



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANÁLISE MOLECULAR E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS
DO VÍRUS DA HEPATITE B, EM PACIENTES NATURAIS
DO ESTADO DO AMAZONAS**

CÍNTIA MARA COSTA DE OLIVEIRA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

CÍNTIA MARA COSTA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE MOLECULAR E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS DO
VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES NATURAIS DO
ESTADO DO AMAZONAS**

Tese apresentada ao programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho
Co-Orientador: Prof. Dr. Wornei Silva Miranda Braga

MANAUS
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Cíntia Mara Costa

Análise molecular e implicações biológicas do vírus da hepatite B em pacientes naturais do Estado do Amazonas/Cíntia Mara Costa de Oliveira-Manaus-UFAM, 2007.

XVII+127 pp

Tese de Doutorado – Universidade Federal do Amazonas

Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho.

Co-Orientador: Wornei Silva Miranda Braga.

Palavras-chave: 1. Hepatite B. 2. Gene S. 3. Gene C. 4. Genótipo. 5. Mutações. 6. PCR. 7. Amazonas.

I. Oliveira, CMC.

II. Título: Hepatite B.

Apresentação

Esta tese foi desenvolvida em colaboração com a Gerência de Virologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), sendo parcialmente financiada com recurso do projeto: **Hepatites virais no município de Lábrea: o impacto na saúde pública**, financiado pela FAPEAM.

CÍNTIA MARA COSTA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE MOLECULAR E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS DO
VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES NATURAIS DO
ESTADO DO AMAZONAS**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração saúde.

Aprovada em 01 de Junho de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Amilcar Tanuri
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Adriana Malheiros
Universidade Federal do Amazonas/ HEMOAM

Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Profa. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Á Deus pela sabedoria

*Ao meu marido **Cyro**, pelo amor incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida possibilitando mais essa vitória.*

*Aos meus filhos **Carlos Augusto**, **Júlio Augusto** e minha princesinha **Tayná**, pelo carinho, alegria e compreensão, razão de minhas vitórias.*

*Ao meu saudoso pai **Mariano Pereira da Costa**, in memoriam, pelo incentivo e todo amor dedicado enquanto aqui esteve.*

*A minha mãe **Conceição Costa**, pelas suas orações, incentivo e amor e por acreditar na minha vitória.*

*As minhas irmãs **Esther**, **Valda** e **Tercilene**, pelo incentivo e apoio a minha mãe nos momentos em que estive ausente.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que pela sua misericórdia e infinito amor me ajudou a concluir este trabalho.

Ao meu querido orientador **Prof. Dr Spartaco Astolfi Filho** pelos ensinamentos, incentivo e principalmente pela demonstração de caráter e lições de humildade que muito contribuíram para minha formação profissional.

Ao meu co-orientador **Wornei Silva Miranda Braga** pelo incentivo, amizade e apoio financeiro, importantíssimo para a realização deste trabalho.

Ao meu marido **Cyro Simões de Oliveira** que nunca poupou esforços para me ajudar e incentivar. Obrigada pela dedicação, compreensão, amor e companheirismo durante toda minha vida acadêmica.

Aos meus filhos **Carlos, Júlio e Tainá**, pela compreensão, alegria e por serem o maior motivo da busca que culminou com esta vitória.

Aos técnicos de laboratório **Enedina Nogueira, Francisco Carlos, André Luis, Diego Bilbi, Aldemir e Manuel** pelo apoio técnico.

Ao amigo e colega de turma **Flamir Victoria da Silva** pela amizade e parceria na triagem dos pacientes importantíssima colaboração para realização deste estudo.

A **todos os amigos e colaboradores** da Gerência de Virologia e NB3 da FMT-AM pelo apoio, incentivo e amizade.

A **todos os amigos do CAM** pelo carinho e amizade.

À amiga **Cristina Maria Borborema dos Santos** pelo carinho, amizade e pelas palavras de incentivo e apoio nos momentos mais difíceis desta jornada, o meu carinho e agradecimentos.

À amiga **Márcia da Costa Castilho** pela amizade, apoio e colaboração que ajudaram a concluir este trabalho.

Aos meus colegas da turma de 2002 pela amizade e incentivo.

A todos os **professores e colaboradores** da primeira turma do Programa de Doutorado Multidisciplinar em Biotecnologia. Obrigada pelos ensinamentos e incentivo.

À **Fundação de Medicina Tropical do Amazonas** pela parceria, pelo apoio técnico e financeiro que possibilitaram a realização deste estudo.

A **Prefeitura Municipal** de Lábrea pela colaboração e apoio técnico importante para efetivar a coleta das amostras naquele município.

Ao **diretor** da Unidade de Saúde do município de Lábrea por disponibilizar as instalações do hospital para a equipe do projeto.

À **Universidade Federal do Amazonas** pela oportunidade do Programa de Doutorado Multidisciplinar em Biotecnologia.

Ao projeto: **Hepatites virais no município de Lábrea: o impacto na saúde pública**, financiado pela FAPEAM, que possibilitou a viagem ao município de Lábrea para coleta de amostras e conclusão deste trabalho.

Aos órgãos financiadores:



AGRADEÇO

RESUMO

O vírus da hepatite B (VHB) é um patógeno de distribuição universal que produz no homem tanto a infecção aguda quanto a crônica. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 30% da população do planeta, ou cerca de dois bilhões de pessoas no mundo, estão infectadas pelo VHB. Destas, mais de 350 milhões tornaram-se portadoras crônicas. A análise molecular do genoma VHB têm permitido a identificação de diferentes genótipos bem como das principais mutações presentes em seu genoma. O presente estudo teve como principais objetivos seqüenciar os genes S e C do genoma do VHB isolados de diferentes amostras obtidas de indivíduos naturais do Estado do Amazonas e analisar a freqüência de mutações nesses genes relacionando-as a evolução da doença. Foram analisadas um total de 80 amostras de plasma de indivíduos positivos para o VHB. Destas, 60 foram procedentes de Manaus e 20 da zona urbana do município de Lábrea, AM. A amplificação dos genes S e C por PCR mostrou que das 80 amostras analisadas, 68 (85%) foram DNA-VHB positivas. A análise filogenética identificou os três grupos genotípicos A, D e F. O genótipo A foi predominante em 40/51 (78,4%), seguido dos genótipos F 7/51 (13,7%) e D 2/51 (3,9%) além de duas seqüências não determinadas. O genótipo A foi mais freqüente nas amostras obtidas de indivíduos naturais da cidade de Manaus enquanto que o genótipo F predominou nas amostras de indivíduos procedentes do interior do Estado do Amazonas. Quanto às mutações observou uma baixa freqüência de mutações relacionadas ao desenvolvimento da doença tanto no gene S quanto no C.

Palavras chave: vírus da hepatite B; genótipos; mutações; gene S; gene C; Amazonas.

ABSTRACT

The hepatitis B virus (HBV) is an agent of universal distribution which produces in humanity both the acute and chronic infection. According to the World Health Organization (WHO) approximately 30% of world population, or about 2 billion of the people, are infected by the HBV. Of these, more than 350 million have become chronic patients. The molecular analysis of the genome HBV has allowed the identification of different genotypes as well as the main mutations which are present in its genome. The present study had as objective to make the sequence of S and C of HBV isolated from different samples born in the Amazon State and to analyze the frequency of mutations in these genes related with the disease evolution. Samples of 80 patients positive for the HBV were obtained. From these, 60 were born in Manaus and 20 in the urban zone of Lábrea city, AM. The amplification of the S gene and C gene by PCR showed that from 80 samples that were analyzed, 68 (85%) were DNA-HBV positive. The phylogenetic analysis identified 3 genotypic groups A, D and F. The prevalent genotype was the A type 40/51 (78,4%), followed by F genotype, (7%) and D 2/51 (3,9%) as well as two undetermined sequences. The A genotype was the most frequent in the samples obtained of people who were born in Manaus, while the F genotype was prevalent in the samples of people from the interior of the Amazon State. Considering the mutations, a very low frequency of mutations related with the development of the disease both in the S and C gene was observed.

Keywords: hepatitis B virus; genotypes; mutation; S gene; C gene; Amazonas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da estrutura molecular do genoma VHB. Fonte: VHB mapa.gif-6	23
Figura 2 -	Ciclo replicativo do VHB. FONTE: http://mgl.snu.ac.kr/html/HBVlife.htm	26
Figura 3 -	Distribuição geográfica de infecção crônica pelo VHB FONTE: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>	31
Figura 4 -	Modelo molecular do HBsAg mostrando o sítio do determinante <i>a</i> quando uma arginina é substituída por uma glicina na posição do aminoácido 145. Fonte: Adaptada de CHEN, et al., 2001.	40
Figura 5 -	Estratégia do sistema semi- <i>nested</i> PCR para amplificação do gene S.....	50
Figura 6 -	Estratégia do sistema de amplificação do gene C por PCR.....	50
Figura 7 (a e b)-	Amplificação por PCR do microsatelite (GATA) ₁₃ do gene da golgina utilizando iniciadores ISO05. B= branco ou controle negativo; M= marcador de peso molecular <i>Ladder</i> de 100 pb.....	62
Figura 8 -	Perfil eletroforético de amostras amplificadas por semi- <i>nested</i> PCR utilizando os iniciadores P1-783. O produto amplificado corresponde a 600 pb. C ⁺ - controle positivo (HEMO); C ⁻ controle negativo; M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies).....	63
Figura 9 (a e b)-	Perfil eletroforético evidenciando amostras amplificadas por semi- <i>nested</i> PCR utilizando os iniciadores P1-783. O produto amplificado corresponde a 600 pb. C ⁺ - controle positivo; C ⁻ controle negativo; M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies).....	63
Figura 10 -	Perfil eletroforético das amostras amplificadas. À esquerda (8-60) são 7 amostras amplificadas por semi- <i>nested</i> PCR utilizando os iniciadores 2821-241; à direita as mesmas amostras amplificadas com os iniciadores P1 e 783 correspondentes a 600 e 680 pb, respectivamente. M-marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies).	65
Figura 11 -	Perfil eletroforético evidenciando amostras amplificadas com os iniciadores CMC1 e CMC2, correspondentes a 580 pb. C ⁺ - controle positivo; C ⁻ controle negativo; M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies).....	64

- Figura 12 - Perfil eletroforético das amostras amplificadas por *nested* PCR utilizando os iniciadores 1680 e 2058, correspondentes a 380 pb. C- controle negativo. M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies)..... 64
- Figura 13 - Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA modelo *Neighbor-Joining* (NJ) a partir do alinhamento de 51 seqüências nucleotídicas correspondentes ao gene S do VHB isoladas de pacientes naturais do estado do Amazonas e seqüências dos diferentes genótipos do VHB obtidas no GenBank..... 67
- Figura 14 - Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA modelo *Neighbor-Joining* (NJ) a partir do alinhamento de 25 seqüências nucleotídicas correspondentes ao gene central do genoma VHB isoladas de pacientes naturais do estado do Amazonas e seqüências dos diferentes genótipos do VHB obtidas no GenBank..... 69
- Figura 15 - Alinhamento de 25 seqüências nucleotídicas de parte do gene C. O alinhamento baseou-se no tipo A- X51970 indicado na primeira linha. Em destaque a mutação pré-*core* 1896..... 71
- Figura 16 - Alinhamento de 25 seqüências nucleotídicas de parte do gene C. O alinhamento baseou-se na seqüência A X51970 indicada na primeira linha. Em destaque: RHV região hiper variável; a mutação *core promoter* e RH AT região rica em AT..... 71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Perfil da faixa etária dos 80 indivíduos participantes do estudo.....	59
Gráfico 2 - Sequências obtidas para o gene S e C.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização da população estuda quanto a procedência e gênero.....	59
Tabela 2 - Naturalidade dos pacientes envolvidos na pesquisa. Em negrito os municípios de áreas endêmicas do VHB.....	60
Tabela 3 - Comparação entre a detecção dos marcadores sorológicos de infecção pelo VHB e a detecção do DNA VHB por PCR.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistema de antígenos e anticorpos marcadores sorológicos de infecção pelo VHB.	49
Quadro 2 Sequência dos iniciadores desenhados para amplificação dos genes S e C...	49
Quadro 3 - Condições de termociclagem para amplificação do gene C utilizando o sistema de amplificação em uma única reação de PCR e pelo sistema <i>nested-PCR</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	- Alanina aminotransferase
Anti-HBc IgM	- Anticorpo contra o antígeno central do vírus da hepatite B, classe IgM
anti-HBcAg	- Anticorpo contra o antígeno central do vírus da hepatite B
anti-HBe	- Anticorpo contra o antígeno e do vírus da hepatite B
anti-HBs	- Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
AST	- Aspartato de aminotransferase
C	- <i>Core</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DNA-VHB	- Ácido desoxirribonucléico do vírus da hepatite B
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	- Ensaio imunoenzimático
FNS	- Fundação Nacional da Saúde
FMT-AM	- Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
HBcAg	- Antígeno central do vírus da hepatite B
HBeAg	- Antígeno e do vírus da hepatite B
HBsAg	- Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Kb	- kilo base
KCl	- Cloreto de potássio
Kd	- Kilo daltons
M	- Molar
mg	- Miligrama
mM	- Milimolar
MS	- Ministério da Saúde
µL	- microlitro
NaCl	- Cloreto de sódio
nm	- Nanômetro
OMS	- Organização Mundial da Saúde
P	- Polimerase
pb	- Pares de base
pmol	- Picomol
PCR	- Reação em Cadeia da polimerase
pH	- Potencial hidrogênico
RNA	- Ácido ribonucléico
SDS	- Dodesilsulfato de sódio
Taq DNA Polimerase	- Enzima DNA polimerase extraída do <i>Thermophilus aquaticus</i>
TEB	- Tampão de Tris HCL, EDTA e ácido bórico
TR	- Tampão de resuspensão
Tris	- Tris (hidroximetil) aminometano
U	- Unidade enzimática
UFAM	- Universidade Federal do Amazonas
V	- Volume
VHB	- Vírus de hepatite B
X	- Proteína X
10X	- Dez vezes concentrado

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
Objetivos	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1 Estrutura genômica do vírus da hepatite B.....	22
2.2 Replicação.	25
2.3 Genótipos e subtipos do VHB.....	27
2.4 Epidemiologia do vírus da hepatite B no mundo	30
2.4 .1 Epidemiologia do vírus da hepatite B no Brasil.....	33
2.4.2 Epidemiologia do vírus da hepatite B no Estado do Amazonas.....	34
2.5 Diagnóstico sorológico do vírus da hepatite B.....	36
2.5.1 Diagnóstico molecular do vírus da hepatite B.....	37
2.6 Mutações no gene S.....	39
2.6.1 Mutações na região C/pré-C.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Critérios de inclusão.....	45
3.2 Critérios de exclusão.....	45
3.3 Procedimentos para coleta e armazenamento das amostras.....	45
3.4 Análise laboratorial do soro.....	46
3.5 Extração do DNA-VHB.....	46
3.6 Procedimentos para avaliar a qualidade do DNA extraído.....	47
3.6.1 Análise eletroforética do produto amplificado com o iniciador IS05.....	48
3.7 Desenho dos iniciadores para amplificação do gene S e C.....	48
3.8 Estratégia de amplificação do gene S por PCR.....	50
3.8.1 Sistema de amplificação do gene C.....	53
3.8.2 Eletroforese dos produtos de PCR amplificados (gene S e C).....	54
3.8.3 Purificação do produto da PCR para o sequenciamento.....	55
3.8.4 Reação de sequenciamento.....	55
3.8.5 Precipitação do produto da reação de sequenciamento.....	56
3.9 Análises dos questionários.....	56

3.10 Análise das seqüências no programa BLAST/BLASTN.....	57
3.10.1 Análise das seqüências pelo programa PHRED.....	57
3.10.2 Edição e alinhamento das seqüências.....	57
3.10.3 Análise filogenética.....	58
4 RESULTADOS	59
4.1 Caracterização da população estudada.....	59
4.2 Resultado da análise sorológica e molecular.....	60
4.3 Análise da qualidade do DNA contido nas amostras.....	61
4.4 Resultado da amplificação do gene S completo.....	62
4.5 Resultado da amplificação do gene C.....	64
4.6 Total de seqüências do gene S e C obtidas após edição e alinhamento.....	65
4.7 Análise filogenética baseada nas seqüências do gene S.....	65
4.8 Análise molecular das seqüências nucleotídicas referentes ao gene S.....	68
4.9 Análise filogenética do gene C.....	68
4.10 Pesquisa das principais mutações do gene C.....	70
5 DISCUSSÃO.....	73
5.1 Características gerais da população estudada.....	73
5.2 Detecção do DNA do VHB	74
5.3 Genotipagem do VHB por inferência filogenética.....	76
5.4 Análise de mutações do gene S.....	78
5.5 Pesquisa das principais mutações do gene C.....	80
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite B (VHB) é responsável por uma das doenças infecciosas mais comum no mundo, a hepatite B. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) aproximadamente dois bilhões de pessoas do globo estão infectadas pelo VHB, sendo que cerca de 400 milhões tornaram-se portadoras crônicas. É responsável ainda por um a dois milhões de mortes e cerca de 50 milhões de novos casos a cada ano (WHO, 2006). O VHB pode ser encontrado em vários tipos de líquidos biológicos humanos, sendo transmitido, sobretudo por via parenteral, oral, genital ou perinatal (HIRSCHMAN, 1986).

A hepatite B pode manifestar-se desde a forma anictérica até a forma aguda crônica e fulminante. Porém, mais de 90% dos portadores de hepatite aguda restabelecem-se totalmente e de 6 a 10% tornam-se portadores crônicos (MORADPOUR & WANDS, 1995). Os portadores crônicos apresentam alto de risco de desenvolver cirrose ou hepatocarcinoma e constituem um reservatório de indivíduos infectados que perpetuam a infecção de geração a geração (McMAHON, 2005).

Apesar de comumente o VHB manifestar-se na forma sintomática evidente, como pele amarela e urina escura, existe também a forma assintomática que, por não manifestar sintomas, geralmente é diagnosticada tardiamente quando o fígado já esta comprometido dificultando a recuperação do paciente. A evolução da forma crônica para carcinoma hepatocelular primário e cirrose hepática é especialmente observada em locais de alta prevalência pelo VHB (BRECHOT et al., 1980; BEASLEY et al., 1981; TORRES & MACHADO, 1994; KAO et al., 2000a). Um dos principais fatores que contribuem para o agravamento da epidemiologia do VHB é a sua capacidade complexa e dinâmica de sofrer mutação genética em sua história natural (McMAHON, 2005).

Na década de oitenta o estado do Amazonas, com exceção de algumas sub-regiões, foi caracterizado como uma região de maior ocorrência de hepatite pelo vírus B e suas seqüelas, no mundo, sendo os vales dos rios Juruá, Purus e Médio Solimões as regiões de alta endemicidade pelo VHB no estado (BENSABATH et al., 1987b; FONSECA, 1988).

Atualmente, enfrentar esse importante problema de saúde pública que constitui o VHB no Amazonas continua sendo um grande desafio. As condições do nosso estado em relação às dificuldades socioeconômicas, deficiência dos serviços de saúde pública, sobretudo no interior, a demora na incorporação de tecnologia avançada para diagnóstico e tratamento dessa enfermidade, são elementos importantes que devem ser considerados na avaliação do processo epidêmico da hepatite B no Amazonas. Além disso, à distância e a dificuldade de comunicação entre os municípios do interior e a capital do estado dificultam o controle e o registro do número efetivo de pessoas infectadas pelo VHB no estado do Amazonas por parte da Fundação de Vigilância Sanitária do Estado (FVS) de forma que grande parte das informações existente baseia-se apenas nos poucos aspectos soropidemiológicos da doença realizados principalmente na década de oitenta.

A grande importância da hepatite B não se limita ao enorme número de pessoas infectadas; estende-se também às complicações das formas agudas e crônicas. O vírus causador da hepatite B determina uma ampla variedade de apresentações clínicas, que varia desde um portador assintomático, hepatite aguda, crônica até cirrose e carcinoma hepatocelular. Considerando que as conseqüências da infecção são diversas, apenas o diagnóstico sorológico, nos dias atuais, será incompleto, pois para o acompanhamento terapêutico torna-se cada vez mais importante conhecer o aspecto molecular do vírus, como por exemplo, a presença de mutações que possam oferecer resistência terapêutica bem como o tipo de genótipo responsável pela infecção, pois estudos comprovam que a agressividade ou não da doença está intimamente relacionada ao tipo de genótipo infectante.

Deste modo, a endemicidade aliada à carência de conhecimentos, particularmente sobre a biologia molecular do VHB no Estado do Amazonas, bem como a necessidade crescente do uso de técnicas laboratoriais cada vez mais sensíveis para o diagnóstico precoce da infecção e identificação das cepas de VHB que circulam na região, motivaram a realização deste estudo. O seqüenciamento do gene S e do gene C, a identificação das principais mutações desses genes e a classificação genotípica das diferentes cepas de VHB que circulam no Amazonas permitirá um melhor entendimento dos principais aspectos da evolução da infecção pelo VHB beneficiando diretamente os portadores deste vírus, pois a partir deste estudo será possível uma interpretação mais concreta da infecção e conseqüente direcionamento do tratamento melhorando as condições de vida da população infectada. Diante do exposto, este estudo teve os seguintes objetivos:

Objetivo geral:

- ◆ Sequenciar e analisar seqüências dos genes S e C do vírus da hepatite B e identificar genotipicamente os diferentes VHB isolados de indivíduos naturais do Estado do Amazonas.

Objetivos específicos:

- ◆ Sequenciar o gene S e o gene C obtidos de diferentes amostras de indivíduos infectados pelo VHB;
- ◆ Caracterizar por análise filogenética as diferentes cepas de VHB isoladas de pacientes naturais do Estado do Amazonas frente a outras seqüências de VHB depositadas no *GenBank*;
- ◆ Caracterizar as principais mutações do gene S e do gene C e relacioná-las ao genótipo obtido.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estrutura genômica do vírus da hepatite B

O vírus da hepatite B (VHB) pertence à família dos Hepadnaviridae (vírus de DNA hepatotrópico) gênero *Orthohepadnavirus* (MASON et al., 2005; SCHAFER, 2007). A partícula viral infecciosa, ou partícula de Dane, constitui o *virion* VHB completo com 42 nm de diâmetro (DANE et al., 1970). O *virion* é formado por uma estrutura interna o nucleocapsídeo ou *core* onde encontra-se os antígenos HBcAg, HBeAg, HBx, uma molécula de DNA parcialmente duplicada e a enzima DNA-polimerase (HOOFNAGLE et al., 1981). Esse nucleocapsídeo é envolvido por um envelope de glicoproteínas e lipídeos onde é expresso o antígeno de superfície HBsAg (LEE, 1997).

Além da partícula de Dane, dois outros tipos de partículas virais não infecciosas podem ser encontradas na circulação. Algumas de pequeno diâmetro (20 nm) e outras com formas tubulares, constituídas exclusivamente pelo antígeno de superfície (CARNEIRO de MOURA, 1997).

O genoma do VHB consiste de uma estrutura densa e complexa com quatro genes envolvidos em seu sistema regulatório (S, C, P e X). Formado por uma molécula de DNA circular parcialmente dupla hélice com aproximadamente 3200 pares de bases (pb), uma cadeia curta ou S (+) segmentada de tamanho variado, e uma fita longa L (-) (Figura 1) (AREIAS, 1996; CARNEIRO de MOURA, 1997). A cadeia mais longa é completa, tendo cerca de 3000 a 3200 nucleotídeos. A cadeia menor é incompleta e seu tamanho varia entre 50 a 70% da cadeia longa. A molécula adota uma configuração circular devido à sobreposição das duas cadeias complementares. Próximo a esta região existem duas seqüências repetidas de 11 bases (DR1 e DR2, *direct repeats*) que são importantes para a replicação do genoma VHB (CARNEIRO de MOURA, 1997; TIOLLAIS et al., 1985; GANEM, 1996; MILLER et al., 1989). A cadeia L (-) é formada por quatro regiões abertas de leitura (*ORFs*), representadas

pelos genes codificantes S, C, P e X. Esses genes são responsáveis por codificar as proteínas estruturais e não estruturais, cada um possui pelo menos uma região sobreposta a outro gene (TIOLLAIS et al., 1985; GANEM, 1996; MILLER et al., 1989).

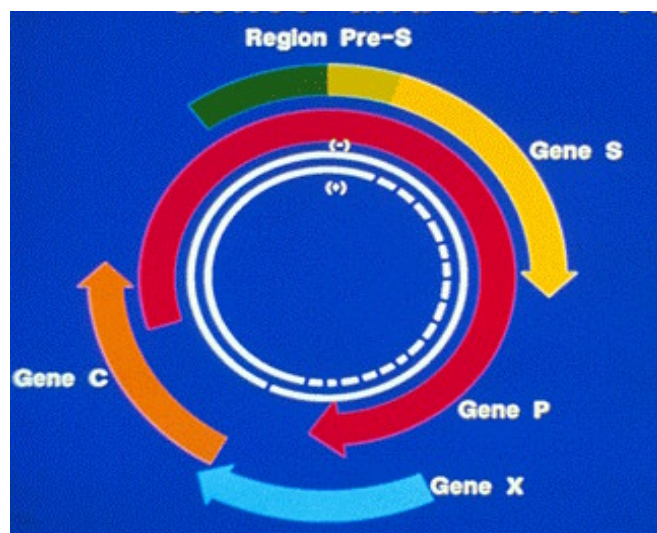


Figura 1. Representação esquemática da estrutura molecular do genoma VHB.
Fonte: VHB mapa.gif-6

O gene S é formado pela região pré-S1 (envolvida no reconhecimento do VHB pelos receptores do hepatócito), pré-S2 e S que codificam as seguintes glicoproteínas do envelope viral: pequena (S), média (M) e grande (L), respectivamente. A região S é formada por 226 aminoácidos e codifica a proteína S que funciona como antígeno de superfície (HBsAg), a região M codifica a proteína pré-S2, é formada pelo seguimento S e 55 aminoácidos adicionais e a região L codifica a proteína pré-S1, é formada pelas regiões S, pré-S2 e mais 108 aminoácidos formando assim o gene S completo com cerca de 390 aminoácidos ou 1200 pb (ROBINSON, 1995; GRANATO, 1998).

O gene C codifica os antígenos do nucleocapsídeo viral, sendo formado por dois *códons* distintos C e pré-C (*Core* e *pré-core*), ambos na mesma fase de leitura aberta, permitindo a codificação de duas proteínas HBcAg e HBeAg, estruturalmente relacionadas, mas com funções distintas. Imunologicamente, estas proteínas funcionam como antígenos do

nucleocapsídeo e são responsáveis pela indução e produção dos anticorpos anti-HBc e anti-HBe por ocasião de infecção natural do VHB (ROSSELLA et al., 1996; GRANATO, 1998). Em relação ao gene S, o gene C possui uma alta frequência de variações nucleotídicas e uma baixa heterogeneidade nos aminoácidos. A região pré-C geralmente é mais variável do que a região C (LAUDER et al., 1993).

O gene P se sobrepõe à porção final do gene C, ao gene S completo e à porção inicial do gene X (MILLER & ROBINSON, 1986). A cadeia codificadora da polimerase compreende cerca de 75% da extensão do genoma e produz uma proteína multifuncional formada por uma proteína terminal, uma região de ligação, uma região da DNA polimerase/transcriptase reversa e uma região correspondente a ribonuclease H (CARNEIRO de MOURA, 1997). Assim, a polimerase viral também funciona como uma transcriptase reversa (para a síntese da cadeia negativa do DNA a partir do RNA genômico). A polimerase do VHB apresenta semelhança com enzimas de transcrição reversa dos retrovírus, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo explorada para o desenvolvimento de fármacos, como a lamivudina, que inibe a atividade desta enzima (FELDMAN et al., 1998). A DNA-polimerase possui 90.000 kD, sendo responsável pela replicação do DNA-VHB na célula hospedeira.

O gene X codifica um polipeptídeo de 154 aminoácidos, cuja verdadeira função não está completamente elucidada. Este gene codifica o antígeno X (HBxAg), que segundo experimentos *in vitro* parece agir como ativador da transcrição, tendo uma função essencial na replicação e na hepatocarcinogênese produzida pelo VHB (COLGROVE et al., 1989).

O VHB pode codificar cerca de 50% mais proteínas do que o esperado do seu genoma (GANEM e VARMUS, 1987). Em termos de evolução, o VHB apresenta duas tendências opostas, pois enquanto o sistema de replicação via transcriptase reversa permite

uma relativa elevação da taxa de mutações, seu genoma por ser extremamente compacto previne a ocorrência de maior variabilidade genética (VYAS e YEN, 1999).

A estrutura genômica do VHB também é importante para sua manutenção no meio, pois resiste até sete dias ou mais em superfície seca, como superfície de mobiliário ou pavimentos. Permanece estável em temperaturas próximas de 30° C por pelo menos seis meses e a -20°C por até 15 anos. Mantém a capacidade infectante após a exposição a éter e a ácido (pH 2,4 por 6 horas) e ao calor de 98°C por 1 minuto e 60° C por 10 minutos. O soro infectado perde o seu poder de infectividade quando sujeito ao calor seco a 160°C por 1 hora ou autoclave a 121°C por 20 minutos. Em plasma humano seco, o VHB é inativado a temperatura ambiente por 10 minutos, após o uso de hipoclorito de sódio (500mg/L), ácido isopropil a 70%, glutaraldeído a 0,125% associado a fenol 0,44 glutaraldeído 2% em pH 8,6 e iodo (75 mg/L) (HOLLINGER, 1996).

2.2 Replicação

O ciclo de replicação do VHB (Figura 2) pode ser dividido didaticamente em sete fases: (1) iniciando com a ligação ou ataque do *virion* ao hepatócito; (2) a penetração do vírus na célula hospedeira por endocitose; (3) subsequente transporte do vírus para o núcleo celular, onde ocorre a liberação do genoma viral; (4) transcrição e tradução das proteínas dos genes virais; (5) replicação do genoma viral; (6) formação dos novos *virions* e, (7) liberação desses *virions* para o meio extracelular (KANN & GERLICH, 2005). Uma vez dentro do hepatócito, o vírus perde o seu envelope viral e o genoma do VHB é liberado no citoplasma da célula, sendo transportado para dentro do núcleo, onde inicia a síntese da cadeia positiva (incompleta) do DNA. No núcleo o genoma viral é convertido numa cadeia fechada de DNA com ligações covalentes superespiralada (cccDNA) pela DNA polimerase vírica (GANEM &

SCHNEIDER, 2001; PUGH e BASSENDINE, 1990; NASSAL, 1996). O cccDNA é o molde que origina o RNA mensageiro para síntese das proteínas do *virion* e o RNA pré-genômico para a síntese do genoma viral. O RNA pré-genômico é transportado para o citoplasma, incorporado no nucleocapsídeo e convertido à cadeia negativa do DNA pela transcriptase reversa.

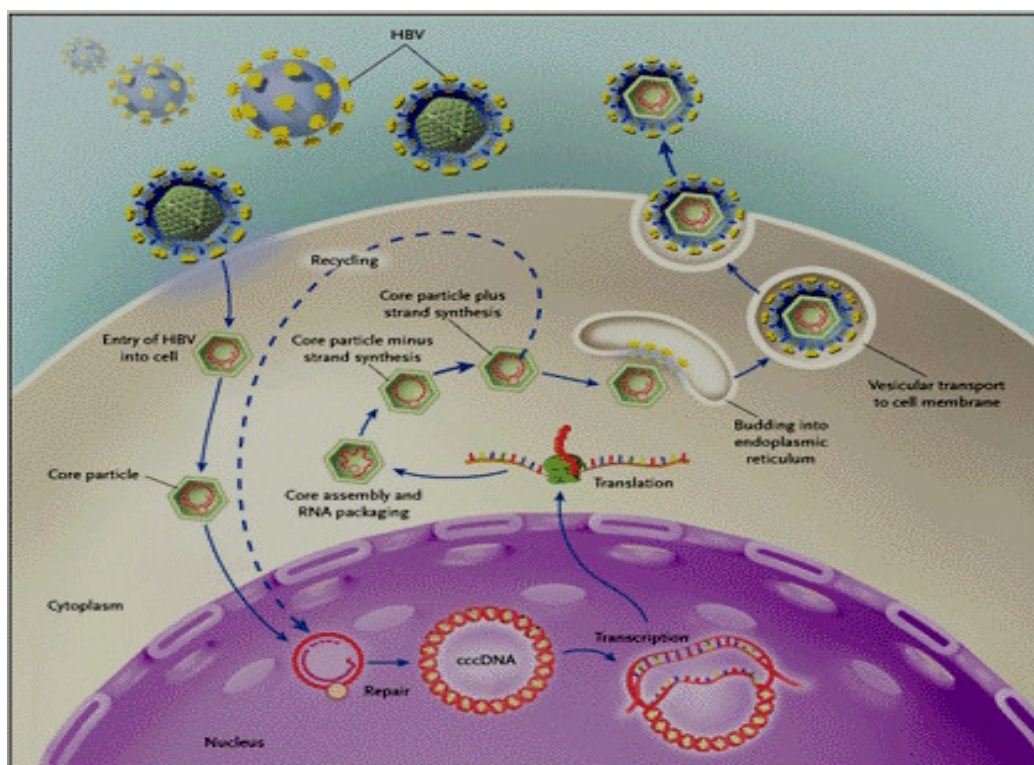


Figura 2 – Ciclo replicativo do VHB
 FONTE: <http://mgl.snu.ac.kr/html/HBVlife.htm>

A partir da síntese das proteínas do *core* no citoplasma do hepatócito, o RNA pré-genômico e a DNA-polimerase são seletivamente encapsulados por essas proteínas ficando restritos ao nucleocapsídeo. Inicia-se então no citoplasma a transcrição reversa do RNA, sendo sintetizada a fita longa do DNA viral (5'→3') que servirá de molde para que a DNA polimerase proceda à síntese da cadeia curta de DNA viral. O pré-genoma que deu origem à cadeia longa é destruído (L+) (NASSAL, 1996; WEI et al., 1996). Posteriormente, as

progênies virais adquirem o envoltório, a partir das membranas intracelulares (retículo endoplasmático e o complexo de Golgi), quando então os *virions* podem retornar ao núcleo celular para continuar o processo de replicação genômica ou podem ser secretados (PUGH e BASSENDINE, 1990; HUOVILA et al., 1992).

2.3 Genótipos e subtipos do VHB

Le Bouvier (1971) estudou os determinantes antigênicos localizados na região que expressa o antígeno de superfície HBsAg do gene S, baseado na heterogeneidade imunológica desse antígeno, definiu o primeiro método de classificação das cepas de VHB por subtipagem. O determinante “a” é comum em todas as cepas, e os pares *d/y* e *w/r* são encontrados habitualmente. A partir desse estudo, quatro subtipos principais foram definidos *adw*, *adr*, *ayw* e *ayr* e nove adicionais *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq+* e *adrq+* (OKAMOTO et al., 1987; COUROUCÉ-PAUTY et al., 1983; BANCROFT et al., 1997).

A classificação genética das cepas de VHB, usando a seqüência de nucleotídeos do genoma completo foi realizada primeiramente por Okamoto e colaboradores em 1988. Essa classificação baseou-se em uma taxa de divergência de nucleotídeos de cerca de 8 a 10% do genoma completo entre as cepas analisadas. Essa análise permitiu a identificação de quatro grupos genômicos: A, B, C e D. Posteriormente, Norder e colaboradores mediante o sequenciamento apenas do gene S, identificaram dois novos genótipos, E e F (NORDER, et al., 1992). O genótipo F é o mais divergente de todos e mais freqüente na América do Sul (BLITZ et al., 1998).

STUYVER et al (2000) descreveram o genótipo G em soro de pacientes franceses e americanos com infecção crônica pelo VHB e ARAUZ-RUIZ et al (2002) relataram um oitavo genótipo do VHB, o genótipo H, isolado em cepas virais oriundas da Nicarágua,

México e Califórnia. O genótipo H difere do F apenas em duas substituições, valina na posição 44 e prolina na posição 45. A técnica de sequenciamento do genoma completo e posterior análise filogenética identificaram um ramo separado junto ao ramo das seqüências do genótipo F, mostrando certa similaridade do novo genótipo com o genótipo F. Na região do gene da polimerase, as três cepas do genótipo H identificadas apresentaram uma região única de 16 aminoácidos bem conservada, ausente em cepas do genótipo F.

A genotipagem baseada no sequenciamento apenas do gene S tem se mostrado equivalente a realizadas com o genoma completo (ARAUZ-RUIZ et al., 2002; CHU e LOK, 2002). Os estudos baseados no sequenciamento parcial do genoma VHB também têm sido usados não só para esclarecer questões de epidemiologia ou mecanismos básicos da evolução do vírus, mas também no diagnóstico molecular, correlacionando a evolução molecular do vírus com a evolução clínica da doença. Dentre esses estudos, destacam-se Lauder et al (1993); Karasawa et al (1995); Stuyver et al (2000); Grandjacques et al (2000); Kikuchi et al (2000); Weinberger et al (2000); Bowyer e Sim (2000); Ojima et al (2001) e Dumpis et al (2001).

Estes estudos mostraram que determinadas mutações são responsáveis pelo agravamento da doença. Kikuchi et al (2000), por exemplo, estudaram amostras de pacientes japoneses que apresentavam o marcador sorológico HBeAg-negativo e encontraram associação estatisticamente significativa entre esses pacientes e a presença do genótipo B, o genótipo A foi encontrado em cinco de oito pacientes com HBeAg positivo e o genótipo C esteve presente em 11 de 13 pacientes com carcinoma hepatocelular.

Outros estudos têm correlacionado o nível de agressividade genotípica à resposta ao tratamento e evolução da doença. Pacientes portadores do genótipo C, por exemplo, comparados aos portadores do genótipo B, apresentam evolução hepática mais severa e maior proporção dos níveis de DNA viral no soro. Apresentam também maior frequência de

mutações no sítio promotor central que por sua vez esta relacionada a uma baixa taxa de soroconversão espontânea do HBeAg para anti-HBe e baixa resposta à terapia antiviral (KAO et al., 2004; HU et al., 2004; YUEN, 2004).

Além dos enfoques acima, Norder e colaboradores (2004) utilizaram seqüências nucleotídicas do VHB em estudo de diversidade genética e distribuição geográfica dos subgenótipos do VHB a fim de traçar um elo entre a história evolucionária do VHB e a migração humana. Foram utilizadas 234 seqüências do genoma completo e 631 seqüências do gene de superfície do VHB. Os genótipos B, D e C foram subdivididos em quatro subgenótipos e os genótipos A e F em dois subgenótipos A1, A2 e F1, F2, respectivamente. Segundo essa nova classificação, o genótipo A2 é mais freqüente na Europa enquanto que o A1 prevalece na América Central e África. O genótipo F1 é mais freqüente na América Central e o F2 na América do Sul e Polinésia. Em 2005 Kato e colaboradores também confirmaram essa subclassificação do genótipo F nos subgenótipo F1 e F2 (KATO et al., 2005). Em uma das ultimas abordagem sobre taxonomia do VHB acredita-se que existam cerca de pelo menos 24 subgenótipos identificados e que outros ainda podem ser descritos (SCHAFER, 2007).

No Brasil, os estudos de genotipagem do VHB têm mostrado a presença dos genótipos A, D e F, respectivamente, como mais freqüentes (MORAES et al., 1996; CARRILHO et al., 2004; De CASTRO et al., 2001; TELES et al., 20002; SOUZA et al., 2003; ARAUJO et al., 2004; SITNIK et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006; FERREIRA et al., 2006).

Os estudos realizados em amostras procedentes da região Amazônica brasileira, também mostram os genótipos A, D e F como mais freqüentes (MORAES et al., 1999; CONDE et al., 2004; VIANA et al., 2005). Bertolini et al (2000) analisaram amostras proveniente de quatro comunidades indígenas da região Amazônica, sendo três delas

fechadas, isto é, não mantinham contato com outras populações e uma com alto grau de aculturação. Nessas populações, o genótipo F predominou nas três comunidades fechadas enquanto que na comunidade que mantinha contato com outras populações houve predomínio de 100% do genótipo A. Oliveira (2001) analisando um total de 44 amostras de pacientes nos estágios de portadores de hepatite crônica, portadores de hepatite aguda e portadores assintomáticos procedentes de vários estados da região Amazônica brasileira identificou três grupos genotípicos A, D e C sendo o genótipo A o mais freqüente. Observou ainda que as seqüências de VHB obtidas de pacientes portadores de hepatite aguda apresentavam maior diversidade genética do que as seqüências obtidas de pacientes portadores de hepatite crônica. Crispim et al (2006) analisando amostras de candidatos a doadores de sangue no Hemocentro de Manaus também identificaram os genótipos A, D e F, sendo o genótipo A predominante.

2.4 Epidemiologia do vírus da hepatite B no mundo

Conforme anteriormente descrito, a infecção pelo vírus da hepatite B é um problema global de saúde pública, dados epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que aproximadamente um terço ou cerca de dois bilhões de pessoas possuem evidências sorológicas de infecção pelo VHB no mundo. Desses, cerca de 350 a 400 milhões são de portadores crônicos (OMS, 2005; *Center for Disease Control-CDC*, 2005).

A OMS didaticamente divide as regiões do globo de acordo com a prevalência de infecção pelo VHB em três categorias geográficas diferentes (Figura 3): áreas de baixa prevalência (<2%) de pessoas cronicamente infectadas, endemicidade intermediária (2 a 8%) e áreas de alta prevalência (>8%). Nas regiões de baixa prevalência (Europa Ocidental, Austrália, Nova Zelândia e parte da América do Norte e do Sul), o risco de infecção durante a vida é 20%. Dentro dessas áreas a infecção pelo VHB geralmente restringe-se a certos grupos

populacionais, tais como, transfundidos, renais crônicos, usuários de drogas injetáveis e profissionais de saúde (CARRILHO & SILVA, 1995).

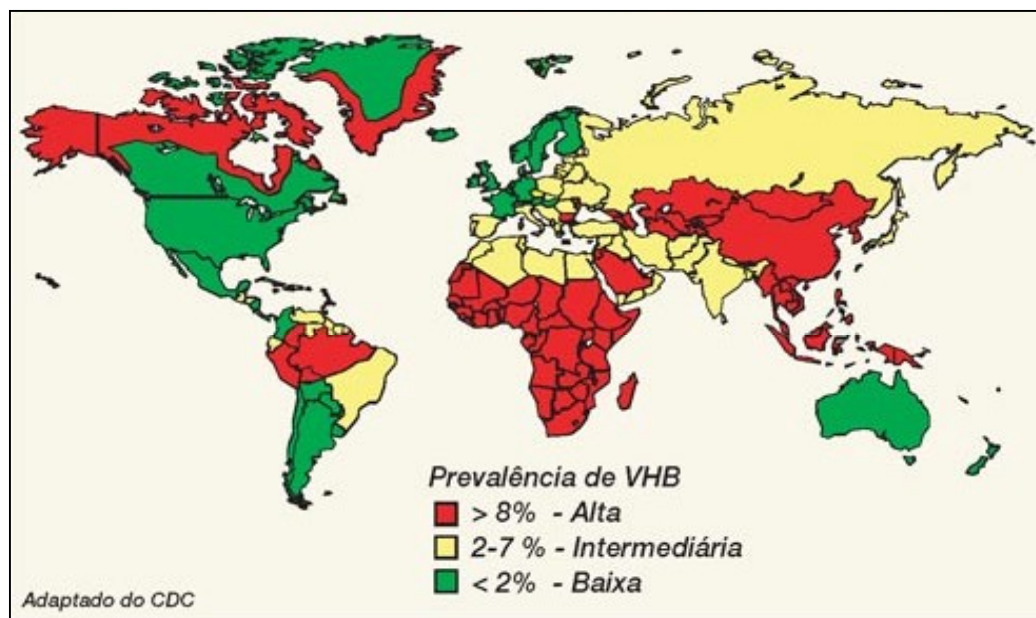


Figura 3 - Distribuição geográfica de infecção crônica pelo VHB
 FONTE: *Centers for Disease Control and Prevention.*

As áreas de endemicidade intermediária incluem regiões do Mediterrâneo, Sul e Leste da Europa, Oriente Médio, Índia e parte da América do Sul. As maiores taxas de infecção estão entre as crianças mais velhas, adolescentes e adultos jovens. Áreas como o Sul do Sahara, Ásia, ilhas do Sul do Pacífico, Oeste do Alasca, Arquipélagos do Canadá e da Groelândia áreas do Mediterrâneo, Índia e América do Sul são consideradas de alta prevalência pelo VHB. Nessas regiões o risco de infecção pelo VHB é maior que 60%, sendo que a maioria das pessoas é infectada no nascimento ou precocemente na infância. As crianças apresentam também, maior risco de adquirir infecção crônica antes dos cinco anos de idade. A taxa de portadores crônicos nessas regiões varia entre 8% e 25% (PARANÁ & ALMEIDA, 2005).

Na América Latina há uma grande variabilidade na soroprevalência do vírus da hepatite B. Regiões de elevada endemicidade são encontradas na Bacia Amazônica, norte da América Latina, em contraste com áreas de baixa prevalência encontradas na região sudeste (PARANÁ & ALMEIDA, 2005). Na América do Sul, a grande maioria dos casos de infecção ocorre entre populações indígenas (NAKANO et al., 2001).

Estudos epidemiológicos realizados em diferentes partes do mundo acreditam que os diversos aspectos populacionais podem estar envolvidos na distribuição mundial do vírus da hepatite B (KANE et al., 1995; TAVERES-NETO et al., 2004). A América Latina talvez, por apresentar regiões de baixos índices de desenvolvimento socioeconômicos, exibe um número elevado de casos de hepatite B (De PAULA et al., 2001). O intenso fluxo migratório das populações rurais para os grandes centros urbanos, a escassez de recursos assistenciais e a prática sexual de risco favorecem a disseminação do vírus na região. A colonização destas regiões por diferentes povos, com um patrimônio sorológico diverso, também pode ser um fator importante (LEON et al., 1999; PARANÁ & ALMEIDA, 2005).

Entre 1996 e 1997 foi conduzido um estudo soropidemiológico em seis países da América Latina: Argentina, Brasil, Chile, República Dominicana, México e Venezuela. Esse estudo incluiu 1.200 participantes com anticorpo, para o core do vírus da hepatite B (anti-HBc) positivo e idade entre 1 e 40 anos. A República Dominicana apresentou a maior soroprevalência do anticorpo (21,4%), seguida pelo Brasil (7,9%), Venezuela (3,2%), Argentina (2,1%), México (1,4%) e Chile (0,6%) (SILVEIRA et al., 1999). Não houve diferença na soroprevalência entre o sexo masculino ou feminino, exceto no Brasil, que predominou o sexo masculino e na República Dominicana, que predominou o sexo feminino. O Brasil foi o único país que apresentou associação entre elevada prevalência do vírus e o baixo nível socioeconômico da população.

2.4.1 Epidemiologia do vírus da hepatite B no Brasil

No Brasil a Fundação Nacional de Saúde (FNS) considera a hepatite B uma doença endêmica com taxa de mortalidade de 0,6 por 100.000 habitantes (FNS/SINAN, 2003). Acredita-se que essa grande incidência do VHB no país provavelmente esteja associada às condições sociais, econômicas, educacionais e a deficiência do sistema de saúde pública do país. O fato de no Brasil não ser obrigatório à notificação dos novos casos de hepatite B à Vigilância Sanitária de cada Estado e a ocorrência freqüente de casos assintomáticos dificulta os levantamentos epidemiológicos e conseqüentemente, o controle da doença.

No Brasil, a prevalência da infecção pelo VHB é um problema de saúde pública. Algumas áreas da região Amazônica, do Estado do Espírito Santo e o oeste do Estado de Santa Catarina, por exemplo, são consideradas áreas de elevada endemicidade, com prevalência superior a 7%. As regiões nordeste e centro-oeste apresentam média endemicidade com prevalência entre 2% e 7% às demais regiões são de baixa endemicidade, com prevalência inferior a 2% (*Boletim Informativo Eurotrials*, 2003).

Um outro aspecto interessante é com relação à faixa etária dos portadores do VHB. Em um estudo de soroprevalência do anticorpo contra o antígeno do nucleocapsídeo viral (anti-HBc) realizado nas quatro regiões do país mostrou que na região Norte a taxa de portadores crônicos é de 21,4% contra 7, 6, 5,5 e 1,2% das regiões Sul, Sudeste e Nordeste, respectivamente. A infecção pelo VHB no Brasil pode ser encontrada em crianças desde um ano de idade (3,1%) ocorrendo um aumento quase que triplicado da taxa de infecção de adolescentes para adultos jovens (CLEMENS et al., 2000). Portanto, embora a partir de 2001 o MS tenha estendido à vacinação até os 19 anos em todo país, com exceção de 2005 que

foram registrados 9.523 casos, de 2001 a 2004 o número de pessoas infectadas foi crescente (7.111, 8.805, 12.204 e 13.441) casos, respectivamente.

Um dos grandes problemas que o MS e a FNS enfrentam para notificação dos casos, é a grande extensão territorial, dificuldade de transporte e o grande número de portadores assintomáticos, principalmente nas localidades mais distantes, como na Amazônia, onde os casos dificilmente são notificados oficialmente, dificultando o controle da infecção na região.

2.4.2 Epidemiologia do vírus da hepatite B no Estado do Amazonas

A região Ocidental do Estado do Amazonas tradicionalmente é caracterizada como a região de maior endemicidade de infecção pelo VHB. Estudos realizados no final da década de 80, com 215 crianças de 0 a 14 anos HBsAg positivo da zona urbana do município de Lábrea detectaram a prevalência do marcador HBsAg em 15,3% das amostras. Nas cidades de Carauari, Ipixuna e Itamarati de 251 amostras de soro analisadas a prevalência do antígeno HBsAg foi de 6, 0, 17,3 e 38,4%, respectivamente. Somente em Carauari, de 240 (95,6 %) amostras positivas para o VHB, 15 (6,0%) foram positivas para o antígeno HBsAg e 225 (89,6%) positivas para o marcador anti-HBs (FONSECA, 1989; MENDES, 1989). Na ocasião esses números superavam índices observados em países como Nigéria, Somália e países do Sudeste da Ásia e Oriente Médio, locais hiperendêmicos de infecção crônica pelo VHB (FONSECA, 1989). Segundo Mendes (1989) apesar da infecção em crianças ser freqüente, a população adulta, principalmente do sexo masculino, era a que mais se destacava.

Atualmente, embora os índices de infecção pelo VHB tenham diminuído, a situação ainda é preocupante. Em um estudo realizado em 2001 no município de Lábrea, por exemplo, de um total de 605 amostras analisadas, a prevalência do antígeno que indica

infecção recente pelo VHB (HBsAg) variou de 2,1 a 5,1%, enquanto que do anticorpo que indica infecção passada (anti-HBc total) foi 49,9% (BRAGA, 2001).

Oliveira (2001) em um trabalho pioneiro de diagnóstico molecular do VHB no Estado do Amazonas detectou a presença de DNA-VHB em 88,4% de um total de 69 amostras HBsAg positivos e em 100% de um total de 9 amostras HBsAg negativo e anti-HBc total positivo. O genótipo A predominou em 41 das 44 amostras genotipadas. Estes resultados demonstram que o potencial infectante do VHB entre a população estudada é muito alto, pois mesmo na presença do anti-HBc total o vírus ainda permanece com DNA positivo, isto é, ainda é considerado potencialmente infectante. Além disso, conforme acima descrito, no Amazonas, tem-se a agravante de ocorrer co-infecção do VHB com o VHD e superinfecção do VHD, em portadores assintomáticos ou em portadores de hepatite crônica, podendo desenvolver quadro de hepatite fulminante principalmente nos locais de maior incidência de infecção pelo VHB (HBsAg positivo), (RIZZETTO, 1983a; SMEDILE et al., 1982a).

No Estado do Amazonas em 2001, o MS/FNS registrou um total de 56 casos de infecção pelo VHB contra 134 registrados no Estado de Rondônia (Estado da região norte com maior número de ocorrência). Em 2002, no período de Julho a Setembro o boletim epidemiológico fornecido pela Secretaria de Saúde do Estado-SUSAM/Fundação de Medicina Tropical - FMT-AM registrou um total de 61 casos de hepatite B no Amazonas. Desses, 41 foram de hepatite crônica e 20 de hepatite aguda, o acumulado do ano foi 100 casos de infecção pelo VHB (59 crônicos e 41 de hepatite aguda) (Boletim Epidemiológico SUSAM/FMT-AM, 2003).

Em 2003, o acumulado anual fornecido pela SUSAM/FMT-AM foi 114 casos de infecção aguda e crônica pelo VHB, destacando-se a mesma entre as dez principais causas de internação hospitalar no estado (Boletim epidemiológico SUSAM/FMT-AM, 2003).

2.5 Diagnóstico sorológico do vírus da hepatite B

Tradicionalmente a infecção pelo VHB é realizada pela pesquisa sorológica dos antígenos e anticorpos presentes durante a infecção e que aparecem e desaparecem de acordo com a fase evolutiva da doença. Esses antígenos e anticorpos são geralmente relacionados à elevação ou decréscimo dos níveis de alanina amino transferase (ALT) e aspartato de aminotransferase (AST). No Quadro abaixo está um resumo do conjunto de antígenos e anticorpos do VHB que constituem o sistema de marcadores sorológicos da infecção.

HBsAg	Antígeno de superfície	Usualmente é detectado dois a três meses após o contato com o vírus, permanece por cerca de três meses no soro (SHERLOCK & DOOLEY, 1993 (HOOFNAGLE et al., 1987).
HBcAg	Antígeno do nucleocapsídeo	É detectável no soro de portadores de hepatite aguda ou crônica com replicação, representa um marcador epidemiológico da infecção (ROBINSON & LUTWICK, 1976).
HBeAg	Antígeno e	É um antígeno circulante sintetizado pelo nucleocapsídeo viral. É liberado durante a fase de replicação ativa ou aguda, simultaneamente ou poucos dias depois da presença do HBsAg (GRANATO, 1998), pode permanecer reativo em portadores crônicos com elevada replicação viral (THOMAS, 1995).
Anti-HBs	Anticorpo contra o HBsAg	É o anticorpo protetor, aparece após o desaparecimento do HBsA, persistindo por muitos anos após a cura, sendo necessários títulos superiores a 10 UI/L (SHERLOCK & DOOLEY, 1993).
Anti-HBc	Anticorpo contra o HBcAg	É expresso em todo indivíduo que teve contato prévio com o vírus, sendo necessária a quantificação e a determinação da classe IgM que aparece na fase aguda ou IgG que permanece após a cura (ROBINSON & LUTWICK, 1976; GRANATO, 1998; LAVARINI et al., 1993; HOLLINGER, 1996).
Anti-HBe	Anticorpo contra o HBeAg	É detectado na fase de infecção aguda no momento ou imediatamente depois que o HBeAg torna-se negativo, persistindo por aproximadamente 1 a 2 anos após a resolução da doença (ROBINSON, 1990).

Quadro 1- Sistema de antígenos e anticorpos marcadores sorológicos de infecção pelo VHB.

2.5.1 Diagnóstico molecular do vírus da hepatite B

Encontrar uma forma de detecção precisa e segura do VHB no soro humano tem sido a meta de virologistas do mundo inteiro. As técnicas imunológicas ou sorológicas são importantes no diagnóstico dessa doença, entretanto, cada vez mais, a biologia molecular tem contribuído significativamente com as análises imunológicas e sorológicas tradicionais.

A aplicação das técnicas de biologia molecular no estudo do VHB, possibilita tanto a manipulação dos genes quanto à análise detalhada da composição química dos ácidos nucléicos e aminoácidos (DNA/RNA). A *Reação em Cadeia da Polimerase* (PCR), por combinar alta especificidade e sensibilidade, tornou-se atualmente, a principal técnica de diagnóstico e investigação molecular do VHB no soro humano. A partir da amplificação *in vitro* do ácido nucléico viral é possível realizar estudos de clonagem, quantificação da carga viral, genotipagem por oligonucleotídeos específicos ou seqüenciamento, verificar mutações no genoma e fazer estudos de expressão gênica. Na prática, a detecção do DNA-VHB (marcador viral de replicação e infectividade) no soro é usada para avaliar a viremia no indivíduo infectado, portadores crônicos e para monitorar a eficácia terapêutica, uma vez que permite a detecção do vírus nas diferentes formas evolutivas da doença mediante a quantificação da carga viral.

O desenvolvimento de *kit's* comerciais de diagnóstico molecular do VHB tem difundido a utilização da PCR nos laboratórios de diagnóstico de rotina ou de pesquisa. Baseados nesta técnica, uma variedade de testes qualitativos e quantitativos do DNA VHB, estão disponíveis comercialmente e são usados para determinar a presença da infecção ou para avaliar a resposta ao tratamento (PARASKEVIS et al., 2002).

Para fins de tratamento, considera-se que a PCR (quantitativa) seja o método mais adequado para avaliar a replicação viral no sangue. Valores acima de 100.000 cópias/mL são

indicativos de replicação, enquanto que indivíduos com valores abaixo desse são portadores inativos (<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>).

Uma das grandes vantagens da utilização da PCR no diagnóstico do VHB é que a mesma não necessita do cultivo do vírus. Assim, dependendo do alvo a ser investigado ou da estratégia adotada, é possível a partir da análise de um segmento específico do genoma viral, investigar determinado fato. Pesquisadores como Hoofinagle e Schafer (1996), Chu e Lok (2002), Kirschberg et al (2004), dentre outros, utilizaram a PCR no diagnóstico das infecções agudas, na avaliação de pacientes com hepatite B crônica com replicação viral HBsAg e HBeAg positivo, no acompanhamento de pacientes pós-transplante hepático; na monitoração da eficácia do tratamento antiviral, na expressão de células com proteínas recombinantes do antígeno de superfície em diferentes níveis e em teste de identificação genotípica, incluído testes por multiplex-PCR.

Conforme descrito acima a PCR apresenta diversas variações que foram desenvolvidas para atender as necessidades específicas. Uma delas é a *nested*-PCR, que em testes realizados apresentou sensibilidade até no mínimo 300 cópias viral por mL (LARGURA et al., 2000). Considerada uma técnica com alto nível de detecção, a *nested*-PCR utiliza duas etapas de amplificação consecutivas, onde o produto da primeira amplificação é submetido a uma segunda amplificação com um par de iniciadores localizados internamente à seqüência de nucleotídeos do fragmento amplificado. Essa maior sensibilidade do processo tornou-se possível devido ao aumento total do número de ciclos e especificidade, garantido pelo reconhecimento de um número maior de bases da seqüência alvo. A PCR permite ainda utilizar a variação semi *nested*-PCR onde somente um iniciador interno é adicionado formando par com um dos iniciadores externos que permanece na reação para amplificação do fragmento de interesse. Kato et al (2001) utilizaram esse método para determinar a presença do genótipo G em soro de portadores do VHB nos Estados Unidos e na França, a

sensibilidade avaliada a partir de 10 diluições serial foi de 10 cópias/mL. Utilizando este mesmo método, Oliveira (2001) também conseguiu amplificar e genotipar diferentes VHBs presentes em amostras de pacientes infectados pelo VHB naturais da Amazônia brasileira, em diferentes fases de evolução da doença. Portanto, de acordo com os estudos acima citados, a PCR parece ser uma técnica que pela sua alta sensibilidade e especificidade é o método mais seguro para se identificar e avaliar a presença do VHB nos diferentes estágios de replicação viral e curso da doença.

Na tentativa de tornar esse processo cada vez mais rápido e seguro, empresas de diagnóstico têm investido no desenvolvimento de kits comerciais para a quantificação da carga viral do VHB, um dos mais conhecidos é o *Amplicor HBV Monitor Test* (ROCHE), desenvolvido a partir da técnica da PCR detectava o DNA do VHB ao nível de 10 a 100 cópias/mL (LOK et al., 2001). Esse *kit*, porém, foi retirado do mercado por não ter sido aprovado nos Estados Unidos, o motivo é que ele não apresentava o mesmo padrão para os diferentes genótipos do VHB. Sabe-se hoje que a detecção do DNA-VHB por PCR é mais eficiente em amostras de pacientes portadores de hepatite crônica e portadores assintomáticos (*Conferência de Consenso sobre hepatite B e C*, 2003).

2.6 Mutações no gene S

As primeiras suspeitas de mutações no gene S foram levantadas após a realização do programa de imunização contra o VHB na Itália onde várias crianças foram infectadas pelo VHB, mesmo tendo sido vacinadas. Análise molecular das seqüências nucleotídicas do gene S de amostras de VHB obtidas dessas crianças, mostraram que as mesmas haviam sido infectadas por um VHB mutante. O VHB mutante ocorre durante a replicação viral, pois nessa fase pode ocorrer mudança na seqüência de bases dos ácidos nucléicos levando a

mudanças no aminoácido da proteína HBsAg. Muitas dessas mutações são de ocorrência natural (KARTHIGESU, et al., 1994) outras têm sido freqüentemente descritas em indivíduos após tratamento com anticorpo monoclonal, em particular após transplante hepático (CARMAN, et al., 1999), durante a infecção crônica ou cirrose (WALLACE e CARMAN, 1997) e mais raramente em portadores assintomáticos antígeno HBeAg positivos (TSUBOTA et al., 1998).

A mutação do gene S consiste em uma alteração na seqüência de aminoácidos na região S do genoma VHB causando conseqüentemente, alteração do determinante antigênico α , o principal alvo antigênico para resposta vacinal. O vírus com essa alteração escapa do sistema imune e não é reconhecido pelos anticorpos anti-HBs. A primeira mutação desse tipo descrita foi à substituição de um resíduo de glicina por arginina, na posição 145 do gene S (YAMAMOTO et al., 1994; CARMAN et al., 1996). A Figura 4 mostra a estrutura molecular da proteína HBsAg descrita por Chen et al (1996) comparando o sítio do determinante α de um VHB selvagem (sem a mutação glicina/arginina) e de um VHB mutante, isto é, com a substituição de uma glicina por uma arginina na posição 145.

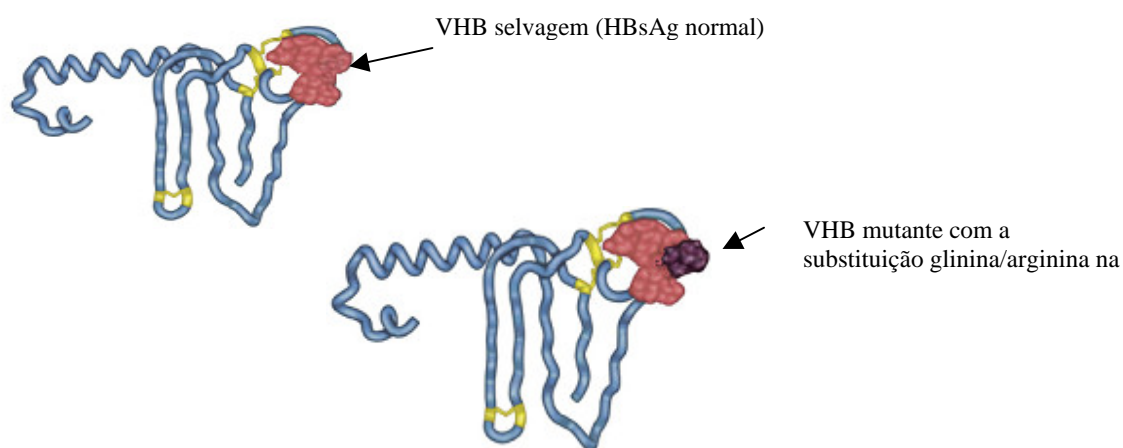


Figura 4- Modelo molecular do HBsAg mostrando o sítio do determinante α quando uma arginina é substituída por uma glicina na posição do aminoácido 145.
Fonte: Adaptada de CHEN, et al., 1996.

Além da mutação acima, outras mutações associadas à falha na vacinação também podem ocorrer tais como: isoleucina/valina, na posição 110; treonina/asparagina, na posição 126; glutamina/histidina, na posição 129; metionina/leucina, na posição 113; lisina/glutamato, na posição 141; prolina/serina, posição 142; aspartato/alanina, posição 144 e cisteína/arginina na posição 149 (CARMAN et al., 1996 e 1998; WALLACE e CARMAN, 1997). A substituição de uma treonina por uma serina na posição 140 pode levar tanto à infecção em indivíduos previamente vacinados (ZUCKERMAN & ZUCKERMAN, 1999), como à falta de detecção do HBsAg por alguns ensaios comerciais (CARMAN et al., 1995).

Outra mutação que também pode ocorrer é uma pequena deleção na região pré-S (posição 2847 a 2863), incluindo o códon de iniciação da proteína de superfície S (KAJIVA et al., 2002). Segundo Bruss e Ganem (1991) mutantes com esse tipo de deleção são provavelmente incapazes de efetuar a replicação, uma que vez as duas proteínas são necessárias para formação do *virion*.

2.6.1 Mutações na região C/pré-C

CARMAN et al (1993) analisando seqüências nucleotídicas de VHB obtidas de pacientes com hepatite B crônica anti-HBe positivos e alta replicação viral verificaram que estes eram VHB mutante, cujo códon 28 correspondente ao sítio de iniciação do HBcAg na posição 1896, havia mudado para um sinal de terminação de síntese protéica (*stop códon*) com substituição de uma glicina por uma alanina. Como isso, a síntese protéica da proteína pré-C (*pré-core*) terminava antes do sítio de iniciação da seqüência do antígeno central (*core*), de tal forma que o antígeno central tinha sua síntese anormal (LANFORD et al., 1998).

Mutantes pré-C foram descritos tanto em pacientes com hepatite fulminante e hepatite crônica, como também em portadores assintomáticos sem evidência de doença

hepática. Portanto, a presença de mutação pré-C não é pré-requisito ou responsável pela evolução mais agressiva da infecção. Parece que o grau de severidade que as diferentes cepas de VHB podem apresentar é fortemente influenciado por outras mudanças tais como, mutações na região C ou uma combinação de outras mutações. Mas, independente da estrutura molecular na região pré-C, a resposta imune do hospedeiro parece ser o maior processo que determina a evolução da doença (BLUM, 1997).

As mutações mais frequentes da região central envolvem substituições de dois nucleotídeos, A-T na posição 1762 e G-A na posição 1764. Em alguns pacientes, as alterações A-T não foram associadas às mutações da posição 1896 da região pré-C, sugerindo que essa mutação na região central talvez possa promover a diminuição dos níveis de HBeAg no soro. Por outro lado, a presença da mutação A-T em pacientes HBeAg portadores de hepatite crônica deixa dúvidas sobre o papel da mutação central na diminuição dos níveis de HBeAg (OKAMOTO et al., 1992; CHAN et al., 1999; KID-LJUNGGREN et al., 2002).

Assim como os genótipos, as cepas mutantes *pré-core* também têm uma distribuição irregular no mundo. As regiões onde mais ocorrem são em indivíduos da Ásia e Mediterrâneo, infectados com os genótipos B, C ou D e raramente na América do Norte e Europa, onde o genótipo A é predominante (RODRIGUE-FRIAS et al., 1995; LINDH et al., 1997).

Chan et al (1999), por exemplo, estudaram mutações pré-C/C em HBV isolados de indivíduos chineses com infecção crônica pelo VHB antes e após soroconversão do antígeno HBeAg, e verificaram que a mutação na região C ocorre antes da mutação pré-C. No referido estudo encontraram maior prevalência da mutação C em pacientes HBeAg negativos (91%) do que em pacientes que permaneceram HBeAg positivos (36%). A mutação A-T diminuiu, mas não inibiu completamente a secreção de HBeAg, isso só ocorreu após a resposta imune ou desenvolvimento de outras mutações, como G-A na posição 1896. Os

autores sugeriram ainda, que a soroconversão HBeAg está geralmente associada ao desaparecimento da doença hepática, mesmo na vigência de mutações na região C e/ou pré-C. Portanto, essas mutações não são necessariamente patogênicas, e outros fatores como mutações em outras regiões do genoma VHB, resposta imune do hospedeiro ou infecção inicial pelos mutantes pode, determinar o curso da doença hepática em pacientes anti-HBe positivos.

No Brasil poucos estudos foram realizados, Castro et al. (2001) encontrou baixa frequência (7/29) de mutantes pré-core em portadores anti-HBe positivos; Sitnik et al (2004) encontraram em 32/102 pacientes, sendo a maioria infectados com o genótipo D.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Considerações éticas – Cumprindo os requisitos da Resolução CNS/196/96, o presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas FMT-AM, processo número: 992/2003 com o título “**Análise molecular e implicações biológicas do vírus da hepatite B, em pacientes naturais da Amazônia Ocidental brasileira**” (ANEXO I). Após enviar ao Comitê de Ética, pela abrangência da origem geográfica mais limitada das amostras achou-se por bem alterar o título para “**Análise molecular e implicações biológicas do vírus da hepatite B, em pacientes naturais do Estado do Amazonas**”.

População de estudo – a população alvo deste estudo foi constituída de indivíduos de ambos os sexos, independentes da faixa etária e da evolução da doença. Os menores de 18 anos foram incluídos na pesquisa após autorização dos pais ou responsáveis.

Tipo de estudo - descritivo dos genótipos do VHB em indivíduos naturais do Estado do Amazonas.

Material biológico e procedência – o presente estudo propôs-se analisar 80 amostras de plasma sanguíneo de indivíduos portadores do VHB, naturais do estado do Amazonas, sendo 60 de pacientes procedentes da demanda espontânea do ambulatório de hepatites da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM) e 20 amostras de pacientes naturais e domiciliados na zona urbana do município de Lábrea. As amostras coletadas no município de Lábrea são de indivíduos selecionados a partir de um banco de dados de um inquérito epidemiológico iniciado no município no ano 2000 pelo grupo de pesquisa da Gerência de Virologia da FMT-AM. As amostras procedentes do ambulatório da FMT-AM foram coletadas no período de Julho de 2003 a Julho de 2004. No município de Lábrea a coleta foi realizada em fevereiro de 2005 no domicílio de cada indivíduo.

3.1 Critérios de inclusão

- Ser natural do Estado do Amazonas;
- Ser portador do VHB independente do quadro clínico de infecção (cirrose hepática, hepatite aguda, hepatite crônica, portador assintomático e hepatocarcinoma);

3.2 Critérios de exclusão

- Indivíduos naturais de outros Estados da Federação;
- Indivíduos portadores do VHB co-infectados com outros agentes virais.

3.3 Procedimentos para coleta e armazenamento das amostras

No momento do atendimento médico dos pacientes no ambulatório de hepatite da FMT-AM e na visita aos domicílios em Lábrea, os mesmos foram convidados a participar do estudo em questão. Ao aceitar participar, os pacientes foram previamente esclarecidos quanto aos objetivos do trabalho, riscos associados ao estudo bem como dos benefícios e confidencialidade dos registros. Após concordar com a pesquisa, o paciente assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO II) e, com ajuda do pesquisador responsável, foi preenchido um questionário individual padronizado (ANEXO III), permitindo assim a realização da investigação. No Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da FMT-AM foi coletada uma amostra de sangue por punção venosa de cada paciente e distribuída em dois tubos: um de 10 mL para realização dos testes sorológicos e outro de 5 mL para os ensaios de biologia molecular (tubo *vacutainer* contendo EDTA).

Cada tubo foi identificado com o número de registro, data e as iniciais do nome do participante. As amostras coletadas no LAC, ao término do período diário de coleta, foram transportadas para o laboratório de virologia da FMT-AM, onde procedeu-se o isolamento do

plasma por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O plasma foi distribuído em alíquotas de 300 µL em microtubo estéril, devidamente identificados e estocados a -20°C para sorologia e a -80°C para análise molecular. Nas amostras coletadas nos domicílios de Lábrea adotou-se os mesmos procedimentos sendo armazenadas a -20°C até o transporte para Manaus.

3.4 Análise laboratorial do soro

Todas as amostras foram submetidas à pesquisa dos marcadores sorológicos de infecção pelo VHB, antígeno de superfície HBsAg (MUREX/Abbot), anticorpo total contra o antígeno *core* anti-HBc total (BIOMÉRIEUX/ORGANO TECNICA), anticorpo contra o antígeno do core da classe IgM (anti-HBc IgM), antígeno *e* do nucleocapsídeo (HBeAg), anticorpo contra o antígeno *e* (anti-HBe) e anticorpos contra o vírus das hepatite A (anti-HAV), da hepatite C (anti-HCV) e da hepatite delta (anti-HD total) (DIASORIN, Itália). Nas amostras procedentes de Lábrea além dos marcadores acima foi realizada também a pesquisa do anticorpo contra o antígeno de superfície anti-HBs). Os teste imunoenzimático ELISA em fase sólida (ELISA) foram realizados de acordo com as instruções do manual do fabricante (), como parte da rotina de exames do laboratório de Virologia da FMT-AM.

3.5 Extração do DNA-VHB

A extração do DNA VHB foi realizada pelo método fenol/clorofórmio (KARASSAWA et al., 1995), modificado por Oliveira (2001). Em um microtubo de 2,0 mL estéril foi adicionado 250 µL de plasma, 3,0 µL de Tris-HCl (1,0 M), 3,0 µL de EDTA (0,5 M), 15 µL de SDS (10%) e 50 µL de proteinase K (10 mg/mL). Após homogeneizar essa solução foi incubada a 56°C por 2 horas. Em seguida, adicionou-se um 1V de fenol hidratado

e tamponado seguido de rigorosa agitação em vórtex e centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro microtubo e adicionado 1V de clorofórmio hidratado. Esse procedimento foi repetido por duas vezes. Para precipitação do DNA viral, foi adicionado à fase aquosa 0,1V de NaCl (3,0 M) e 2,5 V de etanol absoluto a -20°C, incubando a - 20°C por 12 horas. No dia seguinte, foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos. O material precipitado foi seco em fluxo laminar e resuspendido em 30 µL de tampão de resuspensão (TR) (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM) pH = 8 deixando por cerca de 3 horas na geladeira para completa eluição e então estocado à - 20°C para posterior amplificação do DNA viral por PCR. Em todas as extrações realizadas, foi incluída uma alíquota de uma amostra denominada HEMO (HBsAg positivo) que serviu de controle positivo para VHB. Essa amostra foi doada pelo Hemocentro de Manaus.

3.6 Procedimentos para avaliar a qualidade do DNA extraído

Para testar a qualidade do DNA no que se refere à capacidade de funcionar como molde para a reação da PCR, antes de realizar a reação da PCR utilizando iniciadores específicos para o VHB, todas as amostras foram submetidas à reação de amplificação com os iniciadores IS05 (PONTES, 2003) que amplificam uma região de microsatélite (GATA)₁₃ do gene da golgina localizado no cromossomo 15 humano. O sistema de amplificação utilizado nas reações foi:

- Tampão 10X PCR.....	2,5 µL
- Mix dNTP (2,5 mM).....	2,5 µL
- MgCl ₂ (20 mM).....	2,5 µL
- <i>Taq</i> DNA polimerase (5 U/µL).....	0,3 µL
- Iniciador ISO05 (5,0 pmoles µL).....	5,0 µL
- Amostra.....	5,0 µL
- Volume final.....	20 µL

As reações de PCR foram realizadas em aparelho termociclador PXE 0.2 (*Thermal Cycler- Electron Corporation*), num total de 40 ciclos com a seguinte programação:

- 95°C..... por 2 minutos (Pré-aquecimento)
- 95°C..... por 1 minuto.....(desnaturação)
- 55°C.....por 1 minuto(hibridização)
- 72°C..... por 1 minuto(extensão)
- 72°C..... por 5 minutos.....(extensão final)

Manteve-se a reação a 4°C até o momento da retirada da reação do termociclador.

3.6.1 Análise eletroforética do produto amplificado com o iniciador IS05

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 2,0 % corado com brometo de etídeo (1,0 µg/mL). No gel foram aplicados 5,0 µL do produto da PCR misturados com 3,0 µL de tampão de amostra TBE 5X. Como padrão de peso molecular utilizou-se o padrão *Ladder* de 100 pb (INVITROGEN). Na cuba de eletroforese aplicou-se uma corrente elétrica inicial de 70 volts por cerca de 20 min aumentando em seguida para 100 volts até finalizar a migração. Ao final da migração eletroforética o gel foi visualizado e fotografado utilizando o sistema de captura de imagem *Image Master VDS FTI-500 (Amershan Pharmacia Biotec)* ou uma câmera digital *Olympus C-5060 vide 200m*.

3.7 Desenho dos iniciadores para amplificação do gene S e C

Os iniciadores específicos para VHB utilizados neste estudo foram desenhados a partir do alinhamento de seqüências nucleotídicas referentes aos genes S e C dos 8 genótipos do VHB (A-H) depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Procurou-se utilizar nessa análise, seqüências de VHB isoladas em países que fazem fronteiras com o Brasil, e particularmente com a Amazônia brasileira e seqüências isoladas na África e nos Estados

Unidos. Além da seqüência X51970 identificada na Alemanha e considerada como seqüência universal para o VHB. O alinhamento das seqüências foi feito no programa CLUSTAL W, versão 1.7 (THOMPSON, et al., 1994).

A partir de uma seqüência consenso gerada após o alinhamento, foi selecionada a posição mais conservada das extremidades de cada gene e uma posição interna para desenho dos iniciadores. Para amplificação do gene S foram desenhados os iniciadores externos 2821 e 783, sentido senso e anti-senso, respectivamente, e o interno 241, no sentido anti-senso. Para o gene C foram desenhados os iniciadores externos CMC1 e CMC2 senso e anti-senso, respectivamente. As seqüências desses iniciadores estão no Quadro 2.

Gene	Nome	Seqüência	tamh	Posição no genoma VHB
S	2821	5'-GGG TCA CCA TAT TCT TGG-3	23 nt	2821-2150
	241	5'-CAC CAC GAG TCT AGA CTC-3	22 nt	241-219
	783	5'-CTC ACG ATG CTG TAC AGA-3	21 nt	783-762
C	CMC1	5'-GCT TCA CCT CTG CAC GTY-3	22 nt	1588-1608
	CMC2	5'-CCA AAT TAY TDC CCA CCC-3	22 nt	2129-2107

Quadro 2- Seqüência dos iniciadores desenhados para amplificação dos genes S e C.

Além dos iniciadores acima foram também utilizados os iniciadores P1 (5'-TGC CTC TCA CAT CTC GTC AA 3') (OLIVEIRA, 2001) para o gene S e 1680 (5'-ATG TCG ACA ACC GAC CTT GA-3') e 2058 (5'- GTA TGG TGA GGT GAA CAA TG-3') (LINDH et al., 2000) para o gene C. Na Figura 5 abaixo está esquematizada a estratégia utilizada para amplificação do gene S e na Figura 6 para o gene C.

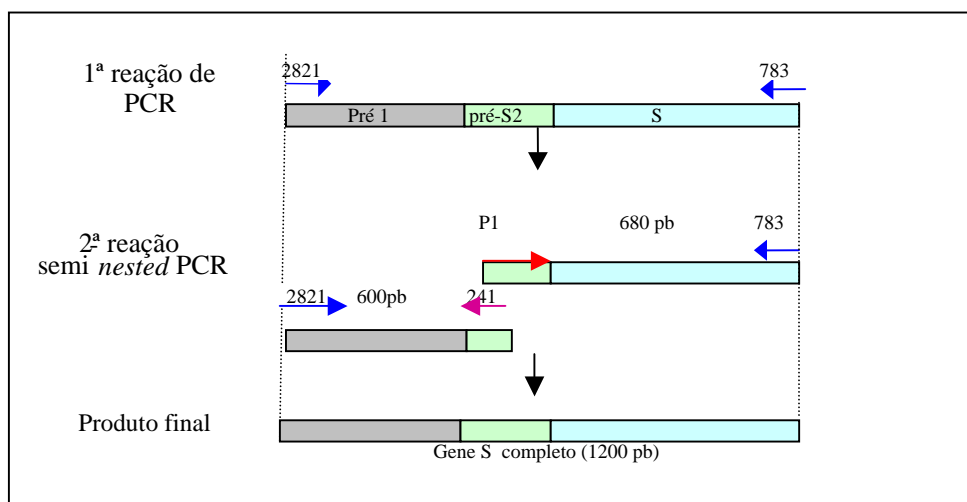


Figura 5 – Estratégia do sistema de amplificação do gene C por PCR.

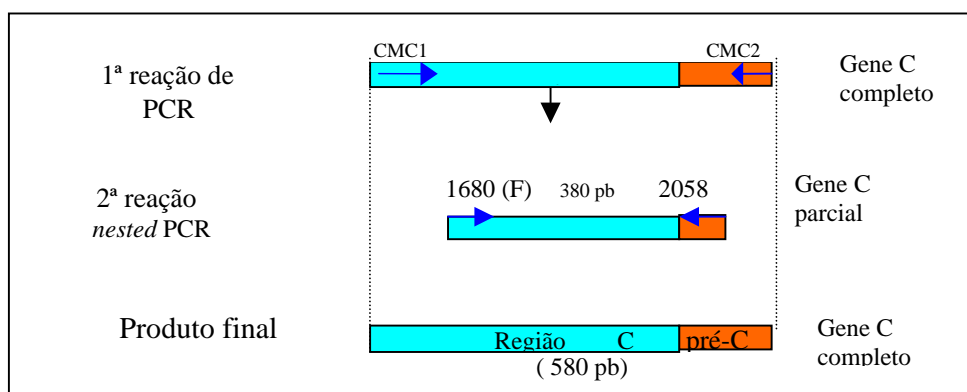


Figura 6- Estratégia do sistema semi-nested PCR para amplificação do gene S.

3.8 Estratégia de amplificação do gene S por PCR

A primeira estratégia para amplificação do gene S foi utilizando os iniciadores 2821 e 783 e enzima *Taq* DNA polimerase comum. Como após a reação de PCR não foi possível visualizar as bandas de DNA amplificado em gel de agarose, foi então adotado o sistema de reamplificação do produto da primeira PCR em semi-nested PCR.

Foi utilizado então na primeira etapa ou primeira reação de PCR os pares de iniciadores 2821 e 783 que amplificam o segmento genômico S inteiro (1200 pb). A partir dessa primeira reação foram feitas duas *semi-nested* PCR, uma para a região pré-S1/2 utilizando os pares de iniciadores 2821 e 214 e outra para a região S com os iniciadores P1 e 783, sendo gerados dois *amplicons* parcialmente sobrepostos a cada reação. A misturas das reações *semi-nested* foi preparada ao mesmo tempo mudando apenas a combinação dos pares de iniciadores. Na primeira reação utilizou-se 5,0 µL de amostra e segunda reação (*semi-nested*) 1,0 µL do produto de PCR da primeira reação. O sistema das reações da PCR foi preparado tal como descrito a seguir:

- Tampão 10X PCR	5,0 µL
- Mix dNTP (10 mM).....	1,0 µL
- MgCl ₂ (50 mM).....	1,5 µL
- <i>Taq</i> DNA polimerase (5U/µL).....	0,5 µL
- Iniciador senso (10 pmoles/µL).....	5,0 µL
- Iniciador anti-senso (10 pmoles/µL).....	5,0 µL
- Amostra ou <i>amplicon</i>	5,0 ou 1,0 µL
- Água Milli-Q para completar o volume final	-- µL.
Volume final	50 µL

Em todas as reações foi incluído uma amostra controle positivo de DNA VHB (plasma humano com carga viral igual a 7.000 cópias/mL de VHB), quantificada com *Amplicor HBV Monitor Test* (ROCHE), uma amostra controle negativo para VHB e um controle dos reagentes (tubo contendo somente reagentes).

As reações foram realizadas em termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradiente*. Tanto na primeira quanto na segunda reação utilizou-se um total de 35 ciclos com a seguinte programação:

Primeira reação	Segunda reação
- 95°C.....	94°Cpor 5 minutos(Pré-aquecimento)
- 95°C.....	94°Cpor 40 segundos.....(desnaturação)
- 58°C.....	57 °C..... por 1:30 minutos(hibridização)
- 72°C.....	72°Cpor 40 segundos.....(extensão)
- 72°C.....	72°Cpor 7 minutos.....(extensão final).
- 4°C.....	∞

Na tentativa de amplificar o gene S completo em uma única reação de PCR, em algumas reações utilizou-se a enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES). Essa enzima além de ser termo-estável possui atividade revisora. O sistema utilizado nessas reações foi:

- Tampão 10X PCR <i>High Fidelity</i>	5,0 µL
- Mix dNTP (10 mM).....	1,0 µL
- MgSO ₄ (50 mM).....	2,0 µL
- <i>Platinum Taq High Fidelity</i> (5 U/µL).....	0,2 µL
- Iniciador 2821 (10 pmoles/µL).....	5,0 µL
- Iniciador 783 (10 pmoles/µL).....	5,0 µL
- Amostra	5,0 µL
- Água Milli-Q para completar o volume final de	50 µL.

As reações foram submetidas a 40 ciclos de PCR nas seguintes condições de termociclagem:

- 94°C	por 5 minutos(Pré-aquecimento)
- 94°C.....	por 30 segundos.....(desnaturação)
- 58°C.....	por 30 segundos(hibridização)
- 68°C.....	por 1:30 segundos.....(extensão)
- 68°C.....	por 5 minutos.....(extensão final).

A reação permaneceu a 4°C até o momento de retirada do termociclador.

3.8.1 Sistema de amplificação do gene C

O sistema adotado para amplificação do gene C foi equivalente ao do gene S, sendo que todas as amostras foram primeiramente amplificadas com única reação de PCR utilizando os iniciadores CMC1 e CMC2 e a enzima *Platinum Taq High Fidelity*. O produto esperado desta reação corresponde a um fragmento de 580 pb. As amostras DNA VHB não detectável pela PCR simples foram reamplificadas pelo sistema *nested*-PCR usando os iniciadores internos 1680 (F) e 2058 (R) (LINDH et al., 2000) e enzima Taq polimerase comum (LAB TRADE ou INVITROGEN). O produto final desta reação é de 380 pb.

Para o sistema de amplificação com uma única reação da PCR utilizou-se as seguintes condições:

- Tampão 10X PCR <i>High Fidelity</i>	5,0 µL
- Mix dNTP (10 mM).....	1,0 µL
- MgSO ₄ (50 mM)	2,0 µL
- <i>Platinum Taq High Fidelity</i> (5U/µL).....	0,2 µL
- Iniciador CMC1 (10 pmoles/µL).....	5,0 µL
- Iniciador CMC2 (10 pmoles/µL).....	5,0 µL
- Amostra	5,0 µL
-Volume final	50 µL

Para o sistema *nested*-PCR as reações foram preparadas conforme descrito abaixo.

Primeira reação		Segunda reação	
- Tampão 10X PCR	5,0 µL	5,0 µL
- Mix dNTP (10	1,0 µL	1,0 µL
- MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µL	1,5 µL
- Taq DNA polimerase (5 U) 0,5 µL	0,3 µL	0,3 µL
- Iniciador CMC1 (10 pmoles/µL) 5,0 µL	5,0 µL	- Iniciador 1680 (10 pmoles/µL) 5,0 µL	5,0 µL
- Iniciador CMC2 (10 pmoles/µL) 5,0 µL	5,0 µL	- Iniciador 2058 (10 pmoles/µL) 5,0 µL	5,0 µL
- Amostra 5,0 µL	5,0 µL	- Produto da 1ª reação	1,0 µL
-Volume final	50 µL		50 µL

No Quadro 3 está representado as duas condições de termociclagem adotadas no estudo para amplificação do gene C.

Condições de termociclagem em uma única reação de PCR	Condições de termociclagem para o sistema <i>nested</i>-PCR
- 94°C.....por 1 minuto (pré aquecimento)	- 94°C.....por 5 minutos (Pré-aquecimento)
- 94°Cpor 30 segundos (desnaturação)	- 94°C..... por 40 segundos(desnaturação)
- 55°C por 30 segundos (hibridização)	- 55°C..... por 1:30 segundos(hibridização)
- 68°C..... por 2 minutos (extensão)	- 72°C..... por 40 segundos (extensão)
- 68°Cpor 5 minutos (extensão final)	- 72°C.....por 40 segundos (extensão final)
- 4°C por tempo indeterminado	- 4°Cpor tempo indeterminado
35 ciclos	35 ciclos

Quadro 3- Condições de termociclagem para amplificação do gene C utilizado o sistema de amplificação em uma única reação de PCR e pelo sistema *nested*-PCR.

3.8.2 Eletroforese dos produtos da PCR amplificados (gene S e C)

Os produtos das PCR simples do gene S e C foram visualizados em gel de agarose 0,8% e das reações *simi-nested* e *nested*-PCR em gel 1,5 % corados com brometo de etídeo (1,0 µg/mL). No gel foram aplicados 5,0 µL do produto da PCR misturados com 3,0 µL de tampão de amostra TBE 5X. Como padrão de peso molecular utilizou-se o padrão *Ladder* de 100 pb (INVITROGEN). Para migração das amostras em gel, na cuba de eletroforese, aplicou-se uma voltagem inicial de 70 volts por cerca de 20 minutos aumento em seguida para 100 volts por 1 horas. Ao término da migração eletroforética as amostras foram visualizadas e fotografadas utilizando o mesmo sistema descrito anteriormente.

3.8.3 Purificação do produto da PCR para o sequenciamento

Após a visualização em gel de agarose do produto das reações de PCR, as amostras positivas foram selecionadas e purificadas utilizando “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, conforme procedimentos descritos pelo fabricante. A purificação do produto de PCR consiste na eliminação de substâncias, tais como, sais, dNTPs e excesso de iniciadores não incorporados durante a reação de PCR.

Depois de purificadas, para verificar a qualidade das amostras, estas foram visualizadas em gel de agarose de acordo com o produto obtido (1,5% ou 0,8%) tal como escrito anteriormente e então, submetidas à reação de sequenciamento.

3.8.4 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas em placa de 96 poços. Foi feito o sequenciamento tanto do produto das reações de PCR simples como das reações *simi-nested* e *nested-PCR* com os iniciadores senso ou anti-senso de cada reação. Utilizou-se o *Kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Mega BACE 1000) Amershan Bioscience*, conforme descrito abaixo.

- Pré-mix (2 μ L de *Big Dye* + 2 μ L de *Dye Terminator*)..... 4,0 μ L
- Iniciadore F ou R (5 pmoles/ μ L)2,0 μ L
- Produto da PCR purificado.....2 a 3,0 μ L
- Água Milli Q para completar o volume final.
- Volume final..... 10,0 μ L

A reação de sequenciamento processou-se em 30 termociclos nas seguintes condições:

- 95° C.....por 25 segundos
- 95°C.....por 15 segundos
- 50°C.....por 20 segundos
- 60°C.....por 1:20 minutos
- 4°C.....por tempo variável,

3.8.5 Precipitação do produto da reação de seqüenciamento

Ao produto da reação de seqüenciamento (10 µL) adicionou-se 1,0 µL de acetato de amônia (7,5 M) (*Kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Mega BACE) Amershan Bioscience*) e 27,5 µL de etanol absoluto. A placa contendo as amostras foi homogeneizada por alguns segundos e incubada por 20 minutos, à temperatura ambiente, protegida da luz com papel laminado. Seguindo-se essa etapa, a placa foi centrifugada a 4.000g por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante da placa foi desprezado invertendo-a ligeiramente na pia. Ao material precipitado na placa, adicionou-se 120 µL de etanol 70% gelado. Repetiu-se o mesmo procedimento de centrifugação acima, agora por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e a placa invertida, foi centrifugada a 700 g por alguns segundos. Para evaporar completamente o etanol, a placa foi seca em fluxo laminar por 15 minutos. Após completamente seca, para resuspending o DNA adicionou-se em cada poço da placa 10 µL *Loading buffer* (tampão de formamida 70% e EDTA 1,0 mM). A placa foi vedada e homogeneizada vigorosamente por 2 minutos em agitador magnético (vórtex) seguido de centrifugação a 700g por alguns segundos. As amostras foram submetidas ao seqüenciamento, utilizando um seqüenciador automático “*MegaBace 1000*” da *Amershan Pharmacia Biotech* (procedimento baseado no método original de Sanger et al (1977)).

3.9 Analise dos questionários

Os dados dos questionários (ANEXO III) foram armazenados em um banco de dados no programa Excel. Neste programa foram conduzidas análises para avaliar os principais aspectos socioeconômicos e epidemiológicos da população estudada, tais como idade, gênero e município de procedência.

3.10 Análise das seqüências no programa BLAST/BLASTN

Para confirmar se as seqüências obtidas após seqüenciamento eram de VHB, foi realizado uma comparação dessas seqüências com seqüências depositadas no *GenBank* utilizando o programa BLAST/BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997). Essa foi uma análise preliminar com os dados brutos das seqüências.

3.10.1 Análise das seqüências pelo programa PHRED

Após análise pelo programa BLAST/BLASTN, a pasta contendo as seqüências válidas foi compactada e encaminhada para análise no programa PHRED disponível na página da Universidade de Brasília UnB (http://www.unb.br/biologia_molecular). Essa análise foi realizada para verificar a qualidade das seqüências após o seqüenciamento. O programa PHRED classifica como seqüência de ótima qualidade, as seqüências com mais de 100 bases e qualidade superior a 20, as seqüências com essas características são mostradas em verde com o símbolo “OK”.

3.10.2 Edição e alinhamento das seqüências

A edição e alinhamento das seqüências nucleotídicas obtidas foi realizado no programa editor e alinhamento de seqüências BioEdit versão 7.0.5.2 (6/5/05) (HALL, 1999). Após a edição das seqüências utilizando a opção *Graphic view* foi feito a pesquisa para localização e identificação das principais mutações dos dois genes utilizando como referência seqüências dos oito genótipos do VHB obtidas no *GenBank*. Foram usadas as mesmas seqüências utilizadas na análise de genotipagem. A numeração adotada baseou-se na seqüência número de acesso X51970.

3.10.3 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada para identificação genotípica por comparação das diferentes cepas obtidas com as seqüências nucleotídicas já conhecidas dos diferentes genótipos de VHB depositadas no *GenBank*. As análises filogenéticas e de evolução molecular foram conduzidas usando o programa MEGA versão 3.1 (KUMAR, TAMURA e NEI, 2004).

Na construção das árvores filogenéticas aplicou-se o modelo de *Neighbor-Joining* (NJ). Os parâmetros definidos para esse modelo consideram principalmente as substituições da 1ª 2ª e 3ª posições, o número de sítios conservados e variáveis e as transversões e transições. O nível de confiança foi obtido usando o método não paramétrico *bootstrap* baseado em 1000 réplicas (uma réplica é igual a uma comparação). A classificação genotípica foi realizada mediante análise de similaridade das seqüências obtidas no estudo e seqüências correspondentes aos genótipos de A ao H obtidas *GenBank*. As seqüências externas estão identificadas com seus respectivos números de acesso no banco de genes seguido da subclassificação genotípica de cada um, segundo Norder et al., 2004. As seqüências do estudo estão representadas pelas iniciais MAO e LAB e o número de identificação de cada uma no banco de dados

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da população estudada

Participaram deste estudo um total de 80 indivíduos, sendo 60 procedentes de Manaus e 20 do município de Lábrea. O grupo caracterizou-se por um predomínio de indivíduos do gênero masculino (57%). No grupo procedente de Lábrea predominou o gênero feminino. Na Tabela 1 estão distribuídos de acordo com o gênero os 80 indivíduos participantes do estudo.

Procedência	Gênero				Total	
	Masculino		Feminino			
	n	%	n	%	n	%
Manaus	42	70%	18	30%	60	100%
Lábrea	4	20%	16	80%	20	100%
Total	46	57,5%	34	42,5%	80	100%

Tabela 1 - Caracterização da população estudada quanto a procedência e gênero.

Em relação à faixa etária, dois indivíduos foram menores de 15 anos, 24 tinham idade entre 15 e 30 anos, 35 entre 30 e 50 e 19 acima de 50 anos (Gráfico 1).

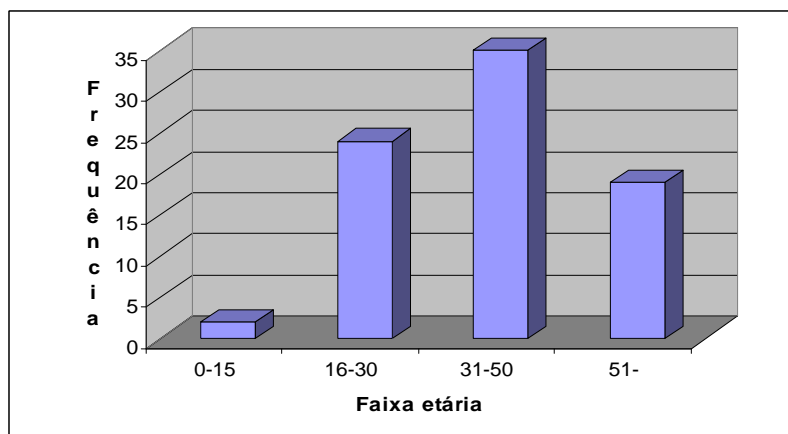


Gráfico 1 - Perfil da faixa etária dos 80 indivíduos participantes do estudo.

Quanto à naturalidade dos indivíduos envolvidos no estudo, das 60 amostras coletadas no ambulatório de hepatite da FMT-AM, 31 foram de pacientes naturais do município de Manaus e 29 de 19 municípios do interior do estado (Tabela 2).

Naturalidade	N (%)
Anori	1 (1,25)
Atalaia do Norte	1 (1,25)
Canutamã	1 (1,25)
Carauari	6 (7,5)
Codajas	1 (1,25)
Coari	1 (1,25)
Eirunepé	5 (6,25)
Fonte Boa	2 (2,5)
Itamarati	1 (1,25)
Juruá	1 (1,25)
Lábrea	20 (25,00)
Manaus	31 (37,5)
Manicoré	1 (1,25)
Novo Airão	1 (1,25)
Pauini	1 (1,25)
Santo Antonio do Iça	1 (1,25)
São Paulo de Olivença	1 (1,25)
Tabatinga	1 (1,25)
Tapauá	3 (3,75)
Total	80 (100)

Tabela 2 – Naturalidade dos pacientes envolvidos na pesquisa. Em negrito os municípios de áreas endêmicas do VHB

4.2 Resultados da análise sorológica e molecular

A comparação entre o resultado da análise sorológica dos marcadores de infecção pelo VHB e a análise de detecção do DNA VHB por PCR mostrou que 37,5% das amostras apresentaram-se positivas para o marcador HBsAg. Dessas, 36,25 % foram positivas DNA VHB positivas. Um percentual equivalente foi observado também entre HBsAg, Anti-HBc

total positivos. Enquanto que 10/19 ou 12,5% das amostras somente com o Anti-HBc total positivo foram DNA VHB positivos (Tabela 3).

Amostras procedentes do ambulatório da FMT-AM				
Marcadores sorológicos	ELISA		DNA VHB⁺	
	n	%	n	%
HBsAg ⁺	30	37,5%	29	36,25 %
HBsAg ⁺ , Anti-HBc total ⁺	29	36,25%	28	35%
HBsAg ⁻ , Anti-HBc total ⁺	19	23,75	10	12,5%
Anti-HBe+, anti- HBc total+	1	2,5	1	1,25%
Total	80	100%	68	85 %

Tabela 3 – Comparação entre a detecção dos marcadores sorológicos de infecção pelo VHB e a detecção do DNA VHB por PCR.

Embora não conste na tabela acima, das 20 amostras procedentes de Lábrea testadas para o marcador anti-HBs, somente uma foi anti-HBc total e anti-HBs positivo, sendo DNA VHB negativo tanto na amplificação do gene S como do C. Das 19 amostras somente Anti-HBc total positivo 10 foram procedentes de Lábrea, sendo todas anti-HBs negativo nesta faixa foi encontrado a menor percentagem de detecção do DNA VHB por PCR nas amostras.

4.3 Análise da qualidade do DNA contido nas amostras

Os resultados da amplificação com os iniciadores ISO05 mostraram que a extração de DNA pelo método fenol/clorofórmio proposta para o desenvolvimento deste trabalho foi adequada, podendo então ser mantida como metodologia para extração do DNA VHB. A integridade do DNA obtido em todas as extrações foi equivalente ao mostrado nas Figuras 7a e 7b abaixo. O produto obtido após amplificação com o iniciador acima correspondeu a um fragmento de 300 pb.

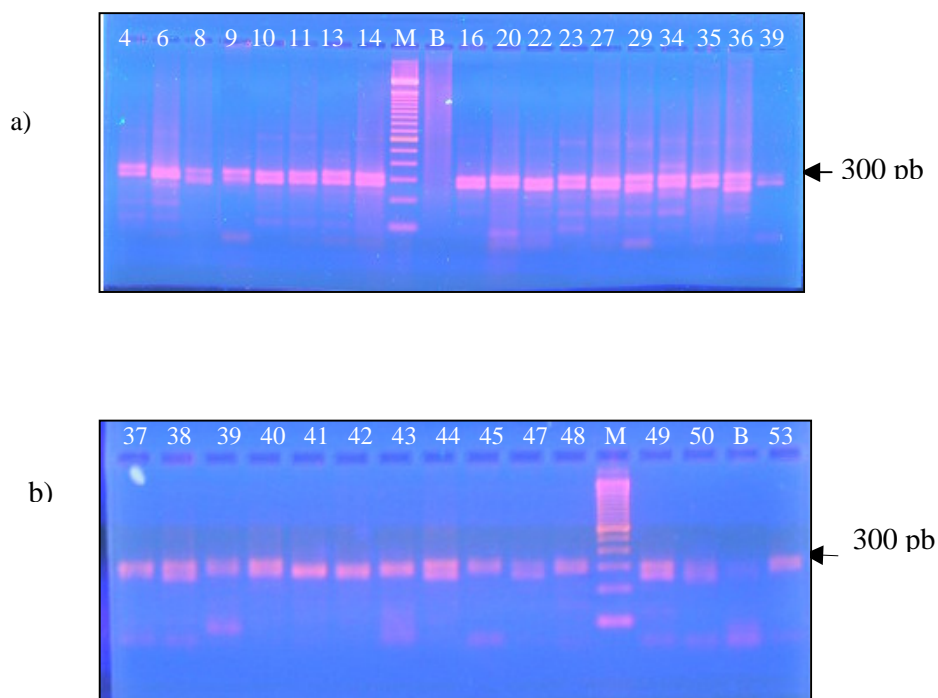


Figura 7 (a e b)– Amplificação por PCR do microsatélite $(GATA)_{13}$ do gene da golgina utilizando iniciadores ISO05. B= branco ou controle negativo; M= marcador de peso molecular *Ladder* de 100 pb.

4.4 Resultado da amplificação do gene S

Das 80 amostras submetidas à reação da PCR para amplificação do gene S, 68 (85%) foram DNA VHB positivas e 12 (15%) foram DNA VHB não detectável. Das 12 amostras DNA VHB não detectável 08 foram procedentes do inquérito de Lábrea. As Figuras 8 e 9 mostram o perfil eletroforético obtido após a amplificação semi-*nested*. Na Figura 10 o perfil obtido da região pré-S1/2 e S, amplificados com os pares de iniciadores 2821-214 e P1-783, respectivamente. O produto de amplificação final correspondeu a dois fragmentos de 680 a 700 pb, respectivamente.

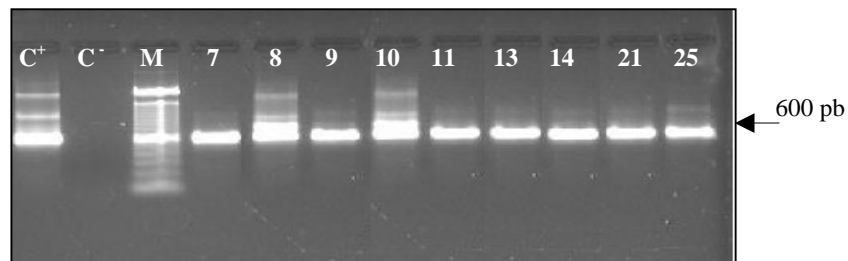


Figura 8 – Perfil eletroforético de amostras amplificadas por semi-*nested* PCR utilizando os iniciadores P1-783. O produto amplificado corresponde a 600 pb. C⁺- controle positivo (HEMO); C⁻ controle negativo; M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies).

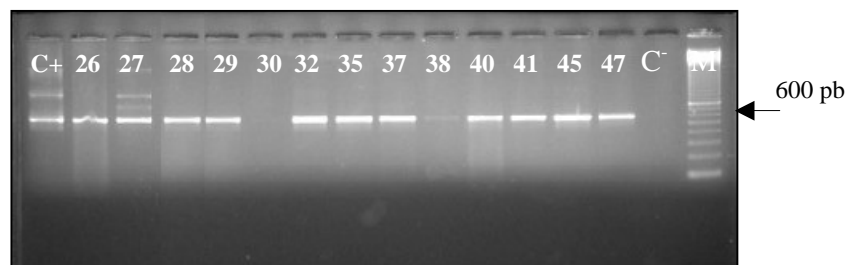


Figura 9 – Perfil eletroforético evidenciando amostras amplificadas por semi-*nested* PCR utilizando os iniciadores P1-783. O produto amplificado corresponde a 600 pb. C⁺- controle positivo; C⁻ controle negativo; M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies).

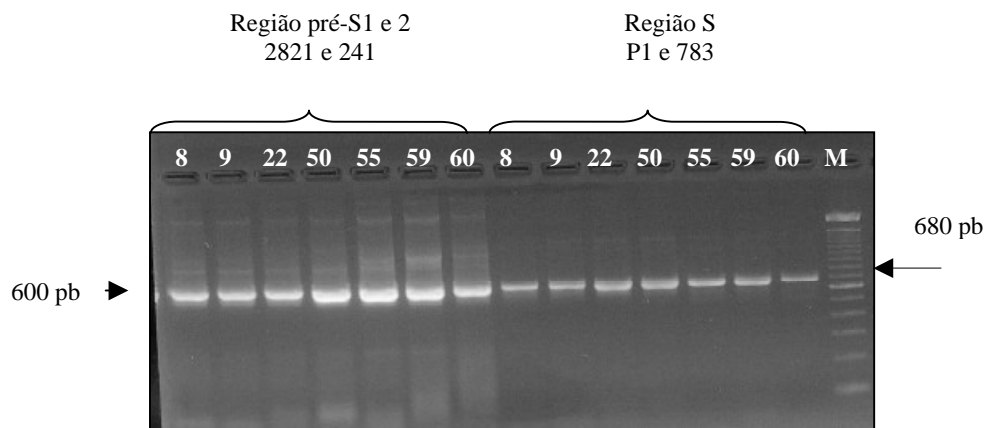


Figura 10 – Perfil eletroforético das amostras amplificadas. À esquerda (8-60) são 7 amostras amplificadas por semi-*nested* PCR utilizando os iniciadores 2821-241; à direita as mesmas amostras amplificadas com os iniciadores P1 e 783 correspondentes a 600 e 680 pb, respectivamente. M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies).

4.5 Resultado da amplificação do gene C

Para o gene C obteve-se um total de 35 amostras DNA-VHB positivas. O produto da PCR foi equivalente a 580 pb para o sistema de PCR simples e 380 pb para o sistema *nested*-PCR (Figura 11 e Figura 12), respectivamente. Não houve diferença na amplificação com o sistema de PCR simples e o *nested*-PCR, isto é, as amostras não amplificadas pelo sistema de PCR em uma única reação também não amplificarão com o sistema *nested*-PCR.

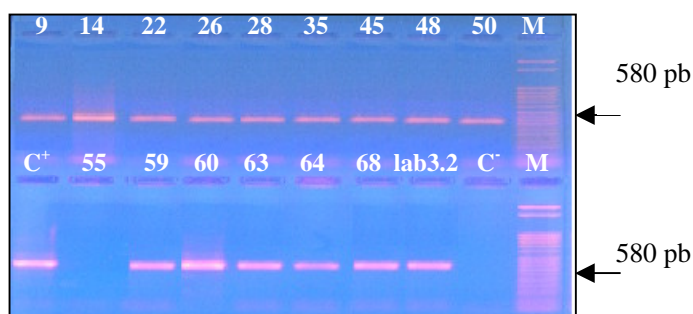


Figura 11 – Perfil eletroforético evidenciando amostras amplificadas com os iniciadores CMC1 e CMC2, correspondentes a 580 pb. C⁺- controle positivo; C⁻ controle negativo; M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies)

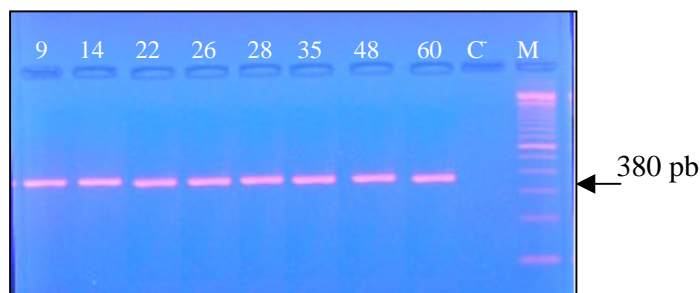


Figura 12 – Perfil eletroforético das amostras amplificadas por *nested* PCR utilizando os iniciadores 1680 e 2058, correspondentes a 380 pb. C⁻ controle negativo. M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies).

4.6 Total de seqüências do gene S e C obtidas após edição e alinhamento

Após sequenciamento e análise, obteve-se um total de 51/68 seqüências nucleotídicas correspondentes ao gene S. Das 35 amostras positivas também para o gene C submetidas ao sequenciamento obteve-se 25 seqüências de boa qualidade, sendo que de 17 amostras obteve-se seqüências correspondentes ao gene S e C completos, as demais foram seqüências parciais de ambos ou de um único gene (Gráfico 2).

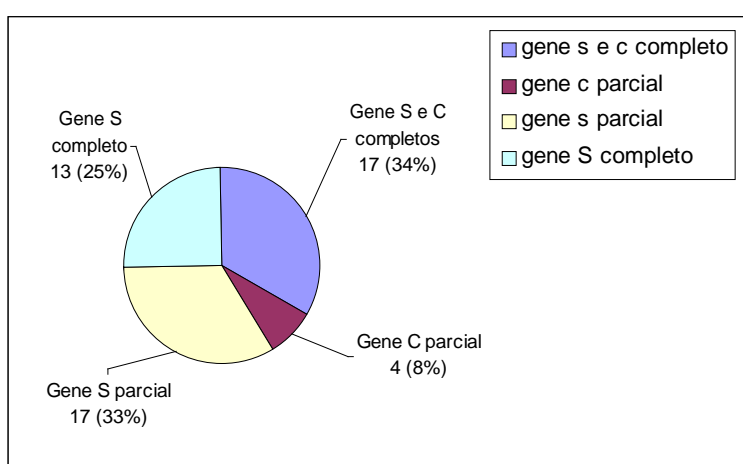


Gráfico 2- Seqüências obtidas para o gene S e C.

4.7 Análise filogenética baseada nas seqüências do gene S

A análise filogenética agrupou 41 (80,4%) das seqüências no grupo do genótipo A, 2 (3,9%) no genótipo D e 7 (13,7%) no grupo formado por seqüências do genótipo F e H, sendo que 6 (11,7%) apresentaram uma relação filogenética maior com o genótipo H do que com o F, além de uma seqüência MAO 57 que não teve correspondência com nenhuma das seqüências usadas na análise e ficando portanto como não determinada. A amostra HEMO agrupou-se no grupo de seqüências do genótipo D (Figura 13). Das 10 amostras dos indivíduos procedentes de Lábrea quatro agruparam-se junto aos genótipos F e H. As amostras MAO-35, MAO-45 e MAO-14 procedentes do ambulatório da FMT-AM e também

agrupadas no grupo F/H são de pacientes naturais dos municípios de Eirunepé, Anori e Manaus, respectivamente. A amostra MAO 68 classificada como do genótipo D é de um paciente com cirrose hepática natural do município de Codajás. A amostra LAB-20.1 foi a única que apresentou maior proximidade com genótipo F, agrupando-se no mesmo braço da seqüência protótipo X69798. F2 isolada no Brasil.

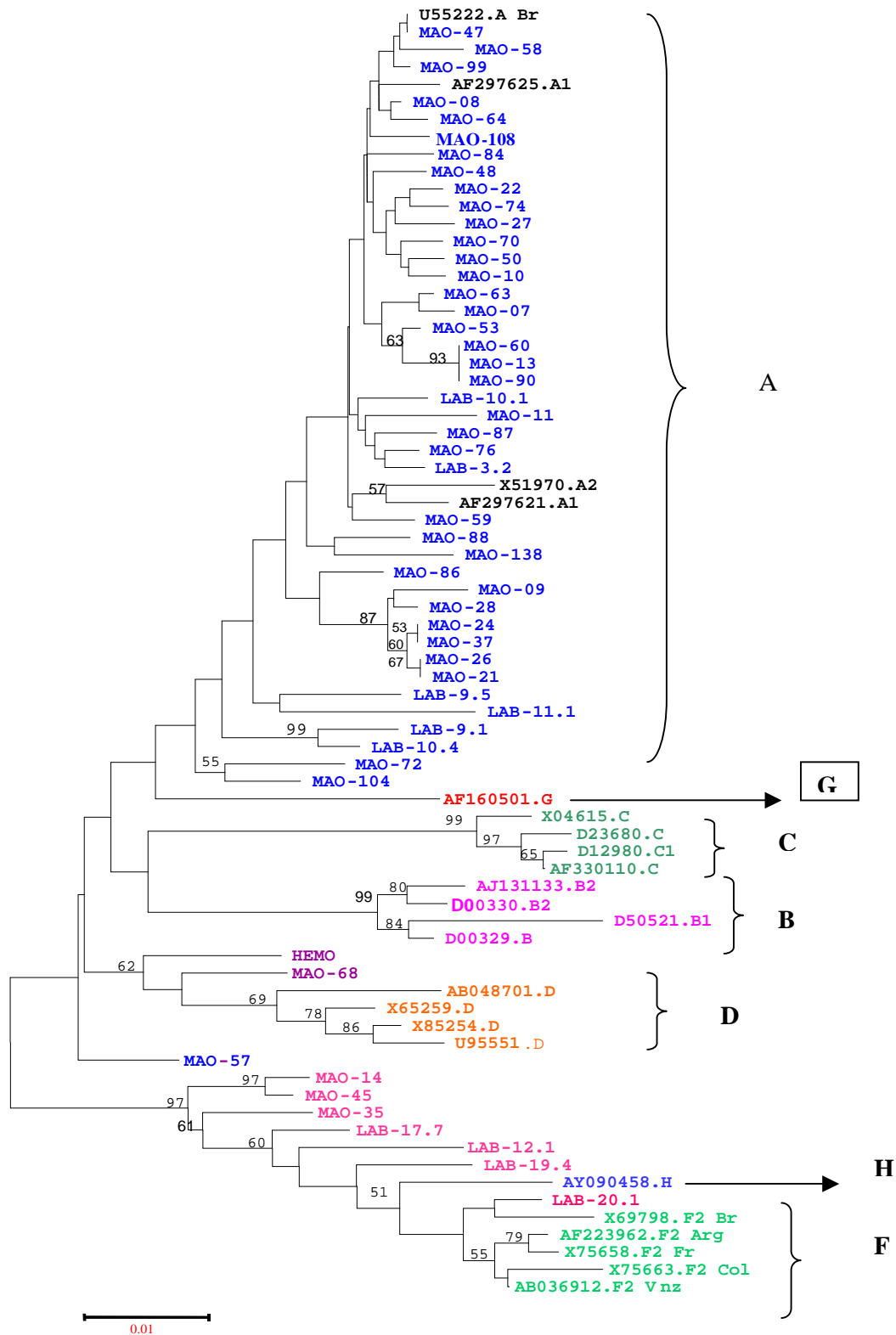


Figura 13 Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA modelo *Neighbor-Joining* (NJ) a partir do alinhamento de 51 seqüências nucleotídicas correspondentes ao gene S do VHB isoladas de pacientes naturais do Estado do Amazonas e seqüências dos diferentes genótipos do VHB obtidas no *GenBank*.

4.8 Análise molecular das seqüências nucleotídicas referentes ao gene S

A análise molecular das seqüências nucleotídicas do gene S conduzida no programa MEGA mostrou que dos 1023 sítios analisados 798 são conservados (C), 225 são variáveis (V) e 184 são parcimônia informativos (Pi).

Quanto às mutações, não foram observadas as mutações das posições: 110, 113, 29, 141 e 142, associadas à falha na vacinação. Na posição 140 (treonina-serina) foi observada a mudança de treonina para isoleucina (ACC-ATT) em 12 seqüências. A mutação da posição 213 glicina-cisteína foi observada em 6 seqüências todas do grupo genotípico F/H. Mutações que geralmente especificam a variabilidade genotípica e subtípica do VHB encontradas na posição 44/45 glicina (GGT) para alanina (GCA) foi detectada em 6 seqüências do genótipo F, da posição 120 detectou-se em 7 seqüências do genótipo F, da 126 em 30 seqüências e da posição 160 não foi detectada. O alinhamento completo de todas as seqüências nucleotídicas do gene S obtidas no estudo encontra-se no ANEXO IV.

4.9 Análise filogenética do gene C

A Figura 14 mostra a árvore filogenética de *Neighbor-Joining* (NJ) obtida a partir de 25 seqüências nucleotídicas do gene C (incluindo amostra controle positivo) e seqüências dos diferentes genótipos do VHB obtidas no *GenBank*. Os números acima dos braços são valores de *bootstrap*, apenas os valores iguais ou acima de 70% foram considerados.

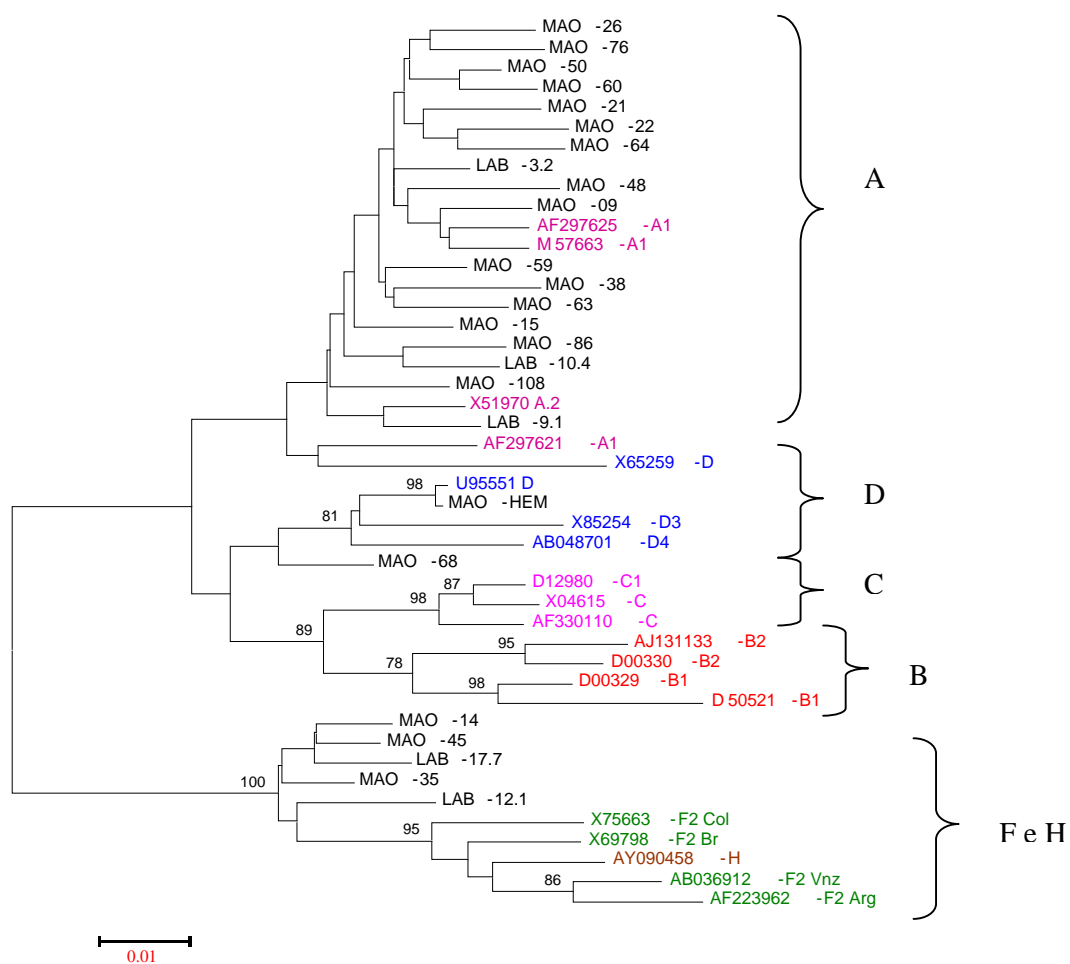


Figura 14- Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA modelo *Neighbor-Joining* (NJ) a partir do alinhamento de 25 seqüências nucleotídicas correspondentes ao gene central do genoma VHB isoladas de pacientes naturais do estado do Amazonas e seqüências dos diferentes genótipos do VHB obtidas no GenBank.

Das 25 seqüências analisadas 18 agruparam-se com o genótipo A, duas (68 e HEMO) com o genótipo D e cinco (MAO-14, MAO-45, MAO-35, LAB-12.1 e LAB-17.7) no grupo dos genótipos F e H. De acordo com o resultado obtido somente a amostra LAB 9.1 parece ter mais similaridade com o genótipo A2, sendo que as demais apresentam maior

similaridade com cepas do genótipo A1. A sequência HEMO utilizada como controle positivo no trabalho apresentou alta similaridade (*bootstrap* igual a 98%) com a sequência do genótipo D número de acesso U95551.

4.10 Pesquisa das principais mutações do gene C

A análise molecular das sequências nucleotídicas do gene C conduzida no programa MEGA v.3.1 mostrou que o fragmento genômico analisado possuía 594 sítios. Destes, 419 foram conservados (C), 171/594 foram variáveis (V) e 124/594 foram parcimônia informativos (Pi). A análise realizada no programa DNAsp 4.10.9 mostrou que dos 594 sítios analisados, 126 foram polimórficos ou variáveis (S), o número total de mutações (Eta) foi 161 e a diversidade nucleotídica por sítio foi $Pi=0,06954$.

Quanto às mutações do gene C, a Figura 15 mostra o alinhamento das sequências nucleotídicas da posição 1750 a 1810, observa-se que muitas regiões foram conservadas em todas as sequências, incluindo a região hiper variável (RHV) 1751-1755, 1789 e a região 1795 rica em AT (RH), essenciais para a replicação do vírus. A mutações da posição 1762-1764 na região do *core promoter*, causada por uma dupla substituição de AGG para TGA (*stop códon*) foi observado em 4 das 25 sequências (MAO-22, MAO-26, MAO-50 e MAO-60), todos do genótipo A. A mutação da posição 1896 da região pré-*core* foi observada em uma única sequência de um indivíduo infectado com o genótipo D (MAO-68). No nucleotídeo 1858 foi observada a mudança de C para T em três pacientes sendo dois infectados com o genótipo D, sendo que em um deles coincidiu com a mutação da posição 1896 (Figura 16). As sequências nucleotídicas completas correspondentes ao gene C encontram-se no ANEXO V.

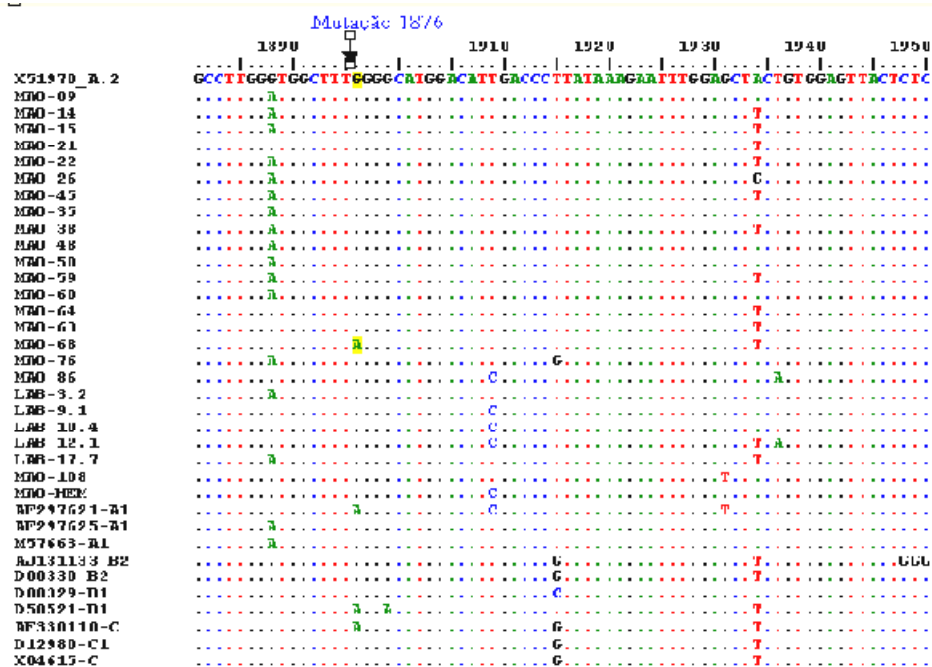


Figura 15 – Alinhamento de 25 seqüências nucleotídicas de parte do gene C. O alinhamento baseou-se no tipo A-X51970 indicado na primeira linha. Em destaque a mutação pré-*core* 1896.

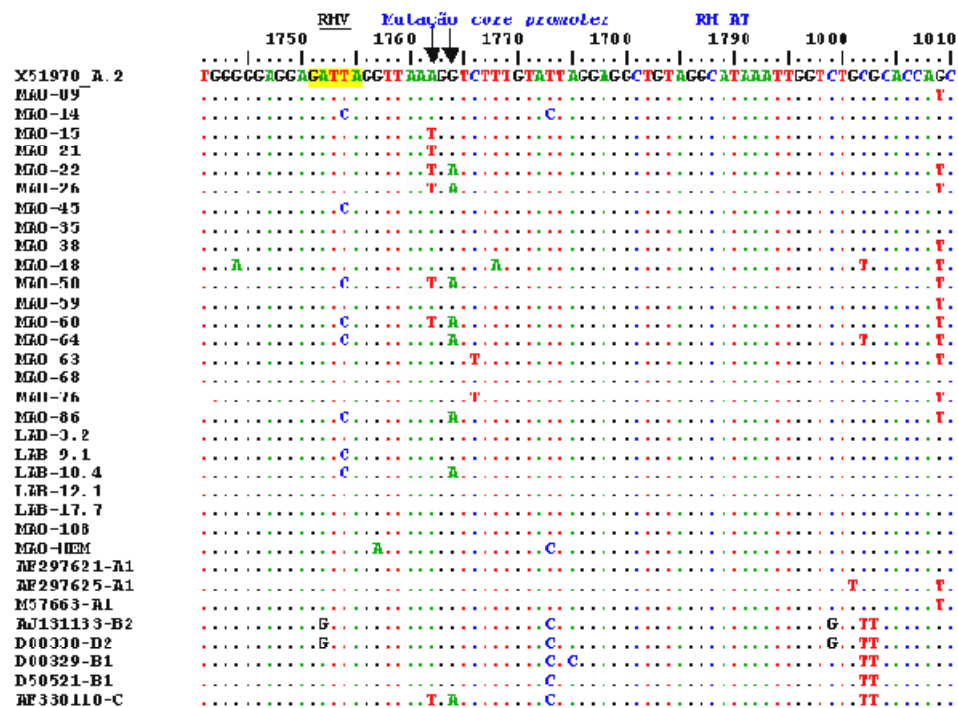


Figura 16 - Alinhamento de 25 seqüências nucleotídicas de parte do gene C. O alinhamento baseou-se na seqüência A X51970 indicada na primeira linha. Em destaque: RHV região hiper variável; a mutação *core promoter* e RH AT região rica em AT.

Outras mutações observadas foram na posição 1721 G para A encontrada em todas as amostras do genótipo F; de G para A na posição 1757 observada na sequência HEMO do genótipo D; de C para T na posição 1802 em duas amostras (MAO-48 e MAO-64) do genótipo A; de A para T na posição 1850 observada em 11 amostras (2 D, 1 F e 8 A); de A para T na posição 1858 em 3 amostras (2 D e 1 A); de G para A em três amostras (2 F e 1 D); de C para T na posição 1740 em 15 das 25 seqüências; de C para T em duas amostras (F e D) e de G para T em 16 seqüências na posição 1862. Comparando o gene C com o gene S, o gene C apresenta uma alta freqüência de variação nucleotídica e uma baixa heterogeneidade de aminoácidos.

5 DISCUSSÃO

5.1 Características gerais da população estudada

Ao analisar o grupo dos 80 indivíduos participantes do estudo, observou-se um predomínio do gênero masculino. Contudo, ao analisar em separado o grupo de pacientes procedentes do município de Lábrea a grande maioria foi gênero feminino. Os resultados encontrados em Lábrea refletem um dos problemas enfrentados pela equipe naquele município, pois durante a coleta domiciliar das amostras na maioria das residências visitadas encontrava-se somente a mãe e os filhos menores ou as meninas, o pai e os filhos mais velhos ou haviam falecidos, geralmente em decorrência da infecção por VHB ou VHD, ou estavam trabalhando em locais distantes da residência. Portanto, os resultados obtidos naquela população não significam obrigatoriamente que as mulheres sejam as mais infectadas, e sim em elas serem em maior número entre os entrevistados.

Em relação à faixa etária dos participantes do estudo, a maioria encontrava-se na faixa etária adulta jovem o que nos permite sugerir a atividade sexual como uma das principais formas de transmissão do VHB na população analisada. Esse aspecto fica mais evidenciado pela diminuição do número de pessoas infectadas com idade superior aos cinquenta anos. Um outro aspecto relevante e que contribui fortemente para esse quadro é com relação à expectativa de vida dos portadores do VHB, como esses indivíduos geralmente vivem menos, logo, o número de indivíduos infectados com idade avançada é menor em relação aos indivíduos sadios.

Quanto à naturalidade dos indivíduos participantes do estudo, mediante os resultados obtidos pôde se observar que o VHB encontra-se amplamente distribuído no Estado do Amazonas, pois além dos municípios de Manaus e Lábrea onde as coletas foram realizadas *in situ*, verificou-se a presença do VHB em 19 municípios do interior do estado, sendo que os municípios que mais se destacaram foram Eirunepé e Carauari na calha do rio

Juruá. Estes municípios há tempos são caracterizados por diversos autores como áreas de média a elevada endemicidade da doença no Estado. As calhas dos rios Solimões, Purus e Juruá destacam-se particularmente, no percentual de portadores de hepatite crônica e de portadores assintomáticos do VHB (BENSABATH, 1973 e 1997; ALECRIM et al., 1986; FONSECA, 1988 e 1989; MENDES, 1989; CLEMENS et al., 2000; BRAGA et al., 2001; OLIVEIRA, 2001).

5.2 Detecção do DNA do VHB

Com relação à detecção do DNA do VHB por PCR, Douglas et al (1993) descreve o método *nested*-PCR como o mais sensível e específico para determinar a presença do vírus da hepatite B em amostras de soro humano. Oliveira (2001) utilizou o sistema *semi-nested* PCR na amplificação de amostras de pacientes portadores de hepatite crônica, hepatite aguda e de portadores assintomáticos tendo detectado o DNA do VHB em 89,7% das amostras analisadas, sendo que os maiores percentuais obtidos foram em amostras com os marcadores HBsAg e anti-HBc IgM positivas (90%) e amostras HBsAg negativo, anti-HBe ou anti-HBc total positivo (100%). No presente estudo, também utilizando o sistema *semi-nested* PCR foi possível detectar percentuais equivalentes entre a reatividade dos diferentes marcadores sorológicos e a detecção por PCR. A maior diferença foi entre as amostras HBsAg negativo e anti-HBc total positivas que das 19 amostras positivas para os referidos marcadores somente 10 foram DNA VHB positivas. Sabe-se que um dos fatores que contribui fortemente para não amplificação do DNA VHB por PCR é a baixa carga viral. Pois, embora a PCR seja uma técnica extremamente sensível, estudos demonstram que, amostras com carga viral muito baixa não são amplificadas, devendo estas, serem diagnosticadas não como negativas, mais como DNA VHB não detectável. Wang et al (1991), por exemplo, analisou 206 amostras de indivíduos doadores de sangue HBsAg negativos e anti-HBc positivo, sendo que o DNA VHB

foi detectado em somente 9 (4%) dos casos, o limite mínimo de detecção descrito foi 150 genomas por mL. Jardi et al (1996) analisou 163 amostras de soro de pacientes portadores assintomáticos e portadores de hepatite crônica detectando o DNA do VHB em 77,8% dos casos. Por outro lado, Largura et al (2000) analisou um grupo de 50 amostras de soro de doadores de sangue de uma região com alta prevalência de hepatite B HBsAg negativo e anti-HBc positivo com um limite mínimo de detecção de 300 cópias por mL e não detectou o DNA em nenhuma das 50 amostras analisadas.

No presente estudo, não foi realizada a quantificação da carga viral, mais provavelmente, este seja um dos fatores que também contribuiu para não amplificação de todas as amostras HBsAg negativo e anti-HBc total positivo. Além disso, analisando os resultados, verificou-se que das 19 amostras somente HBc total positivo 10 foram coletadas em Lábrea, sendo que dessas, 7 foram DNA VHB não detectável, enquanto que das 9 amostras com o mesmo perfil coletadas no ambulatório da FMT-AM somente três foram DNA VHB não detectável. Então, mediante esses resultados acredita-se que o armazenamento e transporte inadequado das amostras de Lábrea para Manaus tenham contribuído para a degradação do DNA VHB presente nas amostras e conseqüentemente não detecção dos mesmos pela PCR. Além disso, como o tamanho do menor produto obtido da PCR foi equivalente a um fragmento de 380 pb para o gene C e 600 pb para o gene S isso talvez tenha acarretado em uma menor sensibilidade da técnica. Portanto, para estudos posteriores, sugere-se a observação de dois pontos importantes, a necessidade de rever principalmente a metodologia de armazenamento e transporte de amostras coletadas em locais de difícil acesso e que no diagnóstico molecular de rotina sejam utilizados iniciadores que amplifiquem um fragmento genômico do VHB menor, a fim de conseguir melhor eficiência nos resultados principalmente em amostras anti-HBc total cuja carga viral é geralmente muito baixa.

5.3 Genotipagem do VHB por inferência filogenética

A utilização de inferência filogenética constitui hoje uma poderosa ferramenta utilizada por pesquisadores do mundo inteiro para identificação genotípica e subtípica do VHB a partir do sequenciamento. Utilizando-se dessa metodologia foram identificados até então, oito genótipos do VHB designados de A-H (OKAMOTO et al., 1987; STUYVER et al., 2000; AURAZ-RUIZ et al., 2002). Entre os vários trabalhos, Norder et al (2004), por exemplo, realizou um estudo de diversidade genética relacionando a distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos do VHB e o fluxo migratório humano a fim de traçar um elo entre a história evolutiva desse vírus e a distribuição da população no mundo. Os genótipos A e F foram subdivididos em A1, A2 e F1, F2, respectivamente. O genótipo A2 foi caracterizado como mais freqüente na Europa enquanto que o A1 prevalece na América Central e África do Sul. O genótipo F1 é mais freqüente na América Central e o F2 na América do Sul e Polinésia. No Brasil o genótipo A1 e o F2 são os mais prevalentes. Os genótipos B, D e C apresentam quatro subgenótipos, desses o subgenótipo D3 é o que ocorre com maior freqüência no Brasil.

Neste estudo utilizando-se da análise filogenética obteve-se a caracterização genotípica das cepas de VHB que circulam no Estado do Amazonas, onde 80,4% das amostras analisadas agruparam-se no genótipo A, 13,7% aos genótipos F e H, 3,9% ao D e 2% a genótipo não determinado, ou seja, há certamente pelo menos três diferentes genótipos do VHB circulando no Estado do Amazonas, sendo que a possibilidade do genótipo H estar presente na região é muito alta. Além disso, a possibilidade de um novo genótipo do VHB ainda não descrito destaca a importância de continuar essa investigação a fim de confirmar ou não esses dados e talvez a caracterização de um novo genótipo do VHB no Estado do Amazonas.

Com relação à distribuição geográfica dos genótipos identificados, o genótipo A é sem dúvida o predominante e encontra-se amplamente distribuído tanto na população urbana como na rural, enquanto que os genótipos F e H foram mais freqüentes em amostras isoladas de pacientes procedentes de municípios do interior do Estado, pois das 7 amostras identificadas nesses genótipos quatro foram de pacientes residentes no município de Lábrea, uma de Anori, uma de Eirunepé e somente uma de um indivíduo natural de Manaus. Com relação à presença do genótipo A no município de Lábrea e demais municípios, reforça a idéia de que o genótipo A talvez tenha sido introduzido na região, pois em um outro estudo não publicado, realizado paralelo a este naquele município pelo grupo de pesquisa da Gerência de Virologia da FMT-AM, com um número maior de amostras obtidas tanto da região urbana quanto rural, obteve-se no interior do município predomínio do genótipo F enquanto que na região urbana o genótipo A foi mais freqüente. Crispim et al., 2006 analisando amostras de doadores de sangue do Estado do Amazonas também encontrou resultados semelhantes a estes isto é, predominância do genótipo A seguido dos genótipos F e D com predominância do genótipo F em doadores naturais do interior do Estado. Deste modo, os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com o descrito na literatura que descrevem ser o genótipo F e o H com os mais freqüentes em populações indígenas na América do Sul e Central (Arauz-Ruiz et al. 1997, Norder et al. 1994, Nakano et al. 2001).

No Brasil, estudos de genotipagem do VHB têm identificado os genótipos A, C, D e F, respectivamente, como mais freqüentes (MORAES, et al., 1996; TELES, et al., 2002; SOUZA, et al., 2003; ARAUJO, et al., 2004; SITNIK, et al., 2004). Na Amazônia estudo realizado por Bertoline et al (2000), em três comunidades indígenas fechadas e uma aculturada encontrou predominância do genótipo F nas comunidades fechada enquanto que na comunidade aculturada predominou o genótipo A em 100% dos participantes do estudo. Oliveira (2001) estudou amostras isoladas de indivíduos de diferentes regiões da Amazônia

Ocidental brasileira, identificou o genótipo A em 41 de 44 amostras analisadas. Conde et al (2004) realizaram um estudo de prevalência genotípica em uma população da Amazônia Ocidental brasileira e encontraram prevalência de 89,1% do genótipo A no grupo estudado. Mais recentemente, Crispim et al (2006), isolaram VHB de 62 amostras de candidatos a doadores de sangue do Hemocentro de Manaus procedentes de diferentes regiões da Amazônia Ocidental brasileira e também identificaram o genótipo A com mais frequência (35 das 62 amostras), o genótipo F em 15 e o genótipo D em 12 amostras.

Diante do exposto, os resultados obtidos neste estudo confirmaram o estudo anteriormente realizado pela autora e por outros pesquisadores tanto em nível regional como nacional. Como a hepatite B é uma doença antiga no mundo, a alta frequência do genótipo A em isolados de VHB no Estado do Amazonas, inclusive na população interiorana pode ser uma herança relacionada ao período áureo da borracha quando para cá vieram muitos europeus e que até hoje o fluxo de turistas europeus e americanos na região ainda é constante. A presença do genótipo F em vários municípios do interior do estado, principalmente aqueles localizados nas margens dos rios, mostra que este vírus segue os movimentos migratórios humanos. Então estas evidências nos permitem sugerir que em estudos posteriores seja também avaliado o perfil étnico da população amazonense. A fim de se ter um embasamento cientificamente comprovado da origem do VHB no Estado do Amazonas.

5.4 Análise de mutações do gene S

Mutações na região pré-S são constantemente encontradas em pacientes com hepatite B ou cirrose e raramente encontradas em pacientes portadores assintomáticos HBeAg positivo (KAJIVA et al., 2002). No presente estudo, para identificação das principais mutações do gene S, as seqüências foram comparadas com seqüências de outros VHB depositadas no *GenBank*. A análise de variabilidade genética das seqüências nucleotídicas do

gene S mostrou que os VHB que circulam na população analisada apresentam pouca variabilidade geneticamente, pois mais de 70% do gene matem-se conservado contra cerca de 17% geneticamente informativos. Esse último percentual embora pareça pouco expressa, dentre outros fatores, a alta taxa de mutações que a enzima transcriptase reversa pode causar pela baixa fidelidade durante o mecanismo de replicação.

Quanto à presença de mutações freqüentemente associadas à falha no processo de vacinação, nas seqüências analisadas não foi possível observar tal associação em nenhuma das posições descritas. Por outro lado, na posição 140 foi possível observar a mudança de uma treonina para isoleucina (ACC-ATT) em 12 seqüências e não de uma treonina por uma serina como a literatura descreve. O mesmo aconteceu com a mutação da posição 213 (glicina-cisteína) observada em 6 seqüências todas do genótipo F. As Mutações que geralmente especificam a variabilidade genotípica e subtípica do VHB encontradas nas posições 44/45 glicina (GGT) para alanina (GCA) foi detectada em 6 seqüências do genótipo F, da posição 120 detectou-se em 8 seqüências do genótipo F, da 126 em 30 seqüências e da 160 não foi detectada.

Esses resultados confirmam os anteriormente descritos mostrando que as seqüências analisadas são razoavelmente conservadas o que está de acordo com a literatura que descrevem seqüências de genes que codificam para proteínas como mais conservadas. Além disso, o genótipo A comparado aos genótipos B e C é extensivamente descrito com o que raramente apresenta mutações, principalmente na região C e pré-C (LI et al.,1993; ALESTIG et al., 2001; De CASTRO et al., 2001; SITNIK et al., 2004).

5.5 Pesquisa das principais mutações do gene C

A análise molecular das seqüências nucleotídicas referente ao gene C mostrou que somente cerca de 20% dos sítios analisados apresentavam-se geneticamente variáveis. Inclusive em regiões tradicionalmente descritas como geralmente hipervariáveis como na posição 1750 a 1810 e a na posição 1795 rica em AT, essenciais para a replicação do vírus. Quanto a mutações da posição 1762-1764 do *core promoter*, causada por uma dupla substituição de AGG no tipo selvagem para TGA no tipo mutante foi observado em quatro seqüências do genótipo A. Em outras duas amostras a mudança foi somente de A para T e G para A isoladamente. A mutação da posição 1896 da região pré-*core* foi observada em uma das seqüências do genótipo D. Examinando a literatura verifica-se que as mutações acima ocorrem com maior freqüência em pacientes infectados com os genótipos B, C, D e F (LINDH et al., 1999; XU et al 2003; FRANÇA et al., 2004; LIM et al., 2006) e raramente em pacientes infectados com o genótipo A (LI et al 1993). Portanto, como a grande maioria das cepas analisadas no presente estudo foi do genótipo A, os resultados obtidos estão de acordo com a literatura. Quanto à mutação do nucleotídeo 1858, seqüências isoladas três pacientes apresentaram essa mutação, sendo que duas dessas seqüências foram classificadas no genótipo D confirmando mais uma vez a literatura relacionada. Assim como os genótipos, as cepas mutantes pré-*core* também têm uma distribuição irregular no mundo. Ocorrem mais em indivíduos asiáticos e do Mediterrâneo, infectados principalmente com os genótipos B, C ou D e raramente na América do Norte e Europa, onde o genótipo A é predominante (RODRIGUES-FRIAS et al., 1995; LINDH et al., 1997; XU et al., 2003; LIM et al., 2006).

No Brasil poucos estudos foram realizados, De Castro et al (2001) encontrou baixa freqüência (7/29) de mutantes pré-*core* em portadores anti-HBe positivos; Sitnik et al (2004) encontrou a freqüência de 32/102 pacientes com VHB mutante pré-*core*, sendo que 22 foram do genótipo D.

A interpretação da mutação pré-C têm sido discordante, pois esta tem sido descrita tanto em pacientes com hepatite fulminante e hepatite crônica, como também em portadores assintomáticos. Alguns autores associam a mutação na região *promoter* e pré-C como responsável por um maior grau de severidade da doença, sendo mais freqüente no genótipo D (FRIEDT et al., 1999; ERHARDT et al., 2000; FUNK et al., 2002). Para outros, a presença de mutação pré-C não é pré-requisito ou responsável pela evolução mais agressiva da infecção (KIDD-LJUNGGREN et al., 2004; LIM et al., 2006) principalmente quando associada ao genótipo A (CONDE et al., 2004). Dentre as várias interpretações, parece que o grau de severidade das cepas VHB também é fortemente influenciado por outras mudanças tais como, mutações na região *promoter* ou uma combinação de outras mutações. Em alguns pacientes, as alterações A-T não foram associadas às mutações da posição 1896 da região pré-C, sugerindo que essa mutação na região central talvez possa promover a diminuição dos níveis de HBeAg no soro. Por outro lado, a presença da mutação A-T em pacientes HBeAg portadores de hepatite crônica deixa dúvidas sobre o papel da mutação central na diminuição dos níveis de HBeAg (OKAMOTO, et al., 1992; CHAN, et al., 1999; KID-LJUNGGREN, et al., 2002).

Nas seqüências de VHB isoladas no Brasil tem-se percebido uma baixa freqüência de mutações na região pré-*core*. Os autores acreditam que a baixa freqüência de mutações pré-*core* esteja associada à quase ausência da substituição C para T no nucleotídeo 1858 do mesmo gene. Como a maioria das seqüências analisadas neste trabalho permaneceu com a C na posição 1858, a quase ausência de mutações na região pré-*core* foi compatível com os dados da literatura.

No estudo também foi verificada a presença de algumas substituições que podem aparecer como exclusiva de cada genótipo, mais que isoladas não são necessariamente suficientes para determinar o genótipo. Na posição 1721, por exemplo, foi verificada a

substituição de uma G por uma A em todas as amostras do genótipo F, já a substituição C para T/1802 e G para T/1803 não mostrou essa relação, o mesmo aconteceu com as substituições A para T/1850 e C para T/1858 presentes tanto em amostras do genótipo F como do D e A. A baixa taxa de mutações juntamente com a baixa diversidade genotípica observada na região sugere que o VHB que circula na região tenha uma história evolutiva recente. Um outro fator que também merece ser ressaltado é que a coleta de amostras desses pacientes for realizada antes que eles fossem submetidos a qualquer tratamento com antiviral.

Para finalizar este trabalho vale ressaltar a importância de alguns pontos anteriormente abordados. Dentre esses o Estado do Amazonas apresenta uma prevalência intermediária de infecção pelo VHB, porém alguns municípios apresentam uma elevada endemicidade. É uma doença importante que depois de 18 anos da introdução da vacina, continua fazendo as pessoas adoecerem causando inclusive óbitos. Só em 2006 foram registrados 25 novos casos da doença no Estado, povos indígenas como os do vale do rio Javari, por exemplo, estão totalmente infectados pelo VHB. Apesar disso, ainda existem poucas informações disponíveis sobre a variabilidade genética das cepas de VHB circulantes na região. Portanto acredita-se ter cumprido os objetivos propostos no início deste trabalho, dentre esses sequenciar e determinar os genótipos do VHB que circulam no Estado do Amazonas contribuindo assim para uma melhor interpretação desses variantes na região.

Lembrado ainda que este trabalho consiste na continuidade de um estudo pioneiro que iniciou em 2001 com a padronização da técnica da PCR para o diagnóstico molecular, sequenciamento e identificação das cepas de VHB que circulam na Amazônia brasileira, até então desconhecidas. Este estudo trouxe, portanto, além do conhecimento científico dos variantes VHB, uma melhoria da qualidade de vida para os portadores do vírus, pois todos os indivíduos que participaram do estudo tiveram como contrapartida, a oportunidade de ter seu

diagnóstico clínico esclarecido e, de acordo com os resultados e as recomendações clínicas, muitos foram submetidos à terapia adequada e até encaminhados para transplante de fígado.

Acreditamos assim, ter cumprido a proposta inicial deste estudo, porém com a certeza de que muito ainda precise ser feito, sobretudo à continuidade da caracterização das cepas e quantificação da carga viral, que é uma importante ferramenta no seguimento terapêutico e a questão do escape vacinal que precisa ser exaustivamente estudado.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitiram fazer as seguintes conclusões:

1. O DNA VHB foi detectado em 85% das amostras submetidas à amplificação do gene S;
2. A análise filogenética com base nas seqüências do gene S identificou os genótipos A, D e F ou H;
3. O genótipo A foi o mais freqüente seguido dos genótipos F/H e D;
4. O genótipo A encontra-se amplamente distribuído no Estado do Amazonas;
5. Os genótipos F e H, típico de etnias indígenas, foram mais freqüentes em amostras de indivíduos naturais dos municípios do interior do Estado;
6. Pelo menos uma seqüência apresentou um perfil sugestivo de um novo genótipo do VHB não relacionado aos descritos na literatura utilizados como controle externo;
7. A mutação pré-core no nt. 1896 que causa *stop* códon no gene C foi detectada em uma única amostras de um paciente do genótipo D com cirrose hepática;
8. A mutação da posição 1858 relacionada à ausência de resposta a terapia com interferon foi detectada em 3/25 (12 %) das seqüências;
9. Quatro amostras apresentaram mutações no gene S relacionado ao escape vacinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALECRIM, W.D; MARREIROS, L.S; ALECRIM, M.G.C., et al. Inquérito sobre presença de HBsAg em habitantes de Lábrea-Amazoas. **Rev Soc Brás Méd Trop.** v.19, p.58-59, 1986.

ALESTIG, E; HANNOUN, C; HORAL, P., et al. Phylogenetic origin of hepatitis B virus strains with precore C-1858 variant. **J Clin Microbiol.** v. 39, p. 3200-3203, 2001.

ALTSCHUL, STEPHEN F; THOMAS L., et al. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 1997.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS (AAP). Hepatitis B. In: Red Book. **Elk Grove Village, Pickering L. K.** p.289-302, 2000.

ARAUJO, N.M; MELO, F.C; YOSHIDA, C.F., et al. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of hepatitis B vírus. **Arch Virol.** v.149, p. 1383-1395, 2004.

ARAUZ-RUIZ, P.; NORDER, H.; VISONA, K. A., et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. **J Infectious Diseases.** v. 176, p. 851-858, 1997.

ARAUZ-RUIZ, P.; NORDER, H.; ROBERTSON, B.H., et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **J Gen Virology.** v. 83, p. 2059-2073, 2002.

AREIAS, J. Hepatites Víricas, Medisa – Edições e Divulgações Científicas, Lda., Porto, p.161, 1996.

BANCROFT, W.H.; MUNDON, F.K.; RUSSEL, P.K. *apud* ARAUZ-RUIZ, et al, 1997. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. **J Infectious Diseases.** v. 176, p. 851-858, 1997.

BEASLEY, R. P.; HWANG, L.Y.; LIN, C.C., et al. Hepatocellular carcinoma and HBV. A prospective study of 22707 men in Taiwan. **Lancet**, v. 2, p.1129-1133, 1981.

BENSABATH , G.; MOROJA, O. Aspecto epidemiológicos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B em portadores sãos na Amazônia. In: **Resumos do Congresso da Sociedade Brasileira de Hematologia e hemoterapia.** v. 4-6, 1997.

BENSABATH, BOSHELLG, J.M. Presença do Antígeno Austrália (Au) em populações do interior do estado do Amazonas-Brasil. **Revist do Instituto de Méd Tropical.** v.15, p.284-288, 1973.

BENSABATH, G.; HADDLER, S. G.; SOARES, M.C., et al. Hepatitis Delta virus infection and Lábrea hepatitis. Prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon basin. **(JAMA)- J Ame Med Association.** v. 258, p. 479, 1987b.

- BERTOLINE, D.A; MOREIRA, R.C; SOARES, M., et al. Genotyping of hepatitis B virus in indigenous populations from Amazon region, Brazil. **Review & Research**. v. 5 (supl 1), p. 101, 2000.
- BLITZ, L; PUJOL, F.H; SWENSION, P.D., et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other populations groups from Venezuela. **J Clin Microbiol**. v. 36, p. 648-651, 1998.
- BLUM, H.E. Hepatitis viruses genetic variants and clinical significance. **Int. J. Clin. Lab. Res.** v. 27, n.4, p. 213-24, 1997.
- BOLETIN EPIDEMIOLOGICO TRIMESTRAL- SUSAM/FMT/IMT-AM. Ano VIII- n. 30, 2003.
- BOWYER, S.M; SIM, J.G. Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at across the genome: footprints of recombination in certain isolates. **Journal of General Virology**. v. 81,p. 379-392, 2000.
- BRAGA, W. S.; BRASIL, L. M.; SOUZA, R. A., et al. The occurrence of hepatitis B and Delta virus infection within seven Amerindian ethnic groups in the Brazilian Western Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 34(4), p. 349-55, 2001.
- BRECHOT, C., et al. Presence of intergrated hepatitis B virus sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. **Nature**. v. 286, p. 533-535, 1980.
- BRUSS, V; GANEM, D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 88, p. 1059-1063, 1991.
- CARMAM, W. F., et al. Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant tha escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. **The Lancet**. v.345, p. 1406-1413, 1995.
- CARMAM, W. F, et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. **J Hepatology**. v. 24, p. 489-93, 1996.
- CARMAM, W. F, et al. Molecular Variants of hepatitis B virus. In: ZUCKERMAN, A.J; THOMAS, H.C. eds. Viral hepatitis. London. **Churchill Livingstone**. p. 141-77, 1998.
- CARMAM, W. F; THOMSD, H; DOMINGOS, E. Viral genetic variation hepatitis B virus as a clinical example. **The Lancet**. v.341, p. 341-53, 1993.
- CARMAN, W. F. Antigenic characterisation of pre-and pos-liver transplant hepatitis B surface antigen sequences from patients treated with hepatitis B immune globulin. **J. Hepatology**. v. 31, p. 195-201, 1999.
- CARNERO de MOURA, M. Hepatites víricas. Bases científicas e prática clínica. Lisboa: **Permmayer Portugal**, 1997.
- CARRILHO, F. J; SILVA, L. C. Epidemiologia. In: SILVA, L.C. Hepatites agudas e crônicas, 2. ed. São Paulo: **Sarvier**, p. 73-95, 1995.

CARRILHO, F.J; MORAES, C.R; PINHO, J.R., et al. Hepatitis B vírus infection in hemodialysis centers from Santa Catarina State, Southern Brasil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. **BMC Public Health**. v. 4, p.13, 2004.

CASTRO, L; NIEL, C; GOMES, S.A. Low frequency of mutations in the core promoter and precore regions of hepatitis B vírus in anti-HBe positive Brazilian carriers. **BMC Microbiol**. v.1, p.10-18, 2001.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Hepatitis B virus: a comprehensive strategy for eliminating transmission in the United States through universal childhood vaccination: recommendations of the Immunization. **Division of hepatitis virais**, 2005.

CHAN, H.L; HUSSAIN, M; LOK, A.S. Different hepatitis B vírus genotype are associated with diferent mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. **Hepatology**. v. 29, p.976-984, 1999.

CHEN, Y.C; DELBROOK, K; DEALWIS, C., et al. Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.93, p.1997-2001, 1996.

CHU, C.J; LOK, A.S. Clinical utility in quantifying serum HBV DNA levels using PCR assays. **Hepatology**. v. 36, p. 549-551, 2002.

CHU, CJ; LOK, A.S. Clinical significance of hepatitis B vírus genotypes. **Hepatology**. v.35, p.1274-1276, 2002.

CLEMENS, S.A. FONSECA, J.C.; AZEVEDO, T., et al. Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, p. 1-10, 2000.

COLGROVE, R; SIMON, G; GANEM, D. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. **Journal of Virology**. v. 63, p. 419-445, 1989.

CONDE, S. R.S.S.; MÓIA, L.J.P.; BARBOSA, M.S.B., et al. Prevalência de genótipos e de mutantes pré-core A-1896 do vírus da hepatite B e suas implicações na hepatite crônica, em uma população da Amazônia Oriental. **Rev Soc Bras Med Trop**. V. (supl II), p. 33-39, 2004.

CONFERÊNCIA DE CONSENSO SOBRE HEPATITE B e C, **SINTRA**, 2003.

COUROUCÉ-PAUTY, A.M; PLANCON, A; SOULIER, J.P. Distribution of HBsAg subtypes in the world. **Vox Sanguinis**. v. 44, p.197-211,1983.

CRISPIM, M; KIESSLICH, D; FRAIJI, N., et al. Importância dos genótipos dos vírus das hepatites B e Delta entre doadores de sangue da Amazônia Ocidental. **Anais do Cong brasileiro de Hematologia e Hemoterapia hemo**. p. 348, ISSN,1516-8484, 2006.

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

De CASTRO, L; ARAUJO, N.M; SABINO, R., et al. Nosocomial spread of hepatitis B virus in two hemodialysis units, investigated by restriction fragment length polymorphism analysis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** v.19, p. 531-537, 2001.

De PAULA, V.S; ARRUDA, M.E; VITRAL, C.L., et al. Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the western region of the Brazilian Amazon basin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 96, p. 1123-1128, 2001.

DOUGLAS, D. D.; TASWEL, H. F.; RAKELA, J., et al. Absence of hepatitis B virus DNA detected by PCR in blood donors who are hepatitis B surface antigen negative and antibody to hepatitis B core antigen positive from a United States population with a low prevalence of hepatitis B serologic markers. **Transfusion**, v. 33, p. 212-216, 1993.

DUMPIS, U; HOLMES, E.C; MENDY, M., et al. Transmission of hepatitis B virus infection in Gambia families revealed by phylogenetic analysis. **Journal of Hepatology**. v.35, p. 99-104, 2001.

ERHARDT, A.; REINEKE, U.; BLONDIN, D., et al. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. **Hepatology**. v. 31, p. 716-725, 2000.

EUROTRIALS, saúde em mapas e números. Scientific Consultants. www.eurotrials.com.br. **Boletim Informativo**, Brasil- N.4, Setembro, 2003.

FELDMAN, M; SCHARSCHMIDT, B; SLEISENGER, M. Gastrointestinal and liver disease. Pathophysiology, diagnosis and management. **6th edition. WB Saunders Company**. p. 1129-1143, 1998.

FERREIRA, R.C; TELES, A.S; DIAS, M.A., et al. Hepatitis B virus infection profile in hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors, and genotypes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 101, p. 689-692, 2006.

FNS-CENEPI/Coordenação de Vigilância Epidemiológica 2001, 2003; SINAN, 2003.

FONSECA, J.C. Epidemiológico das hepatites B e Delta na região Amazônia. **SKOPIA médica**. v. 23, p. 28-32, 1988.

FONSECA, J.C. Hepatite B no Estado do Amazonas-Aspecto epidemiológico: Distribuição geográfica e prevalência. **Moderna Hepatologia**. n.1, p. 33-35, 1989.

FRANÇA, H. P.; GONZALEZ, J.E.; MUNNÉ, M.S., et al. Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected Argentinean blood donors. **J Clin Microbiol**. v.42, p. 5015-5021, 2004

FRIEDT, M.; GERNER, P.; LAUSCH, E., et al. Mutations in the basic core promoter and precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B. **Hepatology**. V. 29, p. 1252-1258, 1999.

FUNK, M.L.; ROSEMBERG, D.M.; LOK, A.S. World-wide epidemiology of HbeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. **J Viral Hepat**. v. 9(1), p. 52-61, 2002.

- GANEM, D. Hepadnaviridae and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. 3^a ed.: Lippincott-Raven Publishers, New York, p.2703-2737, 1996.
- GANEM, D; SCHNEIDER, R.J. Hepadnaviridae and their replication. In: KNIP, D.M; HOWLEY, P.M; CHANOCK, R.M; MONATH, T.P; ROIZMAN, B; STTAUS, S.E. **Eds Fields virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott- Raven.** p. 2703-2737, 2001.
- GANEM, D; VARMUS, H. E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. **Annual Review of Biochemistry.** v. 56, p. 651-693, 1987.
- GRANATO, C.F. Diagnóstico Laboratorial Específico. In: FOCACCIA, R. **Hepatitis virais.** São Paulo: Atheneu, p.127-133, 1998.
- GRANDJACQUES, C; PIERRE, P; STUYVER, L, et al. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. **Journal of Hepatology.** v. 33, p. 430-439, 2000.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** v. 41, p.95-98, 1999.
- HIRSCHMAN, S.Z. Hepatitis viruses and Viral hepatitis. In: **Infectious Diseases and Medical Microbiology**, A.I. Braude, C.E. Davis, J. Fierer eds., 2nd edition, WB Saunders, Philadelphia, p. 557-564; 989-995, 1986.
- HOLLINGER, F.B. Hepatitis B Virus. In: FIELDS, B.N., et al. **Fields Virology.** Lippincott-Reven. v. 2, n. 86, p.2739-2807, 1996.
- HOOFNAGLE, J.H.; SHAFRITZ, D.A & POPPER, H. Chronic type B Hepatitis and the "healthy" HBsAg carrier state. **Journal of Hepatology**, v.7, n.4, p.758-763, 1987.
- HOOFNAGLE, J.H; SCHAFER, D.F. Serologic markers of hepatitis B virus infection. **Semin Liver Disease.** v.6, p. 1-10, 1996.
- HOOFNAGLE, J.H.; DUSHEIKO, G.M.; SEEFF, L.B., et al. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. **Ann Intern, Med** . v. 94, p. 744-748, 1981.
- HU, Y.Y., et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes in 5 cities of Fujian province and the clinical implications of HBV genotype. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.** v.25, p. 251-256, Abstracts. 2004.
- HUOVILA, A.P; EDER, A.M; FULLER, S.D. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-, pre-Golgi compartment. **Journal of Cell Biology.** v.118, p. 1305-1320, 1992.
- JARDI, R.; BUTI,M.; RODRIGUEZ-FRIAS, M., et al. The value of quantitative detection of HBV-DNA amplified by PCR in the study of hepatitis B infection. **J. Hepatology.** V.24, p. 680-685, 1996.

KAJIVA, Y.; HAMASAKI, K.; NAKATA, K., et al. Full-length sequence and functional analysis of hepatitis B virus genome in a virus carrier: a case report suggesting the impact of pre-S and core promoter mutations on the progression of the disease. **J of Viral Hepatitis**. v. 9, p. 149-156, 2002.

KANE, M. Global programme for control of hepatitis B infection. **Vaccine**. v. 13, p.47-9, 1995.

KANN, M & GERLICH, W.H. Structure and molecular virology. In: THOMAS., et al. **Viral Hepatitis**. Section IV cap 10. Hepatitis B virus and other hepadnaviridae, 3 ed, p.149-180, 2005.

KAO, J. H., et al. Hepatitis B genotype correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterology**. v. 118, p. 554-559, 2000a.

KAO, J.H, et al. Hepatitis B virus genotypes and spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in Taiwanese hepatitis B carriers. **J. Med. Virol.** v. 72, p.363-369, 2004.

KARASAWA, T.; AIZAWA, Y.; ZENIYA, M. et al. Genetic heterogeneity in the precore region of hepatitis B virus in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients: Spontaneous seroconversion and interferon- induced seroconversion. **J Medical Virology**. v. 45, p. 373-380, 1995.

KARTHIGESU, V. D., et al. A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children. **J. Gen. Virology**, v.75, p. 443-451,1994.

KATO, H.; FUJIWARA, K.; GISH, R.G., et al. Classifying genotype F of hepatitis B virus into F1 and F2 subtypes. **World J gastroenterol**. v. 11 (40), p. 6295-6304, 2005.

KATO, H.; ORITO, E.; SUGAUCHI, F., et al. Determination of hepatitis B virus genotype G by polymerase chain reaction with hemi-nested primers. **J Virology Methods**. v. 98, p. 153-195, 2001.

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

KIDD-LJUNGGREN, K; MYHRE, E; BLACKBERG, J. Clinical and serological variation between patients infected with different Hepatitis B virus genotypes. **J Clin Microbiol**. v. 42, p. 5796-5837, 2004.

KIKUCHI, K.; NIITSUMA, H; ISHII, M., et al. Genoepidemiology and its relationship to clinical features in patients infected chronically with hepatitis B virus (HBV). **Hepatology Reseach**. v.17, p. 43-55, 2000.

KIRSCHBERG, O.; SCHUTTLER, C.; REPP, R., et al. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus- genotypes A-F. **J Clinical Virology**. v.29, p. 39-43, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**. 5:150-163, 2004.

LANFORD, R. E.; CHEVEZ, D.; BRASKY, K. M., et al. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. **Proc Natl Acad Sci.** v, 95, p. 5757-5761, 1998.

LARGURA, M.A.; PACHECO, M.; LARGURA, A. Ausência do HBV-DNA por PCR em Soros de Doadores de Sangue com HBsAg Negativo e Anti-HBc Positivo em Região de Alta Prevalência de Hepatite B. **Laes & Haes.** n. 125, p.106-128, 2000.

LAUDER, I.J.; LIN, H.J.; LAU, J.Y., et al. The Variability of the Hepatitis B virus Genome: Statistical Analysis and Biological Implications. **Mol. Biol Evol.** v.10, n.2, p. 457-470, 1993.

LAVARINI, C.; FARCI, P.; CHIABERGE, E., et al. IgM antibody against hepatitis B core antigen (IgM anti-HBc): diagnostic and prognostic significance in acute HBsAg positive hepatitis. **Br Med J.** v.287, p.1254-1256, 1993.

LE BOUVIER, G.L. The heterogeneity of Australia antigen. **J Infect Disease.** v. 23, p. 671-676, 1971.

LEE, W. M. Hepatitis B vírus infection. **N. Engl J Méd.** v. 337, p. 1733-1745, 1997.

LEON, P.; VENEGAS, E.; BENGOCHEA, L., et al. Prevalence of infection by hepatitis B, C, D and E viruses in Bolívia. **Rev Panamericana de Salud Pública.** v. 5.p.144-511, 1999.

LI, J.S.; TONG, S.P.; WEN, Y.M., et al. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as a HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. **J Virol.** v. 67, p. 5402-5410, 1993.

LIM, C.K.; TAN, J.T.; KHOO, J.B., et al. Correlations of HBV genotypes, mutations affecting HbeAg expression and HbeAg/anti-HBe status in HBV carriers. **Int J Med Sciences.** v.3, p. 14-20, 2006.

LINDH, M.; ANDERSON, A. S.; GUSDAL., A. et al. Genotype, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus- large-scale analysis using a new genotyping method. **J Inf Diseases.** v. 175, p. 1285-1293, 1997.

LINDH, M.; HANNOUN, C.; DHILLON, A. P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in Asian hepatitis B vírus carriers, **J Inf Diseases.** v.179,p. 775-782, 1999.

LINDH, M.; HORAL, P. Hepatitis B vírus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. **J Viral Hepat.** v. 7, p. 258-67, 2000.

LOK, A. S.; HEATHEOTE, E.J.; HOOFINAAGLE, J.H. Management of hepatitis B: 2000-summary of workshop. **Gastroenterology.** v. 121, p. 1828-1853, 2001.

MASON, W.S.; BURRELL, C.J.; CASEY, J., et al. Hepadnaviridae. In FAUQUET CM, MAYO MA, MANILOFF J, DESSELBERGER U, BALL LA, (eds). **Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Virus.** Amsterdam: Elsevier, 2005.

McMAHON, B.J. Seminars in Liver Disease, SUPPLEMENT 1. v. 25. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2005.

MENDES, P.F. Amazônia brasileira e a Hepatite B. **Moderna Hepatologia**, n.1, p. 01-02, 1989.

MILLER, R.H.; KANECO, S.; CHUNG, C.T.; GIRONES, R. & PURCELL, R.H. Compact organization of the hepatitis B virus genome. **Hepatology**, v. 9, p.322-327, 1989.

MILLER, R.H.; ROBINSON, W. Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. **Proc. Natl Acad Sci USA**. v. 83, p. 2531-2535, 1986.

MORADPOUR, D.; WANDS, J.R. Understanding hepatitis B virus infection. **N. E. J. Med.**, 332: 1092, 1995.

MORAES, M.T.; GOMES, A.S.; NIEL, C. Sequence analysis of pré-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brazil. **Arch Virol**. v. 141, p. 1767-1773, 1996.

MORAES, M.T.B.; NIEL, C.; GOMES, S.A. A polymerase chain reaction-based assay to identify genotype F of hepatitis B virus. **Braz J of Méd and Biol Res**. v. 32, p. 45-49, 1999 (short communication).

MS- Ministério da Saúde – Programa Nacional Para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais. Disponível no endereço: www.saude.gov.br/sps/areas_tecnicas/hepatite.htm, 2004.

NAKANO, T.; LING, L.; HU, X., et al. Characterization of hepatitis B virus genotypes among Yucpa Indians in Venezuela. **Journal of General Virology**. v.82, p.359-365, 2001.

NASSAL, M. Hepatitis B virus morphogenesis. **Microbiology and Immunology**. v. 214, p.297-337, 1996.

NORDER, H.; COUROUCE, A.M. Complete genomes phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology**. v. 198 (2), p. 489-503, 1994.

NORDER, H.; COUROUCE, A.M.; COURSAGET, P., et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strain derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. **Intervirology**. v. 47, p. 289-309, 2004.

NORDER, H.; HAMMAS, B.; LÖFDAHL, S., et al. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. **J Gen Virol**. v. 73, p. 1201-1208, 1992.

OJIMA T.; NIITSUMA, H.; SHAN, H., et al. HBe seroconversion and HBe mutation among Japanese hepatitis B virus carriers. **Hepatology Research**. v. 20, p.172-181, 2001.

OKAMOHTO, H.; YANO, K.; NOZAKI, Y., et al. Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine. **Pediatr Res**. v.32, p. 264-268, 1992.

OKAMOTO, H.; IMAI, M.; TSUDA, F., et al. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adry or adwy. **J Virol.** v.61, p.3030-3034, 1987.

OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; SAKUGAWA, H., et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **J Gen Virol.** v. 69, p. 2575-83, 1988.

OLIVEIRA, C. M. Variabilidade genética do gene de superfície do vírus da hepatite B (VHB) em portadores naturais da Amazônia brasileira. São Carlos: UFSCar, 2001. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, **Universidade Federal de São Carlos.** 2001.

PARANÁ, R.; ALMEIDA, D. Epidemiologia do VHB na América Latina. *Prática Hospitalar.* n. 41, set-out, 2005.

PARASKEVIS, D.; HAIDA, C.; TASSOPOULOS, N., et al. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of HBV DNA. **J Virological Methods.** v. 103, p.201-212, 2002.

PONTES, Izabel Mota. Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para análise genética em humanos. São Carlos: UFSCar. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, **Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.** 2002.

PUGH, J. C.; BASSENDINE, M.F. Molecular biology of hepadnavirus replication. **Br Med Bull.** v. 2, p. 329-353, 1990.

RIBEIRO, N. R.; CAMPOS, G.S.; ANGELO, A.L. et al. Distribution of hepatitis B vírus genotypes among patients with chronic infection. **Liver International.** v. 26, p. 636- 642, 2006.

RIZZETTO, M. The delta agent. **Hepatology.** v. 3, p. 729-766, 1983a.

ROBINSON, W.S. & LUTWICK, L.I. The virus of hepatitis, type B. **N Eng J Med,** v. 295, n.21, p.1168-1175, 1976.

ROBINSON, W. S. Hepatitis B virus and hepatitis D virus. In: MANDELL, G. L; DOUGLAS, G. L; BENNETT, J. E. **Principles and practice of infectious diseases.** 4 ed., v. 2, p. 1406-1433,1995.

ROBINSON, W.S. Hepatitis B virus and hepatitis Delta virus. In: MANDELL, G.L.; DOUGLAS, R. G.; BENNETT, J.E. **Principles and practice of infectious diseases.** 3 ed. part III. Section A, v.125, p.204-1231, 1990.

RODRIGUE-FRIAS, F.; BUTI, M.; JARDI, R., et al. Hepatitis B vírus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. **Hepatology.** v. 22, p. 1645-1647, 1995.

ROSSELLA, C.; RIZZETTO, M.; BRADLEY, D.W. Hepatitis B. In : CRILELLI, O. **Viral hepatitis Handbook**. Italy: Sorin Biomedica Diagnostics S.P.A. Saluggia (Vercelli), p.27-56, 1996.

SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, p.5463-5467, 1997.

SCHAFER, S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. **World J Gastroenterol**. v.13, p.14-21, 2007.

SHERLOCK, S. & DOOLEY, J. Virus hepatitis. **Diseases of the liver and biliary system**. 9th edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 260-292, 1993.

SILVEIRA, T. R.; FONSECA, J. C.; RIVERA, L., et al. Hepatitis B seroprevalence in Latin America. **Rev Panamericana de Salud Pública**. v. 5.p. 144-151, 1999

SIMMONDS, P. The origin and evolution of hepatitis viruses in human. **J Gen Virol**. v. 82, p. 693-712, 2001.

SITNIK, R.; PINHO, J. R.; BERTOLINI, D. A., et al. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in brazilian patients. **J Clinical Microbiology**. v.42, p. 2455-2460, 2004.

SMEDILE, A.; FARCI, P.; VERME, G., et al. Influence of delta infection on severity of hepatitis B. **The Lancet**. v.2, p. 945-952, 1982a.

SOUZA, K.P.; LUZ, J.Á.; TELES, A.S., et al. Hepatitis B and C in the hemodialysis unit of Tocantins, Brazil: serological and molecular profiles. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 599-603, 2003.

STUYVER, L.; De GENDT, S.; VAN GEYT, C., et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **J Gen Virology**. v. 81, p. 67-74, 2000.

TAVARES-NETO J.; ALMEIDA, D.; SOARES, M. C., et al. Seroprevalence of hepatitis B and C in the Western Brazilian Amazon region (Rio Branco, Acre): a pilot study carried out during hepatitis B vaccination program. **Braz J infect Dis**. 2.p. 133-139, 2004.

TELES, A.S.; MARTINS, R.M.; GOMES, A.S., et al. Hepatitis B virus transmission in brazilian homodialysis units: serological and molecular follow-up. **J Méd Virol**. v. 68, p. 41-49, 2002.

THOMAS, H.C. The emergence of envelope and precore/ core variants of hepatitis B virus: the potential role of antibody selection. **Journal of Hepatology**. v.22 (Suppl. 1), p. 1-8, 1995

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

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

TORRES, J.R.; MACHADO, V. Special aspects of hepatitis B virus and delta virus infection in latin america. **Journal of Infectious Disease Clin.**, v. 9, p.13-27, 1994.

TSUBOTA, A.; KUMADA, H.; TAKAKI, K., et al. Deletions in the hepatitis B virus core gene may influence the clinical out-come in hepatitis B e antigen-positive asymptomatic healthy carriers. **J Med Virol.** v.56, p.287-293, 1998.

VIANA, S.; PARANA, R.; MOREIRA, R.C., et al. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. **Am. J. Trop Méd Hyg.** v. 73 (4), p.808-814, 2005

VYAS, V.N.; YEN, T.S.B. hepatitis B virus. In: SPENCER, S, ed. Viral Hepatitis: Diagnosis, therapy and prevention. Totowa, **NJ, Humana Press Inc.**, p.35-64, 1999.

WALLACE, L.A.; CARMAN, W.F. Surface gene variation of HBV: scientific and medical relevance. **Viral Hepat. Rev.** v.3, p.5-16, 1997.

WANG, J.T.; WANG, T.H.; SHEU, J.C., et al. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. **Journal of Infectious Disease.** v.163. n 2, p.397-399, 1991

WEI, T.; TAVIS, J. E.; GANEM, D. Relationship between viral DNA synthesis and virion envelopment in hepatitis B viruses. **Journal of Virology.** v. 70, p. 6455-6458, 1996.

WEINBERGER, K.M.; BAUER, T.; BOHM, S., et al. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum, v. 81, p. 1165-1174, 2000.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geographic pattern of hepatitis B prevalence. Available at: <http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/hepbprev.htm>. Accessed March 15, 2006.

XU, J.; WANG, Q. X.; JIANG, D., et al. Relationship between the genotypes of hepatitis B virus and the severity of liver diseases. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.** v. 11 (1), p. 3-11, 2003.

YAMAMOTO, K., et al. Naturally occurring escape mutants of hepatitis b virus with various mutations in the s gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. **J. Virol.** v.68, p. 2671-2677, 1994.

YUEN, M. F.M.; WONG, D.K.; SABLON, E., et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the chinese: virological, histological, and clinical aspects. **Hepatology.** v. 39, p. 1694-701, 2004.

ZUCKERMAN, J.N.; ZUCKERMAN, A.J. The epidemiology of hepatitis B. **Clin. Liver Dis.** v.3, p. 179-266, 1999.

ANEXOS

ANEXO I

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

**F M T A M**Fundação de Medicina Tropical
do Amazonas
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEPIDENTIFICAÇÃO

Número do Processo: 992/2003-FMTAM
Título do Projeto: Análise molecular e implicações biológicas do vírus da hepatite B, em pacientes naturais da Amazônia ocidental Brasileira.
Coordenador (a): Cintia Mara Costa de Oliveira
Relator (a) do Processo: Dr. Jorge Guerra
Dia da Sessão: 27/06/2003.

DECISÃO

Nesta data, acatando, por unanimidade, o voto do relator, a plenária do Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU plenamente o projeto intitulado “Análise molecular e implicações biológicas do vírus da hepatite B, em pacientes naturais da Amazônia ocidental Brasileira”.

Plenária do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical –FMT/IMT-AM, em Manaus 27 de junho de 2003.



DR. LUIZ CARLOS DE LIMA FERREIRA
Coordenador de Ética em Pesquisa

ANEXO II
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL

DIRETORIA DE ENSINO, PESQUISA E CONTROLE DE ENDEMIAS COORDENADORIA DE PESQUISA

GERÊNCIA DE VIROLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Investigador: Cíntia Mara Costa de Oliveira

Instituição: Fundação de Medicina Tropical e Universidade Federal do Amazonas

Telefone: (092) 238-1711 (092) 238-1711 Ramal: 200

Título: Análise molecular e implicações biológicas do vírus da hepatite B, em pacientes naturais do Estado do Amazonas

Patrocinador e Executor: Fundação de Medicina Tropical e Universidade Federal do Amazonas

Descrição e objetivos do estudo

Este é um estudo biotecnológico. Seu propósito é investigar os aspectos da biologia molecular do vírus da hepatite B (VHB) que infectam os pacientes na Amazônia.

Eu recebi a explicação de que eu serei participante deste estudo. Minha participação é absolutamente voluntária.

Este estudo tem por objetivo a análise molecular da estrutura genômica do vírus da hepatite B, na Amazônia Ocidental brasileira. Se eu voluntariamente concordar em participar do estudo, será colhida uma amostra de sangue na quantidade de 5 ML, de onde será isolado o vírus, para extração, amplificação e sequenciamento das regiões de interesse para análise molecular e para se estabelecer o diagnóstico molecular dos mutantes do vírus de hepatite B pela *reação em cadeia da polimerase* (PCR). Não precisarei realizar outros testes laboratoriais e nem precisarei de hospitalização. Todos os procedimentos serão realizados em apenas uma ocasião. As amostras de sangue não serão utilizadas para outros fins além dos relacionados ao estudo.

Retirada de amostras de sangue: o seu maior desconforto é no momento em que a pele for ferida por uma agulha.

Riscos associados ao estudo

Benefícios

Participando deste estudo, eu não obterei qualquer benefício adicional, mas estarei contribuindo para um conhecimento de possíveis mutantes do vírus da hepatite B na região.

Confidencialidade e avaliação dos registros

Minha participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão mostrados apenas a representante da FMT/IMT-AM, bem como a autoridades normativas nacionais e internacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisa clínica ou para fins normativos. Minha identidade permanecerá sempre na confidencialidade. Serei ressarcido por eventuais despesas decorrentes da participação na pesquisa, bem como poderei ser indenizado diante de eventuais despesas decorrentes do estudo. O patrocinador me assegura que isto acontecerá, de acordo com as normas/leis regulatórias de proteção nacionais e/ou internacionais.

Direito à retirada do estudo

Eu tenho o direito de fazer qualquer pergunta referente aos riscos potenciais ou conhecidos para mim durante minha participação neste estudo.

Eu serei notificado com referência a qualquer nova informação relacionada com o estudo, eu serei capaz de contatar Cíntia Mara Costa de Oliveira, cujo número de telefone é (092) 238-1711, Ramal 200.

Eu tenho direito de retirar minha participação neste estudo a qualquer momento.

Participação voluntária

A minha participação neste estudo é voluntária. Se eu recusar a participação neste estudo, não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios a que eu tenha direito.

Eu tenho direito de manter uma cópia assinada deste documento.

Consentimento pós-informação

Após ter recebido informações claras sobre o conteúdo deste termo, livremente, expresse meu consentimento, eu concordo com minha participação, como sujeito, no estudo.

_____ Data ____/____/____

Assinatura – Paciente

_____ Data ____/____/____

Assinatura – Pesquisador Responsável

Impressão
datiloscópica
(p/não alfabetizado)

ANEXO III

QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL DO PROJETO

“ANÁLISE MOLECULAR E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS DO VÍRUS DA HEPATITE B, EM PACIENTES NATURAIS DO ESTADO DO AMAZONAS”

I- IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nº do prontuário: _____

1. Nome: _____ 2. Sexo: []F []M

3. Idade: _____ 4. _____

Naturalidade: _____

5. Endereço: _____

6. Município: _____

7. Tempo em que vive neste local: _____ 8. Procedência: _____

II. ASPECTOS SOCIO-ECONÔMICOS

1. Grau de instrução: _____ 2. Ocupação: _____

III. FONTES DE CONTÁGIO

1. Houve contato com suspeito de hepatite? () sim () não. Quando? _____

2. Trabalha na área de saúde? () sim () não.

3. Assinalar as ocorrências pertinentes nos últimos 6 meses:

() transfusão de sangue, componentes ou derivados. Data provável ____/____/____

() uso de drogas injetáveis () tatuagem () manicure em salão () barbeiro () acupuntura

() cirurgia () tratamento dentário () endoscopia () injeção () homossexualismo ()

doenças sexualmente transmissíveis. Qual? _____

4. Compartilha um dos seguintes itens? () roupa íntima () escova de dentes () aparelho de barbear/depilar () mat. de manicure () seringas e agulhas () utensílios domésticos (copo, prato, talher).

5. Presença de lesões na pele () sim () não. Tipo _____

6. Etilismo? () sim () não. Tempo: _____

7. Institucionalizado? () sim () não. Onde? _____

8. Nos últimos meses fez alguma viagem () sim () não. Local: _____

IV. ASPECTOS CLÍNICOS

1. Hipótese diagnóstico: () Agudo () Crônico () Portador assintomático

2. Data do início dos sintomas ____/____/____

4. Antecedentes de hepatite? () sim () não

5. Foi vacinado contra hepatite B? () sim () não

6. grávida? () Sim () não.

V. OBSERVAÇÕES : _____

VI. RESULTADO DOS TESTES SOROLÓGICOS

Marcador

Anti-HAV IgM

HBsAg

Anti-HBc IgM

HBeAg

Anti-HBe

Anti-HCV

HCV RNA

Anti-HD IgM

Anti-HD total

Anti-HEV IgM

Anti-HEV IgG

Anti-HBc total

Amostra base

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

[] Pos [] Neg

Data da entrevista ____/____/____


```

AJ131133.B2      ..... A..... C..... T. C..... C.....
D00329.B        ..... A..... C..... T. C..... C.....
D12980.C1       ..... C..... T..... C.....
D23680.C        ..... T..... C.....
AF330110.C      ..... T..... C.....
X04615.C        ..... T..... C.....
X85254.D        ..... CA..... C ACCAG... T..... C..... C.....
X65259.D        ..... CA..... C ACCAG... T..... C..... C.....
AB048701.D      ..... CA..... C ACCAG... T..... C..... C.....
U95551.D        ..... CA..... C ACCAG... T..... C..... C.....
AF223962.F2 Arg ..... ACA..... C..... G..... T. A..... A..C..... C...
X69798.F2 Br    ..... ACA..... C..... G..... T. A..... A..C..... AC...
X75658.F2 Fr    ..... ACA..... C..... G..... T. A..... C..... G..A..C..... C...
X75663.F2 Col   ..... ACA..... C..... G..... T. A..... C..... G..A..C..... C...
AB036912.F2 Vnz ..... ACT..... G..... T..... C..... C.G..A..C..... C...
AY090458.H
AF160501.G

```

```

                2953      2963      2973      2983      2993      3003
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
X51970.A2      ACCCTGTATT CGGAGCCAAC TCAAACAATC CAGATTGGGA CTTCAACCCC ATCAAGGACC
MAO-07
MAO-08
MAO-09
MAO-11
MAO-15         .....C..... T.....
MAO-14         T...C... A...A..T ..... AAA A...A
MAO-21         .....C.....
MAO-22         .....C.....
MAO-24
MAO-26
MAO-27
MAO-28
MAO-35         T..GC... A.G..A..T ..C.G..G.. C..C..... A..A A...A
MAO-38         .....C..... T.....
MAO-45         T...C... T...C.G..G.. C..... AAA A...A
MAO-47         T...C... T...C.G..G.. C..... A...A
MAO-48
MAO-50
MAO-57
MAO-58         .....C..... T.....
MAO-59
MAO-53
MAO-60         .....C..... T.....
MAO-63         .....C..... T.....
MAO-64         .....C..... T.....
MAO-68         T..A.CC... A...A..A..GCA... T... A...A
MAO-72
MAO-74
MAO-76
MAO-84
MAO-87
MAO-86         ..... T.....
MAO-88         .....C..... T.....
MAO-89
MAO-90
MAO-99
MAO-104        .....C..... T.....
MAO-108        .....C..... T.....
MAO-114        T...C... T.....
MAO-138
LAB-3.2        .....C..... T.....
LAB-9.1        .....C..... T.....
LAB-9.5        .....C..... T.....
LAB-10.1       ..... T.....
LAB-10.4       .....C..... T..... C.....
LAB-11.1       .....C..... T.....
LAB-12.1       T...C.T... A...A..T ..C.G..G.. C..... AAA A...A

```

```

LAB-17.7      .T...C.T... .A...A..T .C.G..G.. .C..... .AAA .A.....A
LAB-19.4      .T...C.T... .A...A..T .C.G..G.. .C..... .AAA .A.....A
LAB-20.1      .T...C.T... .A...A..T .C.G..G.. .C..... .AAA .A.....A
MAO-HEMO      .T..GC.... .A.G..A..T .C.G..G.. .C..C.... .A.A .A.....A
M57663.A1     .....C... ..T.....
AF297625.A1   -----
U55222.A Br   .....C... ..T.....
U55220.A Br   .T...C... ..T.....
D00330.B2     .....C... .AA..... .G.A... .C.....G .A.....A
D50521.B1     .....CG... .AA..... .G.A... .C.....A CA.....A
AJ131133.B2   .....C... .AA..... .G..... .C.....G CA.....A
D00329.B      .....C... .AA..... .G.A... .C.....A CA.....A
D12980.C1     .....CG... ..T.....
D23680.C      .....C... ..T.....
AF330110.C    .....CG... ..T.....
X04615.C      .....CG... ..T.....
X85254.D      .T..A.CC... .A...A... A.CGCA... ..T... .A.....A
X65259.D      .T..A.CC... .A...A... A.CGCA... ..T... .A.....A
AB048701.D    .T..A.CC... .A...A... A.C..... .T... .A.....A
U95551.D      .T..A.CC... .A...A... A.GCA... ..T... .A.....A
AF223962.F2 Arg .T...C.T... .A...A..T .C.G..G.. .C..... .AAA .A.....A
X69798.F2 Br  -----
X75658.F2 Fr  .T...C.T... .A...A..T .C.G..G.. .C..... .AAA .A.....A
X75663.F2 Col .T..GC.... .A...A..T .C.G..G.. .C..C.... .A.A .A.....A
AB036912.F2 Vnz .T..GC.... .A.G..A..T .C.G..G.. .C..C.... .A.A .A.....A
AY090458.H   -----
AF160501.G   -----

```

```

                3013      3023      3033      3043      3053      3063
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
X51970.A2      ACTGGCCAGC AGCCAACCAG GTAGGAGTGG GAGCATTCCG GCCAGGGTTC ACCCCTCCAC
MAO-07        .....
MAO-08        .....
MAO-09        .....C. ....C...
MAO-11        .....
MAO-15        .....CA .....T... ..T..C...
MAO-14        CT.....AT G...A... ..GT.A... T.....A..C...
MAO-21        .....CA .....T... ..T..C...
MAO-22        .....CA .....C...
MAO-24        .....
MAO-26        .....
MAO-27        .....
MAO-28        .....
MAO-35        GT.....AT G..A..A... ..GC.A... C.....T .A..C...
MAO-38        .....CA .....T... ..T..C...
MAO-45        CT.....AT G...A... ..GT.A... T.....A..C...
MAO-47        CT.....AT G..A..A... ..GT.A... T.....A...
MAO-48        .....
MAO-50        .....
MAO-57        .....
MAO-58        .....CA .....T... ..T..C...
MAO-59        .....
MAO-53        .....
MAO-60        .....CA .....T... ..T..C...
MAO-63        .....CA .....T... ..T..C...
MAO-64        .....CA .....T... ..T..C...
MAO-68        C.....A C.....A... ..CT... ..TG..T... ..A..G.
MAO-72        .....
MAO-74        .....
MAO-76        .....
MAO-84        .....
MAO-87        .....
MAO-86        .....
MAO-88        .....CA .....T... ..T..C...
MAO-89        .....
MAO-90        .....
MAO-99        .....
MAO-104       .....CA .....T... ..T..C...

```

```

MAO-108      .....CA .....T.....T.C....
MAO-114      .....CA .....T.....T.C....
MAO-138      -----
LAB-3.2      .....CA .....T.....T.C....
LAB-9.1      .....C .....T.....C....
LAB-9.5      .....CA .....T.....T.C....
LAB-10.1     .....CA .....T.....T.C....
LAB-10.4     .....CA .....C.....T.....C....
LAB-11.1     .....CA .....T.....C....
LAB-F12.1    CT.....AT G..A..A.....GT.A...T.....A.C....
LAB-17.7     CT.....AT G..A..A.....GT.A...T.....A.C....
LAB-19.4     CT.....AT G..A..A.....GT.A...T.....A.C....
LAB-20.1     CT.....AT G..A..A.....GT.A...T.....A.C....
MAO-HEMO     GT.....AT G..A..A.....GC.A...C.....T..A.C....
M57663.A1    .....CA .....T.....T.C....
AF297625.A1  -----
U55222.A Br  .....CA .....T.....T.C....
U55220.A Br  .....CA .....T.....T.C....
D00330.B2    .....G.A C.....A..G.....C....
D50521.B1    .....G.A C...C..A..G.....T.....C....
AJ131133.B2  .....G.A C.....A..G.....T...T.C....
D00329.B     .....G.A C...C..A..G.....A.....C....
D12980.C1    .....A C.GA.T.A.....C...AC.....A....
D23680.C     .T.....A G..A..T.....C.....A....
AF330110.C   .....A G..A..T.....C.....A....
X04615.C     .....A G..A..T.....C.....T...T.....A....
X85254.D     C.....A C...A.....CT.....TG..T...A.A.G.
X65259.D     C.....A C...A.....CT.....TG..T...A.A.G.
AB048701.D   CT.....A C...A.....CT.....A.T.....A.A.G.
U95551.D     C.....A C...A.....CT.....TG..T...A.A.G.
AF223962.F2Arg CT.....AT G..A..A.....GT.A...T.....A.A....
X69798.F2 Br -----
X75658.F2 Fr CT.....AT G..A..A.....GT.A...T.....A.C....
X75663.F2 Col GT.....AT G..A..A.....GC.A...T.....A.C....
AB036912.F2 Vnz GT.....AT G..A..A.....GC.A...C.....T..A.C....
AY090458.H  -----
AF160501.G  -----

```

```

          3073      3083      3093      3103      3113      3123
...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
X51970.A2  ACGGCGGTGT TTTGGGGTGG AGCCCTCAGG CTCAGGGCAT GTTGACCCCA GTGTCAACAA
MAO-07     .....
MAO-08     -----
MAO-09     .....
MAO-11     -----
MAO-15     ...A.....
MAO-14     ...T..CC. G.....A.....TG. T..A..AA. T...G..G
MAO-21     ...A.....
MAO-22     ...A.....
MAO-24     -----
MAO-26     -----
MAO-27     -----
MAO-28     -----
MAO-35     ...T..CC. GC.....A.....TG. T..A..AA.C T..C..G..G
MAO-38     ...A.....
MAO-45     ...T..C. G.....A.....T..A..AA.C ...C..G..G
MAO-47     ...T..CC. G.....A.....TC.A..AA.C ...C..G..G
MAO-48     .....
MAO-50     -----
MAO-57     -----
MAO-58     ...A.....
MAO-59     -----
MAO-53     -----
MAO-60     ...A.....
MAO-63     ...A.....
MAO-64     ...A.....
MAO-68     ...A..CC. ....ACATA.C T..C..G..G
MAO-72     .....

```



```

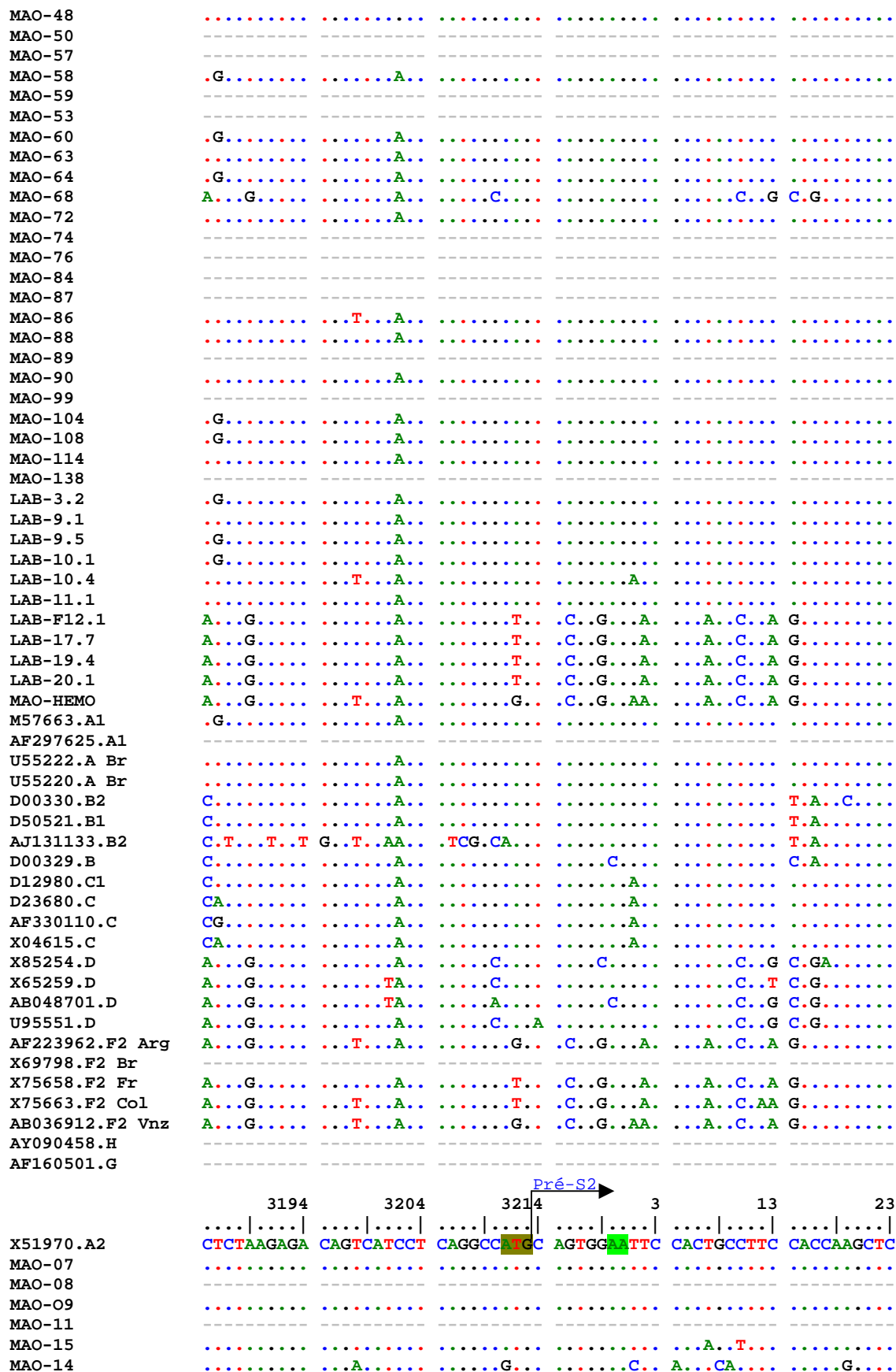
MAO-74
MAO-76
MAO-84
MAO-87
MAO-86      ...T... ..G...G
MAO-88      ...A... ..G...G
MAO-89
MAO-90      ...A... ..G...G
MAO-99
MAO-104     ...A... ..G...G
MAO-108     ...A... ..G...G
MAO-114     ...A... ..G...G
MAO-138
LAB-3.2     ...A... ..G...G
LAB-9.1     ...A... ..G...G
LAB-9.5     ...A... ..G...G
LAB-10.1    ...A... ..G...G
LAB-10.4    ...A... ..G...G
LAB-11.1    ...A... ..G...G
LAB-F12.1   ...T..CC. G... ..G...G
LAB-17.7   ...T..CC. G... ..G...G
LAB-19.4   ...T..CC. G... ..G...G
LAB-20.1   ...T..CC. G... ..G...G
MAO-HEMO    ...T..CC. GC... ..G...G
M57663.A1  ...A... ..G...G
AF297625.A1
U55222.A Br ...A... ..G...G
U55220.A Br ...A... ..G...G
D00330.B2  ...T..G..AC. G... ..G...G
D50521.B1  ...T..G..AC. G... ..G...G
AJ131133.B2 ...T..G..AC. G... ..G...G
D00329.B   ...T..G..AC. G... ..G...G
D12980.C1  ...C... ..G...G
D23680.C   ...C... ..G...G
AF330110.C ...C... ..G...G
X04615.C   ...A..CC. ..G...G
X85254.D   ...A..CC. ..G...G
X65259.D   ...A..C... ..G...G
AB048701.D ...A..CC. .C... ..G...G
U95551.D   ...A..CC. ..G...G
AF223962.F2 Arg ...T..CC. G... ..G...G
X69798.F2 Br
X75658.F2 Fr ...T..CC. G... ..G...G
X75663.F2 Col ...T..CC. GC... ..G...G
AB036912.F2 Vnz ...T..CC. GC... ..G...G
AY090458.H
AF160501.G

```

```

3133      3143      3153      3163      3173      3183
...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
X51970.A2 TTCCCTCCTCC TGCCCTCCGCC AATCGGCAGT CAGGAAGGCA GCCTACTCCC ATCTCTCCAC
MAO-07      ...A... ..G...G
MAO-08
MAO-09      ...A... ..G...G
MAO-11
MAO-15      .G... ..A... ..G...G
MAO-14      A... ..A... ..A.T. .C..G...A. ..A..C..A TCT...
MAO-21      .G... ..A... ..G...G
MAO-22      ...A... ..G...G
MAO-24
MAO-26
MAO-27
MAO-28
MAO-35      A...G... ..T...A... ..G... .C..G...AA. ..A..C..A G...
MAO-38      ...A... ..G...G
MAO-45      .G... ..A... ..T... .C..G...A. ..A..C..A G...
MAO-47      A... ..A... ..T... .C..G...A. ..A..C..G C...

```



	33	43	53	63	73	83
X51970.A2
	TGCAAGACCC	CAGAGTCAGG	GGTCTGTATT	TTCCTGCTGG	TGGCTCCAGT	TCAGGAACAG
MAO-07T..
MAO-08
MAO-09T..
MAO-11
MAO-15T..C.....C
MAO-14	..TTG..T..	G...A..	..CC.....C
MAO-21T..C.....C
MAO-22T..
MAO-24
MAO-26
MAO-27
MAO-28
MAO-35	..TT...T..	G..G..A..	..C.....G..C
MAO-38T..C.....
MAO-45	..TTG..T..	...G..A..	..CA.....C
MAO-47	..TTG..T..	...G..A..A	..CA.....	..C.....G..C
MAO-48
MAO-50
MAO-57
MAO-58T..C.....C
MAO-59
MAO-53
MAO-60T..C.....C
MAO-63T..C.....C
MAO-64T..C.....C
MAO-68T..G..A..	..C.....	..C.....G..
MAO-72T..G..	..C.....
MAO-74
MAO-76
MAO-84
MAO-87
MAO-86	..TT...T..	G..G..A..	..C.....G..C
MAO-88T..C.....C
MAO-89
MAO-90	...G..T..C
MAO-99
MAO-104T..C.....C
MAO-108T..C.....C
MAO-114T..C.....C
MAO-138
LAB-3.2T..C.....C
LAB-9.1	...G..T..C
LAB-9.5T..C.....C
LAB-10.1T..C.....C
LAB-10.4T..C
LAB-11.1	...G..T..C
LAB-F12.1	..TTG..T..	G..G..A..	..CA.....C..GC
LAB-17.7	..TTG..T..	G..G..A..	..CA.....C..GC
LAB-19.4	..TTG..T..	G..G..A..	..CA.....C..GC
LAB-20.1	..TTG..T..	G..G..A..	..CA.....C..GC
MAO-HEMO	..TT...T..	...G..A..A	..C.....	..C.....
M57663.A1T..C.....C
AF297625.A1T..C.....C
U55222.A BrT..C.....C
U55220.A BrT..C.....C
D00330.B2	..T...T..	..G.....	..CC...C.
D50521.B1	..T...T..C...CC
AJ131133.B2	..T...T..CC...C.	..C.....
D00329.B
D12980.C1	...T...T..G..	..C..A..C
D23680.C	...T...T..G..	..C..A..C.C
AF330110.C	...T...T..G..	..C..A..C
X04615.C	...T...T..G..	..C..A..C
X85254.DT..G..AA	..C...C	..C.....
X65259.DT..G..A	..C.....	..C.....

```

AB048701.D      .....T.. .....G..A ..C.....C .C.....
U95551.D        .....T.. .....G..A ..C.....C .....G..
AF223962.F2 Arg ..TTG..T.. G..G..A... ..C..... ..AG..C
X69798.F2 Br    ..TTG..T.. ..G..A... ..C.....C .C..... ..G..C
X75658.F2 Fr    ..TTG..T.. G..G..A... ..CA..... ..C..GC
X75663.F2 Col   ..TTG..T.. ..G..A... ..CA..... .....C
AB036912.F2 Vnz ..TT...T.. G..G..A... ..C..... ..G..C
AY090458.H      ..TT...T.. G..G..A... ..C..... ..AG..C
AF160501.G      .A...A.T.. ..A..... ..C..... ..G..T..
  
```

	93	103	113	▼ 123	Mutação 140	145
X51970.A2	TAAACCTGC	TCCGAATATT	GCCTCTCACA	TCTCGTCAAT	CTCCGCGAGG	ACCGGGGACC
MAO-07T.....
MAO-08
MAO-09T.....
MAO-11
MAO-15	.C.....T	..A.C...T.....	.TT.....
MAO-14	AG.....C...T	CA..A...	..T.T...	..T...G..
MAO-21	.C.....T	..A.C...T.....	.TT.....
MAO-22T	..A.....T.....	..T.....
MAO-24
MAO-26
MAO-27
MAO-28
MAO-35	AG.....TC...T	CA..A...	..T.T...A	..T...G..
MAO-38	.C.....T	..A.....T.....	.TT.....
MAO-45	AC.....C...T	CA..A...	..T.....	..T...G..
MAO-47	AG.....TC..CT	CA.....	..T.....	..T...G..
MAO-48
MAO-50T.....
MAO-57
MAO-58	.C.....T	..A.C...T.....	.TT.....
MAO-59
MAO-53
MAO-60	.C.....T	..A.....T.....	.TT.....
MAO-63	.C.....T	..A.....T.....	..T.....
MAO-64	.C.....T	..A.....T.....	.TT.....
MAO-68TC..CC.T	A.....	..T.T...	.TT.....
MAO-72TC...C	A.....T.....
MAO-74
MAO-76T.....
MAO-84
MAO-87
MAO-86	AG.....TC...T	CA..A...	..T.T...A	..T.....
MAO-88	.C.....T	..A...CT.....	..T.....
MAO-89T.T...	..T.....
MAO-90T.....
MAO-99
MAO-104	.C.....T	..A.C...T.....	.TT.....
MAO-108	.C.....T	..A.C...T.....	.TT.....
MAO-114	.C.....T	..A.....T.....	..T.....
MAO-138
LAB-3.2	.C.....T	..A.C...T.....	.TT.....
LAB-9.1	.C.....C...T.....	..T.....
LAB-9.5	.C.....T	..A.C...T.....	.TT.....
LAB-10.1	.C.....T	..A.C...T.....	.TT.....
LAB-10.4	.C.....TC...T.T...	..T.....
LAB-11.1	.C.....TC...T.....	..T.....
LAB-F12.1	AG.....C...T	CA..A...	..T...A	..T...G..
LAB-17.7	AG.....C...T	CA..A...	..T...A	..T...G..
LAB-19.4	AG.....C...T	CA..A...	..T...A	..T...G..
LAB-20.1	AG.....C...T	CA..A...	..T...A	..T...G..
MAO-HEMOTC...C.T	A.....	..T.T...	..T.....
M57663.A1	.C.....T	..A.C...T.....	.TT.....
AF297625.A1	.C.....T	..C...CT.....	..T.....
U55222.A Br	.C.....T	..A.....T.....	.TT.....
U55220.A Br	.C.....T	..A.....T.....	..T.....

```

D00330.B2      .G.G..... .A....C. .T...GC. .A..... .TAT..A. .T.....
D50521.B1     ..G..... .A....C. .T...AC. .A..... .TAT..A. .T.....
AJ131133.B2   .G.G..... .A....C. .T...GC. .A..... .TAT..A. .T.....
D00329.B      ..G..... .A....C. .T...AGC. .A..... .TAT..A. .T.....
D12980.C1     .....T.....C.C. ....A.C. .A..... .T.T..... .T.....
D23680.C      .....T.....C.C. ....A.C. .A..... .T.T..... .T.....
AF330110.C    .....T.....C.C. ....A.C. .A..... .T.T..... .T.....
X04615.C      .....T.....C.C. ....A.C. .A..... .T.T..... .T.....
X85254.D      .....T.....CC.C. ....C.T .A..... .T.T..... .TT.....
X65259.D      .....T.....T..C.C. ....C.T .A..... .T..... .T.....
AB048701.D    .....T.....C.C. ....C. CA.T....C .T..... .TT.....
U95551.D      .....T.....C.C. ....C.T .A..... .T.T..... .TT.....
AF223962.F2 Arg AG..... .C..... .T... CA..A..... .T.T..A. .T...G..
X69798.F2 Br  AG..... .C..... .T... CA..A..... .T.T..A. .T...G..
X75658.F2 Fr  AG..... .C..... .T... CA..A..... .T.T..A. .T...G..
X75663.F2 Col AG..... .C..... .T... CA..A..... .T.T..A. .T...G..
AB036912.F2 Vnz AG.....T.....C..... .T... CA..A..... .T.T..A. .T...G..
AY090458.H    AG..... .C..... .T... CA..A..... .T.TT..A. .T...G..
AF160501.G    .G.....T.....C..... .T..... .T.T.C... .TT.....
    
```

Região S

153 163 173 183 193 203

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTGTGACGAA CATTGAGAAAC ATCACATCAG GATTCTTAGG ACCCCTGCCG GTGTTACAGG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-07      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-08      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-09      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-11      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-15      ..CAC.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-14      ..CT.T....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-21      ..CAC.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-22      ..C.T....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-24      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-26      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-27      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-28      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-35      ..CT.T....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-38      ..CAC.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-45      ..CT.T....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-47      ..CT.T....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-48      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-50      ..CCC.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-57      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-58      ..CAC.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-59      .....C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-53      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-60      ..CAC.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-63      ..C.C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-64      ..CAC.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-68      ..C.CT....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-72      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-74      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-76      ..CCC.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-84      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-87      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-86      ..CT.T....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-88      ..C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-89      ..C.C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-90      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-99      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-104     ..CAC.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-108     ..CAC.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-114     ..C.C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MAO-138     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LAB-3.2     ..CAC.....|.....|.....C.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LAB-9.1     ..CAC.....|.....|.....C.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LAB-9.5     ..CAC.....|.....|.....C.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LAB-10.1    ..CAC.....|.....|.....C.....|.....|.....T.....|.....|.....|
LAB-10.4    ..CAC.....|.....|.....C.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    
```

```

LAB-11.1      ...CAC... ..C... ..T... ..T...
LAB-F12.1    ...CT.T... ..C.C. .T... ..C... ..T...
LAB-17.7     ...CT.T... ..C.G. .T... ..C... ..T.T...
LAB-19.4     ...CT.T... ..C... .T... ..C... ..T...
LAB-20.1     ...CT.T... ..C.G. .T... ..T... ..T...
MAO-HEMO     ...C.CT... ..T... ..T...
M57663.A1    ...CAC... ..T... ..T...
AF297625.A1  ...C.TT... ..T... ..T...
U55222.A Br  ...C.C... ..T... ..T...
U55220.A Br  ...C.C... ..T... ..T...
D00330.B2    ...AC... ..G... ..C... ..T...
D50521.B1    ...C... ..G... ..T...
AJ131133.B2  ...AC... ..G... ..C... ..T...
D00329.B     ...C... ..G... ..C... ..T...
D12980.C1    ...CAC... ..G. CA... ..T...
D23680.C     ...CAC... ..CA... ..T...
AF330110.C   ...CAC... ..G. CA.T... ..T...
X04615.C     ...CAC... ..G. CA... ..T...
X85254.D     ...C.CT... ..T.T...
X65259.D     ...CACT... ..T...
AB048701.D   ...C.CT... ..T...
U95551.D     ...C.CT... ..T.T...
AF223962.F2 Ar  ...CT.T... ..C... ..C... ..T...
X69798.F2 Br   ...CT.T... ..C... .T... ..C... ..T...
X75658.F2 Fr   ...CT.T... ..C... ..C... ..T...
X75663.F2 Col  ...CT.T... ..C... ..C... ..G...
AB036912.F2 Vn  ...CT.T... ..C... ..C... ..T...
AY090458.H    ...CT.T... ..C... ..C... ..T...
AF160501.G    ...CAC... ..T...

```

```

                213      223      233      243      253      263
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CGGGGTTTTT CTTGTTGACA AGAATCCTCA CAATACCGCA GAGTCTAGAC TCGTGGTGG
MAO-07      .....
MAO-08      .....
MAO-09      .....
MAO-11      .....
MAO-15      .....
MAO-14      ...T.G... ..A... ..A...
MAO-21      .....
MAO-22      .....
MAO-24      .....
MAO-26      .....
MAO-27      .....
MAO-28      .....
MAO-35      ...T.G... ..A... ..A...
MAO-38      .....
MAO-45      ...T.G... ..A... ..A...
MAO-47      ...T.G... ..A... ..A...
MAO-48      .....
MAO-50      .....
MAO-57      .....
MAO-58      .....
MAO-59      .....
MAO-53      .....
MAO-60      .....
MAO-63      .....
MAO-64      .....
MAO-68      .....
MAO-72      .....
MAO-74      .....
MAO-76      .....
MAO-84      .....
MAO-87      .....
MAO-86      .....G... ..A... ..A...
MAO-88      .....
MAO-89      .....
MAO-90      .....

```

```

MAO-99      .....
MAO-104    .....
MAO-108    .....
MAO-114    .....
MAO-138    .....
LAB-3.2    .....
LAB-9.1    .....
LAB-9.5    .....
LAB-10.1   .....
LAB-10.4   .....
LAB-11.1   .....
LAB-F12.1  ...T.G... ..A... ..A...
LAB-17.7   ...T.G... ..A... ..A...
LAB-19.4   ...T.G... ..A... ..A...
LAB-20.1   ...T.G... ..A... ..A...
MAO-HEMO   .....
M57663.A1  .....
AF297625.A1 .....
U55222.A Br .....
U55220.A Br .....
D00330.B2  .....
D50521.B1  ..C.....C ..A... ..A...
AJ131133.B2 .....
D00329.B   .....
D12980.C1  .....
D23680.C   .....
AF330110.C .....
X04615.C   .....
X85254.D   .....
X65259.D   .....
AB048701.D .....
U95551.D   .....
AF223962.F2 Arg ...T.G... ..A... ..A...
X69798.F2 Br  ...T.G... ..A... ..A...
X75658.F2 Fr  ...T.G... ..A... ..A...
X75663.F2 Col ...T.G... ..A... ..A...
AB036912.F2 Vnz ...T.G... ..A... ..A...
AY090458.H   ...T.G... ..A... ..A...
AF160501.G   .....

                273      283      293      303      313      323
X51970.A2     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CTTCTCTCAA TTTTCTAGGG GGATCACCCG TGTGTCTTGG CCAAAATTTCG CGATCCCCAA
MAO-07        .....
MAO-08        .....
MAO-09        .....
MAO-11        .....
MAO-15        .....
MAO-14        .....
MAO-21        .....
MAO-22        .....
MAO-24        .....
MAO-26        .....
MAO-27        .....
MAO-28        .....
MAO-35        .....
MAO-38        .....
MAO-45        .....
MAO-47        .....
MAO-48        .....
MAO-50        .....
MAO-57        .....
MAO-58        .....
MAO-59        .....
MAO-53        .....
MAO-60        .....
MAO-63        .....
MAO-64        .....

```


MAO-68A.TA.....AG.....
 MAO-72G.....AG.....
 MAO-74G.....AG.....
 MAO-76AG.....
 MAO-84AG.....
 MAO-87AG.....
 MAO-86G.....AG.....
 MAO-88AG.....
 MAO-89AG.....
 MAO-90C.....AG.....
 MAO-99AG.....
 MAO-104G.....AG.....
 MAO-108AG.....
 MAO-114AG.....
 MAO-138C.....AG.....
 LAB-3.2AG.....
 LAB-9.1C.....AG.....
 LAB-9.5C.....AG.....
 LAB-10.1AG.....
 LAB-10.4C.....AG.....
 LAB-11.1C.....AG.....
 LAB-F12.1CT.....G.....C.....AG.....
 LAB-17.7CT.....G.....C.....AG.....
 LAB-19.4CT.....G.....C.....AG.....
 LAB-20.1CT.....G.....C.....AG.....
 MAO-HEMOA.TA.....AG.....
 M57663.A1G.....AG.....
 AF297625.A1C.....AG.A.....
 U55222.A BrAG.....
 U55220.A BrAG.....
 D00330.B2A.....AG.A.....
 D50521.B1C.....CA.....AG.A.....
 AJ131133.B2A.....AG.A.....
 D00329.BA.....AG.A.....
 D12980.C1G.....A C.....C.....AG.....
 D23680.CG.....A C.....C.....AG.....
 AF330110.CG.....A C.....C.....AG.....
 X04615.CG.....A C.....C.....AG.....
 X85254.DA.TA.....AG.....
 X65259.DA.TA.....AG.....
 AB048701.DA.TA.....AG.....
 U95551.DA.TA.....AG.....
 AF223962.F2 ArgCT.....G.....C.....AG.....
 X69798.F2 BrCT.....G.....C.....AG.....
 X75658.F2 FrCT.....G.....C.....AG.....
 X75663.F2 ColCT.....A G.....C.....AG.....
 AB036912.F2 VnzCT.....G.....C.....AG.....
 AY090458.HA.....A G.....C.....AG.....
 AF160501.GGTG.....C.....T.....AG.....

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 X51970.A2 CCTCCAATCA CTCACCAACC TCCTGTCCCTC CAATTTGTCC TGGTTATCGC TGGATGTGTC
 MAO-07
 MAO-08
 MAO-09
 MAO-11
 MAO-15
 MAO-14T.....C.....C.....T.....
 MAO-21C.....
 MAO-22C.....
 MAO-24C.....
 MAO-26C.....
 MAO-27C.....
 MAO-28
 MAO-35T.....C.....C.....

MAO-38
 MAO-45T.....C.....C.....T.....
 MAO-47T.....C.....C.....T.....
 MAO-48C.....T.....
 MAO-50
 MAO-57
 MAO-58C.....
 MAO-59
 MAO-53
 MAO-60C.....T.....
 MAO-63C.....T.....
 MAO-64
 MAO-68C.....
 MAO-72
 MAO-74
 MAO-76
 MAO-84C.....
 MAO-87
 MAO-86
 MAO-88
 MAO-89
 MAO-90C.....T.....
 MAO-99C.....
 MAO-104C.....
 MAO-108C.....
 MAO-114
 MAO-138
 LAB-3.2
 LAB-9.1C.....
 LAB-9.5
 LAB-10.1
 LAB-10.4C.....
 LAB-11.1C.....
 LAB-F12.1T.....C.....C.....T.....
 LAB-17.7T.....C.....C.....T.....
 LAB-19.4T.....C.....C.....T.....
 LAB-20.1T.....C.....C.....T.....
 MAO-HEMOC.....
 M57663.A1
 AF297625.A1
 U55222.A Br
 U55220.A Br
 D00330.B2 T.....G.....GT.....
 D50521.B1 T.....G.....GT.....
 AJ131133.B2 T.....G.....GT.....
 D00329.B T.....G.....GT.....
 D12980.C1T.....C.....
 D23680.CT.....A.....C.....
 AF330110.CT.....C.....
 X04615.CT.....C.....C.....
 X85254.DC.....
 X65259.DT.....C.....
 AB048701.DC.....GT.....
 U95551.DC.....
 AF223962.F2 ArgT.....C.....C.....T.....
 X69798.F2 BrT.....C.....C.....T.....
 X75658.F2 FrT.....C.....C.....T.....
 X75663.F2 ColT.....C.....C.....T.....
 AB036912.F2 VnzT.....C.....C.....T.....
 AY090458.HT.....C.....C.....
 AF160501.GT.....C.....C.....

..... 393 403 413 423 433 443
 |.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 X51970.A2 TGC GCG GTTT TATCATATTC CTCTTCATCC TGCTGCTATG CCTCATCTTC TTATTGGTTC
 MAO-07
 MAO-08

MAO-09
MAO-11
MAO-15
MAO-14C.....G.....
MAO-21
MAO-22
MAO-24
MAO-26
MAO-27
MAO-28
MAO-35C.....G.....
MAO-38
MAO-45C.....G.....
MAO-47C.....G.....
MAO-48
MAO-50
MAO-57
MAO-58
MAO-59
MAO-53
MAO-60
MAO-63
MAO-64
MAO-68C.....G.....
MAO-72
MAO-74
MAO-76
MAO-84
MAO-87
MAO-86
MAO-88
MAO-89
MAO-90
MAO-99
MAO-104
MAO-108
MAO-114	-----	-----	-----	-----	-----
MAO-138
LAB-3.2
LAB-9.1G.....
LAB-9.5
LAB-10.1
LAB-10.4G.....
LAB-11.1
LAB-F12.1C.....G.....
LAB-17.7C.....G.....
LAB-19.4C.....G.....
LAB-20.1C.....G.....
MAO-HEMOC.....G.....
M57663.A1
AF297625.A1
U55222.A Br
U55220.A Br
D00330.B2C.....G.....G.....
D50521.B1C.....G.....G.....
AJ131133.B2C.....G.....G.....
D00329.BC.....G.....G.....
D12980.C1G.....
D23680.CG.....
AF330110.CG.....
X04615.CG.....
X85254.DC.....G.....
X65259.DC.....G.....
AB048701.DC.....G.....
U95551.DC.....G.....
AF223962.F2 ArgC.....G.....
X69798.F2 BrC.....G.....
X75658.F2 FrC.....G.....

```

X75663.F2 Col      .....C.....G.....
AB036912.F2 Vnz    .....C.....G.....
AY090458.H         .....G.....G.....
AF160501.G         .....G.....G.....

                453      463      473      483      493      503
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
X51970.A2          TTCTGGATTA TCAAGGTATG TTGCCCGTTT GTCCTCTAAT TCCAGGATCA ACAACAACCA
MAO-07             .....C.....
MAO-08             .....C.....
MAO-09             .....C.....
MAO-11             .....C.T.....
MAO-15             .....C.....
MAO-14             .....C.....C.G.....
MAO-21             .....C.....C.T.....
MAO-22             .....C.....
MAO-24             .....C.T.....
MAO-26             .....C.T.....
MAO-27             .....C.....
MAO-28             .....C.T.....
MAO-35             .....C.....C.....
MAO-38             .....C.T.....
MAO-45             .....C.....C.G.C.....
MAO-47             .....C.....C.G.C.....
MAO-48             .....C.....
MAO-50             .....G.....C.....
MAO-57             .....C.T.....
MAO-58             .....C.....
MAO-59             .....C.....
MAO-53             .....C.....
MAO-60             .....C.....
MAO-63             .....C.....
MAO-64             .....C.....
MAO-68             .....C.T.....C.....
MAO-72             .....C.....C.....
MAO-74             .....G.....C.....
MAO-76             .....T.....
MAO-84             .....C.T.....
MAO-87             .....C.....
MAO-86             .....C.....
MAO-88             .....C.T.....
MAO-89             .....C.....
MAO-90             .....C.....
MAO-99             .....C.....
MAO-104            .....C.T.....
MAO-108            .....C.....
MAO-114            -----
MAO-138            .....C.T.....
LAB-3.2            .....C.....
LAB-9.1            .....C.....
LAB-9.5            .....TC.....
LAB-10.1           .....C.....
LAB-10.4           .....C.....
LAB-11.1           .....C.....
LAB-F12.1          .....C.....G.TC.....G.C.....
LAB-17.7           .....C.....C.G.C.....
LAB-19.4           .....C.....C.G.....
LAB-20.1           .....C.....C.G.C.....
MAO-HEMO           .....C.....T.T.....
M57663.A1          .....C.....
AF297625.A1       .....C.....
U55222.A Br       .....C.....
U55220.A Br       .....C.....
D00330.B2         .....C.....T.....
D50521.B1         .....C.....G.....T.....C.....
AJ131133.B2       .....C.....T.....

```



```

LAB-19.4      .C.....C.....A...T.....C.
LAB-20.1      .C.....C.....A...T.....A.C.....C.
MAO-HEMO      .C.....C...G.....A.....C.
M57663.A1     .C.....C.....A.....C.
AF297625.A1   .....C.....A.....C.
U55222.A Br   .....C.....A.....C.
U55220.A Br   .....C.....A.....C.
D00330.B2     .C..C.....A.....A.C.....C.
D50521.B1     .C.....G.....A.....G.AA..C.....C.
Aj131133.B2   .C..C.....A.....A.C.....A.....C.
D00329.B      .C.....G.....A.....A.C.....C.
D12980.C1     .C.....G.....T.....A.C.....T.
D23680.C      .C..A.....G.....T.....A.C.....T.
AF330110.C    .C.....G.....-.....A.C.....T.
X04615.C      .C.....G.....T.....A.C.....T.
X85254.D      .C.....CGC.....A.....A.....C.
X65259.D      .C.....G.....A.....A.....C.
AB048701.D    .C.....C...G.....A.....A.....C.
U95551.D      .C.....CG.....T...A.....A.C.....A.....C.
AF223962.F2 Arg .C.....A.....T.....A.C.....C.
X69798.F2 Br  .C.....C.....A.....T...A.....A.C.....C.
X75658.F2 Fr  .C.....A.....T.....A.C.....C.
X75663.F2 Col .C.....AG.....T.....A.C.....C.
AB036912.F2 Vnz .C.....A.....T.....A.C.....C.
AY090458.H    .C.....A.....T.....A.C.....C.
AF160501.G    .....C.....A.....C.

```

```

                    573      583      593      603      613      623
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
X51970.A2         GTTGCTGTAC AAAACCTACG GATGGAAATT GCACCTGTAT TCCCATCCCA TCGTCTTGGG
MAO-07           .....A.....
MAO-08           .....A.....
MAO-09           .....C.....
MAO-11           .....C.....
MAO-15           .....A.....
MAO-14           .....T...CT...C...C.....A.....
MAO-21           .....A.....
MAO-22           .....C...T...C.....C.....
MAO-24           .....A.....
MAO-26           .....A.....
MAO-27           .....A.....
MAO-28           .....A.....
MAO-35           .....T...C.....C...T.....A.....
MAO-38           .....A.....
MAO-45           .....T...C...CT...C...C...T.....A.....
MAO-47           .....C...CT...C.....A.....
MAO-48           .....A.....
MAO-50           .....A.....
MAO-57           .....A.....
MAO-58           .....A.....
MAO-59           .....C.....A.....
MAO-53           .....A.....
MAO-60           .....A.....
MAO-63           .....A.....
MAO-64           .....A.....
MAO-68           .....C...T...C.....A...C.....
MAO-72           .....C.....A.....
MAO-74           .....A.....
MAO-76           .....A.....
MAO-84           .....A.....
MAO-87           .....A.....
MAO-86           .....A.....
MAO-88           .....C.....A.....
MAO-89           .....A.....
MAO-90           .....A.....
MAO-99           .....A.....
MAO-104          .....C.....A...C.....
MAO-108          .....A.....

```

```

MAO-114
MAO-138
LAB-3.2
LAB-9.1
LAB-9.5
LAB-10.1
LAB-10.4
LAB-11.1
LAB-F12.1
LAB-17.7
LAB-19.4
LAB-20.1
MAO-HEMO
M57663.A1
AF297625.A1
U55222.A Br
U55220.A Br
D00330.B2
D50521.B1
AJ131133.B2
D00329.B
D12980.C1
D23680.C
AF330110.C
X04615.C
X85254.D
X65259.D
AB048701.D
U95551.D
AF223962.F2 Arg
X69798.F2 Br
X75658.F2 Fr
X75663.F2 Col
AB036912.F2 Vnz
AY090458.H
AF160501.G

```

```

      633      643      653      663      673      683
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
X51970.A2 CTTTCGCAAA ATACCTATGG GAGTGGGCCT CAGTCCGTTT CTCCTGGCTC AGTTTACTAG
MAO-07
MAO-08
MAO-09
MAO-11
MAO-15
MAO-14
MAO-21
MAO-22
MAO-24
MAO-26
MAO-27
MAO-28
MAO-35
MAO-38
MAO-45
MAO-47
MAO-48
MAO-50
MAO-57
MAO-58
MAO-59
MAO-53
MAO-60
MAO-63
MAO-64
MAO-68
MAO-72

```

```

MAO-74      .....G.....T.....C.....
MAO-76      .....G.....T.....C.....
MAO-84      .....G.....T.....C.....
MAO-87      .....G.....T.....C.....
MAO-86      .....G.....T.....C.....
MAO-88      .....G.....T.....C.....
MAO-89      .....G.....T.....C.....
MAO-90      .....G.....T.....C.....
MAO-99      .....G.....T.....C.....
MAO-104     .....G.....T.....C.....
MAO-108     .....G.....T.....C.....
MAO-114     -----
MAO-138     .....G.....T.....C.....
LAB-3.2     .....G.....T.....C.....
LAB-9.1     .....G.....T.....C.....
LAB-9.5     .....G.....T.....C.....
LAB-10.1    .....G.....T.....C.....
LAB-10.4    .....G.....T.....C.....
LAB-11.1    .....G.....T.....C.....
LAB-F12.1   .....A.G.....T.....C.....C.....
LAB-17.7    .....A.....T.....C.....C.....
LAB-19.4    .....A.....T.....C.....C.....
LAB-20.1    .....A.G.....T.....C.....C.....
MAO-HEMO    .....G.....T.....C.....
M57663.A1   .....G.....T.....C.....
AF297625.A1 .....G.....T.....C.....
U55222.A Br .....G.....T.....C.....
U55220.A Br .....G.....T.....C.....
D00330.B2   .....G.....T.....C.....
D50521.B1   .....G.....T.....C.....
AJ131133.B2 .....G.....T.....C.....
D00329.B    .....G.....T.....C.....
D12980.C1   .....G.....T.....C.....
D23680.C    .....G.....T.....C.....
AF330110.C  .....G.....T.....C.....
X04615.C    .....G.....T.....C.....
X85254.D    .....G.....T.....C.....
X65259.D    .....G.....T.....C.....
AB048701.D  .....G.....T.....C.....
U95551.D    .....G.....T.....C.....
AF223962.F2 Arg .....A.G.....T.....C.....C.....
X69798.F2 Br .....A.G.....T.....C.....C.....
X75658.F2 Fr .....A.G.....T.....C.....C.....
X75663.F2 Col .....A.G.....T.....C.....C.....
AB036912.F2 Vnz .....A.G.....T.....C.....C.....
AY090458.H  .....A.G.....T.....C.....C.....
AF160501.G  .....G.....T.....C.....

```


ANEXO V
MULTIPLO ALINHAMENTO DAS 25 SEQUENCIAS NUCLEOTIDICAS
CORRESPONDENTES AO GENE C

	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
X51970_A.2						
	--TCTTTACGGGTCTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTACCTCTGC						
MAO-09	--.....A.....						
MAO-14	--.....A.....T.....A.....						
MAO-15	--.....A.....						
MAO-21	--.....						
MAO-22	--.....A.....						
MAO-26	--.....						
MAO-45	--.....A.....T.....A.....						
MAO-35	--.....A.....T.....A.....						
MAO-38	--.....						
MAO-48	--.....A.....						
MAO-50	--.....A.....						
MAO-59	--.....A.....						
MAO-60	--.....						
MAO-64	--.....A.....						
MAO-63	--.....A.....						
MAO-68	--.....A.....						
MAO-76	--.....						
MAO-86	--.....A.....A.....						
LAB-3.2	--.....A.....						
LAB-9.1	--.....						
LAB-10.4	--.....						
LAB-12.1	--.....A.....T.....A.....						
LAB-17.7	--.....A.....T.....						
MAO-108	--.....T.....A.....						
MAO-HEM	--.....A.....A.....						
AF297621-A1	--.....A.....A.....						
AF297625-A1	--.....						
M57663-A1	--.....						
AJ131133-B2	--.....A.....						
D00330-B2	--.....A.....A.....						
D00329-B1	--.....A.....A.....						
D50521-B1	--.C.....A.....G.....A.....						
AF330110-C	--.....A.....						
D12980-C1	--.....						
X04615-C	--.....A.....						
X65259-D	--.....						
U95551_D	--.....A.....A.....						
AB048701-D4	--.....A.....A.....						
X85254-D3	--.....A.....A.....A.....A.....G.....						
X69798-F2 Br	--.....A.....T.....A.....						
X75663-F2 Col	--.....A.....T.....A.....						
AB036912F2Vnz	--.....A.....T.....A.....						
AF223962F2Arg	--.....A.....T.....						
AY090458-H	--.....C.....T.....A.....						
	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670
X51970_A.2						
	--ACGTTGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCATCAGATCCTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGA						
MAO-09	--.....A.....AT.....						
MAO-14	--.C.....CCTG..GTT...A.CA.....						
MAO-15	--.....C.....G.....						
MAO-21	--.....						
MAO-22	--.....						
MAO-26	--.....A.....						
MAO-45	--.C.....CCTG..AT...A.CA.....						
MAO-35	--.C.....CCTG..GTT...A.CA.....						
MAO-38	--.....C..A.....						
MAO-48	--.C.....						
MAO-50	--.C.....C.....						

```

MAO-59      .....C..A..GT.....
MAO-60      .....
MAO-64      .....
MAO-63      .....C..A.....
MAO-68      .....C.....AT..T.....
MAO-76      .....C.....
MAO-86      .....C..A..AT.....
LAB-3.2     .....C.....C..A.....
LAB-9.1     .....
LAB-10.4    .....C..A..AT.....
LAB-12.1    .....C.....CCTG..AT...A..CA.....
LAB-17.7    .....C.....CCTG..GTT...A..CA.....C.....
MAO-108     .....C.....
MAO-HEM     .....C.....C..GA..GT.....
AF297621-Am .....C..A..AT.....
AF297625-A1 .....
M57663-A1   .....G.....
AJ131133-B2 .....C.....C..G..A.....G.....
D00330-B2   .....C.....CGG..A.....G.....
D00329-B1   .....C.....C..G..A.....G.....
D50521-B1   .....C.....C..G..A.....G.....
AF330110-C  .....C.....C..G..T.....T.....
D12980-C1   .....C.....C..G..T...T...C.....
X04615-C    .....A.....C..G..T.....C.....
X65259-D    .....A.....TA.....T.....
U95551_D    .....C.....C..GA..GT.....
AB048701-D4 .....C.....C..AT..T.....
X85254-D3   .....C.....C..A..T.....
X69798-F2 Br .....C.....CCTG..GTT...A..CA.....C.....
X75663-F2 Col .....C.....CCTG..GTT...A..CA.....
AB036912F2Vnz .....C.....CCTG..AT...A..CA.....
AF223962F2Arg .....C.....CCTG..GTT...A..CA.....A.....
AY090458-H  .....C.....C..GA..G...A..CA.....C.....

```

1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 ▼ ▼ ▼

```

X51970_A.2  CTCCCAGCAATGTC AACGACCGACCTTGAGGCCTACTTCAAAGACTGTGTGTTTAAGGACTGGGAGGAGC
MAO-09      .....
MAO-14      ..TT..G.CG...T...TGGA.C..A.AA...A.....
MAO-15      ..T.....
MAO-21      .....
MAO-22      ..T.....
MAO-26      .....
MAO-45      ..TT..G.CG...T...TGGA.C..A.AA...A.....A.....
MAO-35      ..TT..G.CG...T...TGGA.C..A.A...A.....A.....A.....
MAO-38      ..T.....
MAO-48      ..T.....
MAO-50      ..T.....
MAO-59      ..T.....
MAO-60      .....
MAO-64      .....
MAO-63      .....
MAO-68      ..T.....T.....
MAO-76      .....
MAO-86      ..T.....
LAB-3.2     .....
LAB-9.1     .....
LAB-10.4    .....
LAB-12.1    ..TT..G.TG...T...TGGA.C..A.AA...A.....A.....A.....
LAB-17.7    ..TT..G.CG...T...TGGA.C..A.AA...A.....A.....
MAO-108     ..T.....
MAO-HEM     ..T.T.....T.....A.....
AF297621A1 .....
AF297625-A1 .....A.....T.....
M57663-A1   ..T.....A.....T.....
AJ131133-B2 ..TT.....A.....T..G.....T.....
D00330-B2   ..TT.....A.....T..G.....T.....
D00329-B1   ..TT.....A.....T..G.....

```

```

D50521-B1      ..TT.....A.....CT..G.....
AF330110-C    ..T.....A.....T.....T
D12980-C1     ..T.....A.....T.....A.....T
X04615-C      ..T.....A.....T.....A.....T
X65259-D      .....
U95551_D      ..T.T.....A.....T.....A.....T
AB048701-D4   ..T.T.....A.....T.....A.....T
X85254-D3     ..TT.T.....A.....T.....A.....T
X69798-F2 Br  ..TT..G.TG...T...TGGA.C.A.AA..A.....A.....T
X75663-F2Col  ..TT..G.CG...T...TGGA.C.A.A..A.....A.....
AB036912F2Vnz..TT..G.CG...T...TGGA.C.A.AA..A.....A.....
AF223962F2Arg..TT..G.CG...T...TGGA.C.A.AA..A.....A.....T
AY090458H     ..T..G.CG...T...TGGA.C.A.A..A.....A.....
    
```

```

                RHV      Mutação core promoter                RH AT
                1750      1760      1770      1780      1790      1800      1810
                |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
X51970_A.2     TGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCCTTGTAATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGGCACCAGC
MAO-09         .....T.
MAO-14         ..C.....C.....
MAO-15         ..T.....
MAO-21         ..T.....
MAO-22         ..T.A.....T.
MAO-26         ..T.A.....T.
MAO-45         ..C.....
MAO-35         .....
MAO-38         .....
MAO-48         ..A.....A.....T.
MAO-50         ..C.....T.A.....T.
MAO-59         .....T.
MAO-60         ..C.....T.A.....T.
MAO-64         ..C.....A.....T.
MAO-63         .....T.....T.
MAO-68         .....
MAO-76         .....T.....T.
MAO-86         ..C.....A.....T.
LAB-3.2        .....
LAB-9.1        ..C.....
LAB-10.4       ..C.....A.....
LAB-12.1       .....
LAB-17.7       .....
MAO-108        .....
MAO-HEM        ..A.....C.....
AF297621A1     .....T.....T.
M57663-A1      .....T.
AJ131133-B2    ..G.....C.....G.TT.....
D00330-B2     ..G.....C.....G.TT.....
D00329-B1     .....C.C.....TT.....
D50521-B1     .....C.....TT.....
AF330110-C    .....T.A.....C.....TT.....
D12980-C1     .....C.....TT.....
X04615-C      .....C.....TT.....
X65259-D      .....
U95551_D      .....A.....C.....
AB048701-D4   ..C.....A.....C.....
X85254-D3     .....T.....C.....
X69798-F2 Br  .....TT.....
X75663-F2 Col ..C.....C.....TT.....
AB036912F2Vnz..C.....C.....TT.....
AF223962F2Arg..C.....C.....TT.....
AY090458-H     ..C.....TT.....
    
```



```

AF330110-C T.....TA.TC.....C.....T.....G
D12980-C1 T.....TA.TC.....C.....T.....G
X04615-C T.....TA.TC.....C.....T.....G
X65259-D .A.....TC.A..AC.....T.....A.....
U95551_D .....A..AC.....T.....T.....A.....
AB048701-D4 .....AC.....T.....AA.A.....T
X85254-D3 .....A..AC.....T.....T.....A.....
X69798-F2 Br .....T.....C..A..G..TC.G..C..A..C.....T..A.....T..C.....T
X75663-F2Col T.....G.....G..T..TC.G..C.....C.....A..C.....C.....T
AB036912F2Vn T.....T.....C..G..T..TC.G..C..A..C.....T..A..C..T..C.....T
AF223962F2Ag T.....T.....C..G..G..TC.G..C..A..C.....T..A..C..C..CA.....T
AY090458-H T.....T.....C..G..A..TC.G..C..A..C.....T..A..C..T..C.....T

```

```

                2030      2040      2050      2060      2070      2080      2090
X51970_A2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCCTTAGAGTCTCCTGAGCATGTGCTCACCTCACCATACCGCACTCAGGCAAGCCATTCTCTGCTGGGGG
MAO-09      .....CT.....A.....A.....
MAO-14      .....CA.....T.....T..T.G.....
MAO-15      .....T.....
MAO-21      .....A.....A.....A.T.....C.....T...T...T...T...
MAO-22      .....T.....
MAO-26      .....A.....A.....T.A.....
MAO-45      .....CA.T.....T.....T..T.G.....
MAO-35      .....CA.T.....T.....T..T.G.....
MAO-38      .....A.....T.A.....
MAO-48      .....G.....C.....A.....G..A.T.....T...
MAO-50      .....A.....A.....A.T.....A.....
MAO-59      .....T.....A.....A.....
MAO-60      .....T.....
MAO-64      .....T.....A.....A.....
MAO-63      .....A..G.....C.....A.....T.A.....
MAO-68      .....T.....T.....A...T.....
MAO-76      .....A.....A.....A.....
MAO-86      .....T.....A.....A.....
LAB-3.2    .....A.....A.....A.....
LAB-9.1    .....T.....A.....A.....
LAB-10.4   .....A.....A.....A.....
LAB-12.1   .....
LAB-17.7   .....CA.T.....T.....T..T.G.....
MAO-108    .....A.....A.....G..A.T.....T.....A.....
MAO-HEM    .....T.....T.....A.....T.....
AF297621-A1 .....A..G.....C.....A.....T.A.....
AF297625-A1 .....G.....A.....G..A.T.....T.....
M57663-A1  .....A.....A.....A.....A.....
AJ131133-B2 .....G..A..T.....G.....T..T.G..T...T...
D00330-B2  .....G..A..T.....G.....T...G..T...T...
D00329-B1  .....
D50521-B1  .....A.....A.....T..C..A..A.....T...G.....
AF330110-C .....G..A..T.....C.....T...G..T...T...
D12980-C1  .....G..A..T.....A.....T..C..G..T...T...
X04615-C   .....G..A..T.....A.....T...G..T...T...
X65259-D   .....T.....T.....A...T.....
U95551_D   .....T.....T.....A...T.....
AB048701-D4 .....A..C..TA.....T.....C.TATG...T.....A.....
X85254-D3  .....C..TA.....T.....A.....T.....
X69798-F2Br .....T.....A.....A..A..T..CA.....T..T.....T..T.G..T...T...
X75663-F2Col .....A..G..A.....A.C..CA.T.....T.....T..T.G..T...T...
AB036912-F2Vn .TC.....A..G..A.....A.C..CA.T.....T.....T..T.G..T...T...
AF223962F2Ag .T.....A..G..A.....A.C..CA.T.....T.....T..T.G..T...T...
AY090458-H .T.....A..A..A..A.....A.....A.....T.....T..CT.G.....T...

```

```

                2100      2110      2120
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
X51970_A.2    AATTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAAT-
MAO-09        .....A.....
MAO-14        .....A.....
MAO-15        .....
MAO-21        .....A.....
MAO-22        .....
MAO-26        .....
MAO-45        .....A.....
MAO-35        .....A.....
MAO-38        .....A.....
MAO-48        .....
MAO-50        .....
MAO-59        .....A.....
MAO-60        .....
MAO-64        .....A.....
MAO-63        .....A.....
MAO-68        .....C.A.....
MAO-76        .....A.....
MAO-86        .....A.....
LAB-3.2       .....A.....
LAB-9.1       .....A.....
LAB-10.4      .....A.....
LAB-12.1      .....
LAB-17.7     .....A.....
MAO-108       .....A.....
MAO-HEM       .....C.A.....
AF297621-A1   .....A.....
AF297625-A1   .....
M57663-A1     .....A.....
Aj131133-B2   .G..A...A...C...A.G.-
D00330-B2     .G..A...A...C...A.G.-
D00329-B1     .....
D50521-B1     .....A.....T.....
AF330110-C    .G...A...A...G..C...A.G.-
D12980-C1     .G...A...A.T.G..C...A.G.-
X04615-C      .G...A...A...G..C...A.G.-
X65259-D      ..C.A.....GT.-
U95551_D      ..C.A.....GT.-
AB048701-D4   .CC.A...AC.....
X85254-D3     .CC.A.....GT.-
X69798-F2 Br  .G..A...T.G..T...C...-
X75663-F2 Col .G..A...T.G..T...-
AB036912-F2 Vnz .G..A...T.G..T...-
AF223962-F2 Arg .....A...T.G..T...C...-
AY090458-H    .G..A...T.G..T...G...-

```

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.