbo E, Scotto G, Faleo G, Cibelli DC, Saracino A, Angarano G. Prevalence of HBV-genotypes in immigrants affected by HBV-related chronic active hepatitis. *Arq Gastroenterol* .2007; **44**:54-57. ^a
26. Palumbo E, Scotto G, Falco G, Cibelli DC, Angarano G. Prevalence of HBV genotypes in South American immigrants affected by HBV-related chronic active hepatitis. *BJID* 2007; **11**:311-313. ^b
27. Posada D and Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. **14**: 817-818.
28. Raimondi S, Maisonneuve P, Bruno S, Mondelli MU. Is response to antiviral treatment influenced by hepatitis B virus genotype? *J. Hepatol.* 2010; **52**:441-449.
29. Ribeiro NRC, Campos GS, Angelo ALD, Braga EL, Santana N, Gomes MMS, Pinho JRR, De Carvalho WA, Lyra LGC; Lyra AC. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. *Liver International* 2006; **26**: 636-642.
30. Roncato M, Ballardin PAZ, Lunge VR. Influência dos genótipos no tratamento da hepatite B. *HCPA*. 2008; **28**: 188-193.
31. Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Vieira D S, Pinho JRR, Carrilho Fj, Honda ER, Salcedo JM. Characterization of hepatitis B vírus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. *Virol J.* 2010; **7**: 315.
32. Scheiblaue H, El-Nageh M, Diaz S, Nick S, Zeichhardt H, Grunert H-P, Prince A. Performance avaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg)

- assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. *Vox Sanguinis* 2010; **98**:403-414.
33. Tonetto PA, Gonçalves NSL, Fais VC, Vigani AG, Gonçalves ESL, Feltrin A, Gonçalves Jr FL. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the Southeast of Brazil. *BMC Infectious Diseases* 2009; **9**: 149. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/149>
34. Valente F, Lago BV, Castro CAV, Almeida AJ, Gomes AS, Soares CC. Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda, Angola. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2010; **105**: 970-977.
35. Victoria FS, Oliveira CMC, Victoria MB, Victoria CB, Ferreira LCL. Characterization of HbeAg-negative chronic hepatitis B in Western Brazilian Amazonia. *BJID*. 2008; **12**: 27-37.
36. Zhou y & Holmes EC. Bayesian estimates of evolutionary rate and age of hepatitis B virus. *J. Mol. Evol*. 2007; **65**: 197-205.
37. Welzel TM, Miley WJ, Parks TL, Goedert JJ, Whitby D, Ortiz-Conde BA. Real Time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. *J. Clin. Microbiol*. 2006; **44**: 3325-3333.

**Correlação entre os níveis séricos do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg)
e a carga viral (viremia)**

Izolda F. Moura¹, Edmundo P. Lopes², Mônica Viviana Alvarado-Mora³, Michele Gomes-Gouveia³, João Renato Pinho³, Flair Carrilho³

¹ Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

³ Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia do Instituto de Medicina Tropical e Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), Brasil

.

Autor Correspondente

Edmundo P Lopes

*epalopes@uol.com.br

Fone/Fax: 55 81 2126-8517

Resumo

Introdução: A quantificação sérica do DNA do vírus da hepatite B (HBV DNA) tem sido utilizada na monitorização da carga viral, mas apresenta elevado custo e não está ainda amplamente disponível. Em contraste, o método para quantificação do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) apresenta baixo custo e fácil execução. Os níveis séricos do HBsAg e do HBV DNA (viremia) são utilizados para avaliação da replicação viral no acompanhamento da infecção crônica e da resposta ao tratamento antiviral. **Objetivos:** O propósito deste estudo foi avaliar a correlação entre os níveis séricos do HBsAg, das aminotransferases e do HBV DNA. **Pacientes e métodos:** Foram incluídos no estudo 56 pacientes com infecção crônica pelo HBV que apresentavam o HBsAg, atendidos no ambulatório de Hepatologia, sendo 37 (66%) do sexo masculino, com idade média de 50,3 anos. A quantificação do HBsAg foi realizada usando ensaio imuno-enzimático por quimiluminescência com micropartículas em equipamento automatizado ARCHITEC i 2000 SR - Abbott®. A quantificação do HBV DNA foi realizada pelo método de nested PCR e as dosagens das aminotransferases (AST e ALT) foram realizadas no equipamento COBAS C 501 - Roche®. **Resultados:** os valores médios foram: HBsAg 185,9 IU/mL, HBV DNA (em log) 3,1, AST 39 U/L, ALT 53,5 U/L. Observou-se correlação entre os níveis séricos da ALT e o HBsAg ($p = 0,03$) e entre os níveis séricos do HBsAg e a viremia ($p = 0,05$). **Conclusão:** Neste estudo verificou-se que os pacientes que apresentaram níveis séricos de HBsAg mais elevados também apresentaram maior atividade de ALT e maior viremia.

Marcadores: HBV, HBsAg quantitativo, HBV DNA, nested PCR, AST, ALT.

Introdução

O antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) é o produto do gene S do HBV, o qual circula no soro em altas concentrações, acima de 10^{13} partículas/mL. Após a “montagem” do vírion, um número de HBsAg remanescentes podem ser secretados como filamentos não-infecciosos ou partículas esféricas subvirais. O número de partículas inócuas é cerca de 10^4 a 10^6 maior do que o número de partículas Dane a qual contém o HBV DNA. (LEE et al, 2010).

Estudos mostram que os níveis séricos do DNA, ou seja, a carga viral é o principal determinante para risco de cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e morte em pacientes com hepatite B crônica (ALCALDE et al, 2009).

Alguns autores consideram que níveis de HBV DNA acima de 10 mil cópias/mL predizem forte risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, independente da presença do antígeno e do vírus da hepatite B (HBeAg), dos níveis de ALT e ocorrência de cirrose hepática. (CHEN et al, 2006).

De fato, YUEN et al, 2008, avaliando pacientes com infecção crônica pelo HBV, identificaram que o risco de desenvolver carcinoma hepatocelular era maior em pacientes cuja soroconversão do HBsAg ocorria em idade acima de 50 anos, quando comparado com pacientes cuja soroconversão do HBsAg ocorreu antes desta idade.

Alguns estudos investigaram a correlação entre o HBsAg quantitativo e o HBV DNA em relação às suas aplicações clínicas. Porém, este último ainda é considerado o marcador de maior acurácia para replicação do HBV em curso. Pouco se sabe sobre suas respectivas variações, as quais provavelmente originam-se da dinâmica do ciclo de vida do HBV. Apesar de alguns estudos referirem correlação entre ambos os testes, resultados conflitantes têm sido relatados. (LEE et al, 2010).

A quantificação sérica do DNA do vírus da hepatite B (HBV DNA) constitui padrão para monitorização da carga viral, este método tem elevado custo e não está ainda disponível em alguns serviços. Em contraste, o método para quantificação do HBsAg menor custo e mais simples execução. DEGUCHI et al, em 2004, foram os primeiros a reportarem o significado clínico de elevadas concentrações de HBsAg em dois grupos distintos de pacientes: o primeiro com sorologia positiva para o antígeno e da hepatite B (HBeAg) e o segundo com sorologia positiva para o anticorpo e do vírus da hepatite B (anti-HBe). Estes autores analisaram os níveis séricos de HBsAg e de HBV DNA, nesses grupos, e identificaram correlação entre os testes. (DEGUCHI et al, 2004; LEE, 2011),

Desde então, os níveis séricos do HBsAg e do HBV DNA vêm sendo utilizados na avaliação da replicação do HBV durante o acompanhamento da infecção crônica e da resposta ao tratamento antiviral. (SHAO et al, 2007; VALSAMAKIS, 2007).

Segundo JAROSZEWICZ et al, 2010, os níveis séricos do HBsAg correlacionam-se com os níveis séricos do HBV DNA, nos pacientes com infecção crônica, embora essa associação não seja observada em todas as fases da infecção. Identificaram que, de modo geral, os níveis séricos do HBsAg eram maiores em pacientes com HBeAg positivo quando comparado aos pacientes com HBeAg negativo. Porém, a correlação era fraca ou ausente, quando analisaram esses marcadores em cada fase isoladamente, concluindo que a dissociação entre o HBV DNA e o HBsAg, poderia refletir a desconexão entre a replicação do HBV e a produção de HBsAg.

Tendo em vista as divergências entre os relatos, como também a escassez de dados na nossa região, este estudo tem por objetivo avaliar a correlação entre os níveis séricos do HBsAg, das aminotransferases e do HBV DNA em pacientes com infecção crônica pelo HBV em Recife.

Pacientes e Métodos

Desenho do estudo

Trata-se de estudo transversal para avaliar a correlação entre os níveis séricos do HBsAg, das aminotransferases e do HBV DNA (viremia) em 60 pacientes do ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, com idade média de 50,3 anos, dos quais 37 (66%) eram do sexo masculino, no período de Julho de 2009 a Dezembro de 2010. Destes 60 pacientes, 4 amostras não foram suficientes para a quantificação de todos os parâmetros do estudo, portanto, foram excluídos. Perfazendo um total de 56 pacientes.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE sob registro CEP/CCS/UFPE n 363/09 (Anexo 1) e todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

Foram coletadas amostras sanguíneas dos pacientes, as quais foram levadas para o Laboratório Central do Hospital das Clínicas, onde foram centrifugadas, o soro congelado a -20°C.

Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão utilizados foram pacientes acima de 18 anos que apresentassem HBsAg e anti-HBc positivos, há mais de 6 meses. Os de exclusão foram pacientes com sorologia positiva para o vírus da hepatite C (HCV) e imunodeprimidos.

Métodos

As dosagens das aminotransferases e do HBsAg foram realizadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFPE,

As aminotransferases, AST e ALT, foram dosadas por método cinético automatizado no equipamento COBAS C 501 - ROCHE®, de acordo com as especificações do fabricante, com os seguintes limites superiores de normalidade: AST = 37 U/L para homens e mulheres e ALT = 41 U/L para homens e 33 U/L para mulheres.

O HBsAg sérico foi quantificado usando ensaio imuno-enzimático por quimiluminescência com micropartículas no equipamento automatizado Architect *i* 2000 SR® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois), de acordo com o protocolo do fabricante. Concentrações $\geq 0,05$ IU/mL foram consideradas positivas e o valor máximo de linearidade do método foi considerado até 250 IU/mL.

A quantificação do HBV DNA foi realizada no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP e sua extração foi realizada retirando 100 μ L de soro de cada amostra, usando o método do ácido guanidino tiocianato / fenol/ clorofórmio (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987). Para evitar resultados falsos positivos, procedimentos rigorosos para a técnica diagnóstica de amplificação do ácido nucléico foram seguidos (KWOK & HIGUCHI, 1989). Um fragmento de 1306 pb, compreendendo parcialmente o HBsAg e as regiões codificadoras da DNA polimerase (S/Pol) foi amplificado pelo método nested PCR, usando os primers PS3132F/2920R e PS3201F/P1285R (ALVARADO-MORA et al., 2011). A quantificação da carga viral é expressa em IU/mL cuja sensibilidade de detecção é a partir de 50 IU/mL ou em logaritmo, cujo limite inferior de detecção é 1,7 log e o superior até 7 log.

Análise estatística

Foram calculados valores mínimos, máximos, média, mediana e desvio padrão dos resultados obtidos.

As variáveis AST, ALT e Carga viral foram analisadas utilizando-se o cálculo do coeficiente de correlação de Spearman (**rho**) como medida de correlação não paramétrica.

Resultados

Durante o período do estudo, foram incluídos 60 pacientes, sendo 4 excluídos por não apresentarem amostras suficientes para quantificação de todos os parâmetros do estudo, perfazendo um total de 56 pacientes. Estes apresentaram idade média de 50,3 anos, sendo 19 do sexo feminino (34%) e 37 do masculino (66%).

Na tabela 1 verifica-se a distribuição das variáveis estudadas quanto aos valores mínimo, máximo, média, mediana e desvio-padrão. Em relação à AST e ALT, não foi possível dosá-las em 3 e 2 amostras respectivamente.

Tabela 1 – Níveis séricos de HBsAg, HBV DNA (log), AST e ALT em 56 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

Variáveis	N	Min	Max	Média	Mediana	Desvio
HBsAg (IU/mL)	56	0,12	250	185,9	250,0	101,7
Carga Viral (Log)	56	1,7	7	3,1	2,5	1,7
AST (U/L)	53	10	162	39,0	30,0	32,8
ALT (U/L)	55	11	433	53,5	40,0	57,8

Aplicando-se os testes de coeficiente de correlação de Spearman (**rho**) para analisar os resultados da quantificação do HBsAg em relação às variáveis AST, ALT e carga viral (log), identificaram-se correlações entre os níveis séricos do HBsAg e os

valores de ALT ($p=0,0306$), como também, entre os níveis séricos do HBsAg e os valores de carga viral ($p=0,050$). As demais variáveis não apresentaram correlação.

Tabela 2 – Correlação entre os níveis séricos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), das aminotransferases e carga viral (log) de 56 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

Correlações	HBsAg IU/mL	
	Spearman	
	(rho)	p-valor
AST UI/L	0,08	0.5847
ALT UI/L	0,29	0,0306
Carga Viral (log)	0,27	0,0500

O gráfico 1 demonstra através do teste de Spearman, a correlação entre os níveis séricos do HBsAg e os valores de ALT ($p=0,0306$) e o gráfico 2 demonstra através do mesmo teste estatístico a correlação entre os níveis séricos do HBsAg e a carga viral (viremia) ($p=0,0500$).

Gráfico 1 – Correlação entre os níveis séricos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e os níveis de alanina aminotransferase (ALT) em 56 pacientes com infecção crônica pelo vírus B.

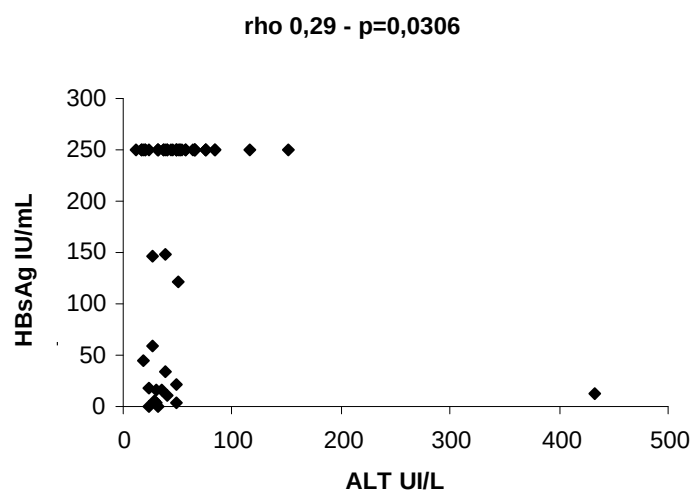
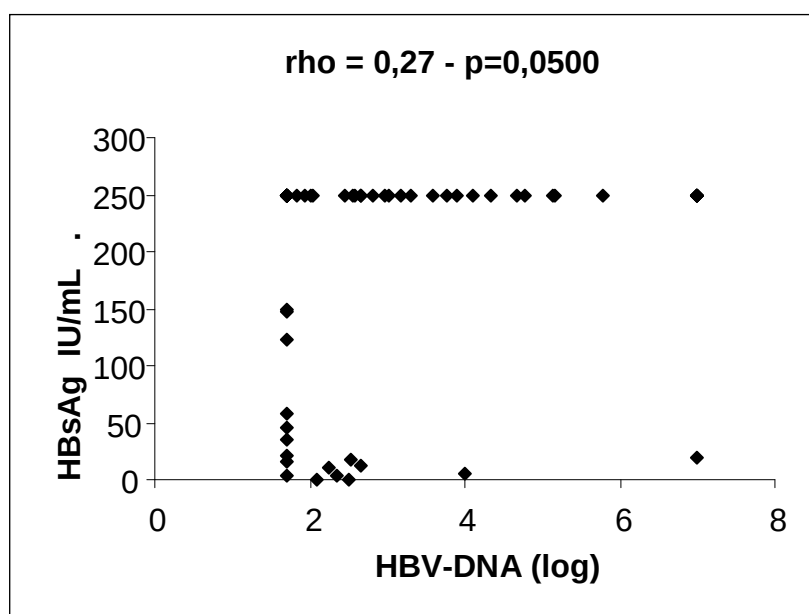


Gráfico 2 – Correlação entre os níveis séricos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e os níveis de HBV DNA (carga viral) em 56 pacientes com infecção crônica pelo vírus B.



Discussão

Apesar do progresso na disponibilização do HBsAg quantitativo, várias questões sobre o seu significado ainda não estão esclarecidas, posto que os mecanismos de controle da sua produção pelo HBV ainda são pouco compreendidos. A discrepância entre os níveis séricos do HBsAg e do HBV DNA existe, embora, estudos sobre correlação entre os mesmos tenham sido documentados. Provavelmente, isto ocorre em função do HBsAg ser produzido e secretado através de mecanismos complexos que ainda não estão completamente elucidados. A exemplo disso, tem-se variáveis interferentes, tais como, escape imunológico dos mutantes e questões resultantes de sobreposição devido a mutação do gene P (LEE & AHN, 2011).

SONNEVELD et al, 2011, referem que a relevância clínica da quantificação do HBsAg sérico é derivada de sua correlação com o DNA circular covalentemente fechado intra-hepático (cccDNA), que é o principal modelo replicativo do HBV. Através dessa associação, acredita-se que possivelmente o HBsAg sérico serviria como marcador para resposta imunológica à terapia antiviral, independente da resposta viral (replicação), mensurada através da quantificação do HBV DNA.

Em virtude da escassez de dados em nosso meio, no que diz respeito ao significado dos níveis séricos do HBsAg, este estudo teve como objetivo avaliar a correlação entre os níveis deste marcador, os níveis do HBV DNA e os níveis das amino transferases.

JAROSZEWICZ et al, 2010, em estudo seccional realizado em 226 pacientes com infecção pelo HBV, não tratados, foram categorizados de acordo com a fase da infecção e genótipo. Identificaram correlação entre os níveis séricos do HBsAg e do HBV DNA ($p < 0,001$), entretanto, consideraram que os níveis de HBsAg apresentaram diferenças significativas durante o curso natural da infecção, como também, entre os

diferentes genótipos. Consideraram esses achados relevantes para compreensão história natural da infecção pelo HBV, como também, a quantificação do HBsAg como importante ferramenta diagnóstica e marcador preditivo da reativação da infecção.

LEE et al, 2010, em estudo realizado com 565 pacientes, os quais apresentavam níveis séricos de HBsAg maiores que 250 IU/ml, dentre esses, 361 com infecção crônica pelo HBV e os demais, 204 pacientes, eram cirróticos e com hepatocarcinoma. Correlacionaram os níveis séricos do HBsAg com os níveis de HBV DNA nos pacientes com infecção crônica e concluíram que a correlação era significativa, porém, considerada fraca ($p < 0,019$, $\rho = 0,168$).

Por outro lado, em estudo realizado com 23 pacientes de transplante hepático e 18 de transplante cardíaco, todos em tratamento antiviral, foram determinados os níveis séricos do HBsAg e HBV DNA. Os autores afirmaram não haver correlação entre esses testes e que a quantificação do HBsAg não substitui a quantificação do HBV DNA durante a da terapia antiviral (WIEGAND et al, 2011).

Similarmente, MUKHERJEE et al, 2010, avaliaram 31 indivíduos com infecção crônica pelo HBV correlacionando a quantificação do HBsAg com o HBV DNA e verificaram que os níveis séricos do HBsAg são independente dos níveis séricos do HBV DNA.

Por sua vez, MOLINA-PEREZ et al, 2010, relataram que os níveis de ALT são um dos mais importantes fatores preditivos de lesão histológica avançada, inclusive como marcador bioquímico no acompanhamento da hepatite pelo HBV, pois têm sido utilizados como indicador de terapia antiviral em pacientes que apresentam níveis duas vezes acima do limite de normalidade. Teoricamente, como a agressão do HBV ao hepatócito é imunomodulada, os pacientes com imunidade preservada, que apresentam

níveis séricos mais elevados de aminotransferases devem apresentar maiores taxas de replicação viral, ou seja, maiores níveis de HBsAg e de HBV DNA.

De fato, neste estudo verificou-se correlação entre os níveis séricos do HBsAg e da alanina aminotransferase (ALT) ($\rho=0,29$ e $p=0,0306$), o que é sugestivo de lesão histológica em função da replicação viral.

LIAW et al, 2008 observaram que as elevações da ALT e os flares de hepatite são resultantes da resposta imune do hospedeiro, restrita ao antígeno expresso nos hepatócitos, mediada pelo linfócito T citotóxico, que resultará em apoptose e necrose.

De fato, SHERMAN et al, 2007 verificaram que a elevação prolongada da ALT é sugestiva de lesão hepática e estando o HBV DNA acima de 20.000 IU/mL, há indicação de terapia antiviral.

IIOEJE et al, 2006, em estudo realizado em Taiwan sobre correlação entre HBV DNA (viremia) e a progressão para cirrose em pacientes com infecção crônica pelo HBV, identificaram que o risco de cirrose aumenta significativamente com o aumento dos níveis de HBV DNA, independentemente dos níveis de ALT.

De fato, neste estudo apesar de identificarmos correlação entre os níveis séricos do HBsAg e do HBV DNA, consideramo-la fraca ($\rho=0,27$ $p=0,05$). Considere-se algumas limitações às quais o mesmo foi submetido, pois, conforme sugerem JEROSZEWICZ et al, 2010, os níveis do HBV DNA se correlacionam com os níveis séricos do HBsAg na infecção crônica, porém, essa correlação varia de acordo com a fase da infecção. Em relação a essa assertiva, nossos pacientes não foram estratificados quanto à fase da infecção, conforme é referido nos critérios de inclusão e exclusão. Além disso, as amostras dos pacientes não foram estratificadas quanto à sorologia para o HBeAg e anti-HBe como fizeram DEGUCHI et al, 2004 e LEE, 2011.

Conclusão

A pesar das limitações presentes neste estudo, foi identificada fraca correlação entre os níveis séricos do HBsAg e do HBV DNA (viremia) ($p=0,05$), como também, correlação entre os níveis de ALT e de HBsAg ($p=0,03$). Entretanto, futuros estudos envolvendo maiores casuísticas e maiores detalhamentos relacionados às fases de infecção crônica dos pacientes serão necessários para confirmar estes dados.

Referências

1. Alcalde R, Melo FI, Nishiya A, Ferreira SC, Langhi Júnior MD, Fernandes SS, Marcondes LA, Duarte AJS, Casseb J. Distribution of hepatitis B vírus genotypes and viral load levels in Brazilian chronically infected patients in São Paulo city. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 2009; **51**:269-272.
2. Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, Pinho JRR. Molecular characterization of the hepatitis B virus genotypes in Colômbia: A Bayesian inference on the genotype F. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011; **11**:103-108.
3. Chen C-J, Yang H-L, Su J, Jen C-L, You S-L, Lu S-N, Huang G-T, Hooje U H. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. 2006; **295**:65-73.
4. Chomczynski P & Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987;**162**:156-9,
5. Deguchi M, Yamashita N, Kagita M, Asari S, Iwatani Y, Tsuchida T, Linuma K, Mushahwar IK. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. *J. Virol. Methods*. 2004; **115**:217-22.
6. Galli C, Orlandini E, Penzo L, Badiale R, Caltran G, Valverde S, Gessoni G. What's the role of serology for the study of chronic hepatitis B vírus infection in the age of molecular biology? . *J Med Virol*. 2008; **80**:974-979.
7. Hooje U, Yang H-L, Su J, Jen C-L, You S-L, Chen C-J. Predicting Cirrhosis Risk Based on the Level of Circulating Hepatitis B Viral Load. *Gastroenterol*. 2006; **130**: 678-686.

8. Jaroszewicz J, Serrano BC, Wursthorn K, Deterding K, Schlue J, Raupach R, Flisiak R, Bock CT, Manns M, Wedemeyer H, Cornberg M. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol*. 2010; **52**:514-522.
9. Kwok S & Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. [*Nature*](#).1989; **18**; **339**:237-238.
10. Lee JH, Kim Sj, Ahn SH, Lee J, Park Y, Kim HS. Correlation between quantitative serum HBsAg and HBV DNA test in Korean patients who showed high level of HBsAg. *J Clin Pathol* 2010; **63**:1027-1031.
11. Lee J M, Ahn S H. Quantification of HBsAg: Basic virology for clinical practice. *World J Gastroenterol*. 2011; **17**: 283-289.
12. Liaw Y-F, Leung N, Kao J-H, Piratvisuth T, Gane E, Han K-H, Guan R, Lau G K K, Locarnini S. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. *Hepatol Int*. 2008; **2**: 263-283.
13. Molina-Perez E, Castroagudín JF, Aguilera-Guirao A, Otero-Antón E, Tomé-Martinez-de-Rituerto S, Mera-Calviño J, Rodríguez-Calviño JJ, Dominguez-Muñoz E. Viral and host factors related with histopathologic activity in patients with chronic hepatitis B and moderate or intermittently elevated alanine aminotransferase levels. *Rev Esp Enferm Dig*. 2010, **102**: 519-525.
14. Mukherjee RM, Reddy PB, Arava J, Rao PN, Mitnala S, Gupta R, Reddy DN. Relationship between serum HBsAg level, HBV DNA level and peripheral immune cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. www.dovepress.com. 2010;**2**; 157-162.

15. Shao J, Wei L, Wang H, Sun Y, Zhang LF, Li J, Dong JQ. Relationship between hepatitis B virus DNA levels and liver histology in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*. 2007; **13**:2104-2107.
16. Sherman M, Shafran S, Burak K, Doucette K, Wong W, Girgrah N, Yoshida E, Renner E, Wong P, Deschênes M. Management of chronic hepatitis B: Consensus guidelines. *Can J Gastroenterol* 2007; **21** suppl C.
17. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Reviews*. 2007; **20**:426-439.
18. Wiegand J, Wedemeyer H, Finger A, Heidrich B, Rosenau J, Michel G, Bock CT, Manns MP, Tillmann HL. A decline in hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) predicts Clearance, but does not correlate with quantitative HBeAg or HBV DNA levels. *Antivir Ther*. 2008; **13**:547-554.
19. Yuen M-F, Wong D, Fung J, Ip P, But D, Hung I, Lau K, Yuen J, Lai C-L. *Gastroenterology*. 2008; **135**:1192-1199.

**AMBULATÓRIO DE HEPATOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
UFPE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar do estudo, no qual, será comparado o seu nível de HBV DNA (carga viral para hepatite B) com a quantificação do HBsAg, (antígeno superfície do vírus da hepatite B). Ambos os métodos destinam-se ao acompanhamento dos indivíduos portadores de hepatite B crônica submetidos a tratamento ou não. Sendo que o HBV DNA trata-se de um método da biologia molecular que é extremamente dispendioso e não está disponível na maioria dos centros de saúde do país, enquanto que o teste para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) na sua forma quantitativa é um exame rotineiro, bem menos dispendioso e extremamente mais rápido. Em vista disso é importante provar que os dois testes se correlacionam, podendo um substituir o outro.

O exame é feito através de coleta de sangue venoso no próprio serviço de Hepatologia no seu dia de consulta médica, não sendo necessário comparecer ao hospital apenas para esse fim. Como forma de risco para o paciente poderá ocorrer um desconforto à picada da agulha ou no máximo ficar um pouco arroxeadado no local da coleta do sangue. Como importante benefício para o paciente, pode-se entender que em instituições onde não esteja disponível a quantificação da carga viral (HBV DNA) para acompanhar seu tratamento, e agora com a nova disponibilidade do HBsAg quantitativo, recém lançado no mercado, pode-se dispor da quantificação do vírus da Hepatite B de forma bem mais rápida, precisa e mais acessível aos hospitais que não dispõem de grandes recursos financeiros, sendo assim a resposta ao tratamento anti viral poderá ser avaliada mais rapidamente e com menor custo. **Portanto é de grande importância sua participação.**

Eu, _____,

ouvi do pesquisador responsável, no dia de minha consulta no ambulatório de hepatologia, através de contato verbal, o esclarecimento sobre o estudo que será realizado, compreendendo para que serve o mesmo. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Eu concordo em participar do estudo.

Recife, ____ / ____ / ____

Assinatura do voluntário (ou representante legal)

Nº. de identidade.

Assinatura do pesquisador principal

Nº. de identidade.

Assinatura 1ª Testemunha

Nº. de identidade.

Assinatura 2ª Testemunha

Nº. de identidade.

Apêndice 2

INFORMAÇÕES SOBRE O PACIENTE

Nome: _____

Prontuário: _____ IDADE _____

Exames Laboratoriais: data:

Hemograma:

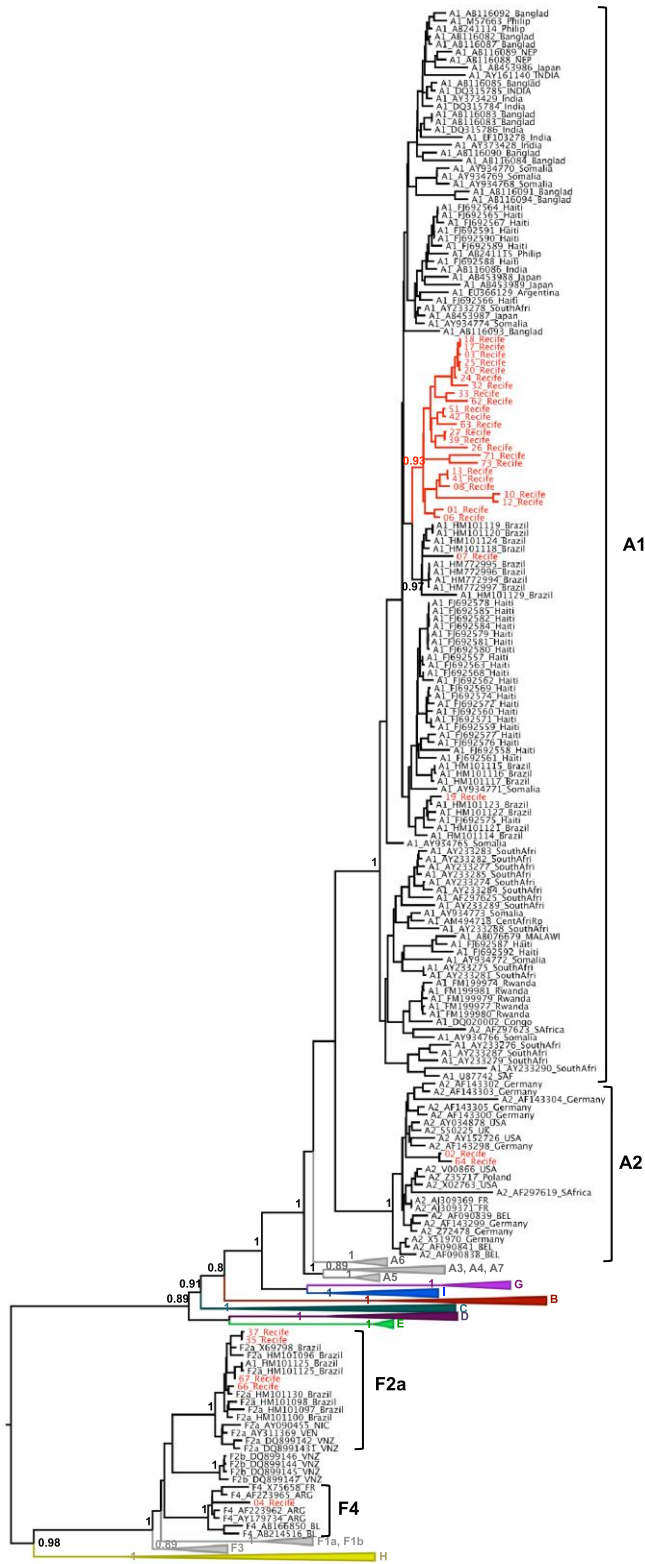
TP _____ AE _____ INR _____

TGO _____ TGP _____

HBsAg QT _____ HBV DNA _____

Achados histológicos: data: _____

Apêndice 3: Árvore Filogenética



Anexo 1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 081/2010 - CEP/CCS

Recife, 15 de abril de 2010

Registro do SISNEP FR – 304627

CAAE – 0359.0.172.000-09

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 363/09

Título: Correlação entre níveis séricos do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B e a carga viral (viremia).

Pesquisador Responsável: Izolda Maria Fernandes de Moura

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 15 de abril de 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente



Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

A

Mestranda Izolda Maria Fernandes de Moura
Pós-graduação em Saúde do Adulto e do Idoso/CCS-UFPE

Anexo 2: Journal of Viral Hepatitis

Author Guideliness

<http://www.wiley.com/bw/submit.asp?ref=1352-0504&site=1>

Anexo 3: Journal of Virological Methods

Author Guideliness

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506080/authorinstructions