UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E D EM PLASMA E TECIDO HEPÁTICO DE PORTADORES CRÔNICOS

Manaus

2018

FELIPE GUEDES AMORIM

CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E D EM PLASMA E TECIDO HEPÁTICO DE PORTADORES CRÔNICOS

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia para a Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira (UFAM)

Co-Orientador: Prof. Dr. Wornei Silva Miranda Braga (FMT-HVD)

Manaus

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Amorim, Felipe Guedes
A524c Caracterização da infecção pelos vírus das hepatites b e d em plasma e tecido hepático de portadores crônicos / Felipe Guedes Amorim. 2016
84 f.: 31 cm.

Orientadora: Cintia Mara Costa de Oliveira
Coorientador: Wornei Silva Miranda Braga
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. HBsAg. 2. HDAg. 3. Genótipo. 4. Filogenia. 5. Amazonas. I. Oliveira, Cintia Mara Costa de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FELIPE GUEDES AMORIM

CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E D EM PLASMA E TECIDO HEPÁTICO DE PORTADORES CRÔNICOS

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia para a Saúde.

APROVADA EM: 18, de Julho de 2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira, Presidente.
Universidade Federal do Amazonas, UFAM

Profa. Dra. Danielle Albuquerque Pires Rocha, Membro
Universidade Federal do Amazonas, UFAM

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, Membro
Universidade Federal do Amazonas, UFAM

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus, à minha família e meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar mais um sonho, por colocar na minha vida pessoas maravilhosas que me ajudaram, e estiveram comigo a todo instante, me dando força e sabedoria.

A minha família que é minha base. Agradeço a minha mãe Francimar Guedes, pelas constantes orações e seu amor incondicional, ao meu pai Ubiracy Amorim pela compreensão e apoio. Aos meus irmãos Adria Barros, Bianca Amorim, Hugo Amorim, Rick Teixeira e Thales Teixeira, pelo apoio e incentivo. Ao meu padrasto Antonio Barros, pela amizade e incentivo.

Aos meus amigos, Priscila Guedes e Karine Trindade que me ajudaram e incentivaram desde o princípio.

Ao Luiz Bentes, pelo companheirismo, amizade e apoio que foi fundamental nessa fase da minha vida.

A minha querida Orientadora Dra. Cíntia Mara, pelo incentivo, ensinamentos, amizade e dedicação.

Ao meu co-orientador Dr. Wornei Braga, pelo apoio, orientações e contribuições neste trabalho.

Aos colaboradores Aline Bessa, Márcia Castilho, Yanka Karolinne, Isa Cristina, pela ajuda no laboratório, pela amizade e incentivo.

Aos amigos da Gerência de Virologia Liane Calado, Maianne Dias, Suellen Clementino, Bosco, Michele, Val pela amizade, incentivo para conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos do CAM (Centro de Apoio Mutidisciplinar) da UFAM, Adolfo Mota, Marjory Ximenes, Lucivana Mourao, Claudia Nayara, Sabrina Meireles, Suelen Dias, Sam, Neto, Danielle, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos meus amigos do Mestrado Anny Maiza, Kessia Caroline, Juliane Correa, João Verçosa, Aline Brilhante, Aline Rubens, Danniel Pinheiro, Bruno Jansen, Lais Garcia, pelas amizades, brincadeiras e incentivo.

A Universidade Federal do Amazonas em proporcionar o Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia.

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado pela infra estrutura para realização desde trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pela bolsa de estudo.

RESUMO

O vírus da hepatite B (VHB) é responsável por um grave problema de saúde pública mundial, sendo que o problema torna-se ainda maior quando ocorre coinfecção ou superinfecção com o vírus D (VHD). Estima-se que das 240 milhões de pessoas no mundo portadoras crônicas de infecção pelo VHB, 15 milhões são portadoras de infecção pelo VHD. Algumas regiões da Bacia Amazônica, particularmente o Estado do Amazonas são consideradas áreas endêmicas de infecção por esses vírus. O VHD é classificado em oito diferentes tipos (VHD-1-VHD-8) e o VHB em dez (A-J). Sendo assim, esta pesquisa tem como objetivo, caracterizar os genótipos do vírus da hepatite B e D no plasma e tecido hepático e investigar possível associação dos genótipos com a evolução da doença. Foram analisadas amostras de plasma e de tecido hepático de pacientes portadores crônicos HBsAg reativos coinfectados com o VHD. Foi realizada a quantificação da carga viral do VHD no plasma por PCR em tempo real; amplificação do DNA-VHB e RNA-VHD por PCR convencional; sequenciamento direto de ambos os vírus; análise filogenética e pesquisa de mutações de resistência na rt do VHB. Como resultados, foram incluídos no estudo um total de 30 pacientes HBsAg e Anti-HD Total reativos, todos procedentes do Estado do Amazonas. Destes, 9/30 tinham simultaneamente amostras de plasma e tecido hepático. O RNA-VHD foi detectado em 13/30 (46,67%) e o DNA-VHB em 11/30 (36,67%). Das 09 amostras de plasma e tecido hepático o RNA-VHD foi detectado em 02/9 (22,27%) e o DNA-VHB em 08/9 (88,89%). Das 30 amostras de plasma submetidas a quantificação do RNA VHD, obteve-se a carga viral de 13/30 (46,67%). Também analisamos as 9 mostras de tecido hepático, obtendo-se a carga viral em 2/9 (22,27%). Na análise filogenética, todas as sequências de Delta agruparam-se no clado VHD-3, já as de VHB, foram identificados os genótipos A 15/19 (78%), D 2/19 (11%) e F 2/19 (11%). Em relação à pesquisa de mutações de resistência à antivirais na rt-VHB, verificou-se que 3/11 (27%) e 05/08 (62%) sequencias isoladas do plasma e tecido hepático, respectivamente, apresentavam mutações de resistência. Conclusões: foi detectado três genótipos do VHB A, D e F, independente do material de origem; todos os extraídos de delta foram exclusivamente VHD-3; a carga viral do vírus delta, foi maior nos extraídos de tecido hepático; quanto ao perfil de mutações de resistência, foi detectado um percentual elevado de mutações na região da polimerase do VHB, principalmente nas sequências isoladas do tecido hepático. Por fim, o perfil dos genótipos do VHB e VHD encontrados no estudo reflete o mesmo padrão encontrado na região por outros autores.

Palavras chaves: HBsAg; HDAg; Genótipo; Filogenia; Amazonas.

ABSTRACT

The hepatitis B virus (HBV) is responsible for a serious global public health problem, and the problem becomes even greater when coinfection or superinfection of D virus (HDV). It is estimated that of the 240 million people worldwide with chronic HBV infection, 15 million are carriers of HDV infection. Some regions of the Amazon Basin, particularly the State of Amazonas, are considered endemic areas of infection by these viruses. HDV is classified into eight different types (HDV-1-HDV-8) and HBV in ten (A-J). Thus, this research aims to characterize the genotypes of hepatitis B and D virus in plasma and hepatic tissue and to investigate possible association of genotypes with the evolution of the disease. Plasma and hepatic tissue samples from chronic HBsAg-reactive patients coinfected with HDV were analyzed. Plasma VHD viral load was quantified by real-time PCR; amplification of HBV DNA and VHD RNA by conventional PCR; direct sequencing of both viruses; phylogenetic analysis and research of resistance mutations in rt HBV. As a result, a total of 30 reactive HBsAg and Total Anti-HD patients, all from the State of Amazonas, were included in the study. Of these, 9/30 had both plasma and hepatic tissue samples. RNA-VHD was detected in 13/30 (46.67%) and HBV DNA in 11/30 (36.67%). Of the 09 plasma and hepatic tissue samples, VHD-RNA was detected in 2/9 (22.27%) and HBV DNA in 8/9 (88.89%). Of the 30 plasma samples submitted to VHD RNA quantification, viral load was obtained in 13/30 (46.67%). We also analyzed the 9 samples of hepatic tissue, obtaining viral load in 2/9 (22.27%). In the phylogenetic analysis, all the Delta sequences clustered in the clade VHD-3, already those of HBV, the genotypes A 15/19 (78%), D 2/19 (11%) and F 2/19 (11%). Concerning the search for antiviral resistance mutations in rt-HBV, 3/11 (27%) and 5/08 (62%) sequences isolated from plasma and hepatic tissue, respectively, showed resistance mutations. Conclusions: three HBV genotypes A, D and F were detected, independent of the source material; all extracted from delta were exclusively VHD-3; the viral load of the delta virus was higher in those extracted from hepatic tissue; a high percentage of mutations in the HBV polymerase region was detected, especially in isolated hepatic tissue sequences. Finally, the profile of the HBV and VHD genotypes found in the study reflects the same pattern found in the region by other authors.

Keywords: HBsAg; HDag; Genotype; Phylogeny; Amazonas

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Vírus da hepatite B (Partícula de Dane), ilustrando os diferentes tipos de partículas virais 16

Figura 02. Organização do genoma do VHB..... 17

Figura 03. Ciclo de replicação do VHB..... 19

Figura 04. Países ou áreas de risco para Hepatite B..... 21

Figura 05 Taxa de detecção de VHB segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017..... 23

Figura 06. Distribuição Geográfica dos genótipos do VHB no mundo..... 24

Figura 07. **(A)** Esquema do enquadramento de leitura aberta da polimerase de VHB. **(B)** Estrutura da polimerase do VHB baseada no modelo de RT do HIV-1. **(C)** Localização das principais mutações da lamivudina. **(D)** Localização das principais mutações de adefovir e tenofovir. **(E)** Localização das principais mutações do entecavir em relação aos domínios conservados..... 29

Figura 08. **A)** Modelagem molecular mostrando impedimento estérico com VHB rtM204V e LMV (direita). **B)** Modelagem molecular mostrando geometria alterada causado por rtN236T, resultando em perturbação do domínio A – D..... 32

Figura 09. Estrutura do Vírus da Hepatite Delta (VHD). A) Microscopia eletrônica do VHD; B) Representação esquemática da partícula do VHD com envoltório do VHB (HBsAg)..... 33

Figura 10. Representação esquemática da partícula do VHD e seu ciclo de vida..... 35

Figura 11. Estimativa da epidemiologia mundial da infecção pelo vírus da hepatite delta..... 36

Figura 12 Casos de hepatite D segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017 37

Figura 13. Prevalência mundial de VHD e distribuição de seus genótipos..... 39

Figura 14. Resistência fenotípica do VHB a cinco drogas antirretrovirais e suas posições..... 56

Figura 15. Distribuição dos pacientes estudados por município de origem..... 57

Figura 16. Árvore filogenética inferida pelo método de *Neighbor-Joining*. Os números acima dos braços da árvore indicam valores de *bootstrap* acima de 50% inferidos a partir de 500 réplicas. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método de Kimura-2-parâmetros. A análise envolveu 14 sequências de nucleotídeos e foi conduzida no programa MEGA 7..... 60

Figura 17. Árvore filogenética inferida pelo método de *Neighbor-Joining*. Os números acima dos braços da árvore indicam valores de *bootstrap* acima de 50% inferidos a partir de 500 réplicas. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método de Kimura-2-parâmetros. A análise envolveu 19 sequências de nucleotídeos e foi conduzida no programa MEGA 7..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Relação entre genótipo e subgenótipo do VHB.....	24
Tabela 02.	Valores dos oito Padrões de Quantificação do kit *RoboGene ® HDV RNA Quantification* v.2. As concentrações dos padrões são em UI/mL (*ABI 7500 Fast*).....	49
Tabela 03.	Valores esperados de Ct dos padrões *RoboGene*, de acordo com o instrumento de PCR em tempo real a ser utilizado. Em destaque o equipamento utilizado no estudo.....	49
Tabela 04.	Condições de amplificação da PCR em tempo real no instrumento ABI 7500 Fast.....	50
Tabela 05.	Sequência dos iniciadores utilizados para a reação de transcriptase reversa (RT).....	51
Tabela 06.	Sequência dos iniciadores utilizados para a reação de amplificação (PCR) do vírus da hepatite D.....	52
Tabela 07.	Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene S do VHB.	53
Tabela 08.	Características Bioquímicas e Moleculares da população estudada.....	58
Tabela 09.	Carga viral das amostras quantificadas dos pacientes infectados com o vírus da hepatite D.....	59
Tabela 10.	Caracterização molecular do VHB e VHD em amostras de plasma.....	65
Tabela 11.	Caracterização molecular do VHB e VHD em amostras de Plasma e Tecido Hepático.....	66
Tabela 12.	Caracterização das Mutações de resistência no gene da Polimerase (rt) em amostras de Tecido Hepático *versus* Plasma.....	66
Tabela 13.	Caracterização molecular do VHB e VHD nas amostras estudadas *versus* Evolução da Doença.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Mmicrolitro
ADV	Adefovir
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do *core* 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
Anti-HDV	Anticorpos contra o vírus da Hepatite D
Anti-VHC	Anticorpos contra o vírus da Hepatite C
cccDNA	DNA circular fechado covalentemente
cDNA	DNA complementar
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CPEB3	Gene do genoma humano que codifica as ribozimas do vírus da hepatite D.
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*
dNTPs	Deoxiribonucleosideo trifosfato
ETV	Entecavir
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical – Dr.Heitor Vieira Dourado
HBcAg	Antígeno do *core* do vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno *e* do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B.
HBxAg	Antígeno *X* do vírus da hepatite B
HDAg	Antígeno do vírus da hepatite Delta/RNA antigenômico
HDAg-L	Proteína curta do antígeno do vírus da hepatite Delta
HDAg-S	Proteína longa do antígeno do vírus da hepatite Delta
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês, Human immunodeficiency vírus.
IgG	Anticorpo de Imunoglobulina G
IgM	Anticorpo de Imunoglobulina M
LMV	Lamivudina
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	Centro Nacional de Informações em Biotecnologia, do inglês *National Center the biotechnology in information.*
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase, do inglês *Polimerase Chain Reaction.*

Primer	Oligonucleotídeos de sequência específica
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid.*
RT	Enzima de transcrição reversa, do inglês *transcriptase reversa*
SER	Serina
TFV	Tenofovir
UAG	Código de parada, do inglês *stop códon*
UFAM	Universidade Federal do Amazonas.
UGG	Código de iniciação, do inglês *start codon*/ Triptofano
UV	Radiação Ultravioleta
VHB	Vírus da hepatite B
VHD	Vírus da hepatite D

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	15
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	16
2.1	Classificação e organização do genoma viral do VHB	16
2.2	Ciclo de Replicação do VHB	18
2.3	Epidemiologia do VHB	21
2.4	Diversidade Genética do VHB	23
2.5	Transmissão do VHB	25
2.6	Diagnóstico Laboratorial para o VHB	25
2.7	Mutação na Região da Polimerase do genoma VHB	27
2.7.1	Resistências Moleculares aos Análogos de Nucleotídeos	29
2.7.2	Mecanismos Moleculares de Resistência às Drogas	30
2.8	Classificação e organização do genoma viral do VHD	32
2.9	Ciclo de Replicação do VHD	33
2.10	Epidemiologia do VHD	35
2.11	Diversidade Genética do VHD	38
2.12	Transmissão do VHD	39
2.13	Diagnóstico Laboratorial para o VHD	40
3	**OBJETIVOS**	43
3.1	Objetivo geral	43
3.2	Objetivos específicos	43
4	**MATERIAL E MÉTODOS**	44
4.1	Modelo de estudo	44
4.2	Local de estudo	44
4.3	Considerações Éticas	44
4.4	População de Estudo	45
4.5	Critérios de Inclusão e Exclusão	45
4.6	Procedimentos laboratoriais	46
4.7	Coleta de Amostra Biológica	46
4.7.1	Carga viral do VHB	47
4.7.2	Purificação do ácido nucleico viral em plasma	47

4.7.3 Purificação do DNA-VHB e RNA-VHD a partir do tecido hepático 48
4.7.4 Carga Viral do VHD 48
4.7.5 Análise dos Dados da Carga Viral do Vírus da Hepatite D 50
4.7.6 Reação da Transcrição Reversa (RT) do vírus D 50
4.7.7 Reação da PCR do VHD e detecção em gel de agarose 51
4.7.8 Amplificação do DNA VHB por PCR 52
4.7.9 Sequenciamento 53
4.7.10 Edição e análise das Sequências 53
4.7.11 Genotipagem por Análise filogenética 53
4.7.12 Análises de mutações de resistência antiviral 55
5 **RESULTADOS** 57
6 **DISCUSSÃO** 68
7 **CONCLUSÕES** 73
8 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 74
ANEXO 83

1. INTRODUÇÃO

É sabido que o vírus da hepatite B (VHB) é responsável por um grave problema de saúde pública no mundo inteiro. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2015 o VHB foi responsável por cerca de 887 mil mortes em todo o mundo, principalmente devido a cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Porém, o problema torna-se ainda maior quando ocorre coinfecção ou superinfecção com o vírus D (VHD) ou delta. Nesse caso, o dano ao fígado do indivíduo portador crônico do VHB é cerca de 70 a 90% mais severo, pois além da cirrose hepática e do carcinoma hepatocelular pode evoluir até mesmo para uma hepatite fulminante. Atualmente, dos 240 milhões de indivíduos HBsAg positivos, cerca de 15 milhões estão cronicamente coinfectados com o VHD (WHO, 2017; Tu & Urban, 2018).

As áreas de mais alta prevalência do VHD são as mesmas do VHB como, a Ásia Central e do Norte, Japão, Taiwan, Groenlândia, partes da África, áreas do Pacífico e a Bacia Amazônica (WHO, 2017).

Em relação à variabilidade genética desses vírus, são conhecidos 10 genótipos do VHB classificados de A-J (Bertollo et al, 2015), enquanto que do VHD existem 8 genótipos identificados (1-8) (Cícero et al, 2016). A taxa de variabilidade genética entre os genótipos e sugenótipos é de 8 e 4%, respectivamente (Bertollo et al, 2015). Estudos evidenciam também a relação dos genótipos com a característica da população, a evolução clínica da doença e a resposta aos antivirais. Na Ásia, por exemplo, o genótipo B e C são os mais frequentes, sendo que o C estaria mais relacionado a complicações mais graves da doença (Huy & Abe, 2004). Os genótipos D e C são os que menos respondem ao tratamento (Zhang et al, 1996). Por outro lado, a mortalidade é mais frequente entre os pacientes infectados com o A e F (Lin & Kao, 2011). Esses dados têm despertado interesse da comunidade cientifica e da indústria farmacêutica.

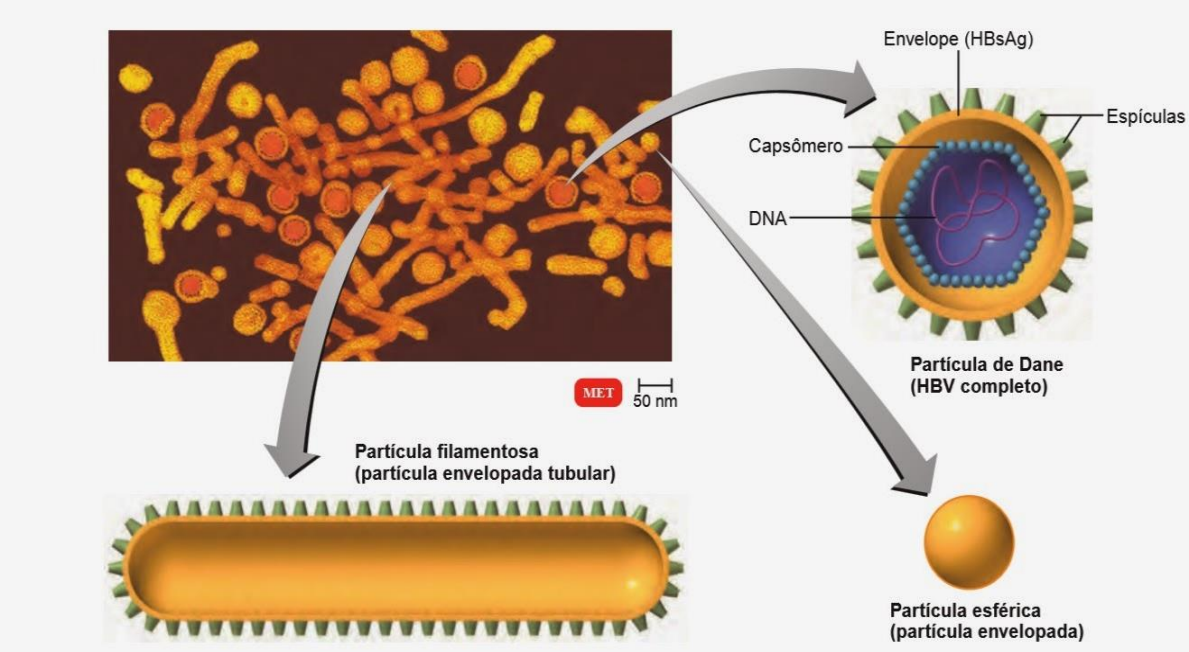
No Brasil, particularmente no estado do Amazonas, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostram que os genótipos A, F e D são os mais frequentes, respectivamente (Oliveira et al, 2008; Braga et al, 2012; Castilho et al, 2012). Sendo que o genótipo F está mais relacionado a populações do interior do Estado (Dias et al, 2012). Em relação ao tratamento, não se tem dados demonstrando a associação entre genótipo e tratamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação e organização do genoma viral do VHB

O vírus da hepatite B (VHB) é um vírus de DNA pertencente à família Hepadnaviridae, gênero *Orthohepadnavirus*. A particula viral completa ou *virion* é esférica com cerca de 42 nm de diâmetro e extremamente infecciosa (Lee, 1997). Porém, além das particulas infecciosas, no soro de pacientes infectados com vírus da hepatite B também podem ser encontradas dois tipos de partículas distintas não infecciosas que podem ser esféricas ou filamentosas. As partículas esféricas são menores do que as partículas de Dane e as patículas filamentosas são tubulares, dez vezes maiores do que as esféricas. Essas partículas não contêm material genético em seu interior, são ocas compostas exclusivamente por proteínas (antígeno de superfície, HBsAg) e lipídeos. Apresentam-se em quantidade muito maior do que as partículas infecciosas (Ganem, 1996; Gomes, 2003). (Figura 01).

Figura 01. Vírus da hepatite B (Partícula de Dane), ilustrando os diferentes tipos de partículas virais. Disponível em <http://hepatiteeshow.blogspot.com/2014/06/virus-da-hepatite-b-hbv-parte-1.html >



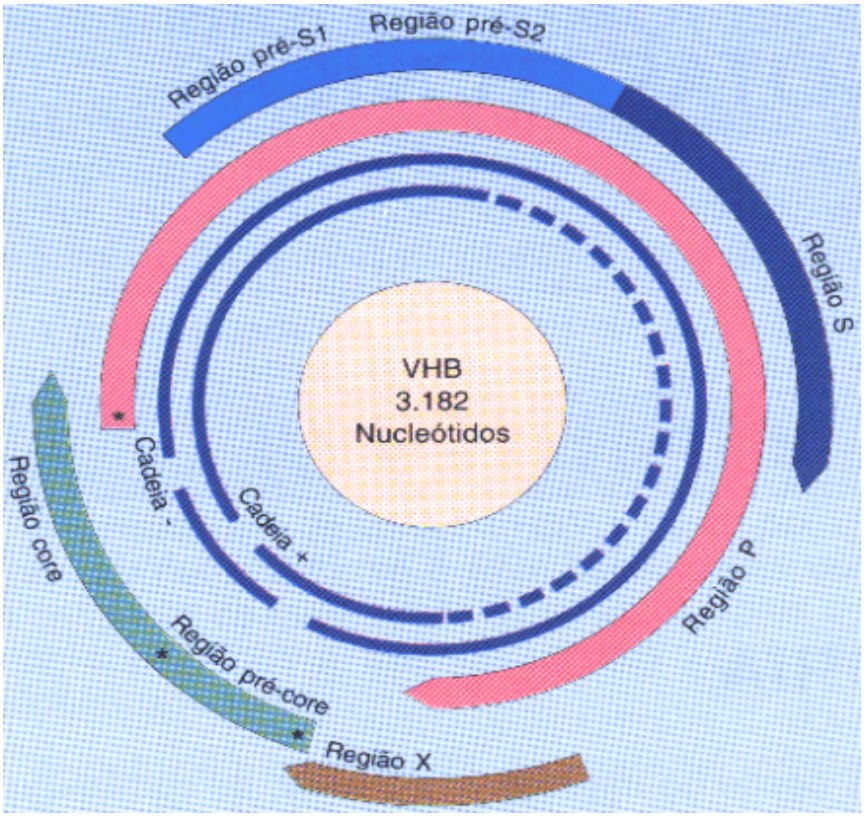
Vírus da hepatite B (HBV). A micrografia e as ilustrações mostram os tipos distintos de partículas de HBV discutidos no texto.

O genoma viral consiste numa molécula de DNA com cerca de 3.200 nucleotídeos, circular de cadeia parcialmente dupla fita, ou seja, uma cadeia longa e outra mais curta,

organizada em quatro regiões de leitura aberta (*Open Reading Frames*, ORF): *S, C, P* e *X*, sobrepostas e que possuem funções diferentes (Seeger & Mason 2000; Lopes, 2010).

A região *S* denominada de gene do antígeno de superfície é subdividida em três regiões codificadoras: *pré-S*1 (proteína de cadeia longa) produzida a partir do primeiro códon de iniciação da ORF, a *pré-S*2 (proteína de cadeia média) produzida a partir do segundo códon de iniciação e a *S* (proteína de cadeia curta) produzida a partir do terceiro códon de iniciação. Sua função é codificar a proteína que funciona como o antígeno de superfície HBsAg. A região C (Pré-C/C) apresenta dois códons de iniciação e codifica as proteínas do nucleocapsídeo viral ***c*** e ***e*** (HBcAg e HBeAg), responsáveis por encapsular o DNA viral (Lee, 1997; Lopes, 2010; Inoue, 2016). A Figura 01 mostra um esquema do vírus da hepatite B (Partícula de Dane), ilustrando os diferentes tipos de partículas virais e na Figura 02 um esquema do genoma viral.

Figura 02. Organização do genoma do VHB. Fonte: Gerlich, 1997



A proteína HBeAg também pode ser expressa na superfície dos hepatócitos, e sua presença indica replicação viral ativa. Isto é, indica maior quantidade de *vírions* no sangue e está associada à evolução para hepatite crônica. O gene P é responsável pela síntese da

enzima DNA polimerase do genoma viral, que também funciona como transcriptase reversa. O gene X codifica a proteína X multifuncional. Controla o nível de replicação do VHB e é importante para a etapa de transcrição viral (Lee, 1997; Lopes, 2010; Inoue, 2016).

2.2 Ciclo de replicação do VHB

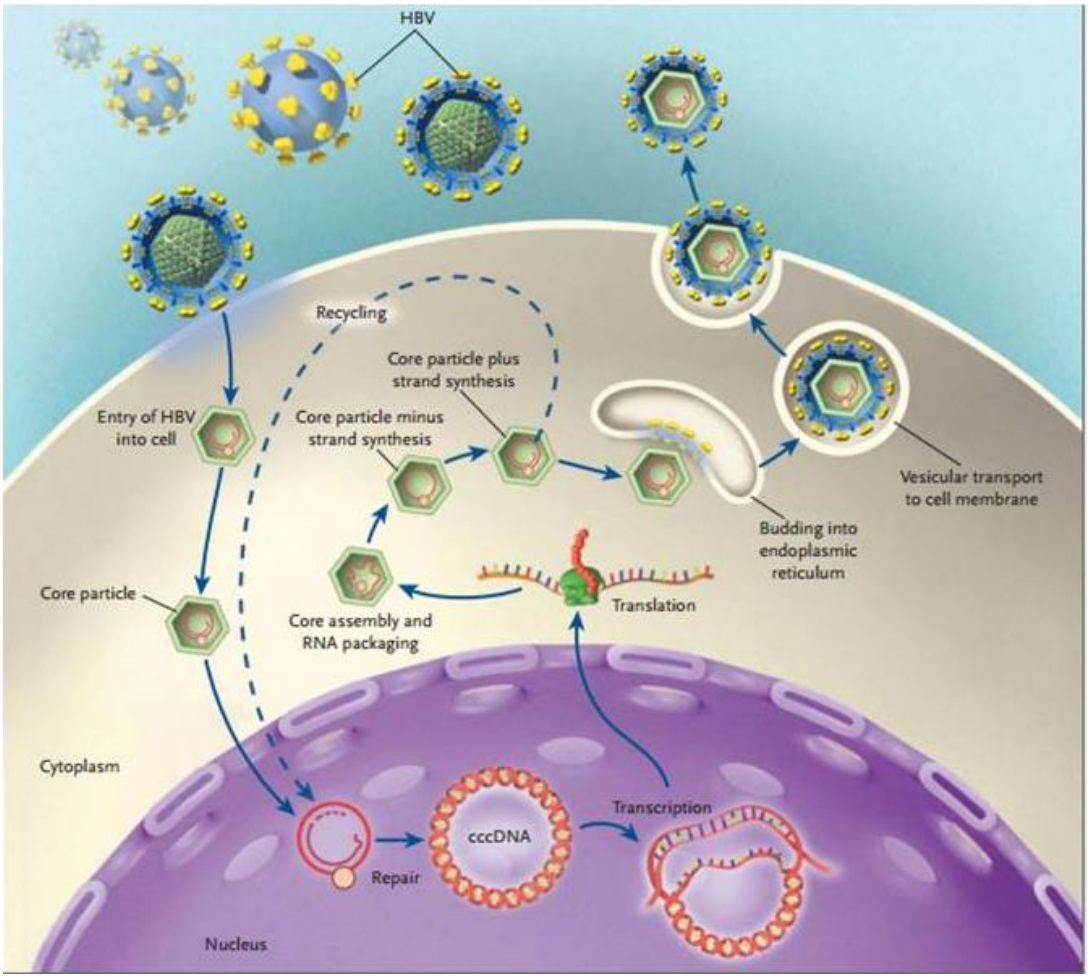
O vírus da hepatite B é o menor vírus de DNA que o homem conhece, porém, o seu ciclo de replicação é extremamente complexo. Sabe-se que a grande quantidade de vírus que circula no sangue de uma pessoa infectada costuma ser elevada. A maneira exata como o vírus penetra na célula ainda é desconhecido. Porém, de acordo com o que está estabelecido até o momento, segue-se uma síntese das principais etapas do processo de replicação do VHB. Acredita-se que para que ocorra a infecção a partícula central que contém o DNA viral é envolvida por uma membrana contendo receptores específicos localizados na região pré-S1 (aminoácidos 21-47) que são atraídos por receptores do hepatócito, sendo dessa forma endocitado para dentro do citoplasma da célula hepática (Raney & Mclachlan, 1991). Essa partícula viral completa ou *virion* é constituída por uma membrana contendo a proteína de superfície (HBsAg) que reveste o núcleo central contendo a DNA polimerase viral (Figura 3).

Após a infecção, uma vez na corrente sanguínea do indivíduo, o vírus circula por todo o corpo. Porém, o seu alvo são os hepatócitos, as células do fígado. Portanto, ao encontrar o hepatócito ocorre a fusão da membrana viral com a vesícula e a liberação do capsídeo viral no citoplasma do hepatócito do hospedeiro. Portanto, a partícula viral penetra através dos sinusóides (rede de capilares sanguíneos) hepáticos, passando para dentro do epitélio sinusoidal de onde o vírus pode finalmente acessar os hepatócitos individuais do fígado, infectando-os (Seeger & Mason, 2000, 2015).

Uma vez no citoplasma, a partícula viral ou capsídeo se move em direção ao núcleo da célula. Durante o percurso, essa partícula se desintegrar liberando o DNA viral e a polimerase que através do poro nuclear chega dentro do núcleo do hepatócito. No núcleo, o DNA viral adquire uma forma circular, parcialmente dupla fita. Nesse momento, entram em ação enzimas da célula hospedeira que vão auxiliar o processo em várias etapas, incluindo a produção da fita positiva de DNA e o fechamento covalente do círculo para formar um DNA altamente estável e covalentemente fechado conhecido como cccDNA. Durante o processo de

replicação viral, cccDNAs vão se acumulando dentro do núcleo da célula formando um reservatório de DNA estável que atuam como molde para produção de enzimas celulares que por sua vez vão transcrever todos os novos mRNA pré-genômicos e subgenômicos virais. As moléculas de RNAs viral atravessam os poros do núcleo celular para entrar no citoplasma onde alguns dos mRNAs são traduzidos pelos ribossomos celulares e iniciam a produção das proteínas centrais do VHB (HBcAg e HBeAg). Portanto, a replicação do VHB se caracteriza basicamente pela síntese do DNA de fita dupla parcial, através da transcrição reversa do RNA intermediário ou RNA pré-genômico (Seeger & Mason, 2000, 2015).

Figura 3. Ciclo de replicação do VHB. Fonte: Ganem D & Prince, 2004.



É valido ressaltar que a polimerase viral tem três atividades funcionais: ativação, transcrição reversa e síntese do DNA. Portanto, sua principal função é converter o RNA viral pré-genômico de cerca de 3,4 K em DNA viral para incorporação nas próximas gerações de vírus. Mas para realizar esse processo são necessárias mais três etapas: ativação da fita negativa de DNA; formação da fita negativa do DNA gerada pela transcrição reversa e

degradação do RNA pré-genômico. Para finalizar, a fita complementar positiva do DNA é sintetizada tendo como resultado o genoma de DNA infeccioso. É importante salientar que o cccDNA é o modelo para a transcrição de mRNAs virais e, que sua formação indica um início bem sucedido da infecção (Seeger & Mason, 2000, 2015).

Em relação à etapa de ativação, a polimerase recém-formada reconhece um fragmento do RNA pré-genômico formado por alças tronco. Então uma molécula de trifosfato dexosiguanosina liga-se covalentemente a polimerase e mediante uma base de citosina pareia dentro da alça tronco do RNA. Em seguida, duas moléculas de trifosfato dexosiguanosina são adicionadas à guanosina para formar uma sequência ativadora de DNA de três bases apenas. Essa sequência de ativação é a chave para a replicação do DNA viral, sem ela não seria possível nenhuma síntese adicional do DNA. Assim, a etapa de ativação começa com o pareamento dos três nucleotídeos com a outra ponta do RNA pré-genômico, servindo como início da síntese da fita negativa do DNA viral pela transcrição reversa. Permitindo que a síntese de DNA continue até o molde de RNA pré-genômico ser copiado completamente. Neste estágio, o seguimento curto de RNA não degradado continua associado com a nova fita de DNA negativo. Este RNA por sua vez se liga ao início da fita de DNA perto do seu ponto de ligação com a polimerase servindo de ativador para o terceiro e último estágio da replicação viral, ou seja, a síntese da fita positiva do DNA. À medida que prossegue a síntese da fita positiva do DNA, ela dá um salto para trás até a ponta da fita negativa de DNA formando um círculo entorno da estrutura da DNA polimerase em uma fita parcialmente dupla de DNA (Focaccia, 1997; Seeger & Mason, 2000; Beck, 2007; Tong, 2016).

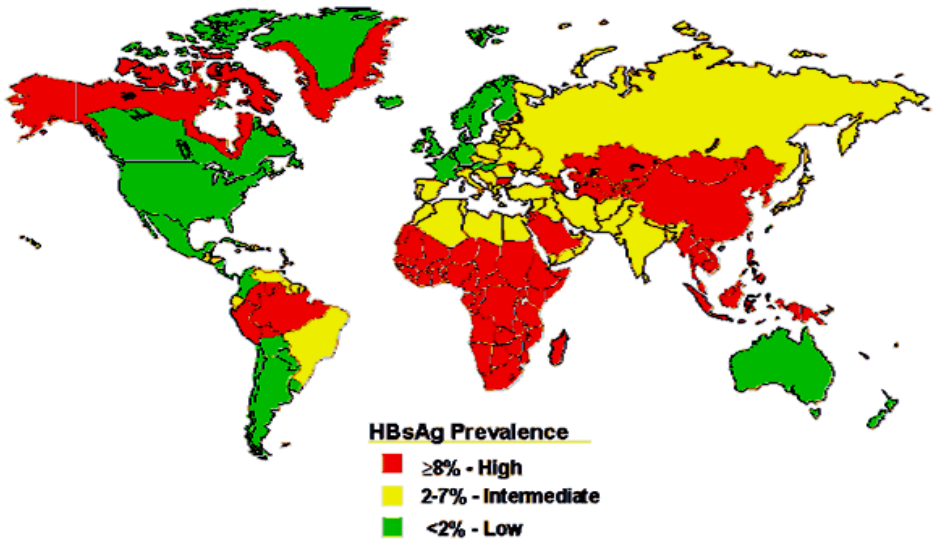
É importante ressaltar que enquanto o novo DNA VHB está sendo sintetizadas as proteínas centrais se juntam em torno do complexo polimerase viral DNA para formar novos centros virais. Ao mesmo tempo, as proteínas da superfície viral começam se acumular na membrana do retículo endoplasmático rugoso. A partícula viral recém-formada brota para dentro da luz do retículo endoplasmático para formar um novo vírus com envelope. Esse vírus passa através do Complexo de Golgi e entra em uma vesícula secretória que o libera para o meio extracelular por meio de fusão com a membrana externa. A partir desse ponto as novas partículas virais são liberadas para infectar outros hepatócitos e disseminar a infecção por todo o fígado ou ser transmitido à outra pessoa onde vai começar um novo ciclo (Focaccia, 1997; Seeger & Mason, 2000; Beck, 2007; Tong, 2016).

Então como acima descrito um dos passos-chave do "ciclo de vida" do VHB é a formação de cccDNA (DNA circular fechado covalentemente) no núcleo celular que atua como molde para posterior replicação do vírus. O mais facinante é que os estudos mostram que os medicamentos antivirais atuais não são eficazes na erradicação do cccDNA e que esse pode persistir no fígado mesmo na ausência de DNA VHB ou do HBsAg detectáveis no sangue. Também não pode ser medido no soro. O cccDNA persistente tem sido associado a vários eventos clínicos, como reativação viral induzida por terapias imunossupressoras, recorrência de VHB após transplante de fígado e carcinoma hepatocelular (CHC). Assim, o cccDNA continua a ser o principal alvo para alcançar a cura da infecção pelo VHB, os esforços têm sido no sentido de desenvolver novos antivirais para degradar ou silenciar o cccDNA (Kumar et al., 2016).

2.3 Epidemiologia do VHB

As taxas de prevalência da infecção pelo VHB variam de acordo com as regiões geográficas do globo. Estima-se que 240 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com hepatite B. Em regiões de baixo risco, a maior incidência de infecção é observada em adolescentes e adultos jovens. (Conceição, 2009; Inoue, 2016; Castilho, 2012). Áreas com altos índices incluem o subcontinente indiano, da África subsaariana, a Ásia Central e do Norte, Taiwan, Groenlândia, as Ilhas do Pacífico e Bacia amazônica. Quase metade da população mundial vive em áreas de alta endemicidade (WHO, 2017; Castilho, 2012). O mapa abaixo destaca as áreas do globo de maior prevalência de infecção pelo VHB.

Figura 4. Países ou áreas de risco para Hepatite B (*World Health Organization* 2012).

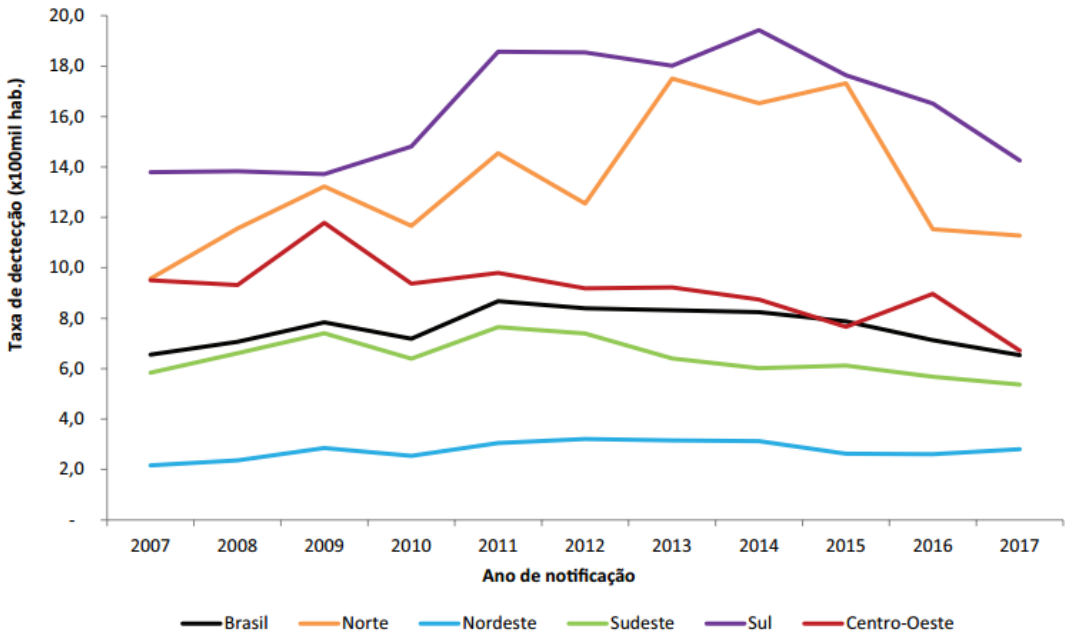


Em regiões de baixa prevalência (<2%), o risco de infecção pelo VHB é inferior a 20%. A transmissão sexual e a transmissão percutânea durante o início da idade adulta são as principais vias de propagação da infecção. Cerca de 12% dos indivíduos infectados com VHB vivem em regiões de baixa prevalência, que incluem a América do Norte, Norte e Oeste da Europa, Austrália e Nova Zelândia. Nestas áreas, a maioria das infecções por VHB ocorre em adolescentes e adultos jovens pertencentes a grupos de alto risco, que incluem usuários de drogas, profissionais de saúde e pacientes submetidos a transfusões sanguíneas regulares ou hemodiálise (Te, 2010; Said, 2011). Em regiões de prevalência intermediária (3-5%), a transmissão sexual e percutânea e a transmissão vertical durante o parto são as principais vias de infecção. Essas regiões incluem a Europa Oriental e Meridional, o Japão, a bacia do Mediterrâneo, o Oriente Médio, América Latina e América do Sul e Ásia Central. O risco ao longo da vida de infecção pelo VHB é de 20% a 60%. As taxas altas de infecção crônica são principalmente devido a infecções que ocorrem em recém-nascidos e crianças (Te, 2010; Inoue, 2016). Em regiões de alta prevalência (10-20%), a transmissão ocorre predominantemente em recém-nascidos e crianças. Durante a infância, o VHB é transmitido verticalmente da mãe para o bebê ou ocorre por contato próximo. Em algumas regiões, a exposição percutânea a agulhas contaminadas ou uma injeção insegura também é uma possível via de infecção pelo VHB. Uma vez que a maioria das infecções em crianças é assintomática, há pouca evidência de doença aguda relacionada ao VHB, mas as taxas de doença hepática crônica e carcinoma hepatocelular (CHC) em adultos são altos. Aproximadamente 45% dos indivíduos infectados com VHB vivem em regiões de alta prevalência. O risco de infecção é superior a 60%, como demonstrado pela presença de anti-HBc nos soros. As regiões de alta prevalência são na sua maioria regiões com economias em desenvolvimento e grandes populações. Incluem a China, o Sudeste Asiático, a Indonésia, a África Subsaariana, as Ilhas do Pacífico, partes do Oriente Médio e a Bacia Amazônica (Ferreira, 2004; Te, 2010; Inoue, 2016).

No período de 1999 a 2017, foram notificados 218.257 casos confirmados de hepatite B no Brasil desses, a maioria está concentrada na região Sudeste (35,2%), seguida das regiões Sul (31,6%), Norte (14,3%), Nordeste (9,7%) e Centro-Oeste (9,2%), segundo a Tabela 9. As taxas de detecção de hepatite B no Brasil, desde 2011, vêm apresentando poucas variações, com leve tendência de queda desde 2014, atingindo 6,5 casos para cada 100 mil habitantes no país em 2017. De 2007 a 2017, verificou-se que a taxa de detecção das regiões Sul, Norte e

Centro-Oeste foram superiores à taxa nacional (à exceção de 2015, quando a região Centro-Oeste apresentou taxa levemente inferior), enquanto as menores taxas foram observadas na região Nordeste (Figura 05). (SINAM, 2018).

Figura 5. Taxa de detecção de VHB segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017.



No Brasil, o número de pessoas infectadas aumentou bastante no decorrer dos anos, sendo a maioria, nos adultos jovens. No cenário nacional, a região Norte foi a que mais identificou casos de pessoas infectadas pelo VHB (Conceição, 2009). Observa-se que o cerne do problema do VHB no Brasil estaria localizado na região Amazônica, mais especificamente na Amazônia Ocidental (Fonseca, 2007), pois fatores como: aspectos genéticos, sociais, econômicos, culturais, além de outros, garante grande influência na determinação da alta taxa de endemia da região (Zatti, 2013).

2.4 Diversidade Genética do VHB

Atualmente são reconhecidos dez genótipos do VHB classificados de acordo com as letras do alfabeto de A a J, sendo que alguns genótipos do VHB também estão divididos em subgenótipos. Definidos por meio de uma análise do genoma completo ou parcial do VHB. Estudos de diversidade genética mostram uma taxa de variabilidade genética superior a 8% entre cada genótipo conhecido e de 4% a 8% entre os subgenótipos. Atualmente foram determinados mais de 30 subgenótipos do VHB, porém os mecanismos das diferentes características patogênicas dos genótipos não são completamente conhecidos. A literatura

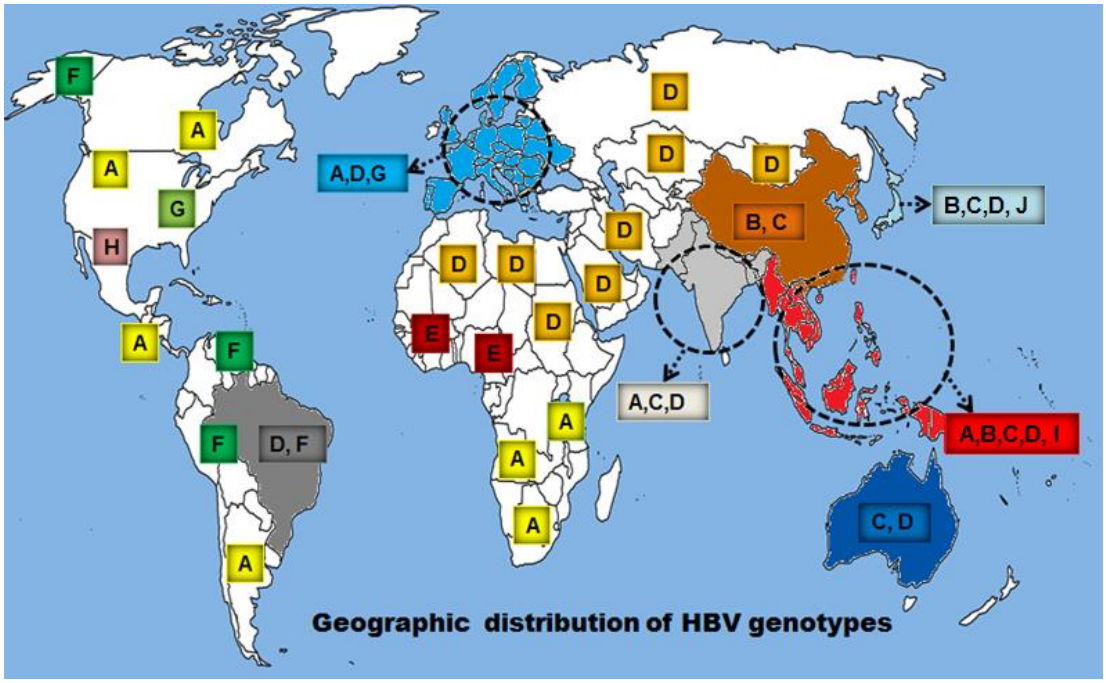
relata que os genótipos e subgenótipos mostram distribuições geográficas distintas, e estão relacionados com a progressão clínica da doença, resposta ao tratamento antiviral, prognóstico e etnia da população. Assim, os genótipos A-D e F, por exemplo, são divididos em vários subgenótipos; enquanto que dos genótipos E, G, H, I e J ainda não foram definidos subgenótipos (Sunbul, 2014).

Tabela 1. Relação entre genótipo e subgenótipo do VHB

GENÓTIPO	SUBGENOTIPO
A	A1, A2, A3, A4, A5
B	B1, B2, B3, B4, B5
C	C1, C2, C3, C4, C5
D	D1, D2, D3, D4, D5
F	F1, F2, F3, F4

Em relação à distribuição dos genótipos, o genótipo A é frequentemente encontrado na América do Norte, noroeste da Europa, Índia e África; os genótipos B e C são endêmicos da Ásia, e o genótipo D predomina na Europa Oriental e no Mediterrâneo; o tipo E é encontrado na África Ocidental; o tipo F é endêmico na América do Sul; o tipo G, na França, Alemanha, América Central, México e Estados Unidos; o genótipo H é prevalente na América Central; o tipo I, no Vietnã e o tipo J, no Japão (Bertollo, 2015; Inoue, 2016). O mapa abaixo mostra a distribuição dos genótipos do VHB no mundo.

Figura 6. Distribuição Geográfica dos genótipos do VHB no mundo.
Fonte:<http://arwr.proboards.com/thread/91/piper-jaffrays-conclusion-latest-arwr>.



Há também distribuição geográfica mundial para os subgenótipos, onde o subgnótipo A1 se localiza na África e América do Sul; o A2 na Europa. Os subgenótipos do B são encontrados nos países asiáticos. Os subgenótipos do C prevalecem também na Ásia, com o C4 na Austrália. Já os subgenotipos do D não têm distribuição seletiva. Os subgenótipos, F3 e F4 se localizam na Bolívia e Argentina, respectivamente. No Brasil, inclusive no estado do Amazonas, predominam os Subgenótipo A1, D1 e F2 (Almeida, 2009).

2.5 Transmissão do VHB

O vírus possui uma alta taxa de contaminação e sua transmissão se faz por via parenteral (percuntânea); relação sexual desprotegida; por solução de continuidade (pele e mucosa); transmissão vertical (perinatal) e contatos domiciliares (Ferreira, 2004; Brasil, 2008).

Estudos mostram que o VHB é extremamente infeccioso podendo sobreviver fora do corpo por pelo menos 7 dias. Após infecção o período de incubação do vírus é de 75 dias, em média, mas pode variar de 30 a 180 dias (WHO, 2017).

Em áreas altamente endêmicas, como no caso da Amazônia Ocidental, o vírus da hepatite B é mais comumente disseminado de mãe para filho ao nascimento (transmissão perinatal), ou através da transmissão horizontal (exposição ao sangue infectado), especialmente entre uma criança infectada para uma não infectada durante os primeiros 5 anos de vida (transmissão intrafamiliar). Nesses casos, o desenvolvimento de infecção crônica é muito mais comum (WHO, 2017).

2.6 Diagnóstico laboratorial para VHB

Em relação ao diagnóstico da hepatite B, existem diversos métodos de diagnóstico que podem ser clínico-laboratorial e laboratorial. Desde os exames específicos feitos através de métodos sorológicos e moleculares como os inespecíficos que incluem as dosagens de aminotransferases (ALT/TGP e AST/TGO) que são sensíveis a lesão do parênquima hepático, mas não são específicos da hepatite viral. Os exames sorológicos detectam anticorpos produzidos em resposta à infecção, antígenos produzidos pelo vírus. Diferentes métodos são usados para diagnóstico e acompanhamento da infecção aguda, ou para detectar infecção

crônica ou assintomática. A relação abaixo mostra os principais marcadores sorológicos usados para detectar a infecção pelo VHB (Inoue, 2016).

HBsAg	Antígeno de superfície da hepatite B
Anti-HBs	Anticorpos contra o HBsAg
Anti-HBc total	Anticorpos totais contra o antígeno c da hepatite B (IgG e IgM)
Anti-HBc IgM	Anticorpos IgM contra o antígeno c da hepatite B
HBeAg	Antígeno e da hepatite B
Anti-HBeAg	Anticorpos contra o HBeAg

O marcador HBsAg e anti-HBc IgM podem ser pesquisados para detectar infecção aguda, assim como o HBeAg; enquanto que para acompanhar a infecção crônica e seu tratamento são pesquisados os marcadores: HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-Hbe e carga viral do VHB e para detectar imunidade ao vírus, adquirida em infecção anterior ou por vacinação pesquisa-se o anti-HBs e anti-HBc total. A pesquisa de marcadores sorológicos também é usada em triagem de populações em risco e de doadores de sangue. Na fase crônica da Hepatite B, o HBsAg permanece no soro durante, pelo menos, 6 meses e a presença do HBeAg persiste por 8 a 10 semanas após o surgimento dos sintomas. Quando o anti-HBe é detectado, geralmente indica uma evolução para cura ou redução da carga viral (Krajden, 2005; Almeida, 2009; Inoue, 2016).

É importante destacar que os exames acima detectam o VHB, mas não avaliam a função hepática. As dosagens de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e gama-glutamil transferase (gama-GT) também são usados para confirmar o diagnóstico de hepatite B. Pode também ser feita uma biópsia hepática para avaliar o estado do fígado. Sabe-se que portadores de fibrose hepática com score F3 apresentam probabilidade de evolução para cirrose de 17%. Pois a presença de atividade necroinflamatória mais intensa sugere evolução mais rápida da doença (Workowski, 2015; Inoue, 2016).

Os exames de diagnóstico molecular são utilizados para detectar a presença do ácido nucléico do vírus (DNA). Os testes podem ser qualitativos (indicam a presença ou ausência do vírus na amostra pesquisada), quantitativos (indicam a carga viral presente na amostra) ou de genotipagem (indicam o genótipo do vírus). Para realização desses testes existem várias técnicas (Polimerase Chain Reaction ou PCR, hibridização, branched-DNA ou b-DNA,

sequenciamento, Transcription Mediated Amplification ou TMA). A definição da técnica a ser utilizada depende da informação clínica que se quer obter tais como presença ou ausência do vírus, replicação viral, genótipo do vírus, pesquisa de mutações no genoma viral, dentre outros (Souza, 2013).

No Brasil, os testes de diagnóstico molecular são disponibilizados pelo Ministério da Saúde (MS) através da Rede de Carga Viral do SUS e são utilizados para: confirmação diagnóstica; detecção da viremia; monitoramento terapêutico; na suspeita de mutação pré-core do HBV (pacientes HBeAg não reagentes para diferenciar portador inativo de pacientes com hepatite crônica) e na suspeita de resistência à lamivudina (Brasil, 2017).

Desse modo, segundo critérios do MS, "o HBV-DNA deve ser utilizado em situações onde há indicação de agressão hepatocelular e suspeitas de que os pacientes desenvolveram cepas mutantes do vírus mediante pressão imunológica (pré-core) ou no curso de terapia anti-viral (YMDD). Nestas circunstâncias os marcadores sorológicos de replicação viral são negativos, sendo necessário fazer exames de biologia molecular, onde poderá ser detectado o DNA viral em alta circulação no soro, o que caracteriza replicação viral ativa" (Brasil, 2015).

2.7 Mutação na Região da Polimerase do genoma VHB

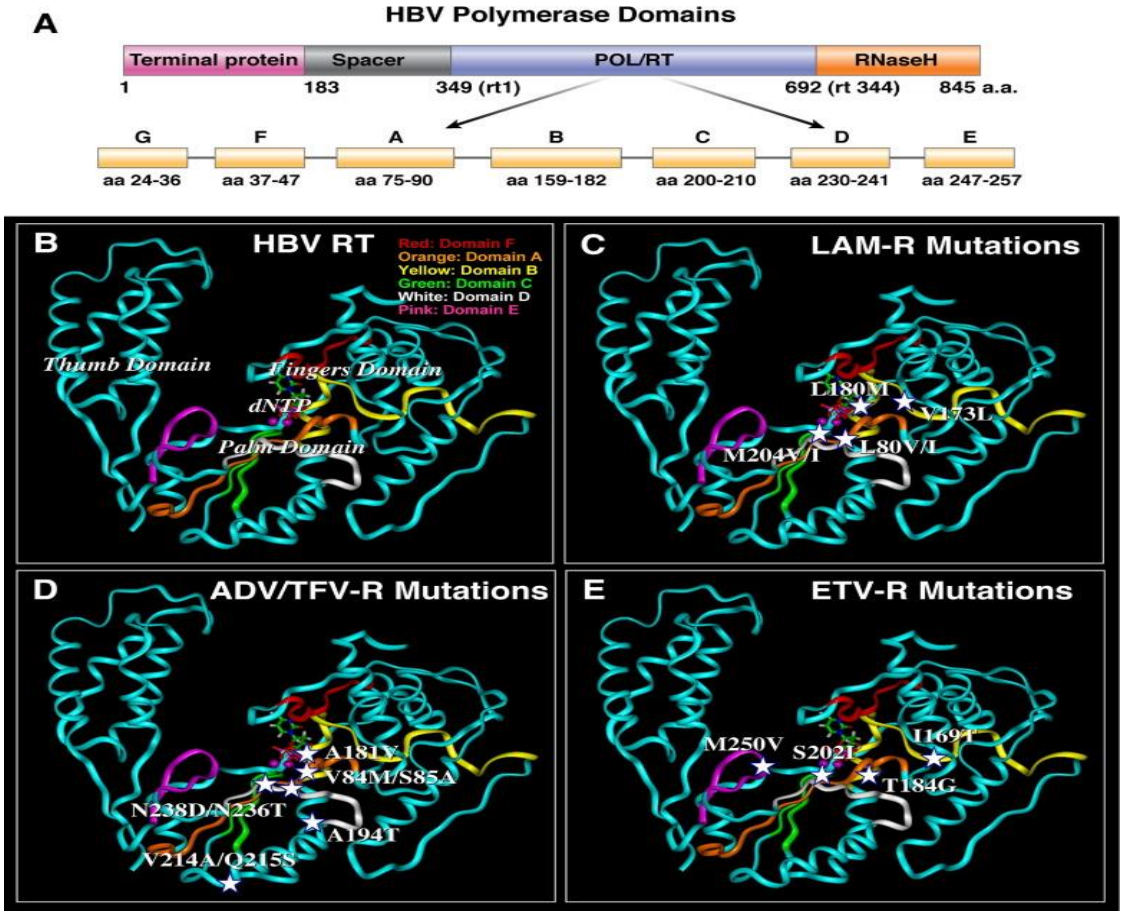
A polimerase do VHB é uma proteína multifuncional que possui quatro domínios: uma região de iniciação; uma região espaçadora de função desconhecida; uma região catalítica que funciona como RNA polimerase/DNA polimerase dependente de RNA e uma região carboxi-terminal que possui atividade ribonuclease H (Figura 7A-D). Apesar da estrutura cristalina da polimerase do VHB ser desconhecida, grande parte da sua estrutura foi deduzida a partir da homologia com a transcriptase reversa (RT) do HIV-1. Foi possível, por exemplo, criar modelos tridimensionais da região da transcriptase reversa (rt) da polimerase do VHB com base nesta homologia. Permitindo entender que as alterações de aminoácidos resultantes de mutações que conferem resistência antiviral podem ser mapeadas em regiões funcionais fornecendo uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência (Ghany, Liang, 2007; Warner, Locarnini, 2014).

Porém é importante ressaltar que ao contrário do HIV, a polimerase do VHB mostra uma preferência por nucleotídeos com a configuração L em contraste com outras polimerases

que preferem nucleotídeos com a configuração D (Ghany, Liang, 2007; Warner, Locarnini, 2014).

A região catalítica da polimerase pode ser subdividida em 7 domínios: A – G (Figura 7A). O Domínio **A** está próximo aos 2 resíduos de ácido aspártico no domínio **C** e faz parte da região de ligação do dNTP. Resíduos neste domínio estão envolvidos na coordenação da porção trifosfato de entrada do dNTP e dos íons de magnésio; o domínio **B** forma um hélice com uma região de laço e está envolvida com o posicionamento da cadeia molde-iniciador na região catalítica; O domínio **C** contém uma sequência de 4 aminoácidos, tirosina, metionina, aspartato, aspartato (YMDD), que é altamente conservada entre polimerases virais / transcriptases reversas que se ligam a 2 íons magnésio e representa o sítio ativo da enzima. Os resíduos dentro do domínio **D** estão fora, mas podem contribuir para o sítio de ligação do dNTP ao RT do HIV-1. Mutações neste domínio podem afetar indiretamente a geometria do sítio de ligação do dNTP. Na RT do HIV-1, o domínio **E** faz parte do sítio de ligação da matriz-*primer*. O primeiro fio contata as alças entre a palma e o polegar em rtM230 e rtG231. Os resíduos de metionina e glicina presentes no domínio **E** são conservados em todos os isolados de HBV. Os domínios **F** e **G** estão a montante do domínio **A**. Essa região pode estar envolvida nas interações com o dNTP recebido e também com o modelo de nucleotídeo (Ghany, Liang, 2007).

Figura 07. **(A)** Esquema do enquadramento de leitura aberta da polimerase de VHB ilustrando os 4 domínios funcionais e os 7 subdomínios catalíticos A-G. **(B)** Estrutura da polimerase baseada no modelo de RT do HIV-1 e adaptada de Das e et al. Conforme ilustrado neste diagrama da fita, a polimerase do VHB tem uma configuração com a mão direita com o polegar, palma e domínios de dedos. As posições aproximadas dos domínios conservados A – E são mostradas pelas fitas coloridas Domínios A, C e D participam diretamente na ligação de dNTP e na catálise. Os domínios B e E estão envolvidos com o posicionamento preciso do modelo de iniciador-molde em relação ao local ativo. **(C)** Localização das principais mutações da lamivudina em relação aos domínios conservados. **(D)** Localização das principais mutações de adefovir e tenofovir em relação aos domínios conservados. **(E)** Localização das principais mutações do entecavir em relação aos domínios conservados. Fonte: Ghany, Liang, 2007



2.7.1 Resistências Moleculares aos Análogos de Nucleotídeos

O VHB tem uma alta taxa de replicação, com 10^{12} *virions* produzidos por dia e uma alta taxa de mutação de aproximadamente 10^{5} substituições/base/ciclo. Isso se traduz em aproximadamente $10^{10\text{-}11}$ mutações pontuais produzidas por dia em indivíduos com replicação ativa. Como o genoma do VHB é de aproximadamente 3.200 pares de bases, todas as possíveis alterações de base única podem ser produzidas por dia. A Transcriptase do VHB não possui uma função de revisão para reparar nucleotídeos incorretamente incorporados.

Portanto, as mutações pontuais podem surgir muito rapidamente. A probabilidade de uma mutação ser selecionada durante a terapia depende da capacidade de uma droga para suprimir a replicação viral. Assim, um fármaco com baixa atividade antiviral não exerce pressão seletiva substancial sobre o vírus, e a chance de resistência a drogas não é alta. Por outro lado, a completa supressão da replicação viral permite poucas oportunidades de surgimento de resistência, porque a mutagênese é dependente da replicação do genoma viral. (Warner, Locarnini, 2014).

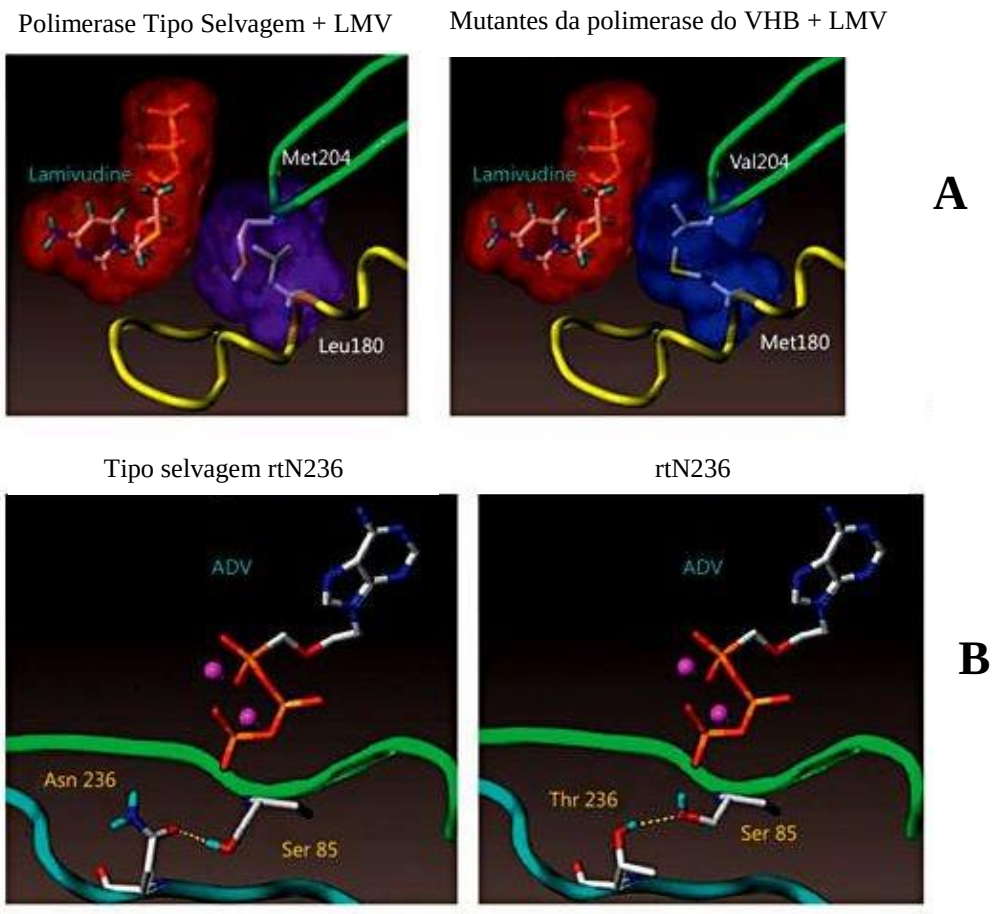
Os Análogos Nucleotídeos inibem a replicação viral, mas não eliminam o vírus existente ou afetam o reservatório de cccDNA de qualquer maneira importante. A monoterapia exercendo uma atividade antiviral modesta e direcionada a um único local-alvo resultaria na maior probabilidade de selecionar a resistência a medicamentos antivirais. O regime de tratamento ideal deve ter atividades antivirais direcionadas a diferentes locais para reduzir o risco de selecionar espécies resistentes a medicamentos. A resistência surge quando a replicação ocorre na presença da pressão de seleção de drogas. Portanto, se pudéssemos alcançar a completa supressão da replicação, a resistência não seria um problema. Outros fatores que contribuem para o surgimento da resistência aos medicamentos são as barreiras genéticas ao desenvolvimento de mutações, mecanismo de resistência a drogas, espaço de replicação viral e vários fatores do hospedeiro envolvidos no controle da replicação viral. (Sablon, Shapiro, 2005).

2.7.2 Mecanismos Moleculares de Resistência às Drogas

Um mecanismo molecular de resistência para Lamivudina (LMV) foi proposto com base na estrutura cristalina do HIV RT. O LMV liga-se a uma bolsa na superfície da RT VHB (região da palma) formada em parte pelo resíduo rtM204. Prevê-se que as substituições primárias de LMV rtM204V/I reduzam a área de superfície acessível entre a RT VHB e a LMV porque o grupo metila na cadeia lateral ramificada de valina/ isoleucina agora colide com o átomo de enxofre no anel de L-oxatiolano não natural LMV (Figura 8A). Essas alterações estruturais têm dois efeitos principais: (1) impedimento estérico para diminuir a ligação do LMV à polimerase viral e (2) reduzir a atividade catalítica para incorporar o LMV-trifosfato no DNA viral replicante. Essas substituições não afetam a ligação do substrato natural, citosina, à polimerase viral, e, portanto, a polimerase ainda está ativa na replicação viral. Para Adefovir (ADV) também foi proposto com base nesses modelos de homologia

focando nos domínios A e D para como a mutação mais comum do ADV, rtN236T, que está fora do sítio catalítico, leva à resistência do ADV (Figura 8B). Acredita-se que os domínios A e D estejam envolvidos na ligação do dNTP e a modelagem sugeriu que o rtN236 no domínio D pode ser ligado por hidrogênio ao rtS85 fisicamente adjacente do domínio A, interagindo diretamente com o γ fosfato de ADV difosfato. A mutação rtN236T pode romper a ligação de hidrogênio entre rtN236 e rtS85 e também entre o difosfato rtN236 e ADV, diminuindo assim a afinidade de ligação para ADV. Em contraste, as mutações que afetam a α-hélice do domínio B parecem alterar o posicionamento da cadeia molde de ácido nucléico em relação à região catalítica. As mudanças de rtA181T/V podem dobrar as hélices através da formação de ligação de hidrogênio, e a resistência a fármaco pode facilmente resultar de uma mudança alostérica no sítio catalítico. Para Tenofovir (TFV), o resíduo rtA194 está localizado em uma alça no final do domínio B, que contém a α-hélice que interage com o modelo de ácido nucleico. A substituição do rtA194T pode afetar a eficiência da polimerização, causando alterações alostéricas que resultam em desalinhamento entre o molde e o local de ligação do dNTP. A modelação molecular do códon rt194 revelou que o resíduo está localizado na charneira de uma hélice a que forma a hélice a do domínio B (a região de ligação ao molde de DNA) com a folha β do domínio C. O rtA194T pode alterar a posicionamento da cadeia molde de DNA relativamente ao local de ligação ao dNTP e, desse modo, afetar a polimerização do DNA. Para a resistência à Entecavir (ETV), a modelagem molecular sugeriu duas vias possíveis com mecanismos bastante diferentes para resistência à ETV. A modelagem do primeiro grupo de alterações nas posições rt169 e rt250 revela que estas alternações de códons têm um impacto na região de ligação ao iniciador da RT, que interage com o terminal 3’ do molde de DNA. A mutação rt250 parece alterar a interação de ligação entre o primer *strand e template* DNA. O rt169 interage com o dNTP e pode trabalhar cooperativamente com a mutação no rt250. (Sablon, Shapiro, 2005; Ghany, Liang, 2007; Warner, Locarnini, 2014).

Figura 8. A) Modelagem molecular mostrando impedimento estérico com VHB rtM204V e LMV (direita). **B)** Modelagem molecular mostrando geometria alterada causado por rtN236T, resultando em perturbação do domínio A – D. Fonte: Warner, Locarnini, 2014



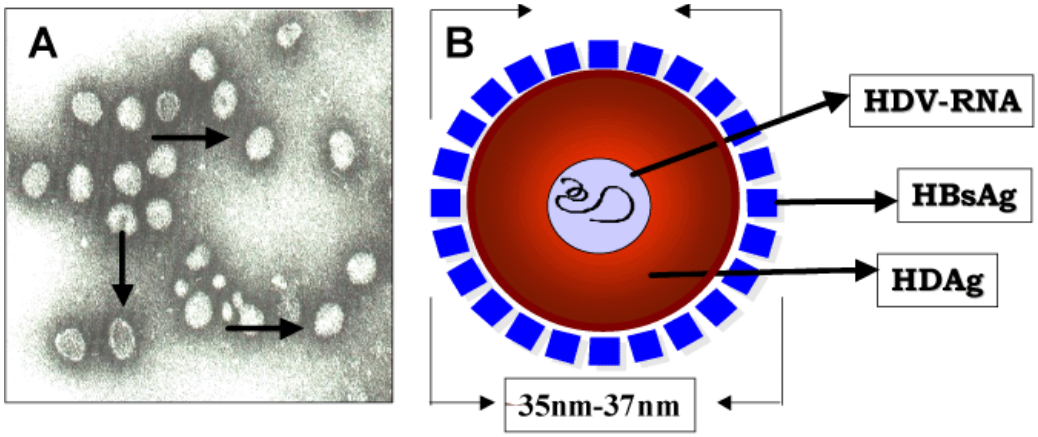
2.8 Classificação e organização do genoma do VHD

O vírus da hepatite D (VHD), também chamado de Delta, foi descoberto por Rizzeto em 1977. É um vírus defectivo que precisa do antígeno HBsAg do vírus B para fazer sua replicação. É reconhecido como o mais patogênico e infeccioso entre os vírus hepatotrópicos. Possui características biológicas que os diferenciam dos demais vírus das hepatites e é um vírus de RNA, único membro da família Deltaviridae, gênero *Deltavirus* (Rizzeto, 1987; Foccacia, 1997; Fonseca, 2002).

O VHD possui composição híbrida, isto é, é composto por uma partícula esférica, medindo cerca de 35nm a 37nm de diâmetro. Essa partícula viral ou *virion* é revestida externamente pelas três formas de HBsAg, do qual é dependente para infectar as células do fígado. No nucleocapsídeo encontra-se o genoma circular composto por uma molécula de

ácido ribonucleico (RNA) de fita simples circular, covalentemente fechado, de polaridade positiva contendo 1700 nucleotídeos (Figura 9) e a proteína HDAg que tem função de antígeno da hepatite D (HDAg). O RNA viral é uma ribozima (molécula de ácido nucleico com capacidade catalítica) (Hughes, 20111; Smedile et al., 2013). O genoma do VHD possui, portanto, uma única ORF que codifica o antígeno delta HDAg que é formado por duas proteínas, uma curta (short) denominada de HDAg-S e outra longa (long) chamada de HDAg-L, com 24 kilodaltons e 27 daltons de peso molecular, respectivamente. A forma curta (HDAg-S) utilizada para a replicação e a longa (HDAg-L) para inibir a replicação do RNA e promover o envelopamento do RNA (Focaccia, 1997; Silva, 2012).

Figura 9. Estrutura do Vírus da Hepatite Delta (VHD). A) Microscopia eletrônica do VHD; B) Representação esquemática da partícula do VHD com envoltório do VHB (HBsAg) (Fonseca, 2002).



2.9 Ciclo de Replicação do VHD

O mecanismo de entrada do VHD nos hepatócitos humanos não é claramente entendido, no entanto, acredita-se ser semelhante ao do VHB, pois esses vírus compartilham o mesmo antígeno de superfície (HBsAg) no seu revestimento externo. Os aminoácidos N-terminais do domínio pré-S1 de L-HBsAg são assim obrigatórios para a entrada do VHD nos hepatócitos (Abbas, 2013).

Após o VHD entrar na célula, ocorre o não revestimento da partícula viral e o HDAg transloca-se para o núcleo. Então, o vírus utiliza a RNA polimerase (I, II) das células hepáticas do hospedeiro, que são utilizadas para replicar o genoma (Lai, 2005).

Durante a replicação três formas de RNA são feitas no hospedeiro: RNA genômico, RNA antigenômico e RNA mensageiro (mRNA) que contém a estrutura responsável por codificar a síntese de HDAg. A polimerase I envolve a transcrição do RNA antigenômico do genoma viral no nucléolo, enquanto que a polimerase II catalisa a replicação do genoma do RNA-antigenômico e a transcrição do mRNA no nucleoplasma (Hughes, 2011; Abbas, 2013)

Para a replicação, o VHD utiliza seu próprio genoma como enzima para clivar os produtos da sua transcrição. O RNA-VHD é primeiramente sintetizado como uma molécula linear e uma sequência de 85 nucleotídeos que atua como uma ribozima, a qual auto-cliva o RNA-VHD linear em monômeros (Sureau, 2016).

Estes monômeros são então ligados para formar RNA circular do VHD. As ribozimas são consideradas como uma característica dos viroides das plantas, mas uma sequência auto-clivável de RNA codificada no gene CPEB3 no genoma humano está estruturalmente e bioquimicamente relacionada com as ribozimas do VHD, a partir dessa informação acredita-se que o VHD tenha surgido do transcriptoma humano (Taylor, 2006).

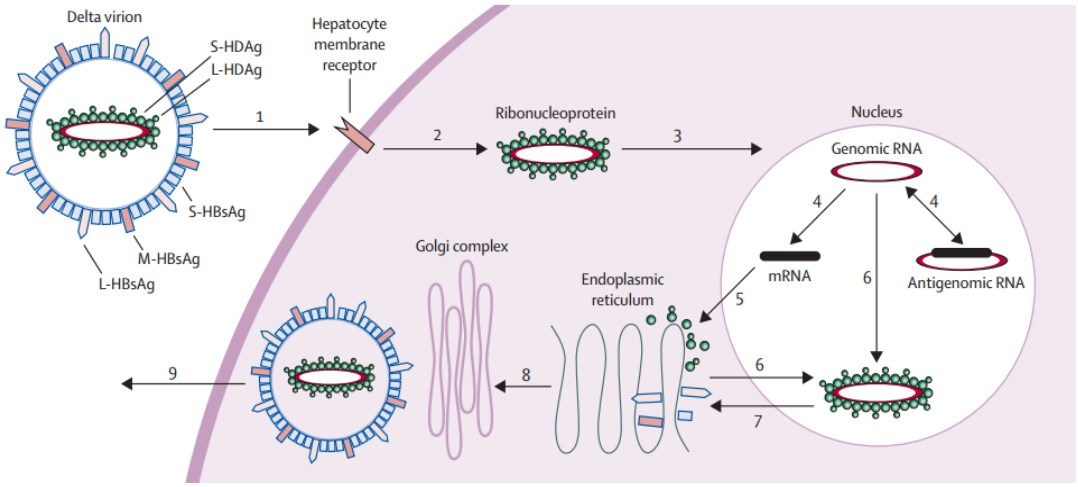
O RNA antigenômico (HDAg), consiste em duas isoformas: 27-kDa L-HDAg com 214 aminoácidos e S-HDAg de 24 kDa com 195 aminoácidos, sendo a sequência N terminal das duas isoformas a mesma, se diferenciando apenas por 19 aminoácidos no terminal C do L-HDAg. O RNA antigenômico gera ambas as isoformas devido à heterogeneidade no RNA no códon 196. Um stop códon UAG nesta posição conduz à tradução de S-HDAg, porém a edição de RNA pela enzima celular adenosina desaminase-1 altera a sequência para UGG e, produzindo assim o L-HDAg (Lai, 2005; Hughes, 2011).

O S-HDAg retorna ao núcleo e suporta a replicação viral, enquanto que o L-HDAg é um regulador negativo da replicação e essencial para a montagem de RNA-VHD. Diante disso, a edição de RNA é de suma importância para o ciclo de replicação deste patógeno, pois além de controlar os níveis de cada isoforma, também mantêm o equilíbrio entre a síntese viral e montagem de partículas. A alteração pós-tradução de L-HDAg, é parte fundamental da sua habilidade de se ligar ao HBsAg e de montar a partícula viral (Tseng, 2009).

A fosforilação de um resíduo de serina na posição 177 (Ser-177) do S-HDAg aumenta a replicação do RNA antigenômico por interagir com RNA polimerase II, enquanto que a sumoilação de S-HDAg aumenta a síntese de RNA genômico e mRNA (Tseng, 2009; Hughes, 2011; Abbas, 2013).

Para que ocorra a replicação da cadeia de RNA antigenômico para formar a cadeia de RNA genômico é essencial que haja a metilação de S-HDAg. Portanto, as alterações pós-traducionais vão determinar o equilíbrio do ciclo de vida viral. No núcleo, moléculas de L-HDAg formam complexos com S-HDAg e novas construções de RNA genômico, e esses complexos são exportados para as membranas de Golgi por um sinal no C-terminal de L-HDAg. Uma vez lá, esses complexos se associam às proteínas do envelope do VHB para criar VHD infeccioso (Hughes, 2011).

Figura 10. Representação esquemática da partícula do VHD e seu ciclo de vida. (Hughes, 2011)



2.10 Epidemiologia do VHD

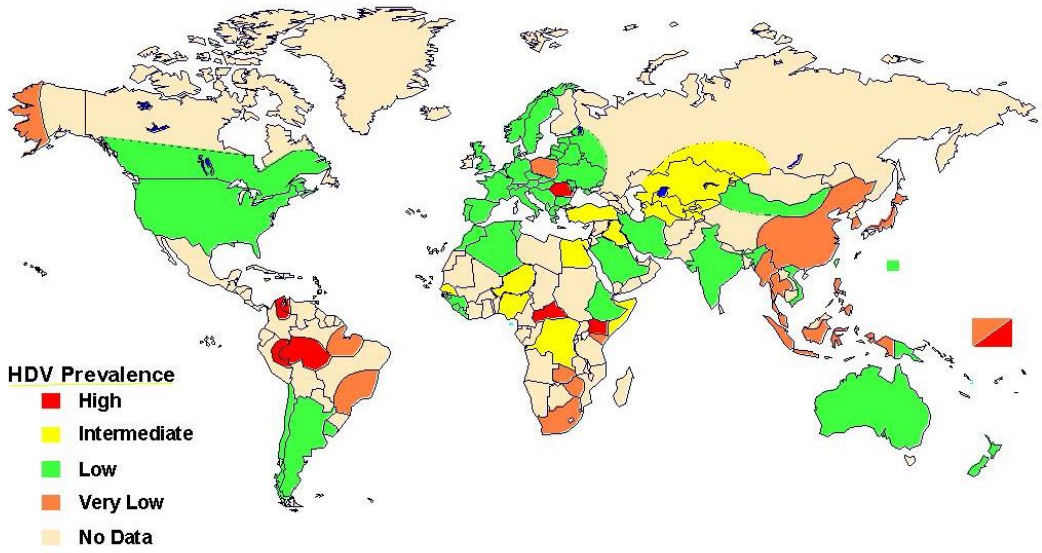
O portador crônico do VHB (HBsAg reativo) é o principal fator epidemiológico para o alastramento do VHD nas áreas de alta endemicidade de infecção pelo vírus da hepatite B (Focaccia, 1997; Fonseca, 2002).

Em áreas endêmicas de hepatite B, a infecção pelo VHD representa grave problema de saúde pública, nos países mediterrâneos, no Oriente Médio, na África Central e no norte da América do Sul (Wendemeyer, 2010; Silva, 2012).

Hoje sabemos que cerca de 240 milhões de pessoas no mundo são consideradas portadoras crônicas de infecção pelo VHB e estima-se que desse valor, 15 milhões são portadoras de infecção pelo VHD no mundo (Nunes, 2010; Wendemeyer, 2010).

Os dados sobre a prevalência de VHD ainda estão distantes em grandes áreas do mundo, não estão apenas agrupados em países com baixo desenvolvimento socioeconômico. As principais áreas de prevalência são a bacia mediterrânea, o Oriente Médio, a Ásia Central e do Norte, a África Ocidental e Central, a bacia amazônica, a América do Norte e a região Ásia-Pacífico (Silva, 2012; Romeo, 2014; François-Souquiere, 2015).

Figura 11. Estimativa da epidemiologia mundial da infecção pelo vírus da hepatite delta. (Romeo, 2014)



Outro país que apresenta alta ocorrência de infecção pelo VHD é a Mongólia, onde um terço das infecções crônicas por hepatites são atribuíveis ao VHD (Hughes, 2011; Romeo, 2014).

A prevalência da infecção por VHD mudou bastante nas últimas décadas em diferentes partes do mundo. Principalmente no sul da Europa, Taiwan e Turquia, onde houve uma diminuição significativa da ação deste patógeno, devido às campanhas de vacinação para o VHB junto a fatores adicionais, incluindo a maior conscientização do vírus e seu modo de transmissão, levando a uma melhor implementação de medidas preventivas, como a mudança para agulhas descartáveis, seringas e outros equipamentos médicos, melhoria das condições socioeconômicas e proteção contra doenças sexualmente transmissíveis (Fonseca, 2002; Hughes, 2011; Romeo, 2014).

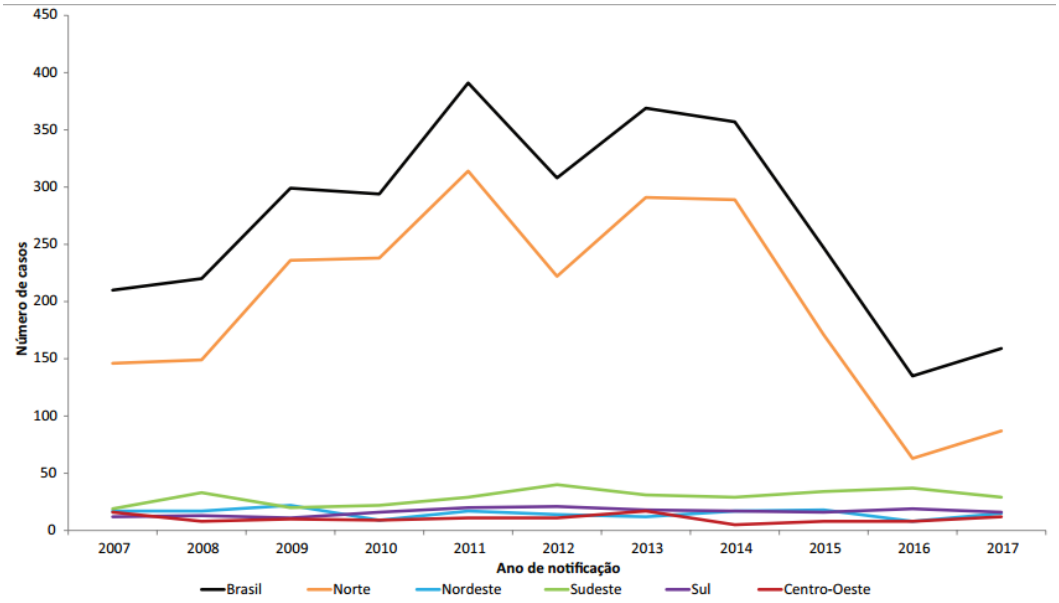
Na Itália, o predomínio de anti-HDV em portadores crônicos de HBsAg foi de 24,7% em 1978-1981, 28% em 1987, mas diminuiu para 14% em 1992 e para 8,3% em 1997. Na Turquia, a prevalência observada em portadores crônicos de VHD e cirrose entre 1980 e 2005 foram de 20% e 32%. Porém em países como Paquistão e Irã observou-se prevalência crescente ao longo do tempo e a presença de VHD tem sido descoberta em novas regiões. No entanto a presença de VHD não é mais detectada em várias áreas do mundo, como em Londres, Alemanha e Itália (Hughes, 2011; Romeo, 2014; François-Souquiere, 2015).

Na França observa-se aumento na taxa de infecção por VHD, a razão para isto é devido a crescente imigração da Europa Oriental, África, Turquia, ou seja, atribuível à imigração de indivíduos de áreas altamente endêmicas. Existem dados limitados sobre a epidemiologia da hepatite D nos EUA (Nunes, 2010; Hughes, 2011; Romeo, 2014).

Independente da alta prevalência de portadores do VHB na população da Ásia, a taxa de infecção pelo VHD mostra-se baixa, isso acontece, pois, o VHD não se encontra difundido na população geral, ou então, há resistência genética dessas populações à infecção pelo VHD (Fonseca, 2002).

No Brasil, período de 1999 a 2017, foram notificados 3.833 casos confirmados de hepatite D. A maior ocorrência se deu na região Norte do país, com 75,0% dos casos notificados. As regiões Sudeste, Sul, Nordeste e Centro-Oeste abrangeram 10,4%, 5,8%, 5,4% e 3,4% dos casos, respectivamente. Em 2017, foram notificados 159 casos no país, sendo 87 (54,7%) na região Norte (Figura 12). (SINAM, 2018)

Figura 12. Casos de hepatite D segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017.



A maioria dos casos de VHD notificados concentram-se na Amazônia Ocidental, com uma das maiores incidências mundiais desse patógeno. Além disso, nessa região encontramos mais de 20% de positividade para o anti-VHC entre os indivíduos VHB assintomáticos e 90% ou mais entre os portadores de hepatite B crônica. A Amazônia oferece condições ambientais, sociais, culturais e aspectos genéticos da população que contribuem para a circulação do VHD. Em certas regiões do país, a prevalência de infecção por VHB é pouco significativa (Fonseca, 2002; Silva, 2012; Romeo, 2014).

As regiões da Amazônia brasileira, principalmente as bacias dos rios Juruá, Solimões e Purus, no estado do Amazonas, são consideradas altamente endêmicas por VHB e VHD representando importante problema de saúde pública com casos graves de hepatite aguda e crônica (Crispim, 2014). Nessa região também foi documentado pela primeira vez uma forma atípica de hepatite conhecida como "Febre Negra de Lábrea", em decorrência do primeiro registro desta entidade ter sido no município de Lábrea localizada no estado do Amazonas (Fonseca, 2002). Posteriormente, essa entidade foi denominada de hepatite fulminante e em 1983, foi sugerida a participação do VHB na etiopatogenia da hepatite fulminante de Lábrea (Bensabath, 1983). Após 1983, estudos soro epidemiológicos com relação à infecção pelo VHB e VHD na Amazônia Ocidental revelaram dados preocupantes (Braga 2004).

2.11 Diversidade Genética do VHD

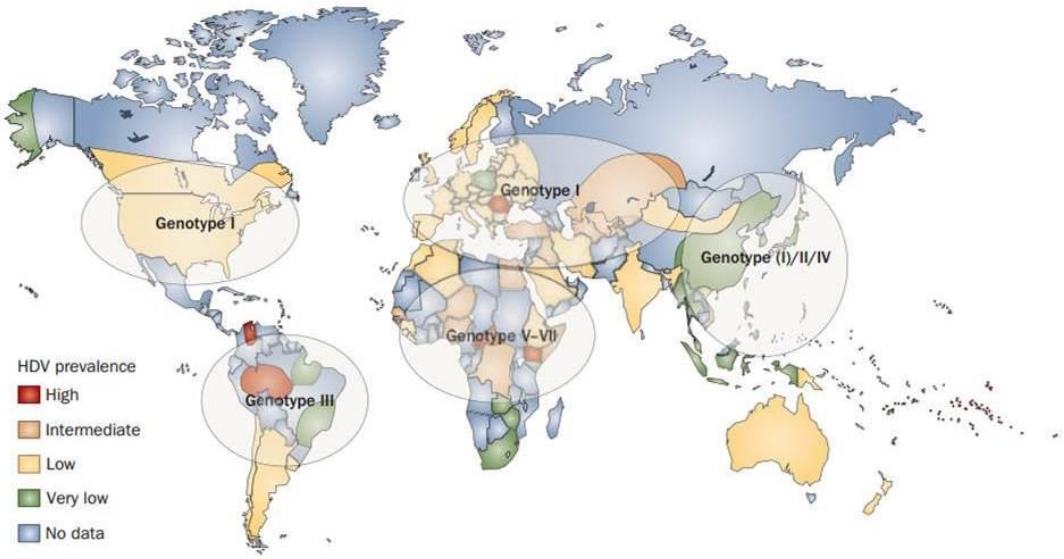
Em relação à diversidade genética do VHD, atualmente está classificado em oito clados ou genótipos distribuídos em áreas geográficas específicas (Barros, 2011).

O genótipo 1 (HDV-1), por exemplo, é encontrado em quase todas as partes do mundo, é o mais comum, especialmente na Europa, no Oriente Médio, na América do Norte e na África do Norte (Wendemeyer, 2010; Abbas, 2013); o genótipo 2 e 4 (HDV-2 e HDV-4) são encontrados na Ásia Oriental, sendo o 2 encontrado no Japão, Taiwan e Rússia e o 4 encontrado em Taiwan e Japão (Foupouapouognigni, 2011; Meshkat, 2015).

O genótipo 3 (HDV-3) é encontrado exclusivamente na região norte da América do Sul, sendo bastante comum na Bacia Amazônica do Brasil, Peru, Colômbia e Venezuela (Abbas et al., 2010; Hughes, 2011; Meshkat, 2015; di Filippo Villa et al., 2015; Braga et al, 2014; Alvarado-Mora et al., 2011; Nguyen et al 2017) e os genótipos 5 a 8 foram

identificados em indivíduos da África Ocidental e Central, incluindo aqueles que migraram para o norte da Europa (Hughes, 2011; Romeo, 2014, Nguyen et al 2017).

Figura 13. Prevalência mundial de VHD e distribuição de seus genótipos. (Hughes, 2011)



2.12 Transmissão do VHD

Segundo a literatura, o VHD é um vírus dependente do VHB para sua replicação e transmissão (Silva, 2012). Porém, existem duas maneiras de adquirir o VHD, ou por uma coinfecção, quando se adquiri o VHD juntamente com o vírus da hepatite B ou posteriormente após o indivíduo ter sido infectado pelo VHB, nesse caso chamamos de superinfecção. A evolução do quadro clínico da doença depende muito do tipo como o indivíduo foi infectado. Sendo assim, na coinfecção geralmente a hepatite é mais branda e somente 5% dos casos evoluem para a forma crônica, em contraste, na superinfecção, cerca de 70% -90% dos indivíduos infectados se tornarão portadores crônicos, geralmente o dano hepático é mais grave progredindo mais rapidamente para quadros de cirrose, descompensação hepática e, eventualmente, hepatite fulminante (Fonseca, 2002; Giersch et al, 2014).

As vias de transmissão de VHD são as mesmas do VHB: contato percutâneo, sanguínea, sexual, permucosa, perinatal e através do contato com sangue, produtos sanguíneos infectados ou fluídos corporais. Uma vez que apenas um inóculo muito pequeno demonstrou ser suficiente para a transmissão do vírus (Xiridou, 2009; Romeo, 2014; WHO, 2016).

O risco de transmissão vertical é baixo e a infecção pelo VHD é incomum em populações com altas taxas de infeção infantil e infância no VHD. O contato sexual é, no entanto, um modo significativo de transmissão de VHD em áreas endêmicas (Francois-Souquiere, 2015).

A transmissão parenteral inaparente tem sido relatada como comum em áreas de alta endemicidade, onde a disseminação intrafamiliar da infecção é comum, ocorrendo mais frequentemente entre parceiros sexuais ou irmãos do que entre pais e filhos (Zanetti, 1987; Romeo, 2014).

A transmissão perinatal de VHD é incomum. Devido ao rastreio de produtos sanguíneos, novas infecções em hemofílicos, receptores de transfusão de sangue e pacientes em hemodiálise não são mais vistas nos países desenvolvidos (Hughes, 2011).

A vacinação contra o VHB evita a coinfecção por VHD e, portanto, a expansão dos programas infantis de imunização contra o VHB resultou em um declínio da incidência de hepatite D em todo o mundo. No entanto, em alguns contextos, o aumento da prevalência de hepatite D tem sido observado em pessoas que injetam drogas, ou como resultado da migração de áreas onde o VHD é endêmico (Fonseca, 2002; WHO, 2016).

A coinfecção VHD + VHB pode estar associada a infecções complexas e Padrões de dominância. A infecção crônica por VHD leva a uma doença hepática mais grave do que a monoinfecção associada à progressão acelerada da fibrose, descompensação hepática precoce e aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Grabowski, 2010). Em determinadas áreas do norte da América do Sul, a exemplo da Amazônia brasileira e venezuelana, a transmissão do VHD pode ocorrer por exposição inaparente, principalmente relacionada com efrações da pele por picadas de insetos ou através das mucosas (Fonseca, 2002; Grabowski, 2010).

2.13 Diagnostico Laboratorial para o VHD

O diagnóstico específico da infecção por VHD envolve a detecção de antígeno delta em biópsia hepática ou em soro. O antígeno deste vírus (HDAg) encontra-se no núcleo dos hepatócitos e em fases mais avançadas da doença no citoplasma (Monjardino, 1990; Fonseca, 2002; Noureddin, 2014). É de suma importância conhecer se a infecção por VHD foi através de coinfecção ou de superinfecção, pois, essas duas formas apresentam prognósticos diferentes (Saraceni, 2001).

O diagnóstico do VHD baseia-se em testes sorológicos, os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) são os mais utilizados para pesquisa do anti-HD IgG, do anti-HD IgM e do HDAg. O HDAg que é marcador de infecção aguda e o anti-HD Total (anti-HD IgG, do anti-HD IgM) é o teste de triagem para infecção passada ou crônica (Saraceni, 2001; Hughes, 2011). A relação abaixo mostra os principais marcadores sorológicos usados para detectar a infecção pelo VHD.

HDAg	Antígeno do vírus da hepatite D (Delta)
Anti-HD IgG	Anticorpos IgG contra o HDag
Anti-HD IgM	Anticorpos IgM contra o HDag
Anti-HD total	Anticorpos totais contra o antígeno da hepatite D (IgG e IgM)
Anti-HBc IgM	Anticorpos IgM contra o antígeno c da hepatite B
Anti-HBc IgG	Anticorpos IgG contra o antígeno c da hepatite B

Na coinfecção, aparece normalmente anti-HDV IgM e depois converte em anti HDV IgG. Os níveis de RNA de VHD atingem níveis elevados no soro. HBV IgM anti-HBc também será encontrado para ser positivo nesta coinfecção aguda. Na superinfecção, os anticorpos VHD mostram-se precocemente como IgM, seguido por IgG anti-HDV, enquanto que o anti-HBc é apenas IgG. Os anticorpos podem aumentar na superinfecção à medida que a doença progride para cronicidade e podem estar presentes em títulos elevados juntamente com RNA positivo de VHD (Saraceni, 2001; Oliveiro, 2012; Noureddin, 2014).

Por meio de métodos moleculares, como a técnica transcriptase reversa (RT) seguida de PCR (Polymerase Chain Reaction) e hibridização molecular é realizado o isolamento do RNA do vírus delta. O RNA VHD possui grande relevância para o diagnóstico e sua presença sugere um alto grau de infectividade. Todos os pacientes com VHD também precisam de investigação para o VHC e o HIV porque a coinfecção com esses vírus é comum (Fonseca, 2002; Hughes, 2011).

O método de análise genética do genoma VHD por PCR e sequenciamento direto, está ganhando aceitação como um teste diagnóstico útil por ser mais confiável, principalmente quanto à avaliação de seu prognóstico e gravidade da infecção (Saraceni, 2001; Fonseca, 2002; Hughes, 2011).

Portanto, sabendo que o Estado do Amazonas se localiza dentro de uma área endêmica de infecção pelos vírus B e D, o conhecimento gerado pela presente pesquisa ampliará as informações sobre o padrão epidemiológico molecular dos genótipos do VHB e VHD na região. Além disso, trata-se do primeiro estudo que visa investigar a associação entre o perfil genotípico do VHB e VHD simultaneamente tanto no plasma quanto no tecido hepático de pacientes coinfectados, a fim de verificar possível diversidade genotípica nesses dois órgãos e que possam estar contribuindo para progressão mais acelerada da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar os genótipos do vírus da hepatite B e D no plasma e tecido hepático e investigar possível associação dos genótipos com a evolução da doença.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a diversidade genotípica do vírus B e D simultaneamente em amostras de plasma e tecido hepático da população investigada;
- Determinar a carga viral do vírus da hepatite D em amostras de plasma e tecido hepático da população investigada.
- Determinar a frequência de mutações de resistência do VHB aos análogos de nucleos(t)ídeos;
- Identificar possível associação entre genótipos virais e a evolução da doença na população de estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

Estudo do tipo analítico experimental que visa a caracterização molecular dos genótipos dos vírus das hepatites B e D em amostras de plasma e tecido hepático de pacientes HBsAg e Anti-HD Total positivos, atendidos na demanda espontânea do ambulatório de Hepatopatias da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), no período de julho de 2016 a julho de 2017.

4.2 Local de Estudo

Este estudo foi conduzido no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas, Blocos "M", em parceria com pesquisadores da Gerência de Virologia da FMT-HVD. A FMT-HVD é uma unidade terciária de saúde referência no atendimento, diagnóstico e tratamento de pacientes portadores de hepatites virais no Estado do Amazonas.

4.3 Considerações Éticas

Este estudo é uma ampliação do projeto: "**Fatores associados à doença hepática crônica avançada compensada pelo vírus da hepatite delta**", coordenado pela pesquisadora **Alinne Lais Bessa Maia** médica Gastroenterologista e Endoscopista. O adendo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD, CAAE No 55957816.0.0000.0005/2016 (Anexo). A atual proposta visa estudar a diversidade genotípica do VHB e VHD em amostras de plasma e de biopsias hepáticas (quando possível) coletadas durante no projeto acima identificado.

No momento da consulta ambulatorial os pacientes foram convidados participar do estudo, ao mesmo tempo em que foram esclarecidos os objetivos e relevância do mesmo. Aqueles que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo) autorizando a coleta e uso de sua amostra de sangue.

A proposta original também previa a realização de biopsias hepática daqueles pacientes que apresentassem exames laboratoriais alterados sugestivos de agressão viral ao fígado. Esse procedimento foi realizado pela pesquisadora acima identificada e por ser considerado um procedimento cirúrgico de pequeno porte foi realizado no ambiente hospitalar

do Hospital-Dia da FMT-HVD. Esse procedimento só é permitido em caso de indicação pelo infectologista mediante uma série de critérios clínicos e laboratoriais, dentre eles, os exames de bioquímicos, de imagem, e cardiológico.

4.4 População de Estudo

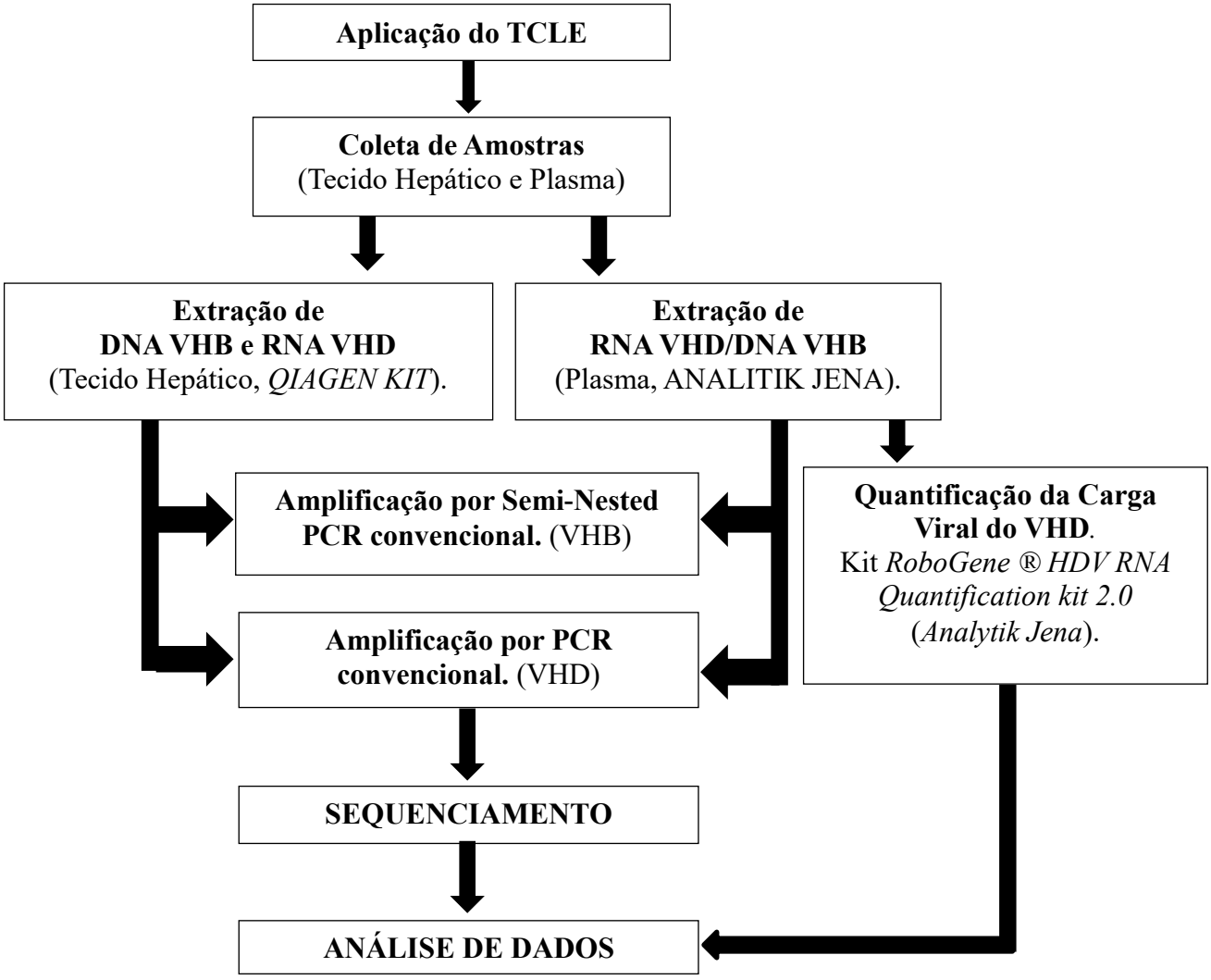
Foram incluídos no estudo 30 amostras de sangue de pacientes Anti-HDV Total reativo que procuraram atendimento clínico na FMT-HVD. Desses, 09 tinham também amostras de biópsias de tecido hepático. No período de julho de 2016 a julho de 2017.

4.5 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos neste estudo, amostras de pacientes com sorologia reativa para os marcadores sorológicos HBsAg e AntiHD Total, independente do quadro clínico de infecção (cirrose hepática, hepatocarcinoma ou portador assintomático), de ambos os sexos, com idade acima dos 18 anos, com e sem tratamento e que aceitaram participar voluntariamente do estudo. Todos os pacientes assinaram o TCLE concordando com o uso de suas amostras biológicas para estudos posteriores. Foram excluídas do estudo amostras insuficientes para análise.

4.6 Procedimentos laboratoriais

Segue abaixo o fluxograma de atividades desenvolvidas no projeto.



4.7 Coleta de amostras biológicas

Conforme proposto no projeto original, um volume de 10mL de sangue venoso foi coletado de cada paciente em tubos contendo anticoagulante (*Vacutainer* com EDTA k3). Após a coleta e incubação de 2 horas para retração do coagulo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rotações por minuto (rpm) para separação do plasma. O qual foi distribuído em cinco alíquotas de 200 μL cada, em microtubos de 1,5 mL estéreis, devidamente identificados e armazenados em freezer -80ºC no laboratório da Gerência de

Virologia da FMT-HVD. Para fins de contraprova, uma alíquota desse material ficou armazenada na soroteca por um período de cinco anos e as demais foram destinadas as análises de biologia molecular previstas no projeto.

Em relação às amostras de tecido hepático, essas foram obtidas a partir de um pequeno fragmento do fígado obtido por ocasião da realização do exame de biópsia daqueles pacientes com indicação. O objetivo da biopsia é obter um fragmento de tecido hepático para avaliação histopatológica para estabelecer o grau de gravidade da doença. Assim, antes de colocar o tecido no formol foi separado dois pequenos fragmentos de tecido (~30 mg/cada) e estocado em microtubos estéreis de 1,5 mL, sendo um destinado a pesquisa do DNA VHB, armazenado em 200uL de Tampão de lise (Lysis buffer), kit RNeasy® Mini Handbook (QIAGEN), e outro para pesquisa do RNA HDV, contendo 200uL de RNAlatter (Thermo Fisher Scientific, Brasil), solução estabilizante de RNA. Essas amostras foram armazenadas em freezer -80ºC para posterior análise molecular.

4.7.1 Carga viral do VHB

O resultado do exame de carga viral do VHB foi coletado no prontuário eletrônico do paciente (*I-Doctor*-FMT-HVD). Esse é um exame de rotina realizado no Laboratório da Rede de Carga Viral do Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde na FMT-HVD, utilizando o sistema de PCR em Tempo Real (metodologia da Abbott do Brasil). Salientando que houve previa autorização do paciente para esse procedimento.

4.7.2 Purificação do ácido nucleico viral em plasma

O ácido nucleico viral (DNA-VHB e RNA-VHD) foi purificado simultaneamente a partir de 400µL de plasma utilizando o *kit INSTANT vírus RNA/DNA* (Analytic Jena, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Para verificar a eficiência dos kits, desde o processo de extração foi incluído um controle interno de RNA HDV (IC RNA) desenvolvido e recomendado pelo Dr. Chudy (Paul Enrich Institute - PEI). Os tubos de lise celular foram revestidos com carreador de RNA (*carrier nucleic acid*) de forma a manter o RNA estável. O ácido nucleico foi eluído em um volume final de 50µL e armazenado em freezer -80ºC.

Para calibração dos padrões foi usando material de referência (PEI) fornecido pela Agência Federal Alemã para os Soros e as Vacinas.

4.7.3 Purificação do DNA-VHB e RNA-VHD a partir do tecido hepático

Na extração do DNA-VHB foi utilizado QIAamp DNA Mini Kit (QIAgen). O fragmento de tecido hepático armazenado a -80°C no tampão de lise do kit foi descongelado e macerado usando esferas de vidro estéreis. Em seguida prosseguiu-se a purificação do ácido nucleico de acordo com as recomendações do fabricante. Ao final, o sedimento (*pellet*) foi eluído em 60 µL de água livre de RNAse, fornecida no kit.

Para a extração do RNA-VHD foi utilizado o kit RNeasy® Mini Handbook (QIAgen, Brasil). O fragmento de tecido hepático (~30 mg) armazenado em *RNAlater* foi descongelado em banho de gelo. Em seguida, com auxílio de uma agulha de injeção o tecido foi transferido para um microtubo de 1,5 mL estéril e, com auxílio de um bastão de vidro ou esferas de vidro estéril foi macerado e homogeneizado em tampão de lise celular especifico do *kit*. Os procedimentos seguintes foram de acordo com as recomendações do fabricante. O sedimento obtido foi eluído em 30µL de água livre de RNase fornecido no kit.

4.7.4 Carga viral do VHD

A carga viral do VHD foi realizada utilizando o kit *RoboGene ® HDV RNA Quantification kit 2.0* (*Analytik Jena*).

O kit inclui oito padrões de quantificação fornecido liofilizados e impregnados em tiras (*streps*), sendo cada um com valor de quantificação previamente determinado. Dependendo do instrumento de PCR em tempo real utilizado, esses valores podem mudar. Na Tabela 2 estão descritos os valores de quantificação da carga viral esperado, quando realizada no equipamento ABI 7500 *Fast* (Life Technologies), equipamento usado neste trabalho.

Os valores de carga viral dos padrões são expressos em UI/mL, assim, a concentração de RNA-VHD a ser analisada pode ser calculada diretamente a partir da curva de referência sem necessidade de conversão subsequente por uma equação.

Tabela 2. Valores dos oito Padrões de Quantificação do kit *RoboGene ® HDV RNA Quantification* v.2. As concentrações dos padrões são em UI/mL (*ABI 7500 Fast*).

Padrão Nº.	Padrão de RNA VHD [IU/ml]	Padrão de RNA VHD [cópias/mL]
1 (A)	200 000 000	> 200 000 000
2	20 000 000	> 20 000 000
3	2 000 000	>2 000 000
4	2 00 000	>2 00 000
5	20 000	>20 000
6	2 000	>2 000
7	1 000	>1 000
8	200	>200

Outro parâmetro importante na técnica de real time PCR é valor de Ct (*Cycle Threshold*). Este parâmetro representa o limiar de detecção, isto é, o número mínimo de ciclos para amplificação do gene alvo pelo equipamento. Portanto, dependendo do instrumento de PCR em tempo real utilizado, os valores de Ct dos Padrões podem mudar. Na Tabela 03 estão os valores de Ct especificado pelo kit *RoboGene*, de acordo com o equipamento utilizado.

Tabela 3. Valores esperados de Ct dos padrões *RoboGene*, de acordo com o instrumento de PCR em tempo real a ser utilizado. Em destaque o equipamento utilizado no estudo.

Padrão No.	7500 Fast *		Rotor-Gene™		3000 Rotor-Gene™ 6000/Q		LightCycler® 480	
	Media	Intervalo	Média	Intervalo	Media	Intervalo	Media	Intervalo
1 (A)	9.7	8.7-10.6	8.3	7.2-9.3	7.3	6.6-8.3	11.1	10.7-11.6
2	13.5	12.6-14.5	11.3	10.4-12.2	10.5	9.8-11.8	14.4	13.7-15.1
3	16.9	16.1-17.8	14.8	13.9-15.6	13.8	12.8-15.1	18.0	17.2-18.9
4	20.6	19.6-21.5	18.2	17.0-19.3	17.2	16.3-18.5	21.3	20.6-22.1
5	24.0	23.1-24.9	21.7	20.7-22.8	20.8	19.5-22.5	25.5	24.7-26.3
6	27.5	26.7-28.3	25.1	24.2-26.1	24.2	22.8-25.7	29.1	28.0-30.2
7	28.2	27.2-29.2	25.9	25.0-26.9	25.2	23.9-26.8	29.6	28.1-31.2
8	30.9	29.6-32.2	28.4	26.5-30.3	27.7	26.1-29.5	31.9	29.7-34.1

Mix da reação

As reações de PCR em tempo real foram padronizadas em um volume final de 25µL. Contendo 5µL de amostra, 12,75µL de PCR água, 1µL de HDV_D4 25x e 6,25µL de RT-PCR *Enzyme Mix FS*. As amostras foram analisadas em duplicatas e as reações foram realizadas na plataforma ABI 7500 *Fast* (Life Technologies, Brasil) com as fluorescências FAM e VIC, respectivamente. As condições de amplificação estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições de amplificação da PCR em tempo real no instrumento ABI 7500 Fast.

Ordem	Ciclo	Perfil	Temperatura	Tempo
1	1	Transcrição Reversa (RT)	55ºC	15:00 min
2	1	Ativação da Enzima	95ºC	2:00 min
3	45	Desnaturação Anelamento/Elongação	95ºC 60ºC	0:15min 1:00 min

4.7.5 Análise dos Dados da Carga Viral do Vírus da Hepatite D

Cada amplificação de RNA está associada com a geração de um sinal de fluorescência mensurável no canal FAM (para RNA VHD) ou no canal VIC/JOE o controle interno do RNA (IC RNA) resultando em uma curva de crescimento sigmóide (escala log). A análise dos dados foi realizada de acordo com as instruções recomendadas para o software do ABI 7500 *Fast*. A concentração de RNA VHD das amostras clínicas foi determinada tendo como referência as curvas dos padrões de quantificação do kit (Tabela 02), bem como os valores de Ct das respectivas amostras. A concentração do RNA VHD foi expressa em UI/mL e Log.

4.7.6 Reação da Transcrição Reversa (RT) do vírus D

Para síntese do DNA complementar (cDNA) do vírus delta foi utilizada enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher). Em um microtubo de 0,2 mL foi adicionado 1,5 µL dos *primers* gene-específicos Delta 100-F (10 pmol) e Delta 101b-R (10pmol), 0,75 µL de RNase Inhibitor (40U/µL), 5µL de RNA viral (10ng/ul) e água ultra pura para completar 10 µL.

Essa mistura foi aquecida a 70°C por 5 minutos e imediatamente incubada em gelo por 3 minutos. Após o choque térmico e uma breve centrifugação, foi adicionado 12,5 µL do

reagente *Reaction* Mix (2x), 1,50µL de RNase *Inhibitor* (40U/µL) e 1,0 µL de SuperScript III/Platinum Taq Mix (25x). O volume final da reação foi 25 µL.

A mistura foi homogeneizada levemente por pipetagem e submetida às seguintes condições: incubação a 50°C por 30 minutos e 95°C por 3 minutos; seguido de 40 ciclos de 94°C por 20 segundos, 48°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e um passo adicional de 72°C por 7 minutos. As reações foram realizadas em termociclador *Veriti Thermal Cycler* 96 (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific). Os iniciadores utilizados estão na Tabela 5. (Kay et al 2014).

Tabela 5. Sequência dos iniciadores utilizados para a reação de transcriptase reversa (RT).

Nome	Posição no Genoma	Sequência
Delta-100-F	306	5' TCCAGAGGACCCCTTCAGCGAAC- 3'
Delta-101b-R	1287	5'- GAAGGAAGGCCCTSGAGAACAAG- 3'

4.7.7 Reação da PCR do VHD e detecção em gel de agarose

Para amplificação do RNA-VHD foi utilizado o *kit* Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific), para uma reação com volume final de 50µL foi adicionado: 5 µL PCR-Buffer (10x), 4,0 µL de dNTP's (2,5 mM/cada), 2,0 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 3,0 µL de cada primer (10µM), 1,0 µL de cDNA (10ng/µL), 0,2 µL de Platinum Taq polimerase (5 U/µL) e água livre de RNAse. As condições de amplificação foram 94ºC por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94ºC por 20 segundos, 54ºC por 20 segundos e 72ºC por 45 segundos, e extensão final a 72ºC por 3 minutos, no mesmo termociclador acima descrito. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,5%), corado com Brometo de Etídeo (1µg/mL) e submerso em tampão TEB 1X. Posteriormente, foi visualizado em transiluminador com luz UV, e a imagem capturada e digitalizada para documentação. O fragmento esperado apresenta tamanho de 462pb. Os iniciadores utilizados estão na Tabela 6 (Kay et al 2014).

Tabela 6. Sequências dos iniciadores utilizados para a reação de amplificação (PCR) do vírus da hepatite D.

Nome	Posição no Genoma	Sequência
Delta102b–F	881	5'-TGGAGATSCCATGCCGACCCGAAG-3'
Delta108-R	1234	5'-CTCAGCAGGGARGAGGAAGAGGAAC-3'
Delta109-R	1234	5'-CTCAGCCRAGAGGAAGAAGAGGAAC-3'

4.7.8 Reação de PCR para amplificação do DNA VHB e detecção em gel de agarose

O DNA do VHB foi amplificado pelo sistema "Semi-Nsted" PCR, sendo a primeira reação realizada com 5 μL do DNA e os iniciadores 2821 e 783. Na segunda PCR foi usado 1 μL do produto da primeira reação com os iniciadores P1 e 783. O fragmento resultante da primeira amplificação foi 1.200 pb, corresponde ao gene *S* completo (regiões pré-*S1*, pré-*S2* e *S*). Na segunda amplificação O fragmento amplificado corresponde a 680 pb (região S/P).

Os ensaios da PCR foram realizados em um volume final de 25 μL contendo: 3,5 μL PCR-Buffer (10x), 2,0 μL de dNTP's (2,5 mM/cada), 0,75 μL de $MgCl_2$ (50 mM), 1,0 μL de cada primer (10μM), 5,0 μL de DNA, 0,1 μL de Platinum Taq polimerase (5 U/μL) e água livre de RNAse.

As condições de amplificação foram: um ciclo de 94ºC – 5 minutos e 35 ciclos (94°C - 30 seg, 57,1°C – 2min, 72°C – 30 seg), seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos, na primeira reação e na segunda reação, um ciclo de 94ºC – 2 minutos e 35 ciclos (94°C - 30 seg, 57,1°C – 30 seg, 72°C – 1 mim), seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações foram realizadas em Termociclador *Veriti Thermal Cycler* 96 (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific). O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,5%), corado com Brometo de Etídeo (0,1μg/mL) e submerso em tampão TAE 1X. Posteriormente, foi visualizado em transiluminador com luz UV, e a imagem capturada, digitalizada para documentação. Os Iniciadores utilizados estão Tabela 07. (Oliveira et al 2008).

Tabela 7. Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene S do vírus da hepatite B.

Nome	Posição no Genoma	Sequência	Função
2821-F	2821	5´-GGG TCA CCA TAT TCT TGG-3'	1ª PCR
783-R	783	5´-CTC ACG ATG CTG TAC AGA-3'	1ª/2ª PCR
P1-F	241	5´-TGC CTC TCA CAT CTC GTC AA- 3´	2ª PCR

4.7.9 Sequenciamento

Nas reações de sequenciamento do VHB e VHD foi utilizado o seguinte protocolo: 1µL do produto de PCR, 0,3 *pmols* de cada iniciador *Foward* ou *reverse* especifico para cada vírus, 2,0µL tampão 5x, 0,3µL de *Big Dye® Terminator* v.3.1 *Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems*) e água ultra pura para completar o volume final de 10µL. Após reação de sequenciamento, as amostras foram submetidas à precipitação utilizando o protocolo de Polietilenoglicol (PEG 8000) que atua como método de purificação da PCR com objetivo de remoção de oligonucleotídeos e nucleotídeos não incorporados na PCR e que podem interferir na reação de sequenciamento. Esse protocolo apresenta ótimo rendimento, podendo utilizar somente 0,5-1µL da amostra na reação de sequenciamento. O sequenciamento genético foi realizado no equipamento 3500 *Genetic Analyzer (Applied Biosystems).*

4.7.10 Edição e análise das Sequências

A edição e alinhamento das sequências nucleotídicas foram feitas utilizando o programa BioEdit (Hall, 1999). As sequências obtidas no estudo foram alinhadas com sequências referentes aos genótipos de cada vírus (VHD/VHB) obtidas no *GenBank* (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) (http.//www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.7.11 Genotipagem por Análise filogenética

Para caracterização dos genótipos do VHB e VHD as sequências obtidas foram submetidas à análise de reconstrução filogenética utilizando o programa MEGA v.7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al 2016). As árvores filogenéticas foram inferidas usando o método estatístico de *Neighbor-Joining* incluindo as substituições do

tipo transições + transversões. A escolha desse método deve-se a rapidez que o mesmo apresenta quando se trata de um número grande de sequências nucleotídicas. Para avaliar a confiabilidade das estimativas das árvores obtidas foi aplicado o método estatístico não paramétrico de replicações de *Bootstrap* com percentual mínimo de 50% e 500 replicações. O *Bootstrap* permite o cálculo de distribuições estatísticas estimadas por meio de criação repetida. Isto é, envolve a construção de novos conjuntos de sequências a partir do conjunto original, construindo uma árvore para cada novo conjunto e calculando o percentual de vezes que um ramo reaparece nas repetições. Essa porcentagem é chamada de valor de *bootstrap;* ramos com valores de *bootstrap* 50% são considerados como refletindo as relações corretas de ancestralidade.

O cálculo das distâncias evolutivas entre as sequências foram realizadas de acordo com melhor indicado automaticamente pelo programa.

Na reconstrução filogenética do VHD foram incluídas sequências dos oito genótipos descritos obtidas no GenBank sob o número de acesso: HF679404 GEN 3-FRANÇA; HF679405 GE3-BR AM; L22061 GEN 3-COLOMBIA. KC590319 GEN 3- BR RJ; AF251367 GEN 3-VENEZUELA; L22064 GEN 3-PERU; AB118847 GEN 4-TOQUIO; AF209859 GEN 4-TAIWAN, AB088679 GEN 4-JAPAO, AJ583889 GEN 5-FRANÇA; AJ584845 GEN 5-GUIANA FRANCESA; JX888107.1 GEN 5-NIGERIA; AX741169 GEN 8-PARIS; AJ584849 GEN 8-CONGO; EU035519.1 GEN 8-GABAO; AM183327 GEN 8-FRANÇA; GU177121 GENT 8-GABÃO; AJ583885 GEN 7-FRANÇA; AJ583888 GEN 7-FRANÇA; AJ583868 GEN 7-FRANÇA; AJ584844 GEN 7-FRANÇA; AJ583871 GEN 6-FRANÇA; AJ583887 GEN 6-FRANÇA; JX888114 GEN 6-NIGERIA; KY861350.1 GEN 1-CAMARÃO; JX888113 GEN 1-AFRICA CENTRAL; AY633627.1 GEN 1-IRÃ; X60193 GEN 2- JAPÃO; AY261457 GEN 2A- TAIWAN; AF425645.1 GEN 2-TAIWAN.

Na reconstrução filogenética foram incluídas sequências dos dez genótipos do VHB obtidas no GenBank sob o número de acesso: AF369544.1 MEXICO - GEN A; KM519452.1 AFRICA DO SUL - GEN A; KT366462.1 INDIA - GEN A; U55222.1 BRASIL - GEN A; HE981181.1 BRASIL - GEN F; HE981185.1 ARGENTINA – GEN F; DQ823095.1 ARGENTINA - GEN F; AB036909.1 VENEZUELA - GEN F; EU579441.1 CHINA - GEN B; EF494381.1 TWAIAN - GEN B; LC093845.1 VIETNA - GEN B; KC875273.1 INDIA - GEN C; HQ622095.1 BRASIL - GEN C; EU579443.1 CHINA - GEN C; AB368297.1 JAPÃO - GEN C; KC875342.1 INDIA - GEN D; AM422939.1 FRANÇA - GEN D;

KC012652.1 ARGENTINA - GEN D; JN642167.1 LÍBANO - GEN D; FN547296.1 NIGERIA - GEN E; MF772355.1 CABO VERDE - GEN E; MG383615.1 HOLANDA - GEN E; HE981174.1 ARGENTINA - GEN G; HE981172.1 BRASIL - GEN G; AF369533.1 MEXICO - GEN G; AB298362.1 JAPÃO - GEN H; AB846650.1 JAPAO - GEN H; AB516395.1 MEXICO - GEN H; AB516394.1 MEXICO - GEN H; FR821987.1 LAOS - GEN I; FR821989.1 LAOS - GEN I; JQ411087.1 VITENÃ - GEN I; FJ023673.1 LAOS - GEN I; FJ023663.1 LAOS - GEN I; AB486012.1 JAPÃO – GEN J.

4.7.12 Análises de mutações de resistência antiviral

Para identificação de mutações de resistência aos antivirais as sequências foram alinhadas juntamente com sequências de referência nos programas de análises filogenéticas virtuais descritas abaixo:

- **HepSeq**

HepSeq é um programa que foi desenvolvido especificamente para fenotipagem virtual de isolados de VHB. Possui um grande banco de dado, globalmente disponível para um acesso rápido, baseado em entrada de sequências de ácidos nucleicos ou sequências de aminoácidos de isolados clínicos de VHB. Usuários registrados podem acessar o programa on-line e introduzir as sequências na web site: http://www.hepseq.org/Public/Web_Front/main.php

O Programa procura por homologia entre as sequências de entrada com as outras já armazenadas no banco de dados, correlacionando dados de fenotipagem, história clínicas, a determinação do genótipo e subgenótipos, reportando quaisquer mutações descobertas, destacando aqueles que já se sabem ter significados clínicos. O banco de dados atualmente possui aproximadamente 3048 isolados clínicos de 2.924 pacientes e inclui mais de 3.743 sequências diferentes de VHB em que aproximadamente 90.000 variações foram identificadas. (Shaw et al, 2006).

- **Genafor**

O nome completo do programa Genafor é “GENAFOR - Gesellschaft für nachhaltige Forschung e.V”, em inglês. A GENAFOR é uma sociedade científica sem fins lucrativos, chamada “eingetragener Verein” (e.V.) sob a lei alemã. Foi fundada por cientistas no ano de

2002 e está aberta a cientistas de todos os países que aceitam seus estatutos; os estatutos oficiais do GENAFOR em alemão podem ser encontrados no site: http://www.genafor.org/about.php.

Sua sede encontra-se em Bonn, na Alemanha. Ao submeter uma sequência de DNA de VHB gene-polimerase/gene-superfície irá obter um alinhamento da sequência com a sequência de consenso de VHB genótipo D, ou, alternativamente, a uma sequência de consenso do respectivo genótipo, uma lista das mutações de acordo com a *transcriptase reversa* (RT) do domínio do gene da polimerase e a *SHB* proteína da superfície do gene, e as previsões de resistência fenotípica do vírus respectivo a cinco drogas antirretrovirais. (Figura 14). Para previsões confiáveis as sequências devem conter uma parte substancial do domínio da RT, nenhuma decisão clínica deve ser baseada apenas no resultado do algoritmo usado.

Figura 14. Resistência fenotípica do VHB a cinco drogas antirretrovirais e suas posições. Fonte: http://www.genafor.org/about.php.

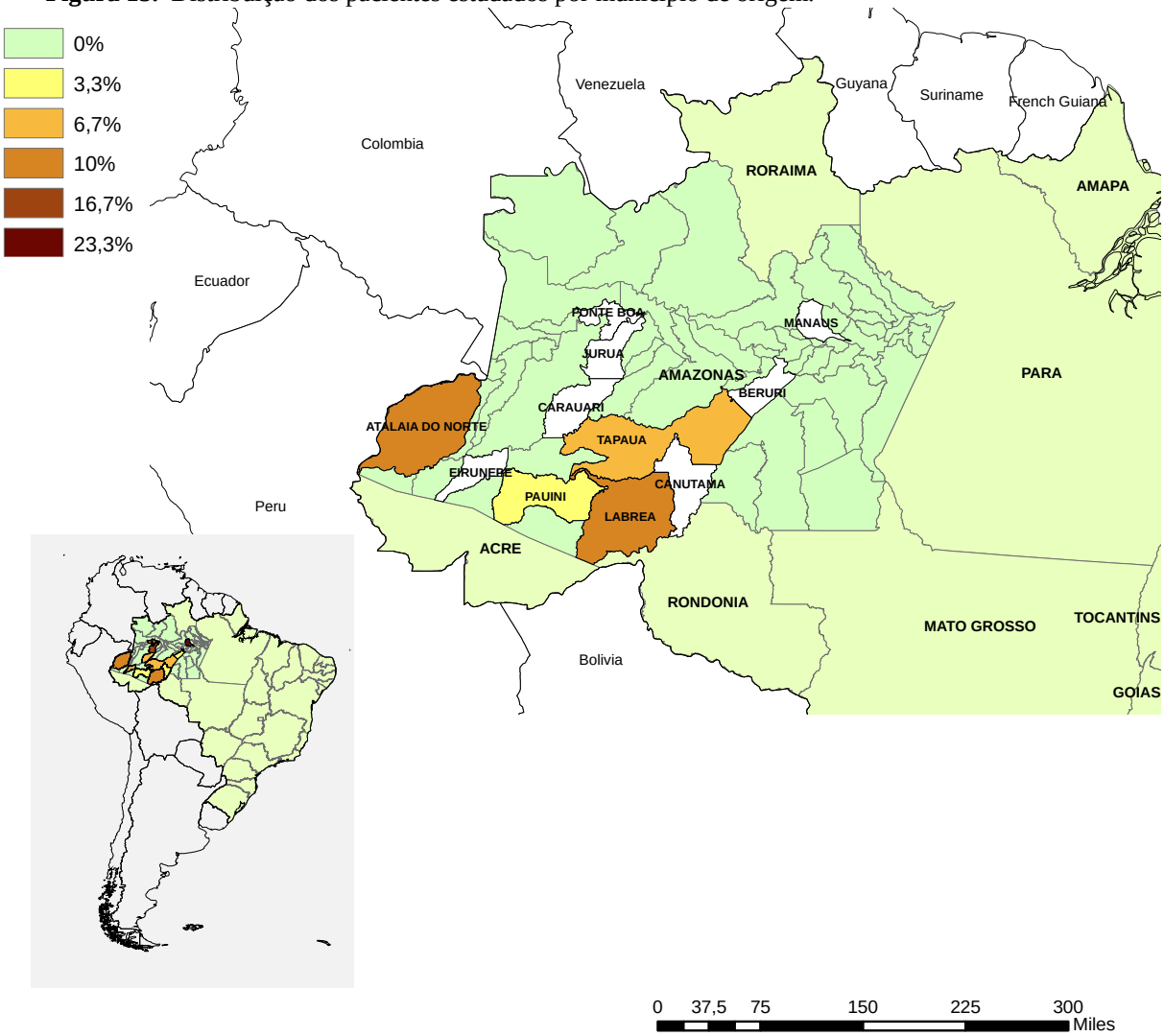
Drugs	Rule Definitions	Predictions
Lamivudine, Zeffix®	173L	resistant
Lamivudine, Zeffix®	180C or 180M	resistant
Lamivudine, Zeffix®	204I or 204S or 204V	resistant
Lamivudine, Zeffix®	181T	resistant
Lamivudine, Zeffix®	80V or 80I	possible resistant
Adefovir, Hepsera®	181T or 181V	resistant
Adefovir, Hepsera®	233V	resistant
Adefovir, Hepsera®	236T	resistant
Entecavir, Baraclude®	(169T or 184A or 184G or 184I or 184S or 202G or 202I or 250V) and (180C or 180M) and (204V)	resistant
Entecavir, Baraclude®	(169T or 184A or 184G or 184I or 184S or 202G or 202I or 250V) and (204I)	resistant
Entecavir, Baraclude®	204I or 204V	possible resistant
Entecavir, Baraclude®	169T or 184A or 184G or 184I or 184S	possible resistant
Entecavir, Baraclude®	202G or 202I	possible resistant
Entecavir, Baraclude®	250V	possible resistant
Tenofovir DF	194T	possible resistant
Telbivudine, Tyzeka®, Sebivo®	204I	resistant
Telbivudine, Tyzeka®, Sebivo®	80I or 80V	possible resistant

5. RESULTADOS

Um total 30 amostras de plasma de pacientes sorologia HBsAg e anti-HD Total positivo foram incluídos no estudo. Dessas, 09/30 tinham também amostras de tecido hepático. Todos os pacientes foram atendidos no ambulatório de hepatites virais da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira dourado (FMT-HVD) no período de julho de 2016 a julho de 2017.

Em relação às características epidemiológicas da população, a idade variou de 18 a 56 anos com média de 37,7 anos, desvio padrão 9,21 e mediana de 37. A maioria do sexo masculino 17/30 (57%) e 13/30 (43%) feminino. Oriundos de 11 municípios do Estado, incluindo aqueles historicamente endêmicos de infecção pelo VHB e VHD, conforme o mapa abaixo (Figura 15).

Figura 15. Distribuição dos pacientes estudados por município de origem.



A Tabela 08 abaixo traz o resumo dos achados Bioquímicos e moleculares da população de estudo. Em relação aos parâmetros bioquímicos de aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transpeptidase (GGT), verificou-se alterações para mais nos três marcadores. A dosagem desses marcadores no sangue é importante para identificar lesões e doenças no fígado, quanto mais elevada maior o grau de lesão. Portanto, os valores encontrados de AST, ALT, GGT correlacionaram-se positivamente com quadro de infecção crônica dos pacientes.

Tabela 08. Características Bioquímicas e Moleculares da população estudada.

Variável	N (%)	(Min-Max)	Média	Parâmetro
HBeAg	30			
Positivo	04 (14)			
Negativo	26 (86)			
ALT	30	11-196 IU/L	67,4 IU/L	02 – 38 IU/L
AST	30	20-213 IU/L	57,6 IU/L	02 – 44 IU/L
GGT	30	12-373 U/L	95,6 U/L	11 – 61 U/L
PCR-HBV (Plasma)	30			
Positivo	11 (37)			
Negativo	19 (63)			
PCR-HBV (BX)	09			
Positivo	08 (88)			
Negativo	01 (12)			
CV-HBV (log_{10})	30	0,5-7,92	1,96	
PCR – HDV (Plasma)	30			
Positivo	13 (47)			
Negativo	17 (53)			
PCR-HDV (BX)	09			
Positivo	02 (22)			
Negativo	07 (78)			
CV-HDV (log_{10}) (Plasma)	13	2,74-6,17	4,2	
CV-HDV (log_{10}) (BX)	02	6,13-6,68	6,4	

N-número de pacientes; **Min**–mínimo; **Max**–máximo; **ALT**–alanina aminotransferase; **AST**–aspartato aminotransferase; **GGT**–gama gutamil transferas; **BX-**Biópisa Hepática; **CV-**Carga Viral; **PCR-** Polymerase Chain Reaction; **HBV-** Hepatite B Vírus; **HDV-**Hepatite D vírus;

- ***Amplificação do genoma VHB e VHD por PCR convencional***

Em relação a detecção do DNA VHB e RNA VHD extraídos do plasma usando a PCR convencional, obteve-se 11/30 (37%) e 13/30 (47%), respectivamente. Das 09 amostras de tecido hepático, 8/9 (88%) foram DNA VHB positivas e 2/9 (22%) positivas para RNA VHD (Tabela 08). Os resultados mostraram que para o VHB a PCR foi mais eficiente nas amostras

de tecido hepático 8/9 (88%) para o VHD foi irrelevante. Em uma única amostra foi detectado simultaneamente o DNA VHB e o RNA VHD no plasma e tecido hepático. (Tabela 11).

- ***Determinação da carga viral dos vírus da Hepatite D (Delta)***

Para determinação da carga viral do RNA VHD por PCR em tempo real utilizou-se o kit *RoboGene ® HDV RNA Quantification* 2.0 (*Analytik Jena- Alemanha*), cujo limite de detecção equivale a 200 UI/mL. Das 30 amostras de RNA VHD extraídas do plasma, 13/30 (47%) tiveram a carga viral quantificada. Embora a metodologia não seja indicada para amostras de tecido, incluímos as 09 amostras extraídas de tecido. De 2/9 (22%) dessas amostras foi possível quantificar a carga viral (Tabela 09). Os valores da carga viral entre as amostras extraídas de plasma variaram de 2,74 a 6.17 Logs e 6.13 a 6.68 Logs entre aquelas extraídas de tecido hepático. Nessa Tabela estão somente os dados das 14 amostras que tiveram o RNA quantificado.

Tabela 09. Carga viral das amostras quantificadas dos pacientes infectados com o vírus da hepatite D.

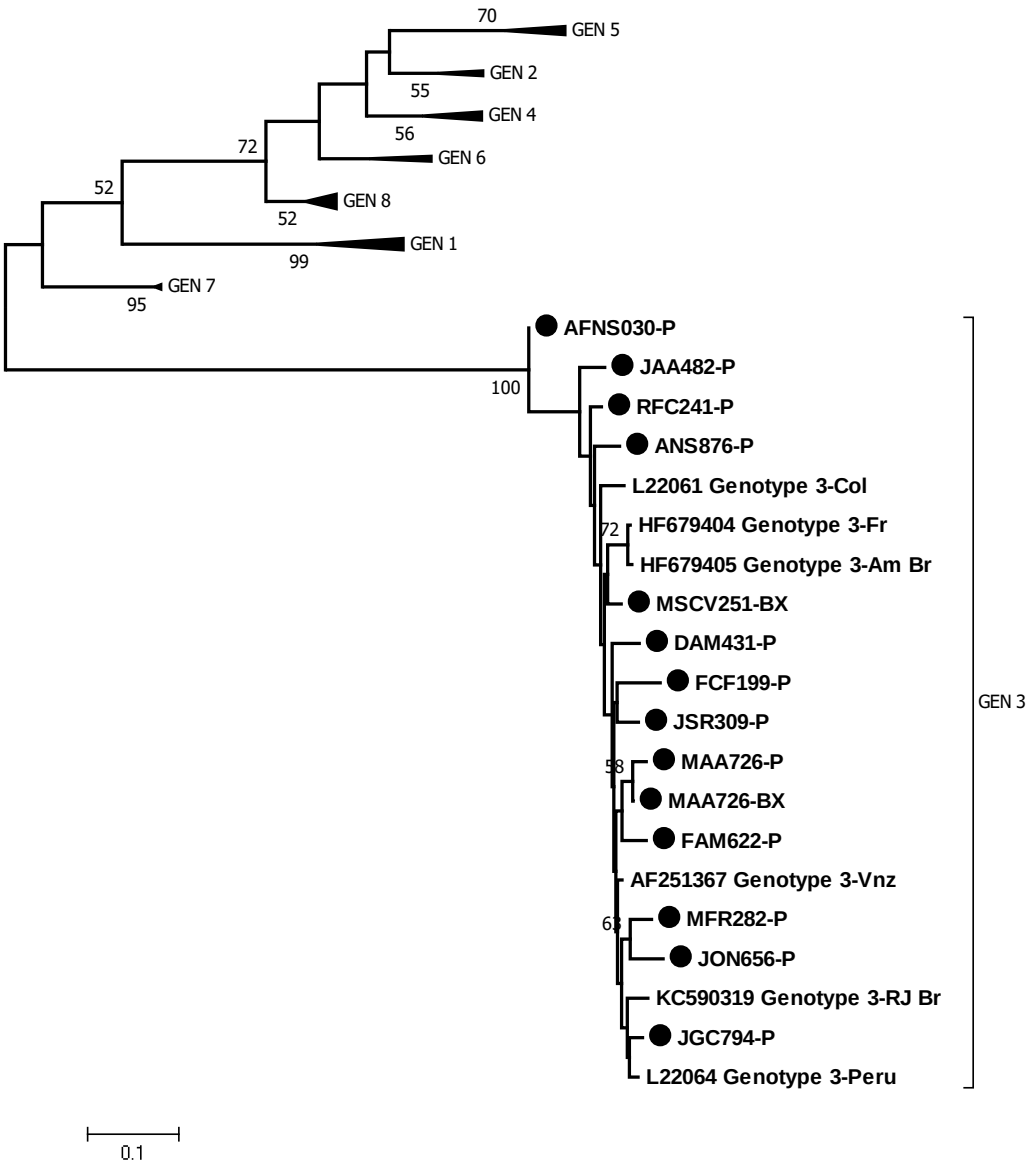
PROBANDOS	**CT**	**UI/mL**	**$Log_{(10)}$**
AFNS030	20.6246	123.159,00	5,09
ANS876	16.4714	1.197.210,00	6,07
DAM431	18.4696	400.840,00	5,60
FAM622	20.4858	132.888,00	5,60
FCF199	16.0453	1.511.820,00	6,17
JON656	19.556	221.107,00	5,34
JGC794	27.4502	2.932,56	3,46
JAA482	22.0896	55.217,10	4,74
JSR309	17.8362	567.028,00	5,75
MAA726	20.9738	101.723,00	5,00
MFR282	25.9412	6700,69	3,82
RFC241	16.4588	1.205.500,00	6,08
SPS647	30.4882	555.609,00	2,74
TECIDO HEPÁTICO	**CT**	**UI/mL**	**$Log_{(10)}$**
MAA726_BX	13.9156	4.852.530,00	6,68
MSCV251_BX	16.222	1.372.400,00	6,13

CT – cycle threshold*;* **BX-** Biópisa Hepática

- ***Caracterização dos genótipos do Vírus da Hepatite D***

Na amplificação por PCR convencional obteve-se 14 amostras RNA VHD, as quais foram sequênciadas obtendo-se 100% de sequências de boa qualidade com fragmente de cerca de 462 nucleotídeos do gene que expressa a proteína HDAg. Para gerar a árvore filogenética foram incluídas sequências dos oito genótipos do VHD obtidas no *GenBank*. A árvore filogenética apresentada na Figura 16 mostrou que todos os isolados se agruparam em um único genótipo HDV-3, *clado* com valor de *bootstrap* de 99%. Esse valor de *bootstrap* garante que todos os isolados sejam fortemente classificados como genótipo 3.

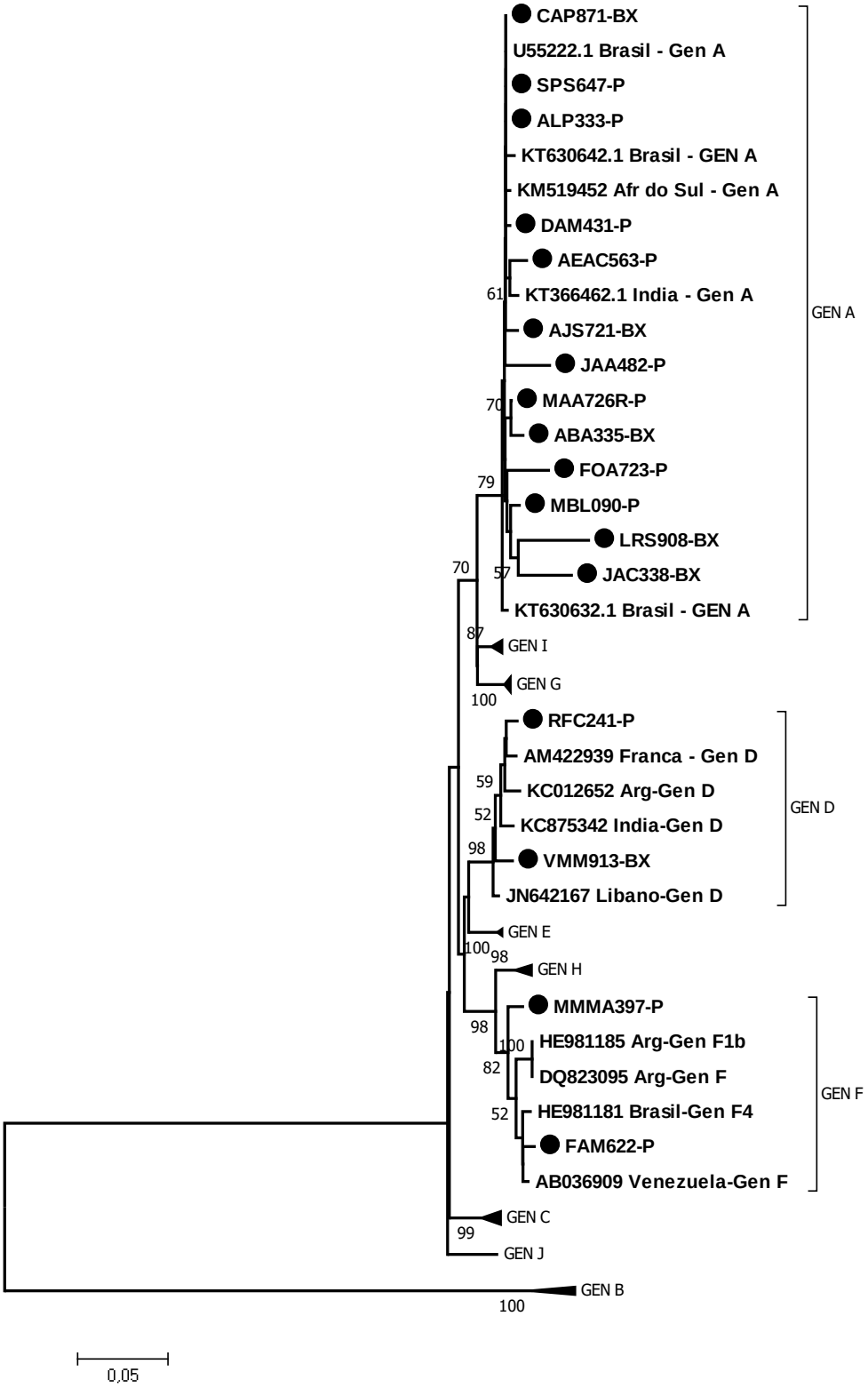
Figura 16. Árvore filogenética inferida pelo método de *Neighbor-Joining*. Os números acima dos braços da árvore indicam valores de *bootstrap* acima de 50% inferidos a partir de 500 réplicas. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método de Kimura-2-parâmetros. A análise envolveu 14 sequências de nucleotídeos e foi conduzida no programa MEGA 7.



- ***Caracterização dos genótipos do Vírus da Hepatite B.***

Um total de 19 amostras (11 plasma + 8 tecido hepático) DNA VHB positivas foram sequenciadas obtendo-se suas respectivas sequências nucleotídicas. Após alinhamento e edição das sequências obteve-se um fragmento com cerca de 600 pb da região *S*/*P* as quais foram usadas na análise filogenética e pesquisa de mutações de resistência. Inclui-se na análise sequências nucleotídicas dos dez genótipos do VHB (A-J) obtidas no *GenBank*. Após inferência filogenética, verificou-se que não houve diferença dos genótipos/subgenótipos identificados entre amostras de plasma e de tecido. Na Figura 15 estão representados da caracterização genotípica obtidos, sendo caraterizados três grupos genotípicos distintos, com as seguintes frequências: A 15/19 (78%), D 2/19 (11%) e F 2/19 (11%). (Figura 17).

Figura 17. Árvore filogenética das 17 sequências nucleotídicas, inferida pelo método de *Neighbor-Joining*. Os números acima dos braços da árvore indicam valores de *bootstrap* acima de 50% inferidos a partir de 500 réplicas. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método de Kimura-2-parâmetros. A análise foi conduzida no programa MEGA 7.



- ***Investigação de Mutações no gene da polimerase (rt) do VHB***

Na pesquisa de mutações na rt polimerase verificou-se que das 11 sequências isoladas do plasma, 08/11 (73%) apresentaram tipo selvagem e 03/11 (27%) apresentaram mutações no gene da polimerase (rt) associadas à resistência a antivirais (Tabela 10). Em relação as sequências isoladas de tecido hepático, 03/08 (38%) apresentaram tipo selvagem e 05/08 (62%) tinham mutações associadas à resistência aos antivirais (Tabela 12).

Nas tabelas 10, 11 e 12 estão os resultados obtidos referentes às características genotípicas, carga viral, resistências e possíveis resistências dos isolados de VHB identificados no estudo. Variantes na região YMDD (Tirosina-Methionineaspartate aspartato) foram encontradas em 03/11 (27%) das sequências de plasma e em 04/08 (50%) das sequências de tecido hepático. Nas sete sequências (plasma + tecido hepático) que apresentaram mutações isoladas na posição 204 foi identificado variações dos aminoácidos. Ao relacionar as sequências que apresentavam variação de aminoácidos aos genótipos, verificou-se que todas pertenciam ao genótipo A.

Mutações na Região "a" determinante do gene S estão relacionadas a "escape mutante de vacina" contra o vírus da hepatite B. De acordo com a análise feita no programa *Genafor* em uma única sequência **JAC338** isolada de tecido hepático foi identificado as mutações sT126I e sN131S (Genótipo A1) relacionadas ao escape de vacina.

- ***Diversidade genotípica do vírus B e delta simultaneamente em amostras de plasma e tecido hepático de pacientes.***

Das 30 amostras estudadas, 09 foram simultaneamente isoladas do plasma e do tecido hepático. O vírus B foi detectado em 02/09 (23%); a amostras VHB positivas na maioria foi identificado o Genótipo A, tendo na amostra **MAA726** diferença no Subgenótipo, na amostra de tecido hepático foi identificado Genótipo A2 e na amostra de plasma A1. Apenas a amostra **VMM913** foi identificada como D3 no tecido hepático. (Tabela 11)

Em relação ao vírus delta, 01/09 (11%) amostra de plasma e 02/09 (23%) amostras de tecido hepático foram positivas para PCR. Todas caracterizadas como genótipo 3 (Tabela 11). Na amostra **MAA726** é possível observar menor quantidade de vírus D no plasma (5 log) que no tecido hepático (6,68 log).

Para a investigação de mutações no gene da polimerase (rt) do VHB. Em relação às amostras de tecido hepático foi possível analisar 08/09 (89%) sequências, destas 3/8 (38%) apresentaram tipo selvagem e 05/08 (62%) mutações no gene da polimerase (rt) associadas à resistência aos antivirais. Para as amostras de plasma, foi possível analisar 02/09 (23%) sequências, onde uma **MAA726** apresentou tipo selvagem e outra **FOA723** mutações no gene da polimerase (rt) associadas à resistência aos antivirais. (Tabela 12).

- ***Associação entre genótipos virais com a evolução da doença na população estudada.***

Das 30 amostras estudadas, foi possível caracterizar os genótipos do VHB em 11 sequências isoladas do plasma e em 08 de tecido hepático. Para o VHD, foram analisadas 12 sequências de plasma e 02 de tecido hepático. Os dados sobre a evolução da doença foram obtidos no prontuário eletrônico dos pacientes (*I-Doctor*), da FMT-HVD. (Tabela 13).

Os genótipos caracterizados de ambos os vírus foram associados com a evolução da doença. Dois (2) pacientes (**CAP871** e **ABA335)** portadores de hepatite aguda foi identificado o genótipo VHB-A1 somente no tecido hepático; os pacientes **JAC338** e **MSV251** caracterizados como portadores assintomáticos**,** foram VHB-A1 no tecido hepático e VHB-A1 no Plasma e VHD-3 no tecido hepático, respectivamente. Devido à insuficiência da amostra, não foi possível realizar o sequenciamento também em amostras de plasma de VHD.

Três (3) pacientes portadores crônicos (**LRS908**, **DAM431** e **AFNS030**), apresentaram o genótipo VHB-A1 somente no tecido hepático (**LRS908)**; VHB-A1 e VHD-3 somente no plasma (**DAM431** e **AFNS030)**. Nove (9) pacientes apresentaram cirrose hepática (**SPS647, ANS876, FCF199, JGC794, JSR309, MAA726**, **AEAC563, ALL333, JAA482),** nos cinco primeiros foi possível caracterizar o genótipo VHD-3 somente no plasma. Nas amostras **JAA482** e **ALL333** foi identificado o genótipo VHB-F2, sendo que o **ALL333** também apresentou VHD-3 no plasma. O paciente **AEAC563** e **MAA726** apresentaram os mesmos genótipos VHB-A1 e VHD-3 no plasma, o mesmo aconteceu com o paciente **MAA726** genótipos VHB-A2 e VHD-3 no tecido hepático. No restante dos pacientes não foram encontrados dados sobre a evolução da doença.

Em relação ao vírus B, da maioria dos pacientes foi identificado o genótipo A, sendo que a maioria apresentava quadro de cirrose hepática. Todos os pacientes que apresentavam o genótipo F estavam com cirrose hepática. Para o genótipo D, não havia dados sobre a evolução da doença desses pacientes. Em relação ao VHD, todos apresentaram o mesmo genótipo (VHD-3) independente do quadro de evolução da doença.

Tabela 10. Caracterização molecular do VHB e VHD em amostras de plasma

	VHB			VHD		Genótipos		Possível Resistência – VHB	Mutação (rt) – VHB
AMOSTRA	**CV (UI/mL)**	**Log**	**PCR-VHB**	**CV (Log)**	**PCR-VHD**	**VHD**	**VHB**		
ABA335	ND*	ND	ND	ND	ND	---	---		
AJS721	20	1,30	ND	ND	ND	---	---		
CAP871	<10	10,00	ND	ND	ND	---	---		
FOA723	27	1.43	+	ND	ND	---	A1	Lamivudine/Entecavir/Telbivudine	M204R/ T184R,M204R /M204R
JAC338	138	2.14	ND	ND	ND	---	---		
LRS908	135	2.13	ND	ND	ND	---	---		
MAA726	333	2.52	+	5	+	3	A1		
VMM913	105	2.02	ND	ND	ND	---	---		
MSV251	<10	10,00	ND	ND	ND	---	---		
AEAC563	37	1,57	+	ND	ND	---	A1		
ALL333	219	2.34	+	ND	ND	---	A1		
DAM431	527	2.72	+	5,6	+	3	A1		
FAM622	8.409.426,1	7.92	+	5,12	+	3	F2		
JAA482	2.887.132,5	7.46	+	4,74	+	3	A1	Lamivudine/Entecavir/Telbivudine	M204K
MBL090	212	2,33	+	ND	ND	---	A1	Lamivudine/Entecavir/Telbivudine	M204K/ T184K/ M204K
MMA397	167	2.22	+	ND	ND	---	F2		
RFC241	49	1.69	+	6,08	+	3	D3		
SPS647	20.490	4,31	+	2,74	ND	---	A1		
AFNS030	104.968	5,02	ND	5,09	+	3			
ANS876	<10	10,00	ND	6.07	+	3	---		
FCF199	21	1,32	ND	6,17	+	3	---		
JON656	11	1.04	ND	5,34	+	3	---		
JGC794	<10	10,00	ND	3,46	+	3	---		
JSR309	48	1,68	ND	5,75	+	3	---		
MAL503	<10	10,00	ND	ND	+	3	---		
MFR282	<10	10,00	ND	3.82	+	3	---		
CCS657	<10	10,00	ND	ND	ND	---	---		
EOS803	331	2.52	ND	ND	ND	---	---		
JGC179	26	1,42	ND	ND	ND	---	---		
RAS583	44	1.64	ND	ND	ND	---	---		

* ND= Não detectado; CV= Carga viral

Tabela 11. Caracterização molecular do VHB e VHD em amostras de Plasma e Tecido Hepático

	PCR (T. Hepático)		PCR (Plasma)		Genótipo (T. Hepático)		Genótipo (Plasma)		Hepatite B (Plasma)		Hepatite D (Plasma)		Hepatite D (T. Hepático)	
AMOSTRAS	**VHB**	**VHD**	**VHB**	**VHD**	**VHD**	**VHB**	**VHD**	**VHB**	**Carga viral (UI/mL)**	**Log**	**CV (UI/mL)**	**Log**	**CV (UI/mL)**	**Log**
ABA335	+	ND*	ND	ND	---	A1	---	---	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AJS721	+	ND	ND	ND	---	A1	---	---	20	1,30	ND	ND	ND	ND
CAP871	+	ND	ND	ND	---	A1	---	---	<10	LOG10	ND	ND	ND	ND
FOA723	+	ND	+	ND	---	A1	---	A1	27	1.43	ND	ND	ND	ND
JAC338	+	ND	ND	ND	---	A1	---	---	138	2.14	ND	ND	ND	ND
LRS908	+	ND	ND	ND	---	A1	---	---	135	2.13	ND	ND	ND	ND
MAA726	+	+	+	+	3	A2	3	A1	333	2.52	101.723,00	5	4.852.530,00	6,68
VMM913	+	ND	ND	ND	---	D3	---	---	105	2.02	ND	ND	ND	ND
MSV251	ND	+	ND	ND	3	---	---	---	<10	LOG10	ND	ND	1.372.400,00	6,13

* ND= Não detectado; CV= Carga Viral

Tabela 12. Caracterização das Mutações de resistência no gene da Polimerase (rt) em amostras de Tecido Hepático *versus* Plasma.

AMOSTRAS	**Resistencia/Possível Resistência (Tecido Hepático)**	**Mutação (rt) (Tecido Hepático)**	**Possível Resistência (Plasma)**	**Mutação (rt) (Plasma)**
ABA335	Lamivudine/Entecavir/Telbivudine	M204D, V180W		
AJS721				
CAP871	Entecavir	T184N		
FOA723	Lamivudine/Entecavir/Telbivudine	M204R/ T184R,M204R/M204R	Lamivudine/Entecavir/Telbivudine	M204R/ T184R,M204R /M204R
JAC338	Lamivudine/Telbivudine/Entecavir	L180S, M204I/ M204I/ T184K, S202K		
LRS908	Adefovir/Entecavir	M204R/ T184K		
MAA726				
VMM913				
MSV251				

Tabela 13. Caracterização molecular do VHB e VHD nas amostras de Plasma e Tecido Hepático *versus* Evolução da Doença.

			Genótipo (Plasma)		Genótipo (Tecido Hepático)		EVOLUÇÃO DA DOENÇA
AMOSTRAS	**HBsAg**	**HBeAg**	**VHD**	**VHB**	**VHD**	**VHB**	
ABA335	(+)	(-)	---	---	---	A1	AGUDA
AJS721	(+)	(-)	---	---	---	A1	NI*
CAP871	(+)	(-)	---	---	---	A1	AGUDA ICTÉRICA
FOA723	(+)	(-)	---	A1	---	A1	NI
JAC338	(+)	(-)	---	---	---	A1	ASSINTOMÁTICO
LRS908	(+)	(-)	---	---	---	A1	CRÔNICA
MAA726	(+)	(-)	3	A1	3	A2	CIRROSE
VMM913	(+)	(-)	---	---	---	D3	NI
MSV251	(+)	(-)	---	---	3	---	ASSINTOMATICO
AEAC563	(+)	(-)	---	A1			CIRROSE
ALL333	(+)	(-)	---	A1			CIRROSE
DAM431	(+)	(+)	3	A1			CRÔNICA
FAM622	(+)	(+)	3	F2			NI
JAA482	(+)	(+)	3	A1			CIRROSE
MBL090	(+)	(-)	---	A1			NI
MMMA397	(+)	(-)	---	F2			ASSINTOMÁTICO
RFC241	(+)	(-)	3	D3			NI
SPS647	(+)	(-)	---	A1			CIRROSE
AFNS030	(+)	(+)	3	---			CRÔNICA
ANS876	(+)	(-)	3	---			CIRROSE
FCF199	(+)	(-)	3	---			CIRROSE
JON656	(+)	(-)	3	---			CIRROSE
JGC794	(+)	(-)	3	---			NI
JSR309	(+)	(-)	3	---			CIRROSE
MFR282	(+)	(-)	3	---			CIRROSE

* NI= Não Identificado

6. DISCUSSÃO

Iniciamos esta discussão ressaltando que este é o primeiro estudo que visa caracterizar os genótipos do VHB e VHD simultaneamente em amostras de plasma e no tecido hepático de pacientes coinfectados. Em nosso estudo analisou-se um total de 30 amostras de plasma de pacientes portadores crônicos do VHB e VHD, sendo que destes, 09 tinham também amostras de tecido hepático. Embora com pouca diferença o grupo de participantes foi composto principalmente do gênero masculino e a média de idade foi 38 anos. Estudos anteriormente realizados nesta região também mostram esse perfil (Fonseca, 2007; Castilho et al, 2012; Braga et al, 2014).

Em relação à procedência dos pacientes, estes foram procedentes de 11 municípios do Estado do Amazonas, sendo a maioria procedentes de Manaus. O elevado número de participantes do município de Manaus é explicado por ser o local de coleta e por ser a cidade com maior concentração populacional. Por outro lado, os municípios de Lábrea e Atalaia do Norte, por exemplo, são tradicionalmente consideradas áreas endêmicas de infecção pelo VHB e D (Oliveira et al, 2015).

Quanto aos resultados das análises laboratoriais, aspectos importantes foram observados como, por exemplo, a relação entre a positividade da reação da PCR para o VHB e VHD, ao *status* de portador do HBeAg, a níveis elevados de ALT, AST, GGT e carga viral do VHD acima de 2 log. Resultados semelhantes foram descritos na literatura relacionando-os aos aspectos da história natural e evolução clínica da coinfecção VHB/VHD (Wu, 1995; Yurdaydın et al, 2010).

Outro parâmetro que se destacou foi o número de amostras HBsAg positivo *versus* HBV DNA não detectável no plasma usando a PCR convencional. Das 30 amostras HBsAg positivo no plasma 11 tiveram o HBV DNA detectado pela PCR, sendo cinco simultaneamente HBV DNA e HDV RNA. Resultado semelhante foi obtido por Sayad e colaboradores analisando um universo também de 30 pacientes obteve 18/30 pacientes HBV DNA positivo e 8/30 HBV DNA e HDV RNA simultaneamente (Sayad et al, 2018). Alvarado-Mora relata que de 70 soros HBsAg e/ou anti-HBc testados para HBV DNA, em 25 (36%) foi detectado o HBV DNA pela PCR (Alvarado-Mora et al, 2013).

Embora não seja o recomendado, ao comparar esses resultados com os do real time verificou-se que a diferença entre amostras HBV DNA detectadas por real time PCR e as não detectadas pela PCR convencional foi muito grande (63%). De um modo geral, esse alto índice de não detectável pela PCR pode ser explicado pelo baixo nível de carga viral, pois com exceção de cinco amostras, a carga viral variou desde não detectada ou <10 UI/mL até 335 UI/mL. Em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa usando a mesma metodologia de PCR estabeleceu-se como ponto te corte para detecção do DNA VHB, a carga viral ≥350 UI/mL (Oliveira, 2008; Castilho, 2012; Braga, 2012).

A interferência do nível de carga viral na detecção do DNA VHB ficou mais evidente quando analisamos as amostras de tecido hepático, pois das nove amostras, oito (88%) tiveram o DNA VHB detectado pela PCR. E embora não tenha sido avaliado o nível de carga viral no tecido hepático, acredita-se que esse seja o principal motivo para esse resultado de 100% de positividade na PCR usando a mesma metodologia. Então, embora empiricamente, podemos supor que a carga viral dosada no plasma é subestimada em relação ao quadro real de replicação viral nos hepatócitos. Evidenciando a necessidade de testes mais sensíveis que permita a detecção precisa dos níveis de carga viral no plasma possibilitando a rápida conclusão do diagnóstico para correta condução clínica principalmente dos portadores crônicos do vírus B ou em coinfecção com o VHD.

Neste estudo tivemos a oportunidade de avaliar a carga viral do vírus delta no plasma usando o *kit RoboGene ® HDV RNA Quantification* 2.0 doado pelo Dr. André Reinhardt da Analytik Jena, Alemanha. Esse kit foi desenvolvido para quantificação do vírus delta e é o único no mundo certificado para quantificação de RNA do vírus D em plasma e soro comercial. Segundo o Dr. Chudy et al 2013 que desenvolveu o **PEI 7657/12** "*1st WHO International Standard for HDV RNA for NAT*" foi preparado a partir de uma amostra de plasma positivo para o vírus D pertencente ao genótipo 1. Porém, detecta todos os outros genótipos (Chudy et al 2013).

A quantificação do RNA do vírus da Hepatite D é utilizada para estimar o risco de gravidade da doença, pois acredita-se que a carga viral do vírus B é suprimida pelo VHD. Nossos resultados também reproduzem esse padrão. Apenas três pacientes tinham o VHB DNA maior, sendo apenas dois logs de diferença (Mumtaz et al, 2011; Heidrich et al 2012; Braga et al 2014; Oliveira, 2015). Apenas as amostras de plasma de

B e D foram comparadas no estudo, pois o resultado da carga viral do VHB dos pacientes foi coletado no prontuário eletrônico *I-Doctor* da FMT-HVD, onde apenas realizam a carga viral a partir do plasma.

Em relação à variabilidade genotípica do VHB, a literatura é unânime ao afirmar que o VHB possui uma alta capacidade de replicação o que resulta em uma extraordinária diversidade genômica, até o momento são descritos dez genótipos (A-J) e mais de quarenta subgenótipos (Schaefer, 2007; Yousif & Kramvis, 2013; Santos et al., 2010; Pourkarim et al., 2014). Para se determinar os genótipos e subgenótipos a PCR seguida de sequenciamento e análise filogenética são considerados padrão ouro para genotipagem do VHB (Villano et al, 2015). Em nosso estudo, usando essa metodologia, amplificou-se um fragmento de 680 pares de bases do gene *S* (região usada para genotipagem) e identificou-se três genótipos A (A1, A2), D3 e F2, respectivamente. Estes resultados concordam com estudos anteriores realizados na região que descrevem o genótipo A como prevalente. (Dias et al.,2012; Galvão, 2013; Castilho et al., 2012; Lampe et al., 2017).

Segundo estudos epidemiológicos, a distribuição dos genótipos do VHB no Brasil sofreu a influência do padrão de imigração entre as diferentes regiões, sendo que, de maneira geral, o genótipo A é o mais encontrado, seguido pelo D e o F. Sendo o genótipo F encontrado principalmente nas populações do interior do Estado do Amazonas. (Almeida, 2009; Dias et al., 2012; Castilho et al., 2012; Braga et al., 2012; Bertollo et al., 2015; Lampe et al., 2017).

Em relação à caracterização molecular e distribuição geográfica dos genótipos do vírus D ou delta, são descritos oito genótipos (1-8), sendo que o tipo 3 é típico da América do Sul. (Casey et al., 1996; Quintero et al., 2001; Alvarado Mora et al., 2011; Villa et al, 2015)

Considerando que em nosso estudo todas as sequências foram agrupadas no clado do genótipo 3, estando, portanto, em consistência com a literatura. O genótipo 3 é conhecido como o mais distante da raiz africana e responsável por um dos casos mais graves de insuficiência hepática aguda e doença hepática em estágio final. (Casey et al, 1993; Braga et al, 2014; Botelho-Souza et al, 2015). No presente estudo, o genótipo 3 apresentou-se associado ao quadro de cirrose hepática (*n=8*) e ao genótipo A do VHB, uma sequência tinha no VHB o genótipo D3, considerado um dos mais agressivos e

outra o genótipo F2. Desse modo, o genótipo 3 do VHD foi mais uma vez confirmado como único circulando entre a população amazonense.

Em relação à pesquisa de mutações de resistência no gene da polimerase (rt), no presente estudo foi possível comparar mutações de resistência tanto no plasma quanto no tecido hepático neste foi realizada pesquisa tanto nas sequências isoladas do plasma quanto do tecido hepático. Neste sentido, enquanto no plasma somente três sequências (*n=11*) apresentaram mutações associadas a resistência antivirais no tecido hepático em cinco (*n=8*) sequências foi detectado mutações de resistência. O que nos leva crer que a taxa de replicação mais elevada pode induzir mutações no gene da polimerase. As principais mutações detectadas foram L180S, V180W, T184R/N/K, S202K, M204R/D/I. É valido ressaltar que essas mutações estão associadas à resistência aos análogos núcleosídeos: Lamivudina, Telbivune, Adefovir e Entecavir. (Haddad et al. 2010; Lim, 2017; Chen, 2018; Choi et al, 2018). Em nosso estudo elas aparecem como possível resistência aos análogos Lamivudine, Entecavir, Telbivudine e Adefovir, apenas uma sequência (05) isolada de tecido hepático, apresentou resistência aos análogos Lamivudine, Entecavir, Telbivudine.

A incorporação aleatória de nucleotídeos e a falha na atividade revisora da enzima transcriptase reversa do VHB durante o processo de replicação, está relacionado com a mutação 204 no domínio YMDD que ocorre espontaneamente em pacientes portadores crônicos de Hepatite B não tratados. As substituições mais comuns são isoleucina (rtM204I, YIDD mutante) ou valina (rtM204V, YVDD mutante). (Locarnini, Yuen, 2010; He et al 2015; Lim 2017). Em nosso estudo, essas mutações foram encontradas em 3/11 (10%) das sequências isoladas de plasma e 4/08 (44%) das isoladas de tecido hepático. É importante ressaltar que nenhum dos pacientes vírus mutante foram submetidos a tratamento com drogas antivirais. O que leva a crer que o desenvolvimento de mutações de resistência está associado a fatores históricos de tratamento e que o vírus vem se perpetuando há muitas gerações na população.

A implementação de rigorosos programas de vacinação levou a diminuição geral na prevalência do HBsAg em todo o mundo, mas isso também pode ter levado ao surgimento de mutantes virais que podem escapar da proteção do anticorpo de superfície da hepatite B (anti-HBs). O monitoramento contínuo dessas mutações é muito importante, pois, em longo prazo pode-se tornar uma grande ameaça para o sucesso do Programa de Vacinação. (Alavian et al, 2013; Leong et al, 2016). No nosso

estudo, mutações de escape de vacina (sT126I e sN131S) foram identificadas em uma sequência isolada de tecido hepático. Infelizmente, não podemos fazer nenhuma inferência a esse respeito, pois não tivemos acesso ao histórico de vacina do paciente para verificar se o calendário de administração vacinal foi cumprido adequadamente. Porém, Figueiredo em um estudo realizado em comunidades do Alto do Rio Solimões mostrou que o número de pessoas com as três doses completas estava abaixo do recomendado (menos de 70%), inclusive na população de até 14 anos. (Figueiredo, 2016).

Conforme mencionado no início dessa discussão, esse é o primeiro estudo do nosso grupo de pesquisa que avaliou simultaneamente aspectos como a carga viral e os genótipos do vírus B e delta em amostras de plasma e tecido hepático de portadores de hepatopatia crônica no Amazonas. Um dos principais achados foi em relação aos resultados de carga viral do vírus delta *versus* vírus da hepatite B, a maioria apresentou níveis de carga viral do VHB mínima ou não detectável sugerindo inibição da replicação viral do VHB pelo VHD, bem como o elevado número de mutações de resistência ou possível resistência nas cepas isoladas do tecido hepático. Por outro lado, algumas limitações durante o estudo possivelmente refletiram nos resultados obtidos, como por exemplo, o baixo índice de positividade do RNA VHD nas amostras de tecido hepático pela PCR convencional. Dentre os possíveis fatores envolvidos, julgamos como principais o longo período de armazenamento do tecido hepático no RNA later, pois apesar do produto ser recomendado para armazenamento de tecido a -20^{o}C por longo período. No presente estudo essa experiência não foi bem-sucedida, pois ao retirar as biopsias de tecido hepático do RNA later para extração estas em sua maioria estavam dissolvidas. Sendo quase impossível separar o tecido do RNA later sem perda de material. Ainda como agravante, o kit de extração de RNA usado recomenda cerca de 30mg de tecido, porém, o tamanho do fragmento de tecido obtido na biopsia era muito pequeno e ainda tivemos esse problema no armazenamento, então consideramos que esse foi um ponto crítico para o sucesso da extração do RNA VHD.

7. CONCLUSÕES

Diante dos objetivos propostos, concluímos que:

- Em relação à diversidade genotípica do VHB, no plasma e tecido hepático, foi identificado os genótipos A, D e F, não houve diferença entre o material de origem;
- Em relação ao vírus delta, todos os extraídos foram genótipos VHD-3;
- A presença do VHD contribuiu para inibição dos níveis de carga viral do VHB;
- Foi detectado um percentual elevado de mutações de resistência no gene da polimerase (rt), relacionadas aos análogos de nucleotídeos (Lamivudine, Telbuvine, Entecavir e Adefovir), principalmente nas sequências isoladas do tecido hepático;
- Em relação a evolução da doença, o VHD-3 apresentou-se associado ao quadro de cirrose hepática e ao genótipo A do VHB.

Recomendações finais:

Diante dos resultados obtidos e a importância dos achados sugere-se estudos futuros com um número de amostras de plasma e tecido hepático mais significativo a fim de responder as questões sobre a diversidade genética do VHB e D, simultaneamente no plasma e tecido hepático.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, Z.; AFZAL, R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. World Journal of Hepatology, v. 5, n. 12, p. 666–675, 2013.
2. ABBAS, Z.; JAFRI, W.; RAZA, S. Hepatitis D: Scenario in the Asia-Pacific region. World Journal of Gastroenterology, v. 16, n. 5, p. 554–562, 2010.
3. ALAVIAN, S. M., CARMAN, W. F., JAZAYERI, M. S.; HBsAg variants: Diagnostic-escape and diagnostic dilemma. Journal of Clinical Virology. v, 57, p. 201–208, 2013.
4. ALLAIN, J-P. Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. Journal of Clinical Virology, V, 1, N 36, P. 12-17. 2006.
5. ALMEIDA, D. Importância Clínica Dos Genotipos Do Vírus B. Gazeta Médica da Bahia, v. 79, n. 15, p. 39–40, 2009.
6. ALVARADO-MORA, M. V. et al. An update on HDV: Virology, pathogenesis and treatment. Antiviral Therapy, v. 18, n. 3 PARTB, p. 541–548, 2013.
7. ALVARADO-MORA, M.V., ROMANO, C.M., GOMES-GOUVEA, M.S., GUTIERREZ, M.F., CARRILHO, F.J., PINHO, J.R. Dynamics of Hepatitis D (delta) vírus genotype 3 in the Amazon region of South America. Infection, Genetics and Evolution, v. 11, n. 6, p. 1462–1468, 2011.
8. BARROS, L. M. F et al. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil : Inheritance from African slaves ? Virus Research, v. 160, n. 1-2, p. 333–339, 2011.
9. BECK, J.; NASSAL, M. Hepatitis B virus replication. World journal of gastroenterology : WJG, v. 13, n. 1, p. 48–64, 2007.
10. BENSABATH, G., SOARES, M.C.P., HADLER, S.C, FIELDS, H., DIAS, L. B, POPPER, H. Hepatitis delta virus infection and Labrea hepatitis – prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon Basin. JAMA, v, p. 479-483, 1987.
11. BERTOLLO, L. A.; OLIVEIRA, E. C. P; NASCIMENTO, H. C. L; ZARIFE, M. A. S. Distribuição dos Genótipos Virais da Hepatite B em Pacientes do Laboratório de Referência, Bahia. Revista Baiana De Saúde Pública, v.39, p.84-90. 2015.
12. BOTELHO-SOUZA, L. F. et al. Characterization of the genotypic profile of hepatitis delta virus: Isolation of HDV genotype-1 in the Western Amazon Region of Brazil. Intervirology, v. 58, n. 3, p. 166–171, 2015.
13. BRAGA WS, CASTILHO MC, BORGES FG, MARTINHO AC, RODRIGUES IS, AZEVEDO EP, SCAZUFCA M, MENEZES PR. Prevalence of hepatitis B virus

infection and carriage after nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. V, 45, p. 13-17, 2012.

14. BRAGA, W. S. et al. Ocorrência da infecçãoo pelo vírus da hepatite B (VHB) e delta (VHD) em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 34, n. 4, p. 349–355, 2001.
15. BRAGA, W. S. M. et al. Chronic HDV/HBV co-infection: Predictors of disease stage – A case series of HDV-3 patients. Journal of Hepatology, v. 61, n. 6, p. 1205–1211, 2014.
16. BRAGA, W. S. M. Infecção pelos vírus das hepatites B e D entre grupos indígenas da Amazônia Brasileira: Aspectos epidemiológicos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 37, n. SUPPL. 2, p. 9–13, 2004.
17. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites virais 2017/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília : Ministério da Saúde, Volume 48, N° 24 , 2017.
18. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites virais: o Brasil está atento / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 40, 2015.
19. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites virais: o Brasil está atento / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3. Ed. – Brasília : Ministério da Saúde, p.60, 2008.
20. CASEY JL, NIRO GA, ENGLE RE, VEGA A, GOMEZ H, M. M. ET AL. Hepatitis B virus (HBV) hepatitis D(HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basic: the roles of HDV genotypes III and HBV genotype F. Journal Infectious Diseases, v. 174, n. 5, p. 920–926, 1996.
21. CASEY, J. L. et al. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, n. 19, p. 9016–9020, 1993.
22. CASTILHO M. C, OLIVEIRA C.M, GEMAQUE J.B, LEÃO J.D, BRAGA W.S. Epidemiology and Molecular Characterization of Hepatitis B Virus Infection in Isolated

Villages in the Western Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg, v, 87, n. 4, p. 768-774, 2012.

23. CASTILLO, E.; MURPHY, K.; VAN SCHALKWYK, J. Hepatitis B and Pregnancy. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada, n. 342, p. 1–10, 2017.
24. CHEN, B.F.; Hepatitis B virus pre-S/S variants in liver diseases. World Journal of Gastroenterology, v. 24, n. 14, p. 1491-1582, 2018.
25. CHOI, Y. M et al. Naturally occurring hepatitis B virus reverse transcriptase mutations related to potential antiviral drug resistance and liver disease progression. World Journal of Gastroenterology, v. 24, n. 16, p. 1679-1824, 2018.
26. CHUDY, M. et al. Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technique (NAT)-Based Assays. world health organization. n. October, p. 17–21, 2013.
27. CONCEIÇÃO, J. S. et al. Conhecimento dos obstetras sobre a transmissão vertical da hepatite B. Arquivos de Gastroenterologia, v. 46, n. 1, p. 57–61, 2009.
28. CRISPIM, M. A. E. et al. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. BMC Infectious Diseases, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.
29. DI FILIPPO VILLA, D. et al. Hepatitis D virus and hepatitis B virus infection in Amerindian communities of the Amazonas state, Colombia. Virology Journal, v. 12, n. 52, p. 1–10, 2015.
30. DIAS, A.L., OLIVEIRA, C.M., CASTILHO, M.C., SILVA, M.S., BRAGA, W.S. Molecular characterization of the hepatitis B virus in autochthonous and endogenous populations in the Western Brazilian Amazon. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. V, 45, p. 9-12, 2012.
31. FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. Em Bras Epidemiol, v. 7, n. 4, p. 473–87, 2004.
32. FIGUEIREDO, I. R. et al. Hepatite B congênita : uma revisão. Revista de Medicina e Saúde de Brasília, v. 5, n. 2, p. 322–332, 2016.
33. FOCACCIA, R. Hepatites Virais. São Paulo: Editora Atheneu, 1997.192p.
34. FONSECA, J. C. F. Hepatite D. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. V. 35, n. 13, p. 181–190, 2002

35. FONSECA, J. C. F. História natural da hepatite crônica B Natural history of chronic 77írus77ia77 B. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 40, n. 6, p. 672–677, 2007.
36. FOUPOUAPOUOGNIGNI, Y. et al. High prevalence and predominance of hepatitis delta virus genotype 1 infection in Cameroon. Journal of Clinical Microbiology, v. 49, n. 3, p. 1162–1164, 2011.
37. FRANCOIS-SOUQUIERE, S. et al. Epidemiological and molecular features of hepatitis B and hepatitis delta virus transmission in a remote rural community in central Africa. Infection, Genetics and Evolution, v. 39, p. 12–21, 2016.
38. GANEM, D. Hepadnaviridae and their replication. Virology (B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), p. 2703–2737, 1996.
39. GERLICH W. Structure and molecular virology. In: Zuckerman A, Thomas HC, editors.Viral hepatitis - scientific basis and clinical management. 4ª ed. New York : Churchill Livingstone; 1997.
40. GHANY, M.; LIANG, T. J. Drug Targets and Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Chronic Hepatitis B. Gastroenterology, v. 132, n. 4, p. 1574–1585, 2007.
41. GIERSCH, K. et al. Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection. Journal of Hepatology, v. 60, n. 3, p. 538–544, 2014.
42. GOMES, S.A. O genoma do vírus da hepatite B. In: Focaccia R (Ed.), Tratado de Hepatites Virais, Atheneu, São Paulo, pp. 119–125. 2003
43. GRABOWSKI, J.; WEDEMEYER, H. Hepatitis delta: Immunopathogenesis and clinical challenges. Digestive Diseases, v. 28, n. 1, p. 133–138, 2010.
44. HADDAD, R. et al. Hepatitis B virus genotyping among chronic hepatitis B patients with resistance to treatment with lamivudine in the City of Ribeirao Preto, State of Sao Paulo. Rev Soc Bras Med Trop, v. 43, n. 3, p. 224–228, 2010.
45. HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NTNucleic Acids Symposium Series, v. 1, n. 41, p. 95–98, 1999.
46. HE, X; FANG, W; BIN, H; PEISON C. Detection and analysis of resistance mutations of hepatitis B virus. Int J Clin Exp Med, v. 8, n. 5, p. 9630-9639, 2015.

47. HEIDRICH, B. et al. HBeAg-positive hepatitis delta: Virological patterns and clinical long-term outcome. Liver International, v. 32, n. 9, p. 1415–1425, 2012.
48. HUGHES, S. A.; WEDEMEYER, H.; HARRISON, P. M. Hepatitis delta virus. The Lancet, v. 378, n. 9785, p. 73–85, 2011.
49. HUY, T. T.; ABE, K. Molecular epidemiology of hepatitis B and C virus infection in Asia v. 46, p. 223-230, 2004.
50. INOUE, T.; TANAKA, Y. Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection – an update. Microbial Cell, v. 3, n. 9, p. 419–436, 2016.
51. KAY, A. et al. HBV/HDV co-infection in the Western Brazilian Amazonia: An intriguing mutation among HDV genotype 3 carriers. Journal of Viral Hepatitis, v. 21, n. 12, p. 921–924, 2014.
52. KIESSLICH, D. et al. Influence of hepatitis B virus (HBV) genotype on the clinical course of disease in patients coinfected with HBV and hepatitis delta virus. The Journal of infectious diseases, v. 199, n. 11, p. 1608–11, 2009.
53. KRAJDEN, M.; MCNABB, G.; PETRIC, M. The laboratory diagnosis of hepatitis B virus. The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology. Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie médicale / AMMI Canada, v. 16, n. 2, p. 65–72, 2005.
54. KUMAR R; PÉREZ-DEL-PULGAR S; TESTONI B; LEBOSSÉ F; ZOULIM F. Clinical relevance of the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. Liver Int. v, 1, n 36, p. 72-77. 2016.
55. KUMAR S; STECHER G; TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33:1870-1874. 2016.
56. LAI, M. M. C. RNA Replication without RNA-Dependent RNA Polymerase: Surprises from Hepatitis Delta Virus. Society, v. 79, n. 13, p. 7951–7958, 2005.
57. LAMPE, E. et al. Nationwide overview of the distribution of hepatitis B virus genotypes in Brazil: A 1000-sample multicentre study. Journal of General Virology, v. 98, n. 6, p. 1389–1398, 2017.
58. LEE, W. M. Hepatitis B virus infection. The New Englad Journal of Medicine. Watham, v, 337, n. 24, p. 1733-1745, 1997.

59. LEONG J ET AL. Hepatitis B surface antigen escape mutations: Indications for initiation of antiviral therapy revisited. World Journal of Clinical Cases, v, 4, n 3, p. 71-75, 2016.
60. LIANG, T. J. Hepatitis B: The Virus and Disease. Hepatology. V. 49, p. 1–17, 2010.
61. LIM, Y.-S. Management of Antiviral Resistance in Chronic Hepatitis B. Gut and Liver, v. 11, n. 2, p. 189–195, 2017.
62. LIM, Y.-S. Management of Antiviral Resistance in Chronic Hepatitis B. Gut and Liver, v. 11, n. 2, p. 189–195, 2017.
63. LIN, C. L. KAO, J.H. The Clinical Implications of Hepatitis B virus genotype: Recent Advances. JGH v. 1, p. 123-130, 2011.
64. LOCARNINI, S. A.; YUEN, L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. Antiviral Therapy, v. 15, n. 3 PART B, p. 451–461, 2010.
65. LOPES, T. G. S. L.; SCHINONI, M. I. Aspectos gerais da hepatite B. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 10, n. 3, p. 337–344, 2011.
66. MESHKAT, M. et al. Distribution of hepatitis delta virus genotypes in Mashhad, Northeast Iran. Jundishapur Journal of Microbiology, v. 8, n. 2, p. 20–23, 2015.
67. MINISTÉRIO DA SAUDE. Hepatites virais: o Brasil está atento / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, v. 3. Brasília : Ministério da Saúde, 60p. 2008.
68. MONJARDINO, J. P.; SALDANHA, J. A. Delta 79írus79ia79. The disease and the virus. Br Med Bull, v. 46, n. 2, p. 399–407, 1990.
69. MUMTAZ, K. et al. Virological and clinical characteristics of hepatitis delta virus in South Asia. Virology Journal, v. 8, n. 1, p. 312, 2011.
70. NGUYEN H.M, SY B.T; TRUNG N.T, HOAN N.X, WEDEMEYER H, VELAVAN T.P.Prevalence and genotype distribution of hepatitis delta virus among chronic hepatitis B carriers in Central Vietnam, v 12, n 4, p. 1–15, 2017.
71. NOUREDDIN, M.; GISH, R. Hepatitis delta: Epidemiology, diagnosis and management 36 years after discovery. Current Gastroenterology Reports, v. 16, n. 1, 2014.
72. NUNES, H. M. et al. Prevalência de infecção pelos vírus das hepatites A, B, C e D na demanda de um hospital no Município de Juruti, oeste do Estado do Pará, Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saude, v. 1, n. 2, p. 105–111, 2010.

73. OLIVEIRA, C. M., FARIAS, I.P., FERRAZ, J.C.F., BRASIL, L.M., SOUZA, R., ASTOLFI-FILHO, S. Phylogeny and molecular genetic parameters of different stages of hepatitis B virus infection in patients from the Brazilian Amazon. Arch Virol, v. 153, p. 823-830, 2008.
74. OLIVEIRA, M. S. DE et al. Hepatite B crônica e a superinfecção por vírus D em pacientes na Amazônia Ocidental brasileira. Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, v. 5, n. 2, p. 72–78, 2015.
75. OLIVERO, A.; SMEDILE, A. Hepatitis Delta Virus Diagnosis. Seminars in Liver Disease, p. 220–227, 2012.
76. POURKARIM MR et al. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: Revised classification hurdles and updated resolutions. World Journal Gastroenterology, v 20, n 23, p. 7152-7168, 2014.
77. PRAVEEN K R, LACEY S R. Hepatitis D: Background, Etiology, Epidemiology. Medscape: Drugs & Diseases, Gastroenterology. 2015. Disponível em: <http://Emedicine.Medscape.Com/Article/178038-Overview#Showall> Acesso Em: 16/11/2016.
78. QUINTERO, A. et al. Hepatitis delta virus genotypes I and III circulate associated with hepatitis B virus genotype F In Venezuela. J Med Virol, v. 64, n. 3, p. 356–359, 2001.
79. RANEY, A.K., MCLACHLAN, A. The biology of hepatitis B virus. *In* McLachlan A, editor. (ed), Molecular biology of the hepatitis B virus. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 1-37, 1991.
80. RIZZETTO M, et al. Liver transplantation in hepatitis Delta virus disease. The Lancet, v. 2, p. 469-471, 1987.
81. ROMEO, R.; PERBELLINI, R. Hepatitis delta virus : Making the point from virus isolation up to 2014. World Journal of Hepatology. V. 7, n. 22, p. 2389–2395, 2015.
82. SABLON, E.; SHAPIRO, F. Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. International Journal of Medical Sciences, v. 2, n. 1, p. 8–16, 2005.
83. SAID, Z. N. A. An overview of occult hepatitis B virus infection. World Journal of Gastroenterology, v. 17, n. 15, p. 1927–1938, 2011.
84. SANTOS, A. O. et al. Characterization of Hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. Virology Journal, v. 7, n. 1, p. 315, 2010.

85. SARACENI, C. P. Vigilância das hepatites virais: a experiência de Vargem Grande Paulista, 1997-1999. 2001. 56p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
86. SAYAD, B. et al. Hepatitis D virus infection in Kermanshah, west of Iran : seroprevalence and viremic infections. n. December 2017, 2018.
87. SCHAEFER, S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. World Journal of Gastroenterology, v. 13, n. 1, p. 14–21, 2007.
88. SCHRÖDER-STUMBERGER, I.; SAFIN, I.; PORSCHEWSKI, P. Optimal RNA later incubation and removal conditions prior to isolation of total RNA from stabilized cell samples Sample to Insight. QIAGEN. p. 1–6, 2017.
89. SEEGER, C., MASON, W. S. Hepatitis B virus biology. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, v. 64, n. 1, p. 51–68, 2000.
90. SEEGER, C; MASON, W, S. Molecular Biology of Hepatitis B Virus Infection. Virology. May. P, 672–686. 2015.
91. SILVA, A. L. et al. Hepatites virais : B , C e D : atualização. Revista Brasileira de Clínica Médica, v. 10, n. 3, p. 206–18, 2012.
92. SMEDILE, A. et al. Hepatite Delta: Historia Natural – Transmissão – Imunodiagnostico. In: FOCACCIA, R. (Ed.). Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas. Editora Atheneu, p. 939-955, 2013.
93. SOUZA, M. Q. DE; ROCHA, T. B. Hepatite B - Estudo sobre HBV vírus, Sintomas, Transmissão e Diagnóstico. Acta de Ciência e Saúde, v. 02, p. 55–72, 2013.
94. SUNBUL, M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. World Journal of Gastroenterology, v. 20, n. 18, p. 5427–5434, 2014.
95. SUREAU, C.; NEGRO, F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. Journal of Hepatology, v. 64, n. 1, p. S102–S116, 2016.
96. TAYLOR, J. M. Hepatitis delta 81írus. Virology, v. 344, n. 1, p. 71–76, 2006.
97. TE, H. S.; JENSEN, D. M. Epidemiology of Hepatitis B and C Viruses: A Global Overview. Clinics in Liver Disease, v. 14, n. 1, p. 1–21, 2010.
98. TONG, S.; REVILL, P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. Journal of hepatology, v. 64, n. 1S, p. S4–S16, 2016.
99. TSENG, C.-H.; LAI, M. M. C. Hepatitis delta virus RNA replication. Viruses, v. 1, n. 3, p. 818–31, 2009.

100. TU, T.; URBAN, S. ScienceDirect Virus entry and its inhibition to prevent and treat hepatitis B and hepatitis D virus infections. Current Opinion in Virology, v. 30, p. 68–79, 2018.
101. VILLANO, U. et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Hepatitis B virus in a group of migrants in Italy. BMC Infectious Diseases, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015.
102. WARNER, N.; LOCARNINI, S. Mechanisms of hepatitis B virus resistance development. Intervirology, v. 57, n. 3-4, p. 218–224, 2014.
103. WEDEMEYER, H.; MANNS, M. P. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D : update and challenges ahead. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, v. 7, n. 1, p. 31–40, 2010.
104. WORKOWSKI, K.A; BOLAN, G.A. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. MMWR Recomm Rep 64(Rr-03): 1-137. 2015.
105. WORLD HEALT ORGANIZATION. Hepatitis B. Media centre. 2017. Disponivel em: < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/em/> Acesso: 21/04/2017.
106. WORLD HEALT ORGANIZATION. Hepatitis D. Media centre. 2016. Disponivel em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/hepatitis-d/en/> Acesso: 19/11/2016.
107. WU, J. C. et al. Natural history of hepatitis D viral superinfection: Significance of viremia detected by polymerase chain reaction. Gastroenterology, v. 108, n. 3, p. 796–802, 1995.
108. XIRIDOU, M. et al. How Hepatitis D Virus Can Hinder the Control of Hepatitis B Virus. PloS ONE. V. 4, n. 4, 2009.
109. YOUSIF, M.; KRAMVIS, A. Genotype D of hepatitis B virus and its subgenotypes: An update. Hepatology Research, v. 43, n. 4, p. 355–364, 2013.
110. YURDAYDIN, C. et al. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis. Journal of Viral Hepatitis, v. 17, n. 11, p. 749–756, 2010.
111. ZANETTI, A. K. et al. Worldwide Epidemiology and Modes of Transmission of Delta Hepatitis. Infection, v. 15, n. 2, p. 1986–1987, 1987.
112. ZATTI, C. A. et al. Hepatite B : Conhecendo a Realidade Brasileira. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, v. 4, n. 1, p. 5–11, 2013.
113. ZHANG, X. ZOULIM, F. HEBERSETZER, F. XIONF, S. TREPO, C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of Hbe antigen negative chronic hepatitis. B J Med Virol, v, 48, p. 8-16, 1996.

ANEXO

- **COMPROVANTE DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA**

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO ((FMT-HVD))

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FATORES ASSOCIADOS À DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA AVANÇADA COMPENSADA PELO VÍRUS DA HEPATITE DELTA

Pesquisador: ALINNE LAIS BESSA MAIA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55957816.0.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.620.140

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: FATORES ASSOCIADOS À DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA AVANÇADA COMPENSADA PELO VÍRUS DA HEPATITE DELTA

Pesquisador Responsável: ALINNE LAIS BESSA MAIA

Versão 2

Tamanho amostral: 50 (amostra de conveniência)

Estudo clínico de natureza descritiva e transversal, a ser realizado com a demanda espontânea do ambulatório de hepatites virais da Fundação de Medicina Tropical Dr.Heitor Vieira Dourado no período de julho a dezembro de 2016. Definição dos participantes do estudo: Os pacientes recém diagnosticados anti-HDV total reativos que procurarem o ambulatório de hepatites virais serão convidados a participar do estudo.

Seleção de pacientes: Os pacientes encaminhados ao ambulatório de hepatites da FMT-HVD pela triagem interna, outros serviços ou outros estados e municípios, independente de terem perfil sorológico definido ou não, serão avaliados pela triagem de enfermagem que

completa o protocolo de exames do serviço, realiza aconselhamento e encaminha aos médicos assistenciais do serviço.Esse programa prevê que os pacientes recém-diagnosticados que

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

- **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO

PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Você está sendo convidado (a) a participar deste estudo intitulado **"Estudo do Vírus da Hepatite B e D em Plasma e Tecido Hepático de Portadores Crônicos"**, pois, você tem perfil e preenche os critérios para na condição de sujeito, participar desta pesquisa. *Sujeito da Pesquisa* é a expressão dada a todo ser humano que, de livre e espontânea vontade e após ser devidamente esclarecido, concorda em participar da pesquisa, doando material biológico, ou seja, amostra de plasma sanguíneo e tecido hepático que já se encontram armazenados em freezer – 80°C no Laboratório da Gerencia de Virologia da FMT-HVD.

Este estudo é uma ampliação do projeto: "**Fatores associados à doença hepática crônica avançada compensada pelo vírus da hepatite delta**", Coordenado pela Pesquisadora **Alinne Lais Bessa Maia** Médica Gastroenterologista e Endoscopista e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD CAAE No 55957816.0.0000.0005/2016.

Sempre que for necessário esclarecer alguma dúvida sobre o estudo, você deverá buscar contato com o coordenador do subprojeto de pesquisa **Felipe Guedes Amorim**, no endereço: Rua São Bartolomeu, n° 28, Bairro: Santa Etelvina, Fone(s) 92-995375427. Para quaisquer informações, fica disponibilizado o endereço do CEP/FMT-HVD, sito à Av. Pedro Teixeira nº 25 – Dom Pedro II, Cep 69.040-000, Manaus-Am, que funciona de 2ª a 6ª Feira, das 08:00 às 14:00 horas, telefone (92)2127-3572, e-mail:cep@fmt.am.gov.br

C O N S E N T I M E N T O

Li tomei conhecimento, entendi os aspectos da pesquisa e, voluntariamente, concordo em participar do estudo.

_____

Assinatura ou Impressão Datiloscópica do Sujeito da Pesquisa

Residência:_____

Fone(s):_____

Pesquisador (a) Responsável:_____