Michele Soares Gomes-Gouvêa

**Prevalência de resistência primária aos antivirais utilizados no
tratamento da hepatite B entre pacientes com infecção crônica
pelo vírus da hepatite B não submetidos a tratamento**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador

Dr. João Renato Rebello Pinho

Coorientadora

Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa

**São Paulo
2014**

Michele Soares Gomes-Gouvêa

**Prevalência de resistência primária aos antivirais utilizados no
tratamento da hepatite B entre pacientes com infecção crônica
pelo vírus da hepatite B não submetidos a tratamento**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador

Dr. João Renato Rebello Pinho

Coorientadora

Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes-Gouvêa, Michele Soares

Prevalência de resistência primária aos antivirais utilizados no tratamento da
hepatite B entre pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B não
submetidos a tratamento / Michele Soares Gomes-Gouvêa. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: João Renato Rebello Pinho.

Coorientadora: Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa.

Descritores: 1.Vírus da hepatite B 2.Hepatite B crônica/epidemiologia
3.Resistência a medicamentos 4.Antivirais 5.Diagnósticos moleculares 6.Mutação
7.Genótipo

USP/FM/DBD-172/14

Dedicatória

Dedico este trabalho aos pacientes portadores de hepatite B no Brasil.

Que sempre lembremos que nossa principal razão de estudar, pesquisar e aprender sobre os diferentes aspectos da doença, do vírus, do tratamento, da resposta imune etc ... é a melhoria da assistência, da saúde e da qualidade de vida desses pacientes.

Dedico também aos profissionais médicos que investem suas vidas no cuidado dos portadores de hepatite B. Agradeço aos meus amigos médico(a)s que me ajudam a lembrar o tempo todo que há uma pessoa, além da amostra que recebemos no laboratório.

Agradecimentos

- A **Deus** pela oportunidade que tive de chegar até aqui, de ter passado pelas instituições que passei e ter encontrado as pessoas que encontrei.
- Ao **Dr. João Renato Rebello Pinho** que me orientou não só no desenvolvimento desta tese, mas em praticamente toda minha carreira acadêmica. Muito obrigada João pelo tempo dedicado à minha formação; por compartilhar as suas ideias, mesmos aquelas malucas; por acreditar nas minhas ideias e me incentivar a colocá-las em prática; obrigada pela sua confiança, que foi fundamental para que meu crescimento pessoal e profissional.
- À **Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Correa**, que também me orientou no desenvolvimento desta tese. Obrigada pela confiança, pois quando começamos este trabalho ainda tínhamos pouco tempo de convivência. Obrigada pelo apoio na busca de financiamento, de pacientes e de colaboradores. Agradeço também pela amizade demonstrada nos momentos mais críticos através de suas palavras de conforto e incentivo.
- Aos **médicos e pesquisadores** que contribuíram para montarmos a casuística que compôs este estudo, assim como às suas **instituições**, que nos forneceram todo o apoio para o desenvolvimento do projeto. Obrigada pela seleção cuidadosa dos pacientes e pela disposição em conferir informações quando estas foram solicitadas. A contribuição de vocês foi essencial para que pudéssemos ter um resultado tão representativo, além disso, para mim foi uma experiência profissional riquíssima poder desenvolver um trabalho com uma rede de colaborações tão ampla. Foi um prazer imenso trabalhar com vocês, muito obrigada pela oportunidade: **Simone Regina Souza da Silva Conde** (Santa Casa de Misericórdia do Pará/PA), **Manoel do Carmo Pereira Soares** (Seção de Hepatologia, Instituto Evandro Chagas/PA), **Adalgisa de Souza Paiva Ferreira** e **Lena Maria Fonseca Barros** (Centro de Estudo do Fígado do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão /MA), **André Castro Lyra** (Universidade Federal da Bahia, Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos/BA), **Rosângela Teixeira** e **José Rubens Andrade** (Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais/MG), **Ana Catharina de Seixas Santos Nastri** (Departamento de Moléstias Infecciosas, Faculdade de Medicina da USP/SP), **Rosamar Eulira Fontes Rezende** (Ambulatório de Hepatites da Secretária Municipal de Saúde de Ribeirão Preto/ SP), **Dennis Armando Bertolini** (Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas/PR) e **Aline Satie Oba Kunyoshi** (15ª Regional de Saúde de Maringá/PR), **Dimas Alexandre Kliemann** (Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre/RS), **Andrea Gurgel Batista Leite**, **Leonora De Zorzi Piccoli** e **Josiane Galvan** (Serviço Municipal de Infectologia do Centro Especializado de Saúde de Caxias do Sul/RS);
- Aos **pacientes** incluídos neste estudo, agradeço pela disposição confiança no nosso trabalho.

- À querida **Ariana Carolina Ferreira**, que contribuiu imensamente na realização das atividades laboratoriais deste trabalho. Agradeço pela oportunidade de ter cooperado na sua formação nesse período e por todo o aprendizado que vivenciei nesse processo, afinal quem ensina também aprende, e muito! Obrigada também pela sua amizade, apoio e estímulo.
- Aos colegas **Márcio Katsumi Oikawa** e **Luciano Vieira de Araújo** que contribuíram com seus conhecimentos matemáticos para análise informatizada das mutações, me ajudando a não enlouquecer no meio de tantos nucleotídeos e aminoácidos.
- À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** que nos forneceu os recursos financeiros necessários para o desenvolvimento do projeto de pesquisa (FAPESP nº2010/51208-2) e para a minha manutenção (Bolsa de Doutorado FAPESP nº 2010/50081-9).
- Ao **Prof. Dr. Flair José Carrilho**, pelo apoio constante ao nosso grupo de pesquisa.
- Aos professores que participaram da banca de qualificação desta tese, por suas preciosas sugestões que contribuíram para que o trabalho fosse melhorado. Muito obrigada **Dra. Ester Cerdeira Sabino**, **Dra. Maria Lúcia C. Gomes Ferraz** e **Dra. Geruza Maria Figueiredo**.
- Ao meu marido **Wellington L.M. Gouvêa**, pelo seu apoio durante todo esse processo, pela sua compreensão nas horas que precisamos abrir mão dos nossos momentos de lazer em prol da realização deste trabalho. Obrigada amor por tantas vezes que você me ajudou a recobrar as forças e me incentivou a superar os obstáculos. Obrigada pelo seu carinho e cuidado comigo e pela sua extrema paciência, especialmente nos meus momentos de impaciência. Obrigada por também ter contribuído diretamente para o andamento do trabalho me ensinando acerca dos recursos no Excel, que tanto facilitaram a organização e análises dos dados.
- À minha amiga e colega não só de pós-graduação, mas de uma longa caminhada profissional: **Fernanda de Mello Malta**. Obrigada pelo seu apoio e incentivo em todos os momentos dessa jornada, obrigada pelo seu exemplo de superação e força, o que para mim foi um estímulo para prosseguir.
- Ao amigo e colega de pós-graduação **Thiago Ferreira de Araújo**, pelo apoio e incentivo, além da sua importante colaboração na operação e manutenção do sequenciador disponível no laboratório.
- Aos colegas e amigos do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical pelo apoio constante, pela torcida e por terem sido compreensivos nos momentos em que fiquei mais retirada e com cara de quem não queria ser incomodada. Obrigada pela paciência: **Paola Lara Faria**, **Ketti Gleyzer de Oliveira**, **João Paulo Moreira**, **Livia de Souza Botelho Lima**, **Caroline Noble**, **Max Diego Cruz Santos**, **Karine Vieira Gaspareto**.

- Às queridas **Cris Nakle** e **Clarice Lemos** do laboratório de doenças autoimunes e metabólicas, que constantemente me apoiaram e incentivaram, além de estarem sempre dispostas a me ajudar em tudo que precisei.
- Ao Dr. **Eduardo Cançado** do laboratório de doenças autoimunes e metabólicas, que sempre me animou com seu jeito empolgado de ser, obrigada pela amizade e incentivo.
- Aos colegas do laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose pelo apoio e incentivo. Em especial agradeço à **Ana Maria** pelas constantes orientações nas questões de biossegurança; à **Fátima** pela ajuda em alguns processos burocráticos do LIM e pelos cafés no meio da tarde, que tantas vezes restabeleceram as minhas forças; à **Miriam** que mais recentemente muito nos ajudou na manutenção do laboratório e também foi uma daquelas que me animou com seus cafés; ao Dr. **Ronaldo** que muitas vezes me animou com suas palavras de incentivo e ao querido Prof. **Tales de Brito**, pela sua amizade e pelo seu exemplo de força e dedicação, uma fonte de inspiração que carregarei sempre comigo.
- Aos meus **familiares e amigos** que sempre me apoiaram na escolha da carreira acadêmica, me incentivaram a superar as dificuldades e a buscar os meus objetivos.
- Às secretarias da pós-graduação **Fabiana Soares** e **Vilma Libério**, obrigada pelo auxílio que vocês me prestaram nas diferentes fases da pós-graduação. Sem dúvida a ajuda de vocês torna a nossa vida um tanto mais leve em meio aos inúmeros papéis e documentos necessários nesse percurso.
- Aos professores que coordenam o programa de pós-graduação Ciência em Gastroenterologia: Prof. Dr. **Ivan Cecconello**, Prof. Dr. **Luiz Augusto Carneiro D’Albuquerque**, Prof. Dr. **Flair José Carrilho**, Prof. Dr. **José Jukemura**. Obrigada pelo constante esforço para que a qualidade do programa seja sempre melhorada.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 - Introdução	2
1.1 – Considerações iniciais	2
1.2 – Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HBV.....	3
1.3 - O vírus da Hepatite B	6
1.4 - O ciclo replicativo do HBV.....	10
1.5 - Diversidade genética do HBV.....	12
1.6 - Aspectos clínicos da infecção pelo HBV	16
1.7 - Tratamento	18
1.8 – Implicações clínicas e epidemiológicas da diversidade genética do HBV.....	23
2 – Objetivos	42
3 - Casuística e Métodos.....	44
3.1 - Desenho do estudo e seleção de pacientes.....	44
3.2 – Métodos.....	45
3.2.4 - Análise das sequências	53
3.2.5 - Análise estatística	54
4 - Resultados	57
4.1 - Detecção do HBV DNA, amplificação e sequenciamento da região S/Pol	57
4.2 – Características demográficas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo.....	58
4.3 - Distribuição dos genótipos do HBV nas regiões brasileiras estudadas.....	60
4.4 - Distribuição dos subgenótipos do HBV circulantes nas regiões brasileiras estudadas	62
4.5 - Relações filogenéticas dos subgenótipos do HBV mais frequentes nas regiões brasileiras estudadas.....	65
4.6 – Pesquisa de mutações na polimerase do HBV	75
4.7 - Pesquisa de mutações no HBsAg	85
4.8 - Associação entre os subgenótipos do HBV e características demográficas dos pacientes (idade, sexo, cor, naturalidade e procedência)	94
4.9 - Associação entre os subgenótipos do HBV, perfil sorológico do HBeAg, e mutações na região do promotor basal do core (BCP) e genes pré-core/core..	96
5 – Discussão	101
5 – Conclusões.....	126
6 – Anexos.....	129
7 – Referências bibliográficas.....	164

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedência das amostras incluídas no presente estudo	47
Figura 2 - Distribuição das amostras que foram efetivamente incluídas neste estudo conforme procedência	57
Figura 3 – Distribuição dos genótipos do HBV nas diferentes regiões geográficas estudadas no Brasil	61
Figura 4 – Frequência dos subgenótipos do HBV encontrada na casuística estudada.....	62
Figura 5 – Distribuição e frequência dos subgenótipos do HBV nas diferentes regiões brasileiras estudadas. Os subgenótipos identificados com letras em fonte menor sem o valor percentual foram identificados em menos de 5% do total de amostras analisadas.	64
Figura 6 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como subgenótipo A1.....	66
Figura 7 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como subgenótipo A2.....	67
Figura 8 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como subgenótipos D1 e D2.....	70
Figura 9 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como subgenótipo D3.....	71
Figura 10 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como subgenótipo D4.	72
Figura 11 - Árvore filogenética das sequências do genoma completo das amostras identificadas neste trabalho como subgenótipo D4.	73
Figura 12 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como genótipos B, C, E, F e G.....	74
Figura 13 – Estrutura esquemática da principal região hidrofílica do HBsAg com as posições onde foram observadas mutações (destacadas em cor de rosa). Abaixo estão relacionadas as mutações encontradas em cada posição.....	88
Figura 14 – Frequência de mutações nas diferentes posições da região MHR do HBsAg	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Mutações associadas à resistência do HBV aos principais análogos nucleos(t)ídeos utilizados no tratamento da hepatite B	32
Quadro 2 - Mutações no HBsAg geradas em decorrência da presença de mutações na polimerase	35
Quadro 3 - Resultados de estudos que avaliaram a frequência de pacientes com HBC e não tratados com AN infectado com cepas do HBV com resistência aos AN	39
Quadro 4 - Mutações relacionadas com resistência aos análogos nucleos(t)ídeos encontradas na região com função de transcriptase reversa da polimerase de cepas do HBV isoladas de 702 pacientes virgens de tratamento.....	78
Quadro 5 - Mutações não associadas com resistência aos análogos nucleos(t)ídeos encontradas na região com função de transcriptase reversa da polimerase de cepas do HBV isoladas de 702 pacientes virgens de tratamento.....	80
Quadro 6 - Mutações no HBsAg (MHR) que afetam a antigenicidade e secreção da proteína	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo	59
Tabela 2- Divergência (média) entre as sequências do genoma completo das cepas de HBV/D4 isoladas no Brasil e sequências HBV/D4 isoladas em outros países publicadas no GenBank.....	69
Tabela 3 – Frequência de mutações na polimerase (região de transcriptase reversa) do HBV de acordo com a região analisada.....	76
Tabela 4 – Carga Viral, subgenótipo, perfil sorológico HBeAg/anti-HBe, padrão de mutações na polimerase/HBsAg e perfil de resistência das amostras com mutações de resistência aos análogos núcleos(t)ídeos identificadas neste estudo	84
Tabela 5 – Frequência de mutações nas diferentes regiões do HBsAg de acordo com os subgenótipos do HBV mais frequentes na casuística estudada.....	86
Tabela 6 – Frequência de mutações na região MHR do HBsAg de acordo com característica demográficas (idade) dos pacientes, variáveis laboratoriais (carga viral e perfil HBeAg) e subgenótipo do HBV.....	89
Tabela 7 – Comparação de idade, variáveis laboratoriais (carga viral e perfil HBeAg) e características virológicas (subgenótipo e mutações nas diferentes regiões do HBsAg) entre os grupos com e sem positividade simultânea para HBsAg e anti-HBs	93
Tabela 8 – Associação entre os subgenótipos do HBV, características demográficas dos pacientes (idade, sexo, cor, naturalidade e procedência) e perfil sorológico do HBeAg.....	95
Tabela 9 - Frequência de mutações nas regiões pré-core/core nos subgenótipos mais frequentes na casuística estudada	99

Resumo

Gomes-Gouvêa MS. *Prevalência de resistência primária aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite B entre pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B não submetidos a tratamento* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a frequência de cepas do HBV com mutações de resistência aos análogos nucleos(t)ídeos (AN) utilizados no tratamento da hepatite B entre indivíduos cronicamente infectados, não submetidos a tratamento, procedentes de diferentes regiões do Brasil. Além disso, foram avaliadas a presença de mutações que alteram a antigenicidade do HBsAg promovendo escape dos anticorpos anti-HBs; mutações nos genes pré-core/core e a associação dos diferentes subgenótipos com as mutações encontradas e características demográficas e laboratoriais dos pacientes. Foram incluídas 779 amostras de soro de pacientes com infecção crônica pelo HBV e virgens de tratamento com AN ou interferon, as quais foram coletadas no período de 2006 a 2011. Os pacientes eram procedentes dos seguintes estados brasileiros: Pará, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. O DNA do HBV foi extraído das amostras de soro utilizando o Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) e posteriormente foi realizada a amplificação das regiões S/polimerase (S/P) e pré-core/core (PCC) do genoma viral por *nested* PCR. O fragmento amplificado foi submetido a sequenciamento direto em sequenciador automático de DNA (ABI 3500) e as sequências obtidas foram analisadas para identificação dos genótipos e subgenótipos do HBV, pesquisa de mutações na polimerase, no HBsAg e nos genes pré-core/core. A região S/Pol foi amplificada e sequenciada com sucesso em 702 amostras, as quais foram incluídas para atender aos objetivos deste estudo. Entre as 702 amostras analisadas sete genótipos e 12 subgenótipos do HBV foram identificados. O subgenótipo A1 foi o mais frequente (63,7%, 447/702), seguido pelo HBV/D3 (14,5%, 102/702). Os demais genótipos e subgenótipos encontrados e suas frequências foram as seguintes: A2 (3,3%, 23/702), A3 (0,1%, 1/702), B1 (0,1%, 1/702), B2 (0,1%, 1/702), C2 (0,9%, 6/702), D1 (0,9%, 6/702), D2 (4,6%, 32/702), D4 (5,1%, 36/702), D com subgenótipo não identificado (0,7%, 5/702), E (0,6%, 4/702), F2a (4,6%, 32/702), F4 (0,4%, 3/702), e G (0,4%, 3/702). Cepas do HBV com mutações de resistência (rtS202G, rtM204V/I, rtA194T, rtM250I, rtA181T/S, rtT184S) associadas ou não a mutações compensatórias (rtL80I, rtV173L, rtL180M, rtV207I) foram identificadas em 1,6% (11/702) das amostras analisadas. Cepas com mutações potencialmente associadas com resistência ao adefovir (rtS85A, rtL217R, rtI233V, rtN238T, rtN238D, rtN248H, rtV214A, e rtQ215S) ou ao entecavir (rtS219A) foram identificadas em 7,7% (54/702) e 2,6% (16/702) dos pacientes, respectivamente. Cinquenta e sete (8,5%) amostras apresentaram cepas do HBV com mutações na principal região hidrofílica do HBsAg previamente relacionadas com escape dos anticorpos anti-HBs ou com prejuízo na secreção do HBsAg. Foram feitas análises

estatísticas para avaliar a correlação entre os subgenótipos do HBV mais frequentes na casuística (A1, A2, D2, D3, D4 e F2a) e a presença de mutações nos genes PCC. Dentre as mutações nos genes PCC associadas com redução ou falha na expressão do HBeAg, as mutações A1762T/T1764A estiveram associadas aos subgenótipos A1 e F2a; G1862T e mutações nas posições 1809-1812 ao subgenótipo A1; G1896A e/ou G1899A aos subgenótipos D2, D3 e D4. Mutações associadas com evolução da doença foram detectadas e entre essas as mutações C1766T e T1768A estiveram associadas aos subgenótipos A1 e F2a, e a mutação G1888A foi associada ao subgenótipo A1. As cepas do HBV que circulam nas diferentes regiões brasileiras estudadas apresentam grande variabilidade genética e a distribuição dos genótipos e subgenótipos reflete a formação histórica de cada região e do fluxo migratório mais recente. A frequência de cepas do HBV com mutações de resistência aos AN circulando entre pacientes virgens de tratamento com esses medicamentos nas diferentes regiões do Brasil estudadas foi baixa, sendo que o perfil de mutações que confere resistência total à lamivudina e parcial ao entecavir parece ser o mais disseminado. Embora tenham sido detectados casos de infecção com cepas do HBV portando mutações com grande impacto na antigenicidade do HBsAg, esse antígeno foi detectado em todas as amostras. Pacientes com HBeAg negativo foram mais frequentes na casuística estudada, independente do subgenótipo. As mutações encontradas nos genes PCC sugerem que há perfis de mutações diferentes envolvidos na negatividade do HBeAg para cada subgenótipo.

Descritores: Vírus da hepatite B, Hepatite B crônica/epidemiologia, Resistência a medicamentos, Antivirais, Diagnósticos moleculares, Mutação, Genótipo

Abstract

Gomes-Gouvêa MS. *Prevalence of primary resistance to antivirals used in the treatment of hepatitis B among treatment-naïve patients with chronic hepatitis B* [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

The main aim of this study was to evaluate the frequency of HBV strains harboring mutations that confer resistance to nucleos(t)ide analogues (NA) used to hepatitis B treatment among treatment-naïve patients with chronic hepatitis B from different Brazilian regions. Furthermore, we evaluated the presence of mutations that alter the antigenicity of HBsAg causing anti-HBs escape and mutations in pre-core/core genes. The association of different subgenotypes with the mutations detected and demographic and laboratory characteristics of the patients were also analyzed. Serum samples from 779 treatment-naïve patients with chronic HBV infection were included in this study. The samples were collected between 2006 to 2011 and the patients were from the following states: Pará, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul. HBV DNA was extracted from serum samples using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) and amplification of S/polymerase (S/Pol) and pre-core/core (PCC) regions were performed by nested PCR. The amplified PCR products were submitted to sequencing in an automatic DNA sequencer (ABI 3500). The sequences obtained were analyzed to classify HBV genotypes/subgenotypes and to analyze the presence of mutations. S/Pol region was amplified and sequenced successfully from 702 samples, which were included in this study. Among these 702 samples, seven genotypes and 12 subgenotypes have been identified. HBV subgenotype A1 was the most frequent (63.7%, 447/702), followed by HBV/D3 (14.5%; 102/ 702). The remaining genotypes and subgenotypes identified and their frequencies were as follows: A2 (3.3%, 23/702), A3 (0.1%, 1/702), B1 (0.1%, 1/702), B2 (0.1%, 1/702), C2 (0.9%, 6/702), D1 (0.9%, 6/702), D2 (4.6%, 32/702), D4 (5.1%, 36/702), D unclassified subgenotype (0.7%, 5/702), E (0.6%, 4/702), F2a (4.6%, 32/702), F4 (0.4%, 3/702), and G (0.4%, 3/702). HBV strains harboring mutations conferring NA resistance alone (rtS202G, rtM204V/I, rtA194T, rtM250I, rtA181T/S, rtT184S) or combined with compensatory mutations (rtL80I, rtV173L, rtL180M, rtV207I) were identified in 1.6% (11/702) of the patients. Isolates harboring mutations potentially associated with adefovir resistance (rtS85A, rtL217R, rtI233V, rtN238T, rtN238D, rtN248H, rtV214A, and rtQ215S) or entecavir resistance (rtS219A) were identified in 7.7% (54/702) and 2.6% (16/702) of the patients, respectively. HBV with HBsAg mutations previous related with anti-HBs escape or impaired secretion were detected in 8.5% (57/702) of the samples. Statistical analyzes were performed to assess the correlation between the more frequent HBV subgenotypes found in this study (A1, A2, D2, D3, D4 and F2a) and mutations in PCC genes. Among the mutations found in these genes that were associated with reduction or failure

in HBeAg synthesis, A1762T/T1764A mutations were associated to subgenotypes A1 and F2a; G1862T and mutations at positions 1809-1812 to subgenotype A1; G1896A and/or G1899A to subgenotypes D2, D3 and D4. Mutations associated with disease progression were also found: C1766T and T1768A mutations were associated with subgenotypes A1 and F2a, and the G1888A mutation was associated with subgenotype A1. HBV strains circulating in different Brazilian regions studied showed high genetic variability and the distribution of genotypes and subgenotypes reflects the population formation history of each region and the occurrence of recent events of migration. The frequency of HBV strains with NA resistance mutations circulating among treatment-naïve patients in different regions of Brazil studied was low and the profile of mutations that confer total resistance to lamivudine and partial resistance to entecavir is more widespread. Although some cases of infection with HBV strains carrying important mutations in HBsAg have been detected, this antigen could be detected in all of them. HBeAg negative cases were more frequent in the studied population, regardless of subgenotype. Different pattern of mutations were found in PCC genes, suggesting that different mechanisms are involved in HBeAg negativity for each subgenotype.

INTRODUÇÃO

1 - Introdução

1.1 – Considerações iniciais

Desde os primórdios da humanidade as doenças infecciosas representam um grande desafio em nossa luta pela sobrevivência nos impulsionando à busca constante de formas eficientes de tratamento, prevenção e controle das mesmas.

Entre essas doenças, a hepatite B, de longa data representa um grande problema de saúde pública entre diversas populações no mundo (Fonseca, 2010). O vírus da hepatite B (HBV) é o agente causal dessa moléstia, que ao infectar e se replicar nas células hepáticas interfere em seu funcionamento normal causando a doença (Seeger and Mason, 2000). Além disso, a resposta do sistema imunológico do hospedeiro aos antígenos virais com o objetivo de combater e eliminar o vírus atua como um dos principais determinantes dos danos hepáticos (Ganem and Prince, 2004).

Há cerca de duas décadas a vacina contra a infecção pelo HBV tem sido utilizada em todo o mundo resultando em grande declínio no número de novos casos de infecção (Shouval, 2003). Apesar disso, a hepatite causada pelo HBV continua a ser uma das doenças infecciosas mais comuns. A Organização Mundial de Saúde estima que atualmente haja cerca de 400 milhões de portadores crônicos do HBV no mundo (WHO, 2008). Esses indivíduos, em longo prazo podem ter graves complicações decorrentes do dano hepático, tais como cirrose, carcinoma hepatocelular (CHC) e, conseqüentemente óbito. Portanto, o efetivo acompanhamento e tratamento desses portadores são de extrema importância e necessidade para reduzir o risco de progressão de doença hepática e transmissão do vírus.

1.2 – Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HBV

A hepatite B é uma doença de distribuição universal, presente em todos os continentes, porém com variações nos níveis de endemicidade. Com base nos resultados de estudos epidemiológicos realizados em diferentes regiões do mundo, a Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 2 bilhões de pessoas (um terço da população mundial) tenham sido infectadas pelo HBV em algum momento de suas vidas e que cerca de 400 milhões desses indivíduos tenham se tornado portadores crônicos do vírus. A infecção pelo HBV é a causa de 30% dos casos de cirrose e de 53% dos casos de CHC no mundo. Estima-se que cerca de 600.000 mortes por ano sejam devido à infecção aguda ou crônica pelo HBV (Merrill and Hunter, 2011; Te and Jensen, 2010; WHO, 2008).

A prevalência do HBV e os padrões de transmissão variam muito nas diferentes partes do mundo, dependendo da taxa de infecção crônica, da proporção de pessoas com o vírus replicando ativamente e da via predominante de transmissão em cada região (Merrill and Hunter, 2011; Te and Jensen, 2010; WHO, 2008). Em função dessas características, as regiões do mundo foram divididas de acordo com o padrão de endemicidade da hepatite B, que é classificado com base na prevalência do HBsAg na população geral de uma área geográfica definida. Dessa forma, define-se que em áreas de elevada endemicidade a prevalência do HBsAg é superior a 8%, prevalência de 2-8% caracteriza uma área de endemicidade intermediária e uma área de baixa endemicidade é aquela onde a prevalência do HBsAg é inferior a 2% (WHO, 2008).

As áreas de elevada endemicidade incluem o Sudeste Asiático, Bacia do pacífico (excluindo Japão, Austrália e Nova Zelândia), África Subsaariana, Bacia Amazônica, partes do Oriente Médio e alguns países da Europa Oriental. Entre aquelas consideradas de baixa endemicidade podemos citar a América do Norte, países do norte e da parte ocidental da Europa, Austrália e partes da América do Sul. As demais regiões do mundo enquadram-se no perfil de áreas

de endemicidade intermediária (Merrill and Hunter, 2011; Te and Jensen, 2010; WHO, 2008).

O HBV é transmitido principalmente através do sangue, mas outros fluidos como sêmen, secreções vaginais e saliva podem estar envolvidos na transmissão desse agente. Além disso, o HBV pode permanecer por longos períodos em superfícies no meio ambiente. Há três principais formas de transmissão do HBV: vertical, sexual e parenteral (Te and Jensen, 2010; WHO, 2008).

Nas áreas com prevalência intermediária ou alta a maioria dos indivíduos torna-se infectado no momento do nascimento (transmissão vertical) ou durante os primeiros anos da infância pelo estreito contato com portadores do vírus, o que ocorre com mais frequência entre membros da mesma família. Já nas áreas de baixa prevalência a infecção é adquirida primariamente durante a vida adulta, principalmente pela via sexual (Te and Jensen, 2010; WHO, 2008).

Em geral quando a infecção pelo HBV ocorre em indivíduos adultos a fase aguda evolui para a cronicidade em cerca de 5% dos indivíduos infectados. Entretanto, o risco de progressão para a cronicidade varia dependendo da idade de infecção, sendo inversamente proporcional à idade: acima de 90% daqueles infectados no momento do nascimento tornam-se cronicamente infectados, o que também ocorre com cerca de 30 a 50% dos indivíduos infectados durante os primeiros 5 anos (Te and Jensen, 2010; WHO, 2008).

Pesquisas realizadas até o final da década de 90 classificaram o Brasil como uma área de endemicidade intermediária, porém com uma grande diversidade na distribuição das taxas de portadores entre as diferentes regiões do país (Souto, 1999). Esses dados mostraram uma crescente prevalência do HBV na direção Sul-Norte, embora com áreas de elevada prevalência no Espírito Santo, região Oeste do Paraná e de Santa Catarina. Diferenças nos níveis de endemicidade do HBV também foram encontradas dentro de uma mesma região ou cidade (Souto, 1999).

A implementação da vacinação contra hepatite B, inicialmente (1989) em áreas de elevada prevalência como a Amazônia Ocidental Brasileira, e

posteriormente em todo o país, contribuiu para um declínio nas taxas de prevalência nas diferentes regiões, fato também observado em outros países. Na região de Lábrea, estado do Amazonas, a taxa de portadores do HBV passou de 15,3% em 1988 para 3,3% em 2000 (Braga, 2004). Na Amazônia Mato-grossense foi observada uma redução de 10,4% para 2% na taxa de portadores crônicos (Souto, 2004). No estado do Acre em um estudo de base populacional foi observado uma prevalência do HBsAg de 3,3% em 12 dos seus 22 municípios (Viana et al., 2005). Entre indígenas do sudeste do Pará houve uma redução da prevalência entre indivíduos de 1 a 14 anos (Nunes et al., 2007).

Recentemente um inquérito nacional de base populacional foi realizado com o objetivo, entre outros, de estimar a prevalência das hepatites A, B e C na população de 13 a 69 anos das capitais das cinco macrorregiões brasileiras e no distrito Federal. A prevalência global do HBsAg referente ao conjunto das capitais do Brasil foi de 0,37%, classificando o país como uma região de baixa endemicidade. Considerando o conjunto de capitais de cada macrorregião o resultado foi o mesmo, cada conjunto foi classificado como região de baixa endemicidade (Estudo de Prevalência de Base Populacional das Infecções pelos vírus das Hepatites A, B e C nas Capitais do Brasil – Relatório disponível no [site
http://www.aids.gov.br/publicacao/2010/estudo_de_prevalencia_de_base_populacional_das_infecoes_pelos_virus_das_hepatites_b](http://www.aids.gov.br/publicacao/2010/estudo_de_prevalencia_de_base_populacional_das_infecoes_pelos_virus_das_hepatites_b)).

Embora os estudos mostrem resultados animadores no que se refere ao controle da disseminação da infecção pelo HBV, é importante ter em mente que no Brasil, particularmente nas regiões com histórico de elevada prevalência do HBsAg, há um reservatório significativo de portadores crônicos. Segundo o Ministério da Saúde a estimativa de portadores de hepatite B crônica no Brasil é de aproximadamente 600 mil pessoas (Ministério da Saúde, 2011). Esses portadores constituem uma importante fonte de infecção para indivíduos susceptíveis, que ainda compõem uma parcela importante da população em nosso país. De acordo com levantamento feito pelo inquérito

Nacional, em algumas regiões como o Nordeste, o percentual de susceptíveis chegou a 75% da população investigada (Pereira et al., 2009).

Ressalta-se também a importância dos movimentos populacionais internos e das migrações na disseminação da infecção pelo HBV, o que pode alterar o perfil epidemiológico de uma determinada população ou região. Tal fato já foi observado em algumas regiões brasileiras e também em outros países (Ahmed and Foster, 2010; Passos et al., 1993; Souto, 2004).

1.3 - O vírus da Hepatite B

O vírus da hepatite B pertence à família *Hepadnaviridae*, na qual também estão inclusos outros vírus relacionados ao HBV identificados em diferentes espécies. Os membros desta família compartilham características estruturais e funcionais, tais como tropismo por células hepáticas, o fato de serem partículas virais envelopadas com nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, genoma formado por DNA fita dupla parcial e replicação através de um RNA intermediário, via transcriptase reversa e relativa espécie-especificidade (Glebe and Bremer, 2013). A família *Hepadnaviridae* é composta por dois gêneros: 1- *Orthohepadnavirus*, que é constituído pelos vírus isolados em algumas espécies de mamíferos, entre eles: humanos, roedores (marmota e esquilos), morcegos e uma variedade de primatas não humanos (chimpanzés, gorilas, orangotangos, gibões e macaco barrigudo); 2- *Avihepadnavirus*, que é composto por vírus isolados em algumas espécies de aves: pato, garça, ganso, cegonha e periquito (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013; Locarnini et al., 2013).

As células infectadas pelo HBV produzem diferentes tipos de partículas relacionadas ao vírus, as quais podem ser identificadas por microscopia eletrônica no soro de indivíduos infectados: 1- Partículas completas infecciosas (Partículas de Dane) com 42 a 47 nanômetros (nm) de diâmetro, formadas pelo envelope e um nucleocapsídeo icosaédrico de 27 nm contendo a molécula de DNA e a polimerase viral; 2- Partículas incompletas esféricas de 17 a 25 nm; 3- Partículas incompletas cilíndricas (tubulares) com cerca de 20 a 22 nm e

tamanho variável. As partículas incompletas são constituídas apenas pelo envelope viral, e não contém DNA, portanto não são infecciosas. Essas partículas são secretadas em grande quantidade, excedendo a produção das partículas completas em 1.000 a 10.000 vezes (Glebe and Bremer, 2013).

O envelope do HBV é constituído por uma membrana lipídica e três proteínas (SHBs, MHBs e LHBs) com formas glicosiladas e não glicosiladas.

A principal proteína do envelope do HBV é a S (do inglês "small") ou também denominada de HBsAg, é altamente imunogênica e é a base da vacina utilizada contra a infecção pelo HBV, que inicialmente consistia em HBsAg isolado do plasma de indivíduos infectados e atualmente utilizada proteínas HBs purificadas produzidas por engenharia genética. Os anticorpos anti-HBs gerados pela vacinação ou que constituem a imunoglobulina hiperimune são predominantemente dirigidos contra um epítopo antigênico presente no HBsAg denominado de determinante "a" (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

As proteínas L (do inglês "large") e M (do inglês "medium") são encontradas em menor proporção e contêm antígenos específicos, além de compartilharem as regiões antigênicas presentes no HBsAg (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

O nucleocápsídeo ou core viral é constituído pela proteína conhecida como antígeno do core do vírus da hepatite B (HBcAg). Este antígeno não é encontrado habitualmente livre no soro, onde só pode ser detectado como um componente interno das partículas de Dane. Porém, ele pode estar presente no núcleo do hepatócito, em seu citoplasma ou expresso na superfície desta célula (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

Outra proteína sintetizada pelo HBV é o HBeAg, que é derivado da proteólise de uma proteína precursora (p25) codificada pelo gene core e mais 29 códon da região que precede esse gene. A proteína HBe não faz parte da estrutura da partícula viral, podendo ser encontrada apenas em forma solúvel no soro de indivíduos infectados e sua detecção é indicativa de altos níveis de replicação viral (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

O HBeAg atua como um tolerógeno de células T regulando a resposta imune do hospedeiro ao HBcAg presente nos hepatócitos. Também tem a capacidade de atravessar a barreira placentária e induzir tolerância imunológica *in utero*. Tal ação se dá pelo fato do HBeAg possuir epítomos em comum com o HBcAg, os quais são reconhecidos pelas células T citotóxicas envolvidas no dano celular durante a infecção (Chen et al., 2004; Walsh and Locarnini, 2012).

A capacidade de expressão do HBeAg é importante para o estabelecimento de infecção crônica, mas não é essencial para a replicação viral. A regulação imunológica exercida pelo HBeAg pode predispor à evolução para a cronicidade nos casos de infecção perinatal e prevenir o dano hepático nos casos de infecção durante a vida adulta (Chen et al., 2004).

A soroconversão do HBeAg para o anti-HBe geralmente indica a redução da fase de replicação ativa do vírus, sendo um dos objetivos no tratamento de indivíduos HBeAg positivos. Durante a fase crônica, a soroconversão para anti-HBe é frequentemente acompanhada pelo aumento da atividade inflamatória e necrose com elevação de transaminases, podendo em alguns casos evoluir para uma hepatite fulminante. A soroconversão durante a fase aguda da infecção geralmente ocorre sem complicações e indica que o indivíduo está progredindo para a recuperação (Liang, 2009).

A detecção do HBeAg pode ser usada clinicamente como um marcador de replicação viral, infectividade, severidade da doença e resposta ao tratamento. Entretanto, algumas cepas possuem mutações no genoma que promovem a interrupção ou redução da síntese desse antígeno. Pacientes portadores dessas cepas irão apresentar soroconversão para anti-HBe e manutenção da replicação viral, que geralmente apresenta níveis inferiores àqueles encontrados nos pacientes HBeAg positivos (Liang, 2009).

Além do HBeAg, o HBV produz pelo menos mais duas proteínas não estruturais: a proteína X ou HBxAg e a DNA polimerase viral. A função do HBxAg ainda não é completamente compreendida, mas já é conhecido o seu papel na ativação da transcrição e replicação viral, e no estabelecimento da

infecção (Benhenda et al., 2009; Lucifora et al., 2011). Além disso, foi observado que o HBxAg interage com diversas proteínas celulares e como ativador da transcrição de genes celulares, o que forneceu evidências de que essa proteína tem propriedades oncogênicas e está envolvida na patogênese do CHC induzido pela infecção crônica pelo HBV (De Mitri et al., 2010). Diversos mecanismos moleculares tem sido propostos para explicar o papel do HBxAg na indução do CHC, contudo essa é uma questão que ainda permanece incerta.

A DNA polimerase está envolvida na replicação viral, é uma proteína multifuncional que possui quatro regiões bem definidas (Ghany and Liang, 2007):

- 1- Região amino-terminal que atua como primase, ligando-se à extremidade 5' do RNA pré-genômico viral para o início da síntese da fita de polaridade negativa do HBV DNA;
- 2- Região espaçadora que não tem função específica conhecida;
- 3- Região catalítica que funciona como uma RNA polimerase RNA dependente e como DNA polimerase. Esta região apresenta 7 subdomínios funcionais bem conservados denominados de A a G.
- 4- Região carboxi-terminal que possui a função de RNase H responsável pela clivagem de RNA apresentado na forma de híbrido com DNA.

O genoma do HBV apresenta uma estrutura peculiar, sendo constituído por uma molécula de DNA circular, com uma fita parcialmente dupla apresentando uma região de fita simples com tamanho variável. A fita longa de polaridade negativa ou L (-) possui um tamanho fixo com cerca de 3200 nucleotídeos, já a fita curta de polaridade positiva ou S (+) pode variar entre 1700 e 2800 nucleotídeos nas diferentes moléculas (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

A capacidade codificadora está restrita à fita de polaridade negativa, na qual foram identificadas quatro regiões codificantes de todas as proteínas conhecidas do vírus, que são denominadas: Pré-core/core, Pré-S/S, X e

Polimerase. A região pré-core/core codifica para a proteína do nucleocapsídeo viral (HBcAg) e para o HBeAg, a região pré-S/S codifica para as três proteínas do envelope viral e é dividida em pré-S1, pré-S2 e S. A região X codifica a proteína HBxAg e a região P a polimerase viral (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

Além dos genes codificantes de proteínas, também foram identificadas no genoma do HBV algumas estruturas, que entre outras funções, são responsáveis pela regulação da replicação e expressão dos genes virais (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

O genoma do HBV é extremamente compacto: apresenta uma sobreposição parcial de todas as ORFs, não possui regiões não codificantes e todos os elementos regulatórios estão localizados em regiões codificantes de proteínas. Além disso, o HBV codifica mais de uma proteína a partir de uma única ORF usando códons de iniciação internos adicionais (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

1.4 - O ciclo replicativo do HBV

Os Hepadnavirus apresentam uma estratégia de replicação única para vírus DNA, na qual usam um RNA intermediário e um passo de transcrição reversa.

Após a ligação do HBV à membrana do hepatócito ocorre a fusão da partícula viral com a membrana celular e penetração do nucleocapsídeo na célula, que transporta o DNA viral até o núcleo. No núcleo, o DNA viral é convertido em uma molécula de DNA circular covalentemente fechada (cccDNA - do inglês "*covalently closed circular DNA*"), a qual é utilizada para transcrição de vários RNAs mensageiros pela enzima celular RNA polimerase II dependente de DNA. Dois grupos de RNAs são transcritos: 1- RNAs subgenômicos, que servem como RNAs mensageiros para a síntese das proteínas do envelope e do HBxAg; 2- RNAs genômicos, que possuem uma dupla função: RNA pré-genômico (RNApg) e RNA mensageiro para a transcrição das proteínas HBeAg, HBcAg e polimerase

Após a síntese dos produtos dos genes virais e dos RNAs pré-genômicos, esses são seletivamente encapsidados juntamente com a polimerase viral dentro das proteínas do core no citoplasma. Este passo é crucial para o início da replicação viral e é dependente de uma estrutura secundária em alça, localizada na extremidade 5' do RNAPg, que constitui o sinal de encapsidação conhecido pela letra grega épsilon (ϵ) (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

A síntese do DNA viral é iniciada através da transcrição reversa do RNAPg encapsidado e é realizada pela polimerase viral. Imediatamente após a síntese da fita negativa e concomitante degradação da cópia de RNA pela atividade de RNase H da polimerase, ocorre a síntese da fita positiva.

Finalmente os nucleocapsídeos virais montados são envelopados por uma membrana lipoprotéica formada pela bicamada lipídica celular e pelas proteínas de superfície do vírus. As partículas virais completas são exportadas por vesículas transportadoras para fora da célula (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

Para a manutenção da infecção, alguns nucleocapsídeos não são envelopados e exportados, mas reiniciam o ciclo de replicação. O DNA genômico replicado é redirecionado para o núcleo com o objetivo de aumentar e manter o reservatório de moléculas de cccDNA na célula, sem haver necessidade de re-infecção (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

Algumas moléculas de HBV DNA podem ser integradas ao DNA dos hepatócitos. A integração do genoma viral não é um passo essencial no ciclo de vida do vírus, pois alguns estudos mostraram que as moléculas de DNA viral integradas nunca são completamente preservadas, impossibilitando dessa forma a sua replicação. Contudo, alguns genes virais podem ser expressos a partir de algumas dessas moléculas integradas, por exemplo, o gene S é um dos genes que menos é interrompido, possibilitando dessa forma a expressão do HBsAg (Gerlich, 2013; Glebe and Bremer, 2013).

A integração do HBV DNA no genoma dos hepatócitos é um importante mecanismo pelo qual a infecção pelo HBV pode promover o desenvolvimento de CHC (Guerrieri et al., 2013).

1.5 - Diversidade genética do HBV

Devido ao seu mecanismo de replicação o HBV tem uma taxa de mutação superior ao que é esperado para um vírus DNA, porém seu potencial para variações é limitado pela organização compacta do genoma, o que o caracteriza como um vírus com uma taxa de mutações intermediária entre os vírus de DNA e RNA (Seeger and Mason, 2000).

Apesar das limitações, mais de 12% dos nucleotídeos podem variar entre os diferentes isolados do HBV e essa variabilidade genética permitiu sua classificação em grupos denominados genótipos e subgenótipos. Além disso, estudos recentes tem mostrado que o mecanismo de recombinação gênica ocorre com muito mais frequência do que se imaginava no genoma do HBV, o que contribui para o aumento da diversidade genética desse vírus (Locarnini et al., 2013; Shi et al., 2013).

A infecção pelo HBV é caracterizada por altos níveis de produção de vírus gerando em torno de 10^{12} partículas virais/dia, o que combinado com a elevada taxa de mutações ($3,2 \times 10^{-5}$ – $7,9 \times 10^{-5}$ substituições/ciclo de replicação) resulta na formação de uma população viral heterogênea (quasispecies virais) em um mesmo paciente. Os vírus que compõem essa população diferem entre si por pequenas variações no genoma (1 ou mais mutações), algumas das quais podem conferir vantagens biológicas e favorecer a seleção da cepa viral que as possui (Rodriguez-Frias et al., 2013; Zoulim and Locarnini, 2009). Algumas dessas mutações promovem alterações nas características fenotípicas da cepa viral (falha ou deficiência na síntese de proteínas, alteração na estrutura de proteínas, alteração na capacidade replicativa etc), as quais resultam em consequências de importância clínica e epidemiológica. Mais adiante serão abordados alguns desses aspectos.

Genótipos e subgenótipos do HBV

A classificação dos genótipos do HBV é baseada no percentual de divergência da sequência do genoma completo, que deve ser maior que 7,5% entre os diferentes genótipos (Kramvis et al., 2005; Norder et al., 2004). Os subgenótipos representam variantes de um mesmo genótipo cujo percentual de divergência baseado na sequência de nucleotídeos do genoma completo é superior a 4% (Kramvis et al., 2005; Norder et al., 2004).

Atualmente o HBV está classificado em 10 genótipos (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J). Os genótipos A-H estão bem estabelecidos, já o I e o J foram recentemente descritos e sua denominação como novos genótipos ainda é fruto de continuas discussões entre os pesquisadores da área. Tal indefinição se dá pelo fato desses supostos novos genótipos serem resultantes de recombinações entre genomas de diferentes genótipos do HBV isolados em humanos (genótipo I) ou entre genótipos isolados em humanos e em primatas não humanos (genótipo J) (Kurbanov et al., 2008; Locarnini et al., 2013; Shi et al., 2013).

Em relação aos subgenótipos, estes só foram identificados entre os genótipos A, B, C, D e F (Kramvis et al., 2005; Norder et al., 2004).

A maioria dos genótipos e alguns subgenótipos apresentam um padrão de distribuição geográfica característico, e são associados com diferentes etnias (Kramvis et al., 2005; Kurbanov et al., 2010; Norder et al., 2004). O genótipo A predomina em algumas regiões da África, regiões norte e central da Europa e na América do Norte. Para o genótipo A, inicialmente dois subgenótipos foram descritos: o A1, que é encontrado principalmente em algumas regiões dos continentes Africano (África Oriental e do Sul), Asiático (Índia, Bangladesh) e Americano (Haiti, Martinica) e o A2, que predomina na Europa (Kramvis et al., 2008; Norder et al., 2004). Posteriormente, mais cinco subgenótipos foram propostos para a classificação de cepas isoladas em diferentes regiões da África (A3, A4, A5 e A7) e na Bélgica entre pacientes de origem Africana (A6) (Shi et al., 2013). Esses subgenótipos não parecem estar disseminados em outras regiões do mundo, com exceção do A5, que foi

recentemente identificado com elevada frequência no Haiti (Andernach et al., 2009b).

Os genótipos B e C são comuns no Sudeste Asiático, China e Japão. Quanto aos subgenótipos, diversos já foram descritos para o genótipo B: B1 (Japão), B2 (Japão, China), B3 (Indonésia), B4 (Vietnã), B5 (Filipinas) e B6 (populações nativas do Ártico incluindo Alasca, norte do Canadá e Groenlândia), B7-B9 (Indonésia); e da mesma forma para o genótipo C: C1 (Sudeste da Ásia, Sul da China), C2 (Sudeste Asiático, China e Japão), C3 (Oceania, Indonésia), C4 (Austrália), C5 (Filipinas, Vietnã, Indonésia), C6 (Indonésia, Filipinas), C7 (Filipinas), C8-C16 (Indonésia) (Kramvis et al., 2008; Norder et al., 2004; Shi et al., 2013).

O genótipo D tem uma ampla distribuição geográfica, mas é principalmente frequente em países localizados na bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio. Este genótipo também apresenta uma grande diversidade genética caracterizada pelos diferentes subgenótipos já identificados: D1 (Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Índia, China), D2 (Japão, Norte da Europa), D3 (Índia, África do Sul, Sul da Europa), D4 (Oceania, Haiti), D5 (Índia, Japão), D6 (Indonésia) e D7 (Tunísia), D8 (Nigéria) (Shi et al., 2013; Yousif and Kramvis, 2013).

O genótipo E é considerado nativo da África e predomina na região Ocidental desse continente (Andernach et al., 2009a; Kramvis and Kew, 2007a). Estudos sugerem que a ampla disseminação do genótipo E na África parece ser um evento relativamente recente resultante, principalmente, da aplicação de injeções em massa (campanhas de vacinação, aplicação de medicamentos) usando as mesmas agulhas e seringas, realização de rituais tribais envolvendo o uso de objetos perfuro cortantes, além de outros mecanismos de transmissão horizontal pelo contato próximo com indivíduos infectados e da transmissão sexual (Andernach et al., 2009a). Apesar de uma grande população Africana ter sido introduzida em outros continentes, particularmente nas Américas, casos de infecção com o genótipo E fora do continente africano têm sido encontrados apenas em indivíduos com

procedência recente dessa região (Andernach et al., 2009a). Exceção a esse perfil foi observada em Quibdó, Colômbia, onde o genótipo E foi encontrado entre indivíduos afrodescendentes sem histórico de viagens para a África ou contato recente com pessoas procedentes de qualquer país Africano (Alvarado Mora et al., 2010).

As cepas do HBV genótipo E caracterizadas até o presente momento apresentam pouca variabilidade genética e, portanto não foram identificados subgenótipos (Andernach et al., 2009a; Kramvis and Kew, 2007a).

O genótipo F é característico da América do Sul, sendo o único genótipo encontrado entre populações indígenas isoladas (Devesa et al., 2008; Mello et al., 2007) e amplamente distribuído nos países com forte contribuição desse grupo racial em sua formação, tais como: Venezuela (Devesa et al., 2008), Colômbia (Alvarado Mora et al., 2011a) e Chile (Di Lello et al., 2009). As cepas do genótipo F isoladas em diferentes regiões geográficas são classificadas em 4 subgenótipos: F1, cujo clado é subdividido em F1a (América Central) e F1b (Argentina), F2, que também tem uma subdivisão em F2a (Venezuela, Argentina) e F2b (Venezuela), F3 (Venezuela, Colômbia) e F4 (Argentina) (Torres et al., 2011).

A distribuição dos genótipos G e H ainda não é bem conhecida: o genótipo G foi identificado inicialmente na Europa (Alemanha e França) e posteriormente nas Américas (Canadá, EUA, México, Colômbia), além de alguns poucos casos na Ásia (Locarnini et al., 2013; Norder et al., 2004). Já o genótipo H foi encontrado na América Central, sobretudo no México, onde é encontrado com elevada frequência (Alvarado-Mora and Pinho, 2013; Norder et al., 2004; Panduro et al., 2013).

A infecção pelo genótipo G apresenta algumas particularidades: 1- tem sido encontrada mais frequentemente entre homens que fazem sexo com homens e entre os casos de coinfeção com o Vírus da Imunodeficiência humana (HIV); 2- ocorre sempre em coinfeção com outro genótipo do HBV, sendo a coinfeção com os genótipos A e H a mais descrita até o momento (Locarnini et al., 2013; Marin et al., 2012; van der Kuyl et al., 2013).

O genótipo I foi encontrado no Vietnã, Laos e China e o J em um único caso no Japão (Locarnini et al., 2013).

No Brasil os genótipos A, D e F circulam em todas as regiões, sendo que o genótipo A é o mais prevalente em todas elas com exceção da região Sul, onde o genótipo D predomina (Bertolini et al., 2012; Mello et al., 2007; Sitnik et al., 2004). O genótipo F é encontrado com maior frequência no norte do país, especialmente entre populações indígenas (Mello et al., 2007).

Os genótipos B e C também circulam no Brasil, porém restritos a indivíduos com origem oriental ou seus descendentes (Clemente et al., 2009; Sitnik et al., 2004), da mesma forma o genótipo E, até o momento só foi encontrado entre imigrantes Africanos (Sitnik et al., 2007). O genótipo G também já foi descrito em alguns casos no Rio de Janeiro, São Paulo e Acre; e o genótipo H até o momento só foi encontrado em um caso no Sul do Brasil (Bertolini et al., 2012; Bottecchia et al., 2008b; Lobato et al., 2006; Mendes-Correa et al., 2010).

Em relação à distribuição dos subgenótipos do HBV no Brasil ainda há poucos estudos, considerando-se as dimensões continentais do país e as particularidades envolvidas na formação da população de cada região. Os seguintes subgenótipos do HBV foram descritos nesses estudos: A1, A2, D2, D3, D4, F1, F2a e F4, sendo o A1 o mais frequente entre os casos de genótipo A, o D3 entre os casos de genótipo D e o F2a entre os casos genótipo F (Alvarado-Mora et al., 2011b; Araujo et al., 2004; Bertolini et al., 2012; Gomes-Gouvea et al., 2009; Mello et al., 2007; Motta-Castro et al., 2008; Moura et al., 2013; Santos et al., 2010).

1.6 - Aspectos clínicos da infecção pelo HBV

O período de incubação da infecção pelo HBV varia de 1 a 4 meses e o curso da infecção depende de vários fatores que influenciam a resposta imune, tais como: idade no momento da aquisição da infecção, fatores genéticos do hospedeiro e a variabilidade genética do vírus (Ganem and Prince, 2004; Nebbia et al., 2012).

O indivíduo, uma vez infectado, pode evoluir para três principais formas: 1- hepatite fulminante que é rara, mas de elevada gravidade e letalidade; 2- resolução da infecção; 3- infecção crônica (Ganem and Prince, 2004; Nebbia et al., 2012).

A resolução da infecção pelo HBV é caracterizada pelo desaparecimento do HBsAg e detecção dos anticorpos anti-HBs dentro de um período de 6 meses. Contudo, é importante ressaltar que essa resolução da infecção não significa eliminação completa do vírus e sim um eficiente controle da replicação pelo sistema imune do hospedeiro, o que pode resultar em reativação da infecção na ocorrência de imunossupressão (Ganem and Prince, 2004; Nebbia et al., 2012).

O diagnóstico de infecção crônica se caracteriza pela detecção do HBsAg por período superior a 6 meses, o que é observado na maioria dos indivíduos infectados antes dos 5 anos de idade e na minoria daqueles infectados durante a fase adulta (Ganem and Prince, 2004; Nebbia et al., 2012).

Alguns fatores clínicos, demográficos e epidemiológicos têm sido associados à evolução da doença: idade avançada, idade no momento da infecção, sexo masculino, coinfecção com os vírus das hepatites C, D ou com o HIV, níveis de carga viral do HBV, consumo de álcool, genótipo do HBV e presença de determinadas mutações no genoma viral (Taylor et al., 2009).

No curso natural da infecção crônica pelo HBV são definidas quatro fases, contudo nem sempre todas elas são identificadas em todos os pacientes (Kwon and Lok, 2011; McMahon, 2009b).

A primeira fase denominada fase de tolerância imune é caracterizada pela presença do HBeAg, elevados níveis de carga viral (> 20.000 UI/ml e comumente acima de 10^{7-8} UI/ml), níveis de aminotransferases persistentemente normais e sem lesões hepáticas significantes. Esta fase é vista com mais frequência entre indivíduos infectados pela via perinatal, nos quais pode perdurar por 30 anos ou mais. Posteriormente, segue-se a fase de clareamento imune, também chamada de fase hepatite B crônica. Nesta fase o

sistema imune passa a reconhecer o HBV como um agente estranho e inicia intensa resposta imunológica, o que resulta em lesão hepática. Nesta fase ainda se detecta o HBeAg no soro, altos níveis de HBV DNA (> 2.000 UI/ml), assim como aumento persistente nos níveis das aminotransferases, especialmente a alanina aminotransferase (ALT), e inflamação hepática ativa.

Durante a fase de clareamento imune pode ocorrer a soroconversão do HBeAg para anti-HBe espontaneamente (taxa de 10 a 20% ao ano) ou resultante da terapia antiviral, o que reduz o risco de descompensação hepática. A soroconversão para anti-HBe pode ser precedida por exacerbação ("flare") aguda da hepatite B crônica. Esta fase da infecção pode durar vários anos, e pode resultar no desenvolvimento de cirrose hepática e complicações.

A terceira fase, denominada fase de portador inativo, é caracterizada pela negatificação do HBeAg e presença do anti-HBe, níveis de HBV DNA baixos (< 2.000 UI/ml) ou indetectáveis e níveis de ALT persistentemente normais resultante da resolução do processo necroinflamatório. O paciente pode permanecer neste estado por longos anos. A resolução completa da infecção com soroconversão HBsAg/anti-HBs (taxa de 0,5% ao ano) pode ocorrer, assim como o retorno à fase replicativa com reativação da doença caracterizando a fase de reativação. Esta última fase é também conhecida como hepatite B crônica HBeAg negativo e tem como característica a ausência do HBeAg, presença do anti-HBe, níveis de ALT e HBV DNA persistentemente elevados e inflamação hepática ativa. Pacientes nesta fase geralmente são mais velhos e apresentam doença hepática mais avançada que aqueles em outras fases da doença. A presença de variantes do HBV com mutações no genoma que abortam a síntese do HBeAg é comum em pacientes nesta fase (Lok and McMahon, 2009; McMahon, 2009b).

1.7 - Tratamento

O tratamento da Hepatite B crônica tem como objetivo a supressão permanente da replicação do HBV e conseqüentemente a remissão da doença hepática, prevenindo dessa forma a progressão para cirrose e CHC. Considera-

se resposta ao tratamento a redução do HBV DNA no soro, perda do HBeAg com ou sem soroconversão para o anti-HBe, perda do HBsAg com ou sem soroconversão para o anti-HBs, normalização dos níveis de ALT e redução da inflamação hepática observada na biopsia de fígado (Kwon and Lok, 2011; Marzio and Hann, 2014).

O tratamento não é indicado para todos os pacientes com hepatite B crônica (HBC), a indicação é baseada em três critérios principais: 1- níveis de HBV DNA; 2- níveis de transaminases hepáticas; 3- gravidade (grau) e estágio da lesão hepática (EASL, 2012; Lok and McMahon, 2009).

Nas últimas duas décadas (1991 a 2008) muitos avanços foram alcançados no que diz respeito ao desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da HBC. Atualmente, há sete medicamentos aprovados, que incluem duas apresentações de interferon (interferon-alfa, interferon-alfa peguilado) e cinco análogos nucleos(t)ídeos (AN): lamivudina, adefovir, entecavir, telbivudina e tenofovir (EASL, 2012; Kwon and Lok, 2011; Lok and McMahon, 2009; Marzio and Hann, 2014).

O interferon (IFN) convencional alfa-2a foi o primeiro medicamento aprovado para tratamento da HBC, que posteriormente foi substituído pelo IFN peguilado (PEG-IFN alfa-2a e 2b) por este apresentar melhores propriedades farmacocinéticas e menor frequência de injeções com eficácia comparável. Esse medicamento possui ação antiviral direta e ação imunomoduladora. O tratamento com PEG-IFN alfa-2a se mostrou eficaz no controle da replicação viral e redução da incidência de descompensação hepática e carcinoma hepatocelular, porém essa eficácia só foi alcançada em uma pequena parcela dos pacientes. Apenas 30% dos pacientes com hepatite crônica HBeAg positivo, e em torno de 40% dos pacientes com hepatite crônica HBeAg negativo apresentaram resposta virológica sustentada. Além da baixa taxa de resposta, os pacientes tratados com IFN experimentam efeitos adversos durante a terapia que muitas vezes dificultam a finalização da mesma (Kwon and Lok, 2011; Marzio and Hann, 2014).

Os análogos nucleos(t)ídeos são medicamentos de uso oral que atuam primariamente na inibição da transcrição do RNA pré-genômico para formação da primeira fita do DNA viral e secundariamente inibindo a formação da fita positiva. O uso desses medicamentos promove inibição rápida e potente da replicação viral, de forma segura e com poucos efeitos colaterais, resultando na redução da progressão da fibrose hepática, da evolução para a cirrose e do desenvolvimento de CHC. Contudo, não foram observadas modificações nas taxas de soroconversão do HBeAg, e o clareamento do HBsAg continuou a ser um evento raro (EASL, 2012; Kwon and Lok, 2011; Lok and McMahon, 2009; Marzio and Hann, 2014).

Embora os AN sejam eficazes na inibição da replicação do HBV eles não são capazes de eliminar totalmente o vírus das células hepáticas infectadas. Isso ocorre devido à presença do cccDNA no núcleo dessas células, o qual não sofre a ação dos AN e funciona como um reservatório celular para a formação de novas moléculas de RNA pré-genômico. Portanto, a manutenção da supressão viral só é possível com o uso de AN por longos períodos.

Essa necessidade de tratamento em longo prazo leva a uma séria consequência, a seleção de cepas do HBV resistentes à ação desses medicamentos, o que representa um dos principais obstáculos para o sucesso do tratamento com AN. A emergência de cepas resistentes geralmente resulta na perda de todos os benefícios alcançados anteriormente com o tratamento podendo resultar em episódios de exacerbação e até descompensação hepática (EASL, 2012; Kwon and Lok, 2011; Lok and McMahon, 2009; Marzio and Hann, 2014).

Os AN aprovados para o tratamento da HBC apresentam diferenças na sua potencia de inibição da replicação viral e na sua capacidade de manter essa potencia na presença de alterações que ocorrem na polimerase viral em decorrência de mutações no gene codificante da mesma (barreira genética) (EASL, 2012; Kwon and Lok, 2011; Lok and McMahon, 2009; Marzio and Hann, 2014).

O primeiro análogo nucleosídeo aprovado para o tratamento da HBC foi a lamivudina, que por um longo período (1998-2001) foi o único análogo disponível para esse fim. A lamivudina promove eficaz redução da replicação do HBV, porém, longos períodos de tratamento estão relacionados com a seleção de HBV resistentes ao medicamento. A resistência a esse AN aumenta progressivamente ao longo do tratamento, após 48 meses de tratamento cerca de 80% dos pacientes apresentam vírus resistentes (Kwon and Lok, 2011; Marzio and Hann, 2014).

Em 2002 foi introduzido o adefovir, um análogo nucleotídeo que se mostrou efetivo nos casos com resistência à lamivudina, o que trouxe novas perspectivas para o tratamento da HBC. Porém, com o decorrer do tempo observou-se a seleção de cepas do HBV resistentes ao adefovir, o que ocorre em cerca de 2% dos pacientes com HBeAg negativo após dois anos de terapia, aumentando para 30% após 5 anos de tratamento em monoterapia. Nos casos de tratamento de pacientes com HBV resistentes à lamivudina, a resistência ao adefovir é observada mais precocemente, cerca de 20% apresentam resistência após 12 meses de terapia. Esse fator, juntamente com o potencial desse medicamento para o desenvolvimento de toxicidade renal tornou seu uso bastante limitado (Kwon and Lok, 2011; Marzio and Hann, 2014).

Em 2005 foi aprovado o entecavir, um análogo nucleosídeo com atividade antiviral bem mais potente do que os dois anteriores e com elevada barreira genética. As taxas de resistência ao entecavir são bem mais baixas, vírus resistentes foram descritos em 0,1% dos casos após um ano de terapia, chegando a apenas 1,2% dos casos após seis anos. Todavia, essa taxa aumenta quando pacientes com vírus resistentes à lamivudina são tratados, indo de 6% em um ano a quase 60% após 6 anos de tratamento (Kwon and Lok, 2011; Marzio and Hann, 2014).

A telbivudina foi outro análogo nucleosídeo aprovado em 2006 para o tratamento da HCB, que apresenta capacidade de supressão da replicação comparável à lamivudina. Embora a barreira genética da telbivudina seja um

pouco mais alta que a da lamivudina, as taxas de desenvolvimento de resistência são bem elevadas: 21,6% em pacientes com HBeAg positivo e 8,6% naqueles com HBeAg negativo após 1 e 2 anos de terapia, respectivamente (Kwon and Lok, 2011; Marzio and Hann, 2014).

O tenofovir é o mais novo medicamento aprovado para o tratamento da hepatite B, é um análogo nucleotídeo estruturalmente relacionado ao adefovir, porém muito mais potente em sua ação de supressão da replicação viral. Desde sua introdução em 2008 até o momento não houve relatos de seleção de cepas do HBV com mutações que promovam resistência viral completa à ação desse AN (Kwon and Lok, 2011; Marzio and Hann, 2014). Por sua potencia e elevada barreira genética o tenofovir, assim como o entecavir, são indicados atualmente como primeira opção de tratamento da HCB (EASL, 2012; Lok and McMahon, 2009).

No Brasil, em 2002 o Ministério da Saúde aprovou e disponibilizou as primeiras opções de tratamento para HBC pelo Sistema Único de Saúde (SUS), que consistia em dois medicamentos: IFN-alfa e lamivudina. Nesse momento também foi disponibilizado um protocolo clínico nacional (Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas) com diretrizes para o uso desses medicamentos no tratamento da doença (Ministério da Saúde, 2002). IFN-alfa e lamivudina foram as únicas opções para o tratamento da HCB no Brasil até 2009, quando foi aprovado um novo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas que incorporavam novos medicamentos no arsenal terapêutico para tratamento da HBC: PEG-IFN alfa-2a e 2b, tenofovir, entecavir e adefovir (Ministério da Saúde, 2009).

1.8 – Implicações clínicas e epidemiológicas da diversidade genética do HBV

1.8.1 - Genótipos/subgenótipos & formas de transmissão, evolução clínica da infecção e resposta ao tratamento

Têm crescido o número de estudos relatando que, além das diferenças no padrão distribuição, alguns genótipos e subgenótipos do HBV apresentam diferenças na forma de transmissão, na capacidade de desenvolver infecção crônica, na severidade da doença hepática e na resposta ao tratamento. Contudo, vale ressaltar que ainda é necessário cautela no uso dessas informações na prática clínica, uma vez que há uma série de limitações e controvérsias nesse campo do conhecimento.

Os diferentes genótipos e alguns subgenótipos parecem estar mais associados a algumas vias específicas de transmissão e uma das razões para explicar essas diferenças está relacionada com diferenças no tempo de conversão do HBeAg para o anti-HBe. Indivíduos com HBeAg positivo apresentam níveis de carga viral mais elevado e consequentemente maior possibilidade de transmissão, particularmente pela via vertical (Araujo et al., 2011; Guirgis et al., 2010; Kim et al., 2011; Lin and Kao, 2011; McMahon, 2009a; Tanwar and Dusheiko, 2012). Os genótipos B e C estão mais envolvidos em casos de transmissão vertical do que outros genótipos, que têm sido mais associados com a transmissão horizontal (sexual e parenteral). O subgenótipo A2 parece estar mais associado com transmissão sexual, assim como genótipo G, cuja transmissão é mais frequente entre homossexuais masculinos (Araujo et al., 2011; Kim et al., 2011). Na Europa as infecções pelo HBV transmitidas pelo uso de drogas endovenosas estão relacionadas com o genótipo D (Araujo et al., 2011; Kim et al., 2011).

Em relação ao papel dos genótipos na evolução da doença a maioria dos estudos publicados até agora foram realizados na Ásia e restringem-se a comparar os genótipos B e C, que predominam nessa região. Esses estudos associam as formas mais graves de doença hepática e o aparecimento de cirrose ao genótipo C. Além disso, os pacientes com genótipo C parecem

apresentar mais frequentemente a presença do HBeAg e níveis mais altos de viremia, o que pode contribuir para uma pior evolução da doença (Kim et al., 2011; Lin and Kao, 2011; McMahon, 2009a; Tanwar and Dusheiko, 2012).

Embora os subgenótipos C1 e C2 estejam associados com desenvolvimento de CHC, apenas o subgenótipo C2 foi independentemente associado a maior risco de evolução para esse quadro. Na China e em Taiwan a infecção com o subgenótipo B2 foi associada com desenvolvimento ou recorrência de CHC em pacientes jovens, enquanto que a infecção pelo subgenótipo B1 é frequentemente associada a episódios de hepatite fulminante no Japão (Kim et al., 2011; Lin and Kao, 2011; McMahon, 2009a; Tanwar and Dusheiko, 2012).

Estudos realizados em regiões (principalmente Europa) onde os genótipos A e D são mais prevalentes têm sugerido que a infecção pelo genótipo A tem maior evolução para a cronicidade do que a infecção pelo genótipo D (Kim et al., 2011). Por outro lado, um estudo realizado na Espanha entre pacientes com HBC mostrou que os casos com infecção pelo genótipo A (provavelmente A2) estiveram mais associados com elevada taxa de remissão bioquímica sustentada, clareamento do HBV DNA e do HBsAg do que aqueles infectados pelo genótipo D (McMahon, 2009a).

Um estudo realizado na Índia mostrou maior relação do genótipo D com severidade da doença hepática e evolução para CHC em relação ao genótipo A (McMahon, 2009a).

Comparações feitas entre indivíduos infectados pelo subgenótipo A2 e genótipo D mostraram que a taxa de complicações da doença hepática, incluindo CHC foi menor nos casos de A2 (Kim et al., 2011; McMahon, 2009a).

O subgenótipo A1 tem sido associado com elevadas taxas de CHC na África-Subsaariana. Um estudo caso-controle com pacientes africanos demonstrou que o risco de desenvolver CHC foi 4,5 vezes maior naqueles infectados com o HBV/A1 do que entre aqueles infectados com outros genótipos (Kim et al., 2011; McMahon, 2009a; Tanwar and Dusheiko, 2012).

No Alasca, em um estudo que acompanhou pacientes com HBC por cerca de 20 anos, uma proporção significativamente alta dos pacientes infectados com os subgenótipos F1 ou C2 desenvolveram CHC em comparação com aqueles infectados com A2, B6 ou D (Kim et al., 2011; McMahon, 2009a).

No México o genótipo H foi encontrado em um grande número de casos de hepatite B oculta, caracterizada por baixos níveis de carga viral, HBsAg negativo e com presença ou não de evidências de infecção prévia pelo HBV (Anti-HBs e Anti-HBc + ou Anti-HBc + isoladamente) (Panduro et al., 2013).

Em relação ao tratamento, pacientes com genótipos A e B apresentaram maior taxa de resposta ao tratamento com interferon (soroconversão do HBeAg e negatificação do HBV DNA) do que aqueles infectados com genótipos D ou C. Contudo, nenhuma diferença significativa foi observada na resposta ao tratamento com análogos nucleos(t)ídeos (Cooksley, 2010; Kim et al., 2011; Lin and Kao, 2011; Tanwar and Dusheiko, 2012).

1.8.2 - Mutações no gene S & escape dos anticorpos anti-HBs

A proteína S é constituída por 226 aminoácidos e apresenta três regiões: região N-Terminal (aa 1 – 99), a principal região hidrofílica (MHR – do inglês “major hydrophilic region”) (aa 100 – 169) e a região C-terminal (aa 170 – 226). Dentro da MHR está localizada uma região conhecida como determinante “a”, que é o principal sítio de reconhecimento dos anticorpos neutralizantes anti-HBs. Essa região está localizada entre os aminoácidos 124 – 147 e nela são encontrados cinco resíduos de cisteína (C) ligados por pontes dissulfeto (C 121 – 124; C 124 – 137 e C139 – 147), as quais são responsáveis pela estabilidade e estrutura conformacional que conferem a imunogenicidade ao HBsAg (Alavian et al., 2013).

Mutações localizadas no gene S do HBV podem resultar na alteração da estrutura antigênica do HBsAg com consequente perda da imunogenicidade.

Vírus com mutações no gene S, principalmente na região do determinante "a", podem não ser neutralizados pelos anticorpos induzidos pela vacina e causar infecção em pessoas vacinadas. Além disso, alguns desses mutantes podem não ser detectados pelos testes imunoenzimáticos utilizados na detecção do HBsAg (Alavian et al., 2013).

Cepas do HBV com mutações na região que codifica o determinante "a" são selecionadas, sobretudo, pela pressão seletiva exercida pela vacinação ou tratamento com imunoglobulina hiperimune (Alavian et al., 2013; Rodriguez-Frias et al., 2013). Alguns trabalhos têm demonstrado que a seleção dessas cepas também pode ocorrer durante o curso natural da infecção crônica sem a interferência de agentes seletivos exógenos, em alguns desses casos tem sido observada a coexistência de HBsAg e Anti-HBs (Ponde, 2011) e em outros a ocorrência de hepatite B oculta (Huang et al., 2012).

A mutação mais comumente descrita que induz escape vacinal é a substituição do aminoácido Glicina (G) por Arginina (R) na posição 145 (sG145R) do HBsAg, a qual está localizada na segunda alça do determinante "a". Este mutante foi identificado pela primeira vez na Itália infectando uma criança nascida de uma mãe positiva para o HBsAg e HBeAg. Neste caso a criança havia recebido imunoprofilaxia adequada (vacina e imunoglobulina hiperimune) e apresentava anti-HBs (Rodriguez-Frias et al., 2013).

Cepas do HBV com a mutação sG145R podem também ser transmitidas horizontalmente e permanecer replicando de forma estável por vários anos, embora a capacidade replicativa seja inferior à observada nas cepas selvagens, o que está relacionado com o fato dessa mutação resultar em secreção de vírions deficiente e redução de sua estabilidade (Rodriguez-Frias et al., 2013).

Diversas outras mutações dentro da MHR associadas com escape vacinal, escape aos anticorpos utilizados no tratamento com imunoglobulina hiperimune (HBlg) ou ao escape aos anticorpos utilizados nos testes para a detecção do HBsAg têm sido descritas, entre elas as mais comuns são: sP120E/S/T, sT123N, sC124R/Y, sI/T126A/N/S, sQ129H/L, sG130D/R, sM133L,

sF/Y134N/R, sK141E/I, sP142S, sD144A/E, sN146S, sT148I, sC149R, sA157D/R, sF158Y, sE164D (Alavian et al., 2013).

A prevalência de cepas do HBV com mutações no determinante “a” tem sido relatada com maior frequência entre crianças que receberam vacinas recombinantes do que entre aquelas vacinadas com vacinas derivadas de plasma. Além disso, também foram encontradas com maior frequência em países que implementaram a vacinação universal contra o HBV, entretanto com prevalência variadas: 39% em Singapura, 22% em Taiwan, 12% no Reino Unido e 0% na África do Sul (Alavian et al., 2013; Rodriguez-Frias et al., 2013).

1.8.3 - Mutações no gene da polimerase & resistência ao tratamento com AN

As mutações de maior importância no gene da polimerase ocorrem na região com função de transcriptase reversa (RT) e estão relacionadas com resistência aos AN utilizados no tratamento da hepatite B crônica. Assim como as demais mutações, estas surgem naturalmente em decorrência de erros inerentes ao processo de transcrição reversa, o que pode dar-se durante o curso natural da HBC ou durante o tratamento com AN. Neste último caso o surgimento de cepas com mutações de resistência ocorre devido à supressão incompleta da replicação, que pode ser resultado da baixa potência da droga, baixa dosagem ou aderência inadequada ao tratamento (Zoulim and Locarnini, 2009).

O tratamento com AN promove a pressão seletiva necessária para a emergência das cepas com mutações de resistência, as quais pela sua vantagem seletiva de se replicar na presença do antiviral vão se tornando dominantes sobre a população de vírus selvagens e se estabelecendo lentamente pela substituição do arquivo genético de cccDNA da cepa selvagem (Zoulim and Locarnini, 2009).

A identificação das mutações na polimerase é realizada através de uma nomenclatura padronizada que numera de forma independente os aminoácidos de cada uma das quatro regiões da polimerase (amino-terminal,

espaçadora, RT e carboxi-terminal). Essa padronização foi sugerida devido a diferenças no tamanho do genoma observadas entre os genótipos do HBV (presença de inserções ou deleções principalmente na região dos genes pré-S1 e polimerase), o que resultava em divergências no tamanho das polimerases e consequentemente na localização dos aminoácidos. O domínio de RT da polimerase do HBV de todos os genótipos inicia com uma sequência de aminoácidos padrão altamente conservada entre eles (EDWGPCDEHG) e possui 344 aminoácidos (Stuyver et al., 2001). As mutações são identificadas usando as letras rt para identificar a região, o aminoácido original, o número da posição do aminoácido e o novo aminoácido gerado pela mutação, por exemplo rtM204I (Lok et al., 2007).

As mutações estabelecidas como causadoras de resistência do HBV aos AN ocorrem em 8 códons localizados nos diferentes domínios da região de RT da polimerase viral: domínio B (rtI169, rtL180, rtA181, rtT184), domínio C (rtS202, rtM204), domínio D (rtN236) e domínio E (rtE250). Existem outras mutações de grande importância no âmbito da resistência aos análogos, que são as mutações chamadas de compensatórias ou secundárias. Essas mutações têm a função de restaurar completamente ou parcialmente a capacidade replicativa das cepas resistentes, que geralmente é reduzida em comparação com as cepas selvagens devido às alterações na estrutura da polimerase. As mutações compensatórias são de grande importância para as cepas resistentes porque promovem a fixação das mutações de resistência no arquivo de cccDNA através do aumento dos níveis de replicação (Locarnini and Yuen, 2010; Zoulim and Locarnini, 2009).

A mais importante mutação responsável pela resistência à lamivudina localiza-se no locus YMDD (domínio C) e é caracterizada pela substituição de uma Metionina (M) para uma Isoleucina (I), para Valina (V) ou para Serina (S) na posição 204: rtM204I/V/S. Posteriormente, a mutação rtA181T/V/S também foi relacionada com redução da susceptibilidade viral a esse AN (Karatayli et al., 2007; Zoulim and Locarnini, 2009). Além dessas mutações, diversas mutações compensatórias em diferentes domínios da RT já foram identificadas em cepas

com resistência à lamivudina: rtL80V/I, rtV173L, rtL180M/C (Shaw et al., 2006; Zoulim and Locarnini, 2009), rtA200V (Sheldon et al., 2006), rtV/F/L/M207I (Fu and Cheng, 1998), rtQ215S (Bartholomeusz and Locarnini, 2006; Locarnini and Mason, 2006), rtL217P (Ji et al., 2011), e rtL229F (Ji et al., 2012).

A resistência ao adefovir foi inicialmente caracterizada pelas mutações rtA181V/T (domínio B) e/ou rtN236T (domínio D) (Bartholomeusz and Locarnini, 2006; Locarnini and Yuen, 2010; Zoulim and Locarnini, 2009).

Posteriormente, outras mutações foram associadas com resistência ou susceptibilidade reduzida ao adefovir: rtL80V/I (Lee et al., 2009; Shaw et al., 2006), rtV84M, rtS85A (Bartholomeusz and Locarnini, 2006; Shaw et al., 2006), rtL180M (Lee et al., 2012b), rtA181S (Karatayli et al., 2007), rtV214A, rtQ215S (Shaw et al., 2006), rtL217R (Sheldon et al., 2006), rtE218G (Liu et al., 2010b), rtI233V (Zoulim and Locarnini, 2009), rtP237H (Bartholomeusz and Locarnini, 2006; Shaw et al., 2006), rtN238T/D/R, rtT240Y, rtN248H (Bartholomeusz and Locarnini, 2006; Bo Qin, 2013; Shaw et al., 2006). Entre essas a rtV214A e a rtQ215S também foram associadas com falhas na resposta ao tratamento com lamivudina (Locarnini, 2005; Locarnini and Mason, 2006). Entretanto o papel dessas mutações na resistência a esses AN não está estabelecido, em alguns casos os estudos ainda são escassos e em outros os resultados apresentados por diferentes estudos são contraditórios. Algumas dessas mutações tem sido confirmadas como polimorfismos de determinados genótipos como é o caso da rtL217R, que é encontrada em praticamente todas as cepas de A2 (Bottecchia et al., 2008a) e das mutações na posição rt215, que são encontradas com frequência bem maior nas cepas genótipo D (Amini-Bavil-Olyae et al., 2009a).

A resistência ao entecavir ocorre quando há a combinação das mutações de resistência à lamivudina (rtM204V/I) com uma das seguintes mutações: rtI169T, rtT184G/A/I/S/C/L/F/M, rtS202G/I/C/A ou rtM250V/I/L/C (Baldick et al., 2008; Zoulim and Locarnini, 2009). Estas mutações isoladamente conferem redução mínima da susceptibilidade ao entecavir (Zoulim and Locarnini, 2009). Um estudo publicado recentemente associou a presença de duas novas

mutações (rtS219A e rtY245H) à redução da susceptibilidade ao entecavir (Karatayli et al., 2012).

Para o tenofovir nenhuma mutação foi definitivamente associada à resistência, todas aquelas associadas com redução da susceptibilidade descritas até o momento ainda são alvo de muita controvérsia ou foram pouco estudadas. Por outro lado, já se conhece que as mutações que conferem resistência ao adefovir (rtN236T e rtA181V/T) promovem a redução da eficácia do tratamento com tenofovir, uma vez que essas drogas são estruturalmente relacionadas (Locarnini and Yuen, 2010; Zoulim and Locarnini, 2009).

Há uma discussão na literatura acerca do papel da mutação rtA194T na redução da susceptibilidade a esse medicamento. Essa mutação foi encontrada em cepas do HBV isoladas de dois pacientes coinfectados pelo HIV que estavam em tratamento com tenofovir (Sheldon et al., 2005). Dois estudos que realizaram testes *in vitro* para avaliar a susceptibilidade dessas cepas ao tenofovir demonstraram que a mutação rtA194T causa redução na susceptibilidade ao tenofovir e também à lamivudina (Amini-Bavil-Olyaei et al., 2009b; Sheldon et al., 2005), contudo outros dois estudos não observaram esses resultados (Delaney et al., 2006; Zhu et al., 2011).

Recentemente um estudo testou uma série de mutações que poderiam interferir na ligação da polimerase do HBV com o tenofovir, as quais foram selecionadas após análises com métodos de bioinformática tendo como base a homologia existente entre as polimerases do HBV e HIV. Nesses estudos os autores concluíram que cepas do HBV com as mutações rtP177G ou rtF249A apresentam redução na susceptibilidade ao tenofovir (Qin et al., 2013).

A diversificação do arsenal terapêutico para o tratamento da hepatite B trouxe grandes benefícios para os pacientes não respondedores ao tratamento com interferon e àqueles que inicialmente se beneficiaram com a introdução da lamivudina, mas que logo foram surpreendidos pelo surgimento dos vírus resistentes. Por outro lado, o manejo do tratamento da hepatite B se tornou muito mais complexo, exigindo cada vez mais a disponibilidade de exames que permitam avaliar a resposta ao tratamento e a emergência de cepas

resistentes. Esse monitoramento é fundamental no acompanhamento dos pacientes em tratamento com AN pelo fato de algumas mutações conferirem resistência cruzada a vários medicamentos. Por exemplo, cepas do HBV resistentes à lamivudina com as mutações rtL180M ± rtM204V/I, que desenvolvam mutações nas posições rtT184, rtS202 ou rtM250 serão resistentes também ao entecavir. A mutação rtA181T/V, que pode ser selecionada durante o tratamento com lamivudina, confere resistência ao adefovir e redução da susceptibilidade ao tenofovir (Locarnini and Yuen, 2010; Zoulim and Locarnini, 2009).

O quadro 1 apresenta de forma resumida as mutações na polimerase (região RT) relacionadas em algum aspecto com a resistência à lamivudina, adefovir, tenofovir e entecavir.

Quadro 1 – Mutações associadas à resistência do HBV aos principais análogos nucleos(t)ídeos utilizados no tratamento da hepatite B

Região da RT (Domínio)	Posição do aminoácido na região RT	Medicamentos			
		Lamivudina	Adefovir	Entecavir	Tenofovir
A	80	L80V/I	L80V/I		
	84		V84M		
	85		S85A		
B	169			I169T*	
	173	V173L			
	177				P177G
	180	L180M/C	L180M		
	181	A181T/V/S	A181T/V/S		A181T/V/S
	184			T184G/A/I/S/C/L/F/M*	
ENTRE B-C	194	A194T			A194T
C	200	A200V			
	202			S202G/I/C/A*	
	204	M204V/I/S		M204V/I/S	
	207	V/F/L/M207I			
ENTRE C-D	214	V214A	V214A		
	215	Q215S/ Q215S	Q215S		
	217	L217P	L217R		
	218		E218G		
	219			S219A	
	229	L229F			
D	233		I233V		
	236		N236T		N236T
	237		P237H		
	238		N238T/D/R		
	240		T240Y		
E	245			Y245H	
	248		N248H		
	249				P249A
	250			M250V/I/L/C*	

As mutações estão destacadas com diferentes cores de acordo com o seu papel na resistência aos análogos nucleos(t)ídeos:

Azul: mutações de resistência

Vermelho: mutações que conferem resistência parcial;

Verde: mutações compensatórias, que restauram a capacidade replicativa quando associadas às mutações na posição 204;

Rosa: mutações que conferem resistência ao entecavir apenas quando associadas às mutações rtM204I/V ± rtL180M;

Preto: mutações potencialmente associadas com resistência;

1.8.4 - Mutações no gene da polimerase & alterações na estrutura do HBsAg

Além da redução da susceptibilidade do vírus ao tratamento, as mutações que ocorrem no gene da polimerase têm uma importante implicação epidemiológica uma vez que podem gerar alterações no HBsAg. Algumas dessas alterações podem reduzir a antigenicidade do HBsAg a ponto de promover o escape dos anticorpos neutralizantes anti-HBs desenvolvidos em resposta ao HBsAg selvagem, de forma similar ao que ocorre com as cepas mutantes selecionados pela vacina ou tratamento com imunoglobulina.

Isso ocorre devido à organização genômica do HBV, cujas regiões codificantes são sobrepostas, ou seja, uma mesma sequência de nucleotídeos é utilizada para a codificação de duas ou mais proteínas. A parte do genoma utilizada para codificar as proteínas do envelope também é utilizada para codificar a polimerase viral, logo substituições de nucleotídeos que provocam alterações em uma proteína podem também alterar a outra.

O quadro 2 mostra o impacto no HBsAg das mutações mais comuns no gene da polimerase selecionadas pelo uso de AN.

A capacidade de ligação dos anticorpos anti-HBs a proteínas HBs com algumas dessas mutações foi avaliada em um estudo que demonstrou elevada redução da afinidade na presença das mutações sE164D+sI195M, a qual foi similar àquela produzida pela presença da mutação sG145R (Alavian et al., 2013). Essas mutações são geradas pela ocorrência das mutações de resistência à lamivudina rtV173L+rtM204V, que no geral são observadas em conjunto com a mutação rtL180M constituindo o padrão rtV173L+ rtL180M +rtM204V encontrado em cerca de 20% dos casos com resistência à lamivudina (Zoulim and Locarnini, 2009).

Proteínas HBs com as mutações sE164D, sI195M, sW196S e sM198I também apresentam redução na capacidade de ligação com o anti-HBs, embora em menor grau (Alavian et al., 2013).

Outro tipo de alteração que pode ser provocada em decorrência das mutações na polimerase é a introdução de mutações que geram códons de

parada (*) prematura no gene S, o que leva à síntese de proteínas de envelope de tamanho menor do que o esperado. No quadro 2 são descritos aqueles resultantes de mutações relacionadas à resistência aos AN, contudo a presença dessa alteração já foi encontrada em outras posições do HBsAg (sL15*, sL21*, sL95*, sW156*, sW163*, sW165*, sW182*, sW191*, sL216*) (Huang et al., 2014; Lai et al., 2009; Lee et al., 2012a; Rodriguez-Frias et al., 2013; Zoulim and Locarnini, 2009).

Essas proteínas truncadas prejudicam a secreção de partículas virais e consequentemente a infectividade do vírus. Apesar disso, as cepas com genomas produtores dessas proteínas conseguem se propagar e se manter na população viral através dos mecanismos de transcomplementação, onde os vírus mutantes utilizam as proteínas produzidas por cepas selvagens para montagem da partícula viral e infecção de outras células. Por outro lado, a não utilização dessas proteínas defeituosas resulta em acúmulo das mesmas no interior dos hepatócitos resultando em stress celular e ativação de vias celulares oncogênicas. Alguns estudos tem demonstrado a associação dessas mutações com risco aumentado de desenvolvimento de CHC (Huang et al., 2014; Lai et al., 2009; Lee et al., 2012a).

Quadro 2 - Mutações no HBsAg geradas em decorrência da presença de mutações na polimerase

Mutações na polimerase (região RT)	Mutações geradas no HBsAg
rtL80V/I	não altera
rtI169T	sF161H/L
rtV173L	sE164D
rtL180M	não altera
rtA181T	sW172*
rtA181T	sW172L
rtA181V	sL173F
rtA181S	sL173C
rtT184G	sL176V
rtT184A	não altera
rtT184I	não altera
rtT184S	sL175F
rtT184C	sL175F + sL176V
rtT184L	sL175F
rtT184F	sL175F
rtT184M	sL176*
rtA194T	não altera
rtS202G	não altera ou sS193L
rtS202I	sV194F/S
rtS202C	não altera ou sS193F
rtS202A	sV194H
rtM204V	sI195M
rtM204I	sW196*, S ou L
rtV/F/L/M207I	sW199*
rtN236T	após o final do gene S
rtM250V/I/C	após o final do gene S

1.8.5 - Transmissão de cepas do HBV com mutações de resistência

Como foi possível observar pelos resultados dos estudos citados anteriormente a seleção de cepas com resistência aos AN pode trazer consequências que vão além da perda dos benéficos alcançados com a introdução do tratamento. Algo que traz uma grande preocupação é o inadequado manejo do tratamento na presença de resistência viral aos AN, o que favorece a replicação contínua de cepas resistentes e consequentemente o ganho de mutações compensatórias, aumento da carga viral e maior potencial de transmissão.

A transmissão de cepas com mutações de resistência aos AN foi documentada inicialmente em um caso HIV positivo, que desenvolveu infecção aguda por cepas do HBV com mutações de resistência à lamivudina (rtL180M, rtM204V) (Thibault et al., 2002), sendo posteriormente identificada em outros casos de infecção aguda (Hayashi et al., 2010; Luo et al., 2012; Morando et al., 2013; Xu et al., 2010). Um desses estudos avaliou a evolução para a cronicidade e observou que um caso dos onze (9%) infectados com cepas com mutações de resistência à lamivudina desenvolveu infecção crônica pelo HBV, porém com característica de hepatite B oculta (Luo et al., 2012).

Um estudo recente demonstrou que cepas do HBV com as mutações rtV173L+rtL180M+rtM204V na polimerase, que resultam nas mutações sE164D+sI195M no HBsAg, foram capazes de causar infecção em Chimpanzés vacinados com altos títulos de anti-HBs. Além disso, esse estudo também evidenciou uma grande estabilidade dessa cepa viral, que foi capaz de ser transmitida, causar infecção e se manter estável (sem reversão para o padrão genético selvagem) durante a infecção (Kamili et al., 2009).

Esses resultados nos dão evidências do grande potencial que essas cepas têm de causar infecção não apenas em indivíduos susceptíveis, mas também em indivíduos vacinados. Felizmente, até o presente momento não há relatos na literatura sobre infecções de indivíduos vacinados com cepas do HBV com as mutações rtV173L+rtM204V/ sE164D+sI195M. Por outro lado, diversos trabalhos têm relatado casos de infecção crônica com cepas do HBV

resistentes aos AN em pacientes virgens de tratamento, o que representa um grande problema para o manejo do tratamento nesses pacientes, uma vez que a caracterização da cepa viral quanto à susceptibilidade ou resistência aos AN não é preconizada nas diferentes diretrizes que orientam o acompanhamento clínico e terapêutico de pacientes com HBC (EASL, 2012; Lok and McMahon, 2009; Ministério da Saúde, 2011).

Casos de não respondedores primários têm sido observados mais frequentemente em pacientes tratados com adefovir (aproximadamente 10-20% dos pacientes) que naqueles tratados com outros antivirais. Neste caso a resistência primária tem sido associada por alguns autores à presença de mutações, o que não tem sido confirmado por outros que referem a baixa dosagem utilizada nesses casos como responsável pela não resposta ao tratamento (Carrouee-Durantel et al., 2008; Curtis et al., 2007; Fung et al., 2006; Pastor et al., 2009; Schildgen et al., 2004). Contudo, estudos realizados em diferentes países têm relatado a presença de vírus da hepatite B com resistência em pacientes nunca tratados, tais pesquisas relatam prevalências variadas (0 a 57%) (Quadro 3).

No Brasil desde a introdução do tratamento com AN em 2002 até 2009 a lamivudina foi o único medicamento dessa classe utilizado, e como já foi descrito anteriormente o uso desse medicamento em monoterapia leva à seleção de vírus resistentes em até 80% dos pacientes após 48 meses de tratamento. Apesar da introdução dos AN no tratamento da HBC ter ocorrido há mais de 10 anos no Brasil, ainda são poucos os estudos que avaliaram a frequência de casos infectados com cepas do HBV resistentes entre os pacientes tratados ou em tratamento com AN. Estudos brasileiros que avaliaram pacientes sem coinfeção pelo HIV tratados com lamivudina em monoterapia ou combinada com adefovir, entecavir ou tenofovir mostraram que de 24 a 62% desses casos apresentavam cepas do HBV com mutações de resistência à lamivudina, com um dos seguintes padrões: (1) rtM204I, (2) rtL180M+rtM204V, (3) rtL180M+rtM204I, (4) rtV173L+rtL180M+rtM204V, (5) rtV173L+rtL180M+rtM204I (Bottecchia et al., 2008b; Haddad et al., 2010;

Mello et al., 2012b). O padrão 2 foi o mais frequente (57%; 26/46) nas casuísticas estudadas, seguido pelo padrão 1 (22%; 10/46), 4 (11%; 5/46), 3 (9%; 4/46) e 5 (2%; 1/46).

Entre pacientes coinfectados pelo HIV a frequência de casos infectados com vírus resistente é bem maior, variando de 66,7 a 100% (Bottecchia et al., 2008b; da Silva et al., 2010; Mendes-Correa et al., 2010). Os padrões de mutação encontrados e suas frequências nessas populações de coinfectados HBV/HIV foram os seguintes: rtL180M+rtM204V (61%; 20/33), rtV173L+rtL180M+rtM204V (24%; 8/33), rtL80V+rtL180M+rtM204V (9%; 3/33) e rtL180M+rtM204I (6%; 2/33). A frequência de cepas com mutações que provocam resistência aos demais AN tem sido raramente avaliada.

Um aspecto interessante que pode ser observado nesses estudos é que a maioria dos pacientes (com ou sem coinfecção pelo HIV) portadores de cepas resistentes apresentam níveis elevados de carga viral, o que pode ser explicado pelo padrão de mutações frequente nas cepas do HBV isoladas desses casos: cepas com mutações de resistência acompanhadas de mutações compensatórias estão presentes em cerca de 87% (69/79) dos casos. O padrão rtV173L+rtL180M+rtM204V/ sE164D+sI195M pode ser observado em 19% (13/69) das cepas com mutações compensatórias.

Diante desse quadro e dos resultados observados em outros países, onde elevada frequência de pacientes não tratados infectados com cepas do HBV resistente aos AN foi encontrada, consideramos como de grande importância avaliar a ocorrência de infecção por esses vírus resistentes entre pacientes nunca tratados no Brasil. Essa informação dará ideia do quanto essas cepas estão sendo disseminadas e trará grande contribuição para a avaliação das atuais estratégias de tratamento, diagnóstico e monitoramento dos pacientes com infecção crônica pelo HBV em nosso país.

Quadro 3 - Resultados de estudos que avaliaram a frequência de pacientes com HBC e não tratados com AN infectados com cepas do HBV com resistência aos AN

Autor, ano	Origem da casuística	N	Metodologia	Frequência de casos com cepas do HBV com mutações de resistência	Mutações de resistência encontradas	Outras mutações
Kobayashi <i>et al.</i> , 2001	Japão	18	SMITEST HBV-YMDD Mutation Detection Kit	27,7% (n=5)	rtM204I/V	ND
Matsuda <i>et al.</i> , 2004	Japão	40	SMITEST HBV-YMDD Mutation Detection Kit	0%		ND
Huang <i>et al.</i> , 2005	China	104	PCR-ELISA (YMDD)	2,9% (n=3)	rtM204I/V	ND
Zoellner <i>et al.</i> , 2005	Alemanha	96	Sequenciamento direto	0%		ND
Akarsu <i>et al.</i> , 2006	Turquia	71	Inno-Lipa HBV-DR	18,3% (n=13)	14,1% (n=10) rtM204I/V + L180M 4,2% (n=3) rtM204V/I	ND
Shi <i>et al.</i> , 2006	China	98	PCR em tempo real (YMDD)	5,1% (n=5)	rtM204I/V	ND
Lee <i>et al.</i> , 2006	Taiwan	28	PCR específico YMDD	42,8% (n=12)	rtM204I/V	ND
Jardi <i>et al.</i> , 2007	Espanha	111	Sequenciamento direto	4,5% (n=5)	1,8% (n=2) rtL180M + rtM204M/I 2,7% (n=3) rtS202S/I	ND
Selabe <i>et al.</i> , 2007	África do Sul	35	Sequenciamento direto	20% (n=3) monoinfectados HBV 50% (n=10) coinfectados HBV + HIV	M204I	ND
Amini-Bavil-Olyaei <i>et al.</i> , 2008	Iran	147	PCR específico YMDD	0%	rtM204I/V	ND
Han <i>et al.</i> , 2009	China	350	Sequenciamento direto	4% (n=14)	0,3% (n=1) rtI169T/L 0,6% (n=2) rtA181T/V/D 1,7% (n=6) rtM204V/I 1,1% (n=4) rtL180M + rtM204V/I 0,3% (n=1) rtL180M + rtM204V/I + rtA181T/V	rtL80I/V (4), rtV173L (1), rtL180M (4), rtV84M (1), rtV214A/E/I/G (6), rtQ215S/H,R/L/P (1)
Nguyen <i>et al.</i> , 2009	Califórnia	472	Sequenciamento direto	0,6% (n=3)	0,4% (2) rtA181T/S 0,2% (1) rtM250I	rtA194S (1)
Pollicino <i>et al.</i> , 2009	Itália	100	Sequenciamento direto	0%		V214A/E (2), Q215S/H/P (9), S219A (3), I233V (3), N238H (4)
Treviño <i>et al.</i> , 2009	Madrid	55	Inno-Lipa HBV	3,6% (n=2) coinfectados HBV + HIV	rtM204V/I	ND
Sayan <i>et al.</i> , 2010a	Turquia	88	Sequenciamento direto	3,4% (n=3)	2,3% (n=2) rtA194T 1,1% (n=1) rtN236T	rtV214A/E/T (2), rtQ215A/H/P/S (2), rtI233L/S/T/V (4)

Quadro 3 – Continuação

Autor, ano	Origem da casuística	N	Metodologia	Frequência de casos com cepas do HBV com mutações de resistência	Mutações de resistência encontradas	Outras mutações*
Liu et al., 2010a	China	191	Sequenciamento direto	0%		rtV207I (1), I233V (1)
Sayan et al., 2010b	Turquia	185	Sequenciamento direto	2% (4)	0,5% (n=1) rtL180M + rtM204I 0,5% (n=1) rtM204I 0,5% (n=1) rtA181V 0,5% (n=1) rtA194T	rtQ215H/S (3) rtI233V (1)
Sayan et al., 2011	Turquia	256	Sequenciamento direto	0,8% (n=2)	0,4% (n=1) rtL80I + rtM204I 0,4% (n=1) rtL180M + rtS202C + rtM204V	rtQ215S (1)
Salpini et al., 2011	Itália	140	Sequenciamento direto	1,4% (n=2)	0,7% (n=1) rtA181V 0,7% (n=1) rtA194T	rtV173L (2), rtL180M (1), rtQ215S (17), rtI233V (6), rtV214A (5)
Mirandola et al., 2011	Itália	286	Inno-Lipa HBV DRv2/v3	2,0%	1% (n=3) rtL180M+rtM204V 1% (n=3) rtM250L/V	rtL80V (2), rtV173L (1) rtI233V (4)
Ismail et al., 2010	Índia	97	Sequenciamento direto	0%		rtI233V (4), rtV214A, rtQ215S, rtN238S
Mohebbi et al., 2012	Iran	57	Sequenciamento direto	0%		rtQ215S/H (3)
Li et al., 2012	China	105	Sequenciamento direto	0%		rtL229V/F (1), rtI233V (1), rtH/N 238N/H/T/S/Q (12)
Zheng et al., 2012	China	527	Sequenciamento direto	3,7%	0,4% (n=2) rtM204I/V/S 1,5% (n=8) rtL180M + rtM204V/I 0,2% (n=1) rtV173L + rtL180M + rtM204V 1% (n=5) rtA181T/V 0,2% (n=1) rtN236T 0,4% (n=2) rtS202I	rtL80I/V (3), rtV173L (n=2), rtL180M (1), rtV84I/M (4), rtV214A/E/I (18), rtQ215H (4), rtN238A/D/H/Q/S/T(24), rtS219A/T (7), rtI233V (2), rtP237H (1), rtN248H (12)
Tan et al., 2012	China	1042	Inno-Lipa HBV DRv1	23,3%	rtM204V/I	ND
Estévez et al., 2013	Espanha	105	Sequenciamento direto	0%		rtV173L (2), rtI233V (1)
Mantovani et al., 2013	Brasil	80	Sequenciamento direto	1,2% (n=1)	rtL180M + rtM204V	rtL80V (2), rtS219A (2)
Singla et al., 2013	Índia	71	Sequenciamento direto	4,2% (n=3)	2,8% (n=2) rtM204I 1,4% (n=1) rtM250I	rtL80V (3), rtI233V (2), rtQ215 (2), rtN238H (1)
Vutien et al., 2013	EUA	198	Inno-Lipa HBV DRv3	0,5% (n=1)	rtM250M/L	rtI233V (1)

OBJETIVOS

2 – Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a frequência de cepas do HBV com mutações de resistência aos análogos nucleos(t)ídeos utilizados no tratamento da hepatite B entre indivíduos cronicamente infectados, não submetidos a tratamento, procedentes de diferentes regiões do Brasil.

Objetivos específicos

- 1- Determinar as seguintes características dos HBV circulantes em diferentes regiões do Brasil entre indivíduos cronicamente infectados e virgens de tratamento:
 - Genótipo e subgenótipo;
 - Relações filogenéticas entre os genótipos/subgenótipos circulantes no Brasil e aqueles circulantes em diferentes países;
 - Presença de mutações na polimerase viral que conferem resistência aos análogos nucleos(t)ídeos utilizados no tratamento da hepatite B;
 - Presença de mutações compensatórias na polimerase viral;
 - Presença de mutações no HBsAg;
 - Presença de mutações na região pré-core/core;
- 2- Avaliar a associação dos diferentes subgenótipos com as mutações encontradas e características demográficas e laboratoriais dos pacientes;

MÉTODOS

3 - Casuística e Métodos

3.1 - Desenho do estudo e seleção de pacientes

Desenvolveu-se um estudo transversal retrospectivo e prospectivo no qual foram incluídos pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B procedentes de diferentes regiões do Brasil, que não haviam recebido previamente tratamento com análogos de nucleos(t)ídeos ou interferon.

Foram incluídas amostras de soro coletadas anteriormente a partir do ano de 2006, que faziam parte da soroteca de algumas das instituições colaboradoras ou que foram coletadas dentro de um projeto anterior para o estudo do vírus da hepatite B; e amostras que foram coletadas a partir do ano de 2010 especificamente para o presente estudo.

Para a realização das coletas foram selecionados pacientes entre aqueles regularmente atendidos nos serviços de saúde específicos de cada estado sob a supervisão de médicos e pesquisadores dos respectivos serviços. Foram incluídos no estudo os pacientes que concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A).

Crítérios de Inclusão

- 1- Indivíduos com diagnóstico de infecção crônica pelo vírus da hepatite B, através da identificação da presença do marcador sorológico HBsAg, reagente por mais de 6 meses;
- 2- Indivíduos nunca submetidos a tratamento para hepatite B crônica com análogos nucleos(t)ídeos ou interferon convencional ou peguilado;
- 3- Indivíduos que assinaram o termo de consentimento livre e informado ou no caso de amostras de soroteca foi obtida a aprovação da instituição para utilização das amostras.

Crterios de excluso:

- 1- Indviduos com coinfeco pelo HIV;
- 2- Tratamento prvio com algum dos seguintes medicamentos: lamivudina, adefovir, tenofovir, telbivudina, entecavir, interferon convencional ou peguilado;

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comit de tica em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de So Paulo (CEPFMUSP protocolo de pesquisa n 036/10) (ANEXO B).

3.2 – Mtodos

3.2.1 - Coleta das amostras

A estimativa do nmero de amostras necessrias para responder pergunta deste estudo foi baseada na prevalncia de cepas do HBV com mutaes de resistncia aos anlogos nucleos(t)deos observadas em estudos realizados em outros pases que levantamos na poca de planejamento do projeto de pesquisa (Fung, 2009; Han et al., 2009; Ludwig Amei D, 2008; Pollicino et al., 2009; Sayan et al., 2010a; Selabe et al., 2007; Thibault et al., 2002).

Para o cculo foram considerados os resultados que demonstraram prevalncia de mutaes que comprovadamente conferem resistncia aos AN como a rtM204I/V. O programa STATA 9.0 foi utilizado para as anlises (<http://www.stata.com>).

Foram consideradas duas possveis situaes:

1. A prevalncia baixa (0,7%), como foi observada por Ludwig et al., (2008) e a inteno a de que se a prevalncia for zero em nossa amostra este resultado seja conclusivo (significativamente menor que o esperado). Para o cculo foi adotado $\alpha=0,05$, prevalncia= 0,7%,

poder estatístico=0,8. Neste caso o tamanho estimado da amostra foi igual a 545.

2. A prevalência é mais elevada (10%) como foi observada por Fung et al., (2009) e a intenção é de que se tenha uma amostra representativa desta situação permitindo-se 3,4% de margem de erro. Para o cálculo foi adotado $\alpha=0,05$, prevalência= 10%, poder estatístico=0,8. Neste caso o tamanho estimado da amostra foi igual a 550.

Foram incluídas neste estudo amostras de sete estados brasileiros: Pará, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, São Paulo (Capital, Região do ABC e Ribeirão Preto), Paraná e Rio Grande do Sul.

A maior parte das amostras incluídas neste projeto haviam sido ou estavam sendo coletadas para outros projetos que envolviam também o estudo da infecção pelo vírus da hepatite B. As amostras procedentes de São Paulo (Capital, região do ABC e Ribeirão Preto) e Rio Grande do Sul foram coletadas especificamente para este projeto, sendo que a coleta de sangue foi realizada utilizando-se tubos estéreis com gel e sem anticoagulantes. Posteriormente, o soro foi separado por centrifugação e o tubo congelado e encaminhado para o laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical da USP, em São Paulo.

No total foram coletadas 779 amostras, sendo que houve certa variação no número de amostras obtidas em cada região conforme mostrado na figura 1.

Figura 1- Procedência das amostras incluídas no presente estudo

Essas amostras foram coletadas com a colaboração de pesquisadores e/ou médicos das seguintes instituições:

- **Pará**

Santa Casa de Misericórdia do Pará e Instituto Evandro Chagas;

- **Maranhão**

Centro de Estudo do Fígado do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão;

- **Bahia**

Universidade Federal da Bahia, Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos;

- **Minas Gerais**

Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais;

- **São Paulo - SP**

- **Capital e região do ABC**

Faculdade de Medicina do ABC e Faculdade de Medicina da USP;

- **Ribeirão Preto – SP**

Ambulatório de Hepatites Virais da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão; Preto

- **Paraná**

15ª Regional de Saúde de Maringá e Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas;

- **Rio Grande do Sul**

- **Porto Alegre**

Hospital Nossa Senhora da Conceição;

- **Caxias do Sul**

Serviço Municipal de Infectologia do Centro Especializado de Saúde de Caxias do Sul;

3.2.2 - Coleta de dados

Aos pacientes do Rio Grande do Sul e de Ribeirão Preto foi aplicado um questionário que visou a obtenção de informações individuais referentes à idade, cor da pele, estado civil, ocupação, naturalidade, procedência, origem familiar, histórico de viagens, história de hepatite B na família e possível forma de contágio. Do prontuário dos pacientes foram obtidas as seguintes informações clínicas quando disponíveis: níveis das aminotransferases,

resultado de biópsia hepática e fase de evolução da doença. Dos demais pacientes obtivemos as informações já previamente coletadas ou aquelas obtidas nos bancos de dados das instituições colaboradoras.

A informação quanto a situação de tratamento do paciente foi fornecida na maioria dos casos pela consulta dos prontuários clínicos pelos médicos colaboradores e quando necessário, a confirmação da informação foi realizada por entrevista com o próprio paciente. As informações de amostras procedentes de soroteca (amostras do Instituto Evandro Chagas/PA) foram obtidas nas fichas de encaminhamento das amostras.

3.2.3 - Procedimentos laboratoriais

As amostras de soro foram acondicionadas a -20°C nas instituições onde foram coletadas e posteriormente enviadas ao Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical em São Paulo, onde foram realizados todos os procedimentos laboratoriais.

O transporte das amostras foi realizado por empresas com experiência no transporte de material biológico de forma adequada para manter a integridade do material e observando as regras de biossegurança vigentes em nosso país.

Pesquisa dos marcadores sorológicos

Para pesquisa dos marcadores sorológicos foi empregada a técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kits comerciais (Diasorin, Itália). Todas as amostras foram submetidas a nova pesquisa de marcadores sorológicos do HBV: HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe. Além disso, também foi realizada a pesquisa do anticorpo anti-HD, marcador da coinfeção pelo vírus da hepatite delta (HDV).

Técnicas de biologia molecular

As reações de amplificação para detecção e quantificação do DNA do HBV por PCR em tempo real e a amplificação e sequenciamento das regiões

genômicas para genotipagem e pesquisa de mutações de resistência aos antivirais (região da transcriptase reversa da polimerase) foram realizadas usando metodologias desenvolvidas no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical. Para a realização dessas reações foram utilizados primers e sonda que hibridizam em regiões do genoma viral conservadas entre os diferentes genótipos do HBV, que foram desenhados a partir da análise de um banco de dados contendo sequências do HBV de todos os genótipos descritos procedentes de diferentes regiões do mundo.

As boas práticas para evitar resultados falso-positivos utilizando técnicas de biologia molecular foram adotadas para a realização das reações, assim como a inclusão de controles negativos entre as amostras para monitoramento da qualidade e confiabilidade dos resultados (Kwok and Higuchi, 1989).

Extração do DNA viral

O DNA do HBV foi extraído do soro de cada paciente utilizando o Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) conforme instruções do fabricante.

Amplificação e quantificação do DNA por PCR em tempo real

O material extraído foi submetido à amplificação por PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan® (Life Technologies), os primers HBV362F (5'- CCT GGY TAT CGY TGG ATG TGT - 3') e HBV477R (5' –GGA CAV ACG KGC AAC ATA CCT T – 3) e a sonda HBV419T (5'- FAM - CTA TGC CTC ATC TTC TT - MGB – 3'), que anelam em regiões conservadas do gene S (Sitnik et al., 2010). Juntamente com amplificação do DNA viral foi amplificado um controle interno (kit TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents, Life Technologies) para avaliar a presença de inibidores na reação, evitando dessa forma resultados falso-negativos.

Em cada corrida foi realizada em paralelo a amplificação de uma curva padrão com cinco pontos de diluição de um controle para quantificação, cuja carga viral foi determinada pela corrida em paralelo com um padrão de quantificação para HBV DNA disponível comercialmente (ValiQuant® HBV

DNA Quantification Panel, Acrometrix). A carga viral de cada amostra foi determinada através da plotagem do resultado do Ct obtido em cada amostra contra os Cts obtidos a partir da curva padrão. Os resultados foram expressos em UI (unidades internacionais) por ml.

Amplificação das regiões S/polimerase (domínio de RT) e pré-core/core do HBV DNA

Foi realizada a amplificação das regiões S/polimerase (S/Pol) do genoma viral das amostras nas quais foi possível detectar o HBV DNA. E dos genes pré-core/core (PCC) daqueles que foi possível amplificar a região S/Pol e determinar o genótipo/subgenótipo viral.

Para tanto, após a extração do DNA viral, a região de interesse do HBV DNA foi amplificada utilizando a metodologia de *nested* PCR, na qual se realiza duas etapas de amplificação com o objetivo de aumentar a sensibilidade da reação.

Para a amplificação da região S/Pol foram utilizados primers que amplificam toda a região RT do gene da DNA polimerase viral gerando um fragmento de 1306 pares de base (pb). Como as regiões codificantes do genoma do HBV são sobrepostas, essa região também inclui parte do gene pré-S1 e a totalidade dos genes pré-S2 e S. Essa sequência contém informação genética não só para a caracterização dos diferentes genótipos do HBV como também de todos os subgenótipos com excelente confiabilidade, conforme confirmado em análises prévias com sequências dos diferentes subgenótipos do HBV obtidas no GenBank.

Para a primeira etapa foram utilizados os primers PS3132F (5' CCT CCY GCH TCY ACC AAT CG 3'; nt 3132 – 3151) e 2920RM (5'ACG TCC CKC GHA GRA TCC AG 3'; nt 1417 – 1398) e para o segundo ciclo de amplificação os primers PS3201F (5' CAY CCH CAG GCM ATG CAG TGG 3'; nt 3201 – 3221) e P1285R (5' CWA GGA GTT CCG CAG TAT GG 3'; nt 1285 – 1266). Foi utilizada a enzima Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies) e a reação montada conforme orientações descritas pelo fabricante. Para as duas etapas

de amplificação foram realizados 35 ciclos de variação de temperatura em termociclador MasterCycler® EPGradiente S (Eppendorf), após uma etapa de incubação inicial a 94 °C por 1 minuto, os quais consistiram nas seguintes temperaturas: 94 °C por 30 segundos, 48 °C (primeira etapa) ou 54 °C (segunda etapa) por 30 segundos, e 72 °C por 1 minuto e 40 segundos.

Para a amplificação da região pré-core/core foram utilizados primers descritos anteriormente (EP1.1 e 2032R no primeiro ciclo de PCR e EP1.2 e 2017R no segundo ciclo) que geram um fragmento de 501 bp dessa região do genoma viral (Sitnik et al., 2004).

Detecção do DNA amplificado

A detecção do fragmento de DNA amplificado foi realizada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, no qual foi realizada a eletroforese das amostras juntamente com um marcador de tamanho e massa molecular (Low DNA Mass Ladder, Life Technologies) para identificação do tamanho do fragmento gerado e quantificação do DNA, respectivamente.

Sequenciamento das regiões S/Pol (domínio RT) e PCC do HBV DNA

Para o sequenciamento foi empregada a técnica derivada da metodologia de Sanger (1977), utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o *kit* ABI Prism^R BigDyeTM Terminator (Applied Biosystems).

Os amplicons gerados no segundo ciclo de PCR foram inicialmente purificados usando a enzima ExoSAP (ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit, GE Healthcare) e então submetidos a reação de sequenciamento para incorporação dos didesoxinucleotídeos marcados.

Os amplicons foram sequenciados em ambos os sentidos da fita de DNA (sense e antisense) para garantir maior confiabilidade dos resultados.

Para o sequenciamento da região S/Pol (1306 pb) foram utilizados três pares de primers que geraram sequências em torno de 500 pb superponíveis nas duas extremidades: 1 - PS3201F e HBV477R (5' GGA CAV ACG GGC AAC

ATA CCT T 3'; nt 477 – 456); 2 - L372 (5' - TCG YTG GAT GTR TCT GCG GCG TTT TAT - 3'; nt 370 – 396) e RADE2M (5' - TGR CAN ACY TTC CAR TCA ATN GG - 3'; nt 989 – 970); 3 - P781F (5' GAR TCC CTT TWT RCC KCT RTT ACC 3'; nt 781 – 804) e P1285R. E para o sequenciamento do fragmento de 501 pb da região pré-core/core foram utilizados os mesmos primers usados no segundo ciclo de amplificação.

A eletroforese e leitura das fluorescências nas moléculas de DNA foram realizadas em sequenciador automático modelo ABI 3500 (Applied Biosystems). A sequência gerada por cada primer utilizado foi montada em software acoplado ao sistema de sequenciamento (Sequencing Analysis Software).

3.2.4 - Análise das sequências

As sequências obtidas foram analisadas quanto à sua qualidade utilizando o programa Phred-Phrap e a sequência consenso de cada amostra foi montada a partir do alinhamento das sequências geradas de cada fragmento sequenciado (seis sequências região S/Pol ou duas sequências região pré-core/core) utilizando-se o programa CAP3. Ambos os programas estão disponíveis no site *Eletropherogram quality analysis* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

Para a classificação dos genótipos e subgenótipos das amostras analisadas, as sequências consenso da região S/Pol obtidas foram alinhadas com sequências dos diferentes genótipos e subgenótipos do HBV disponíveis no GenBank. Para o alinhamento foi utilizado o programa Clustal_W integrado ao programa BioEdit (Hall, 1999). Posteriormente, o alinhamento foi submetido a análise filogenética utilizando-se o programa BEAST v.1.6.1 (Drummond and Rambaut, 2007). O programa FigTree v1.3.1 foi utilizado para visualização e edição das árvores filogenéticas.

Para a pesquisa de mutações na região codificante da proteína S e da polimerase, as sequências de nucleotídeos foram traduzidas para aminoácidos e comparadas à sequência de aminoácidos de uma sequência referência

consenso de cada subgenótipo. Para isso foi construído um banco de sequências de cada um dos subgenótipos identificados em nossa casuística, no qual procuramos incluir sequências isoladas em diferentes regiões do mundo com o objetivo de abranger o máximo possível da diversidade dentro de cada subgenótipo.

A análise das mutações no gene da polimerase limitou-se aos aminoácidos dos domínios A a E da região com função de transcriptase reversa, incluindo os aminoácidos localizados entre os domínios B – C e C – D, pois são as regiões onde a ocorrência de mutações está relacionada com alteração da conformação da proteína prejudicando dessa forma sua capacidade de ligação aos análogos nucleos(t)ídeos. A numeração de cada aminoácido da região RT da polimerase foi realizada seguindo a nomenclatura proposta por Stuyver e recomendada pelo consenso Americano de 2007 (Lok et al., 2007; Stuyver et al., 2001).

A identificação das mutações nas regiões pré-core/core foi realizada pela análise visual do alinhamento das sequências de nucleotídeos. As sequências obtidas foram submetidas à análise para caracterização de alterações de nucleotídeos nas seguintes posições: 1653, 1753, 1762, 1764, 1766, 1768, 1809-1812, 1814-1816, 1858, 1862, 1888, 1899. A presença de determinada base nessas posições têm sido associadas com alterações na capacidade replicativa do HBV (aumento ou redução), ausência ou redução da síntese do HBeAg e/ou evolução clínica da hepatite B crônica.

3.2.5 - Análise estatística

Foram descritas as características demográficas dos pacientes (idade, sexo, cor, naturalidade, procedência), laboratoriais (perfil HBsAg/anti-HBe, HBeAg/anti-HBe e carga viral) e virológicas (subgenótipos, presença de mutações no HBsAg e genes pré-core/core).

Analizou-se a presença e a frequência das mutações no HBsAg e genes pré-core/core nos genótipos e subgenótipos mais frequentes na casuística

estudada. Foram realizados testes de associação entre os subgenótipos e variáveis demográficas, laboratoriais e virológicas.

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa estatístico SPSS (IBM SPSS ® Statistics, versão 20.0). Quando indicadas, foram realizadas as seguintes análises dos resultados obtidos: média, mediana, desvio padrão, teste qui-quadrado, teste t-Student, testes da razão de verossimilhanças, teste Exato de Fisher e ANOVA (Kirkwood, 2006).

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 - Detecção do HBV DNA, amplificação e sequenciamento da região S/Pol

Todas as amostras coletadas (n=779) foram submetidas aos exames para detecção e quantificação do HBV DNA e dentre essas, 741 (95,1%) apresentaram HBV DNA detectável. O fragmento de 1306 pb da região S/Pol foi amplificado em 731 amostras daquelas que apresentaram carga viral detectável e, entre essas, foi possível obter sequências em 702 que atenderam aos critérios de qualidade. Portanto, das 779 amostras coletadas, 702 (90,1%) puderam ser incluídas para atender aos objetivos deste estudo. A figura 2 mostra a distribuição dessas amostras de acordo com sua procedência.

Figura 2 - Distribuição das amostras que foram efetivamente incluídas neste estudo conforme procedência

4.2 – Características demográficas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo

Foi possível obter algumas informações demográficas acerca de idade, sexo e naturalidade de parte dos pacientes cujas amostras foram incluídas neste estudo. O perfil laboratorial quanto à presença de marcadores sorológicos (HBsAg/anti-HBs, HBeAg/anti-HBe) e carga viral também foi determinado para a maioria desses pacientes.

A idade média dos indivíduos foi de 45 ($\pm 15,9$) anos, não houve predominância de gênero na casuística e a maioria (81,1%) era de cor branca ou parda. A informação quanto à naturalidade só estava disponível para a maioria dos casos procedentes de Minas Gerais, Ribeirão Preto, Rio Grande do Sul e São Paulo (apenas os casos de naturalidade estrangeira). Entre esses casos a maioria era natural da região Sudeste (60%), seguido pela região Sul (25,2%) e Nordeste (8,4%).

A sorologia para a pesquisa do HBsAg foi repetida nas 702 amostras incluídas no estudo e naquelas com volume de soro suficiente ($n=596$) foi realizada também a pesquisa do anti-HBs. Em todas as amostras foi confirmada presença do HBsAg e 8,7% ($n=52$) das 596 analisadas apresentaram positividade simultânea dos anticorpos anti-HBs.

Quanto ao perfil sorológico do HBeAg, na maioria (84,1%) dos pacientes esse antígeno não foi detectado, os quais apresentaram apenas a presença de anticorpos anti-HBe. Baixos níveis de carga viral (< 2.000 UI/ml) foram detectados em 38,9% dos casos, enquanto que níveis superiores a 20.000 UI/ml foram encontrados em 32,7%.

A tabela 1 apresenta de forma resumida os resultados das variáveis avaliadas.

Tabela 1 - Características demográficas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo

Variável	Total	
	n	%
Idade (anos) (n=471)		
média (DP)	45 (15,9)	
mediana (mín.; máx.)	43 (1; 88)	
Sexo (n=657)		
Masculino	353	53,7
Feminino	304	46,3
Cor da pele (n=412)		
Branco	173	42,0
Pardo	161	39,1
Negro	75	18,2
Amarelo	3	0,7
Naturalidade (Região Brasileira) (n=310)		
Norte	7	2,3
Nordeste	26	8,4
Centro-Oeste	5	1,6
Sudeste	186	60,0
Sul	78	25,2
Outros países*	8	2,6
HBsAg (n=702)		
Negativo	0	0,0
Positivo	702	100,0
Anti-HBs (n=596)		
Negativo	544	91,3
Positivo	52	8,7
Perfil sorológico do HBeAg (n=678)		
Negativo	570	84,1
Positivo	108	15,9
Níveis de carga viral (UI/ml) (n=696)		
< 2.000	271	38,9
2.000 a 20.000	198	28,4
> 20.000 e ≤ 10.000.000	134	19,3
> 10.000.000	93	13,4

* Angola (n=6), Turquia (n=1), China (n=1)

4.3 - Distribuição dos genótipos do HBV nas regiões brasileiras estudadas

Entre as 702 amostras analisadas neste estudo sete genótipos do HBV foram identificados: A, B, C, D, E, F e G, sendo que o genótipo A foi o mais frequente (67,1%; 471/702), seguido pelos genótipos D (25,8%; 181/702) e F (5%; 35/702). Os demais genótipos foram encontrados em um pequeno número de casos: B (0,3%; 2/702), C (0,9%; 6/702), E (0,6%; 4/702) e G (0,4%; 3/702).

O padrão de distribuição dos genótipos nas diferentes regiões brasileiras estudadas apresentou semelhanças e particularidades. Entre as semelhanças destaca-se a presença de três genótipos (A, D e F) em comum na maioria das regiões e a predominância do genótipo A, com exceção no Rio Grande do Sul. Entre as particularidades temos o fato de São Paulo ter apresentado a maior diversidade de genótipos, onde quase todos os genótipos do HBV foram identificados (A, B, C, D, E, F e G), e a maior prevalência do genótipo D no Rio Grande do Sul.

Bahia e Minas Gerais foram as regiões que apresentaram maior prevalência de genótipo A (100 e 91,7%), seguida do Pará (85,3%), Ribeirão Preto (73,6%), Maranhão (67,2%) e São Paulo (57,1%). As cepas do HBV genótipos B e C identificadas nesta casuística foram isoladas de pacientes de origem oriental (China: 1 caso genótipo B) ou brasileiros descendentes de orientais; já as amostras classificadas como genótipo E foram isoladas de pacientes procedentes da África (Angola). A figura 3 apresenta a distribuição dos genótipos do HBV nas diferentes regiões brasileiras estudadas.

Figura 3 – Distribuição dos genótipos do HBV nas diferentes regiões geográficas estudadas no Brasil

4.4 - Distribuição dos subgenótipos do HBV circulantes nas regiões brasileiras estudadas

Considerando a classificação em subgenótipos, 12 diferentes subgenótipos do HBV foram encontrados na casuística estudada. Na figura 4 são apresentados os subgenótipos encontrados, assim como sua frequência. Em cinco casos classificados como genótipo D não foi possível classificar o subgenótipo.

Figura 4 – Frequência dos subgenótipos do HBV encontrada na casuística estudada

Foram identificados três subgenótipos do genótipo A na casuística estudada: A1, A2 e A3, sendo que o HBV/A1 foi o subgenótipo mais frequente (95,1%; 447/471) em todas as regiões onde o genótipo A foi encontrado. O HBV/A2 foi encontrado em 4,8% dos casos de genótipo A (23/471) e HBV/A3 foi identificado em uma única amostra (0,2%). Este caso trata-se de um paciente de origem Africana (Angola) residente em Ribeirão Preto.

Dentre as amostras classificadas como genótipo D quatro subgenótipos foram identificados: D1, D2, D3 e D4, sendo que apenas os subgenótipos D2,

D3 e D4 foram encontrados com maior frequência: 17,7% (32/181), 56,4% (102/181) e 19,8% (36/181), respectivamente.

Quanto à distribuição dos subgenótipos de D nas regiões estudadas observou-se que a mesma não seguiu um padrão homogêneo. O HBV/D3 foi o mais frequente subgenótipo encontrado em todas as regiões onde o genótipo D foi identificado, com exceção do Maranhão, onde o subgenótipo D4 prevaleceu.

Os casos de genótipo F, que foi o terceiro genótipo mais frequente, foram classificados como F2a e F4, sendo o primeiro o mais frequente (91,4%) em todas as regiões e o último identificado em três casos (8,6%), dois de São Paulo e um do Pará.

As amostras genótipo C foram todas classificadas como C2 e as genótipo B como B1, a procedente de São Paulo, e B2, a procedente de Minas Gerais. A figura 5 resume os achados acerca da distribuição dos subgenótipos do HBV nas diferentes regiões brasileiras estudadas.

Figura 5 – Distribuição e frequência dos subgenótipos do HBV nas diferentes regiões brasileiras estudadas. Os subgenótipos identificados com letras em fonte menor sem o valor percentual foram identificados em menos de 5% do total de amostras analisadas.

4.5 - Relações filogenéticas dos subgenótipos do HBV mais frequentes nas regiões brasileiras estudadas

Subgenótipos A1 e A2

A topologia da árvore filogenética das sequências A1 identificadas neste estudo mostrou que todas agruparam no clado constituído principalmente por sequências de origem Asiática e Americana, nenhuma agrupou no clado composto por sequências Africanas (Figura 6). Esse padrão de agrupamento indica que o genótipo A1 que circula no Brasil é mais próximo do A1 que circula em regiões da Ásia do que daquele que atualmente é prevalente na África. Observou-se também que as sequências isoladas de pacientes procedentes de uma mesma região não apresentaram um agrupamento específico dentro de um mesmo clado, o que sugere várias introduções desse genótipo dentro de uma mesma região do Brasil (Figura 6).

Em relação ao A2 identificado neste estudo, no geral também não se observou a formação de um grupo monofilético, o que apenas pode ser visto entre a maioria das sequências A2 isoladas em Ribeirão Preto, que formaram um grupo monofilético com uma sequência do GenBank identificada na Alemanha (Figura 7).

Figura 6 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como subgenótipo A1.

A análise foi realizada pelo método Bayesiano a partir de 878 sequências (493 do GenBank e 385 deste estudo) com 1230 nucleotídeos da região S/polimerase do genoma do HBV. Os valores de probabilidade posterior são apresentados acima dos ramos principais. À esquerda a topologia da árvore completa com todos os genótipos do HBV e destacado à direita em tamanho maior o clado onde as sequências subgenótipo A1 identificadas neste estudo agruparam. Os ramos desse clado foram coloridos de acordo com a procedência das sequências, conforme legenda ao lado da figura.

Figura 7 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como subgenótipo A2.

A análise foi realizada pelo método Bayesiano a partir de 878 sequências (493 do GenBank e 385 deste estudo) com 1230 nucleotídeos da região S/polimerase do genoma do HBV. Os valores de probabilidade posterior são apresentados acima dos ramos principais. À esquerda a topologia da árvore completa com todos os genótipos do HBV e destacado à direita o clado do subgenótipo A2. As sequências caracterizadas neste estudo estão destacadas em diferentes cores de acordo com a procedência, conforme legenda ao lado da figura; e as sequências retiradas do GenBank são identificadas pelo subgenótipo, seguido pelo número de acesso e origem geográfica.

Subgenótipos D2, D3 e D4

As sequências D2 do Rio Grande do Sul apresentam maior proximidade formando um grupo monofilético (com valor de probabilidade alto) junto com sequências isoladas em algumas regiões da Europa (Polônia, Alemanha e Espanha) (Figura 8).

As sequências HBV/D3 brasileiras não formaram um grupo monofilético, nem mesmo com aquelas isoladas na mesma região (Figura 9). Quanto à relação filogenética do D3 circulante do Brasil com aqueles isolados em outros países, observamos uma proximidade maior entre algumas sequências brasileiras com sequências isoladas na Itália. A topologia do agrupamento das sequências HBV/D3 brasileira sugere que várias cepas de D3 foram introduzidas no Brasil (Figura 9).

As demais sequências pertencentes ao genótipo D agruparam mais próximas ao clado de sequências classificadas como subgenótipo D4, o que nos levou a classificá-las como D4 (Figura 10). Considerando que as sequências HBV/D4 identificadas no Brasil agruparam em um clado separado e bem suportado (valor de probabilidade posterior=1) levantou-se a possibilidade dessas amostras representarem um outro subgenótipo do genótipo D. Para testar essa hipótese todas as 36 amostras classificadas como HBV/D4 foram submetidas a amplificação e sequenciamento do genoma completo e dessas foi possível amplificar e obter sequências de boa qualidade de 22 casos, sendo 15 procedentes do Maranhão e todas as demais encontradas nas outras regiões. A análise filogenética das sequências de genoma completo HBV/D4 caracterizadas no Brasil juntamente com aquelas caracterizadas em outras regiões do mundo mostrou um agrupamento similar aquele observado com base nas sequências de 1306 pb (Figura 11).

Além disso, a análise de divergência entre as amostras D4 brasileiras e aquelas isoladas em outros países demonstrou que a diversidade genética entre elas é menor que 4% (Tabela 2), não atendendo, portanto, aos critérios para classificação como outro subgenótipo.

Tabela 2 - Divergência (média) entre as sequências do genoma completo das cepas de HBV/D4 isoladas no Brasil e sequências HBV/D4 isoladas em outros países publicadas no GenBank

	D4_Brasil (PA, MA, SP)	D4_Brasil (MG)	D4_Oceania	D4_Haiti	D4_Canada	D4_Martinique
Nº de sequências	20	2	4	3	3	3
D4_Brasil (PA, MA, SP)	0,80%					
D4_Brasil_MG	1,80%	0,80%				
D4_Oceania	1,40%	1,60%	0,60%			
D4_Haiti	1,30%	1,50%	0,70%	0,10%		
D4_Canada	2,00%	2,20%	1,50%	1,40%	1,30%	
D4_Martinique	1,70%	2,00%	1,20%	0,90%	1,50%	1,00%

Subgenótipos F2a e F4

Dentro do clado das sequências classificadas como subgenótipo F2a também não observamos um agrupamento das sequências de acordo com a procedência dos pacientes, indicando que diversas cepas F2a foram introduzidas nas diferentes regiões estudadas. As sequências F4 agruparam juntas e apresentam estreita relação com uma sequência F4 isolada na Argentina (Figura 12).

Figura 8 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como subgenótipos D1 e D2.

A análise foi realizada pelo método Bayesiano a partir de 509 sequências (377 do GenBank e 132 deste estudo) com 1230 nucleotídeos da região S/polimerase do genoma do HBV. Os valores de probabilidade posterior são apresentados acima dos ramos principais. Os cladogramas dos subgenótipos D1 e D2 são mostrados em detalhes, os cladogramas com sequências de outros genótipos e dos subgenótipos D3, D4, D5 e D7 foram colapsados. As sequências D1 e D2 caracterizadas neste estudo estão destacadas em diferentes cores de acordo com a procedência, conforme legenda ao lado da figura; e as sequências retiradas do GenBank são identificadas pelo subgenótipo, seguido pelo número de acesso e origem geográfica.

Figura 9 – Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como subgenótipo D3.

A análise foi realizada pelo método Bayesiano a partir de 509 sequências (377 do GenBank e 132 deste estudo) com 1230 nucleotídeos da região S/polimerase do genoma do HBV. Os valores de probabilidade posterior são apresentados acima dos ramos principais. O clado do subgenótipo D3 é mostrado em detalhes, os cladogramas com sequências de outros genótipos e dos subgenótipos D1, D2, D4, D5 e D7 foram colapsados. As sequências D3 caracterizadas neste estudo estão destacadas em diferentes cores de acordo com a procedência, conforme legenda ao lado da figura; e as sequências retiradas do GenBank são identificadas pelo subgenótipo, seguido pelo número de acesso e origem geográfica.

Figura 10 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como subgenótipo D4.

A análise foi realizada pelo método Bayesiano a partir de 509 sequências (377 do GenBank e 132 deste estudo) com 1230 nucleotídeos da região S/polimerase do genoma do HBV. Os valores de probabilidade posterior são apresentados acima dos ramos principais. O clado do subgenótipo D4 é mostrado em detalhes, os clados com sequências de outros genótipos e dos subgenótipos D1, D2, D3, D5 e D7 foram colapsados. As sequências D4 caracterizadas neste estudo estão destacadas em diferentes cores de acordo com a procedência, conforme legenda ao lado da figura; e as sequências retiradas do GenBank são identificadas pelo subgenótipo, seguido pelo número de acesso e origem geográfica.

Figura 11 - Árvore filogenética das sequências do genoma completo das amostras identificadas neste trabalho como subgenótipo D4.

A análise foi realizada pelo método Bayesiano a partir de 509 sequências (432 do GenBank e 22 deste estudo). Os valores de probabilidade posterior são apresentados acima dos ramos principais. O clado do subgenótipo D4 é mostrado em detalhes, os clados com sequências de outros genótipos e dos subgenótipos D1, D2, D3, D5 e D7 foram colapsados. As sequências D4 caracterizadas neste estudo estão coloridas e as sequências retiradas do GenBank são identificadas pelo subgenótipo, seguido pelo número de acesso e origem geográfica.

Figura 12 - Árvore filogenética das sequências identificadas neste trabalho classificadas como genótipos B, C, E, F e G.

A análise foi realizada pelo método Bayesiano a partir de 422 sequências (382 do GenBank e 40 deste estudo) com 1230 nucleotídeos da região S/polimerase do genoma do HBV. Os valores de probabilidade posterior são apresentados acima dos ramos principais. Apenas os clados dos subgenótipos F2a e F4 são apresentados em detalhes, os clados com sequências de outros genótipos e dos subgenótipos F1, F2b e F3 foram colapsados. As sequências genótipo F caracterizadas neste estudo estão destacadas em diferentes cores de acordo com a procedência, conforme legenda ao lado da figura; e as sequências retiradas do GenBank são identificadas pelo subgenótipo, seguido pelo número de acesso e origem geográfica.

4.6 – Pesquisa de mutações na polimerase do HBV

Foram analisadas sequências do gene da polimerase de 702 amostras de HBV isoladas de pacientes virgens de tratamento com análogos nucleos(t)ídeos. A sequência de nucleotídeos caracterizada neste estudo permitiu a identificação de todos os 344 aminoácidos da região com função de transcriptase reversa da polimerase do HBV, contudo a pesquisa de mutações foi restringida aos aminoácidos que compõem os domínios funcionais da RT (domínios A-E) e as regiões interdomínio B-C e C-D. No total foram analisadas 107 posições da região de RT da polimerase viral.

Cepas do HBV com alguma alteração de aminoácido nas regiões analisadas foram identificadas em 276 (39%) amostras. A maioria dessas amostras (66,3%; 183/276) apresentou cepas com mutações em apenas um dos domínios ou subdomínios analisados.

As mutações observadas ocorreram em 56 posições das 107 analisadas e foram localizadas nas diferentes regiões da RT avaliadas. Dentre as regiões analisadas aquela que apresentou maior variabilidade foi a interdomínio C-D (aminoácidos 211 a 229), onde foram observadas mutações em 14 (73,7%) das 19 posições que constituem esse domínio (Tabela 3). Considerando todas as posições onde foram identificadas mutações, observou-se que cinco delas (t194, rt207, rt221, rt238, rt253) apresentaram maior polimorfismo com a ocorrência de 4 a 6 tipos de mutações. Na maioria das posições (50%; 28/56) apenas um tipo de mutação foi observada; em 23,2% (13/56) foram observadas 2 tipos e em 5,4% (3/56) ocorreram 3 tipos.

Tabela 3 – Frequência de mutações na polimerase (região de transcriptase reversa) do HBV de acordo com a região analisada

Região da RT	Nº de posições analisadas	No. de posições com mutações (%)	Posições com mutações
A (aa 75 a 91)	17	8 (47,1%)	rt76, rt78, rt79, rt80, rt84, rt85, rt88, rt91
B (aa 163 a 189)	27	12 (44,4%)	rt163, rt164, rt173, rt175, rt180, rt181, rt183, rt184, rt185, rt186, rt187, rt188
INTER B-C (aa 190 a 199)	10	5 (50%)	rt190, rt191, rt194, rt197, rt199
C (aa 200 a 210)	11	5 (45%)	rt202, rt204, rt205, rt207, rt209
INTER C-D (aa 211 a 229)	19	14 (73,7%)	rt211, rt212, rt213, rt214, rt215, rt217, rt218, rt219, rt220, rt221, rt222, rt225, rt226, rt229
D (aa 230 a 241)	12	6 (50%)	rt231, rt233, rt234, rt235, rt237, rt238, rt241
E (aa 247 a 257)	11	5 (45,5%)	rt248, rt250, rt253, rt256, rt257

Entre as posições que apresentaram mutações, 22 são aquelas onde já foi descrito a ocorrência de mutações relacionadas com resistência aos AN. Dessas, 6 correspondem aquelas onde ocorrem mutações que conferem resistência (rt181, rt184, rt202, rt204 e rt250) ou redução de suscetibilidade (rt194) aos análogos nucleos(t)ídeos lamivudina, adefovir, entecavir e tenofovir; 5 são posições onde ocorrem mutações compensatórias (rt80, rt173, rt180, rt207 e rt229) e 11 são posições onde foram identificadas mutações potencialmente relacionadas com resistência ao adefovir (rt84, rt85, rt214, rt215, rt217, rt218, rt233, rt237, rt238, rt248) ou ao entecavir (rt219). As mutações encontradas nessas 22 posições, assim como a frequência das mesmas na amostra como um todo e em cada genótipo/subgenótipo identificado, estão relacionadas no quadro 4.

As mutações observadas nas demais 35 posições e a frequência das mesmas estão descritas no quadro 5. É interessante observar que em algumas posições dentro das regiões analisadas a presença de um determinado aminoácido representa uma mutação para um genótipo/subgenótipo específico e para outro representa uma característica comum, um padrão. Isso foi observado em 12 das 56 posições com mutações: rt91, rt163, rt164, rt207, rt217, rt221, rt231, rt235, rt237, rt238, rt248 e rt256 (Quadros 4 e 5).

Quadro 4 - Mutações relacionadas com resistência aos análogos nucleos(t)ídeos encontradas na região com função de transcriptase reversa da polimerase de cepas do HBV isoladas de 702 pacientes virgens de tratamento

Região RT	Posição	HBV/A1 (N=447)	HBV/A2 (N=23)	HBV/A3 (N=1)	HBV/B1 (N=1)	HBV/B2 (N=1)	HBV/C2 (N=6)	HBV/D1 (N=6)	HBV/D2 (N=32)	HBV/D3 (N=102)	HBV/D4 (N=36)	HBV/D (N=5)	HBV/E (N=4)	HBV/F2a (N=32)	HBV/F4 (N=3)	HBV/G (N=3)	Total (702)
Domínio A (aa 75 - 91)	80	L	L	L	L	L	L	L	L I 3.1	L	L	L	L	L	L	L	L I 0.1
	84	V I 0.2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V I 0.1
	85	S A 0.4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S A 0.3
Domínio B (aa 163 - 189)	173	V	V L 8.7	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V L 0.3
	180	L M 0.2	L M 4.3	L	L	L	L	L	L	L M 2.0	L	L	L	L M 3.1	L	L	L M 0.7
	181	A T 0.2	A	A	A	A	A	A	A	A S 1.0	A	A	A	A	A	A	A T 0.1 S 0.1
	184	T S 0.2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T S 0.1
Interdomínio B - C (aa 190 - 199)	194	A T 0.2 V 0.2 S 0.2 G 0.2	A	A	A	A	A	A	A	A M 1.0	A	A	A	A T 3.1	A	A	A T 0.3 V 0.1 S 0.1 G 0.1 M 0.1
Domínio C (aa 200 - 210)	202	S	S	S	S	S	S	S	S	S G 2.0	S	S	S	S	S	S	S G 0.3
	204	M V 0.2	M	M	M	M	M	M	M I 3.1	M V 2.0	M	M	M	M I 3.1	M	M	M V 0.4 I 0.3
	207	V M 0.9 L 0.2 I 0.4	V	V	V	V	V	V	V	V L 1.0	V	V	V	L	L V 33.3	V	V L 0.6 M 0.3 I 0.3
Interdomínio C-D (aa 211 - 229)	214	V A 0.9 E 0.9 G 0.2	V	V	V	V	V	V E 16.7	V	V A 3.9 E 1.0 G 1.0	V	V	V	V	V	V	V A 1.1 E 0.9 G 0.3
	215	Q H 0.4	Q	Q	Q	Q	Q	Q H 16.7	Q H 9.4 S 8.4 P 6.3	Q H 10.8 S 6.9 P 2.0	Q S 5.6	Q H 20.0	Q	Q S 3.1	Q	Q	Q H 2.6 S 1.9 P 0.6
	217	L R 0.4	R	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L R
	218	E D 0.7	E	E	E	E	E	E	E D 3.1	E	E	E	E	E	E	E	E D 0.6
	219	S A 1.6 T 0.2	S A 13	S	S	S	S	S	S A 6.3	S A 2.0	S	S A 20.0	S	S A 3.1	S	S	S A 2.3 T 0.1
	229	L M 0.7 V 0.4 V/D 0.2	L	L	L	L	L	L M 16.7	L	L M 2.0	L M 2.8	L	L	L V 3.1	L	L	L M 1.0 V 0.4 V/D 0.1
Domínio D (aa 230 - 241)	233	I V 0.2	I	I	I	I	I	I V 16.7	I V 9.4	I V 2.9	I L 2.8	I V 60.0	I	I	I	I	I V 1.6 L 0.1
	237	P	P	P	P	P	P	P	P	P T 1.0	P	P	P	I A 3.1	I	P	P T 3.1 A 3.1
	238	N H 1.6 T 0.9 D 0.4 S 0.2	N	N	H	H	N	N H 33.3 T 16.7 D 16.7	N D 3.1 H 3.1	N H 3.9 D 2.0 T 2.0 A 1.0	N	N E 20.0	N	S D 33.3	N	N H 1.0 S 0.1 A 0.1 E 0.1 D 0.1	
Domínio E (aa 247 - 257)	248	N H 0.9	N	N	N	N	N	H	H	N H 2.0	N	N H 20.0	N	H Q 15.6	H	N	N H 0.7 Q 0.1
	250	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M I 3.1	M	M	M I 0.1

Legenda na página seguinte

Legenda quadro 4 - A primeira coluna indica a região da RT analisada; a coluna 2 indica a posição onde a mutação foi encontrada; nas colunas 3 a 17 são mostrados os aminoácidos encontrados em cada posição de acordo com o genótipo/subgenótipo, e em caso de ocorrência de mutação a frequência (número sobrescrito) da mesma. Na coluna 18 são apresentados os aminoácidos encontrados em cada posição e a frequência (número sobrescrito) de cada mutação encontrada nas diferentes posições na amostra como um todo.

Nas diferentes posições o aminoácido consenso entre as amostras do mesmo genótipo/subgenótipo está destacado em **negrito** na primeira linha de cada posição; as mutações, assim como suas frequências estão relacionadas abaixo e coloridas de acordo com tipo de mutação que representam: mutações de resistência total ou parcial (**vermelho**); mutações compensatórias (**verde**); mutações potencialmente relacionadas com resistência ao adefovir ou entecavir (rtS219A) (**azul**); novos padrões de mutações não relacionadas a resistência que foram observadas em posições nas quais ocorrem mutações relacionadas a resistência (preto sem negrito).

Quadro 5 - Mutações não associadas com resistência aos análogos nucleos(t)ídeos encontradas na região com função de transcriptase reversa da polimerase de cepas do HBV isoladas de 702 pacientes virgens de tratamento

Região RT	Posição	HBV/A1 (N=447)	HBV/A2 (N=23)	HBV/A3 (N=1)	HBV/B1 (N=1)	HBV/B2 (N=1)	HBV/C2 (N=6)	HBV/D1 (N=6)	HBV/D2 (N=32)	HBV/D3 (N=102)	HBV/D4 (N=36)	HBV/D (N=5)	HBV/E (N=4)	HBV/F2a (N=32)	HBV/F4 (N=3)	HBV/G (N=3)	Total (N=702)
Domínio A (aa 75 - 91)	76	N D 1,8	N	N	N	N	N	N D 16,7	N D 3,1	N D 7,8	N	N D 20,0	N	N	N	N	N D 2,7
	78	S	S	S	S	S	S	S	S T 3,1	S	S Y 2,8	S	S	S T 6,3	S	S	S T 0,4 Y 0,1
	79	W V 0,2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W V 0,1
	88	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F Y 2,8	F	F	F	F	F	F Y 0,1
	91	I	I	I	L	I	I	L I 16,7	L I 15,6	L I 23,5	L	L I 20,0	L	L	L	I	I L
Domínio B (aa 163 - 189)	163	I	V	I	I	I	I	I	I	I V 3,9	I V 8,3	I	I	I	I	I	I V
	164	L M 1,1	L	L	L	L	L	L M 16,7	L	L M 5,9	L M 8,3	L	M	L	L	L	L M
	175	L I 0,2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L I 0,1
	183	F L 0,7	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F L 0,4
	185	S G 0,2	S	S	S	S	S	S	S G 6,3	S G 1,0	S	S	S	S	S T 33,3	S	S G 0,6 T 0,1
	186	A S 0,4 T 0,2	A	A	A	A	A	A	A	A S 2,0	A	A	A	A	A	A	A S 0,6 T 0,1
	187	I L 1,8 V 0,7	I L 4,3	I	I	I	I	I L 16,7	I L 6,3	I L 2,9 V 2,9	I	I	I	I	I	I	I L 2,1 V 0,9
	188	C Y 0,2	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C Y 0,1
Interdomínio B - C (aa 190 - 199)	190	V	V	V	V	V	V	V	V	V M 1,0	V	V	V	V M 3,1	V	V	V M 0,3
	191	V I 0,7	V I 8,7	V	V	V	V	V	V	V	V	V I 25,0	V	V	V	V	V I 0,9
	197	H N 0,2	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H N 0,1
	199	L V 0,2	L	L	L	L	L	L	L V 3,1	L	L	L	L	L	L	L	L V 0,3
Domínio C (aa 200 - 210)	205	D N 0,2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D N 0,1
	209	L	L	L	L	L	L	L V 16,7	L	L	L	L	L	L	L	L	L V 0,1

A primeira coluna indica a região da RT analisada; a coluna 2 indica a posição onde a mutação foi encontrada; nas colunas 3 a 17 são mostrados os aminoácidos encontrados em cada posição de acordo com o genótipo/subgenótipo, e em caso de ocorrência de mutação a frequência (número sobrescrito) da mesma. Na coluna 18 são apresentados os aminoácidos encontrados em cada posição e a frequência (número sobrescrito) de cada mutação encontrada nas diferentes posições na amostra como um todo.

Nas diferentes posições o aminoácido consenso entre as amostras do mesmo genótipo/subgenótipo está destacado em **negrito** na primeira linha de cada posição; as mutações, assim como suas frequências estão relacionadas abaixo (preto sem negrito).

Quadro 5 – Continuação

Região RT	Posição	HBV/A1	HBV/A2	HBV/A3	HBV/B1	HBV/B2	HBV/C2	HBV/D1	HBV/D2	HBV/D3	HBV/D4	HBV/D	HBV/E	HBV/F2a	HBV/F4	HBV/G	Total
Interdomínio C-D (aa 211 - 229)	211	A T 0,4	A	A	A	A	A	A T 16,7	A T 6,3	A T 2,0	A	A	A	A	A	A	A T 1,0
	212	K R 1,1	K	K	K	K	K	K	K	K N 2,9	K	K	K	K	K	K	K R 0,7 N 0,4
	213	S T 0,9	S T 4,3	S	S	S	S	S T 16,7	S T 6,3	S T 1,0	S T 5,6	S	S T 25,0	S	S	S	S T 1,7
	220	L I 0,4	L	L	I	L	L	L	L	L I 1,0	L	L	L	L	L	L	L I 0,6
	221	Y F 0,7 C 0,2	Y	Y	Y	Y	F	F Y 16,7	F Y 6,3	F Y 5,9 S 1,0	F Y 2,8	F Y 20,0	Y	Y	Y	Y	F Y 0,1 S 0,1 C 0,1
	222	T A 0,2 S 0,2	T	T	A	T	T	T	T S 3,1	T S 1,0	T	T	T	T	T	T	T A 0,4 S 0,4
	225	T S 0,2	T A 4,3	T	T	T	T	T I 16,7	T	T S 2,0	T	T	T	T	T	T	T S 0,4 I 0,1 A 0,1
	226	N T 0,4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N T 0,3
Domínio D (aa 230 - 241)	231	L	L	L	L	L	L	L V 16,7	L	L	L	L	L	V	V	L	L V
	234	H Q 0,7	H	H	H	H	H	H	H	H N 1,0	H	H	H	H	H	H	H Q 0,4 N 0,1
	235	L	L	L	L	L	L	L I 16,7	L	L I 2,9	L	L	L	L	L	L	L I 0,6
	241	K Q 0,4 R 0,2	K	K	K	K	K	K	K	K R 2,0	K	K	K	K	K	K	K R 0,4 Q 0,3
Domínio E (aa 247 - 257)	253	V I 12,8 A 0,4 T 0,4	I	I	V	V	V E 16,7	V	V S 3,1	V I 1,0	V	V	V	V	V	V I 33,3	V I 0,3 A 0,3 T 1,1 E 0,1 S 0,1
	256	S	S	S	S	S	S C 16,7	C S 16,7 G 16,7	C S 3,1	C S 10,8 G 3,9	C S 5,6 G 2,8	C S 20,0	S	S	S	S	S C 0,9 G 0,9
	257	W	W	W	W	W	W	Y	Y H 3,1 F 3,1 Q 3,1	Y H 9,8	W	Y F 20,0	W	W	W	W	W Y 1,6 H 0,3 F 0,1 Q 0,1

Cepas do HBV com mutações de resistência foram identificadas em 1,6% (11/702) das amostras analisadas, sendo que algumas também apresentaram mutações compensatórias. Cinco pacientes apresentaram cepas com mutações de resistência à lamivudina (rtM204V/I), sendo que em dois a mutação rtS202G estava associada constituindo o padrão responsável pela resistência ao entecavir. Em dois outros pacientes encontrou-se cepas com a mutação rtA181S/T, que confere resistência à lamivudina e ao adefovir, além de promover a redução da sensibilidade ao tenofovir.

Dois pacientes estavam infectados por cepas com mutações (rtT184S ou rtM250I), que contribuem para a resistência ao tenofovir quando associadas com mutações na posição 204, entretanto nesses dois casos essa associação não foi observada.

Cepas com a mutação rtA194T, que tem sido relatada como responsável pela redução da sensibilidade ao tenofovir, foram observadas em dois pacientes. Na tabela 4 estão relacionadas informações sobre subgenótipo, carga viral, perfil sorológico HBeAg/anti-HBe, padrão de mutações e perfil de resistência aos diferentes AN das 11 amostras com mutações de resistência. Além disso, também foram mapeadas as alterações geradas no HBsAg em decorrência dessas mutações na polimerase.

Em 19 pacientes (2,7%; 19/702) foram identificadas cepas do HBV com mutações compensatórias (rtL80I, rtV173L, rtL180M, rtV207I, rtL229V/M), sendo que em apenas 6 casos a presença de mutações de resistência estava associada (Tabela 4). Dessas a mutação na posição rt229 (rtL229V/M) foi a mais frequente seguida pela mutação rtL180M (Quadro 4).

Em 7,7% (54/702) das amostras analisadas foram identificadas cepas com mutações que tem sido potencialmente associadas com resistência ao adefovir (rtS85A, rtV214A, rtQ215S, rtL217R, rtI233V, rtN238T, rtN238D e rtN248H), sendo que a mais frequente foi a rtQ215S (13/54), seguida pela rtI233V (11/54). A presença de uma Arginina (R) na posição 217 não foi considerada uma mutação no caso das amostras pertencente ao subgenótipo A2, uma vez que é um padrão desse subgenótipo (Quadro 4). Cepas com a

mutação rtS219A, que é potencialmente associada com resistência ao entecavir, foram encontradas em 2,3% (16/702) das amostras. O quadro 4 relaciona a frequência de cada uma das mutações potencialmente associadas com resistência que foram identificadas neste estudo.

Em 7,3% (51/702) das amostras foram identificadas cepas do HBV com outros padrões de mutações em 11 diferentes posições da RT onde ocorrem mutações associadas ou potencialmente associadas a redução da resposta à terapia com AN: rt84, rt181, rt194, rt214, rt215, rt218, rt219, rt233, rt237, rt238, rt248. As mutações observadas, assim como a frequência de cada uma, estão apresentadas no quadro 4.

Tabela 4 – Carga Viral, subgenótipo, perfil sorológico HBeAg/anti-HBe, padrão de mutações na polimerase/HBsAg e perfil de resistência das amostras com mutações de resistência aos análogos núcleos(t)ídeos identificadas neste estudo

Amostras	Carga viral (log ₁₀ UI/ml)	Subgenótipo	Padrão de mutações na região RT da polimerase	Alterações correspondentes no HBsAg	HBeAg/ anti-HBe	Perfil de resistência			
						LAM	ADV	ETV	TDF
MA_8052	2.3	D3	rtL180M + rtS202G + rtM204V	sI195M	Neg/Pos	R	S	R	S
MA_8075	2.3	D3	rtL180M + rtS202G + rtM204V	sI195M	Neg/Pos	R	S	R	S
MA_8130	2.7	A1	rtA194T	Não altera o HBsAg	Neg/Pos	I	S	S	I
MG_206	4.2	F2a	rtL180M + rtM204I	sW196S	Pos/Neg	R	S	I	S
PA_16726	3.9	F2a	rtM250I	após o final do gene S	Neg/Pos	S	S	S	S
PA_16727	ND	A1	rtL180M + rtM204V + rtV207I	sI195M + sM198I + sW199L	Neg/Pos	R	S	I	S
PA_17071	6.0	A1	rtA181T + rtD205N	sW172STOP + sW196*	Neg/Pos	R	R	S	I
RP_54	2.2	D3	rtA181S	sW172F	Neg/Pos	R	R	S	I
SP_125	8.3	D2	rtL80I + rtM204I	sW196L	Pos/Neg	R	S	I	S
SP_15	2.7	F2a	rtA194T	Não altera o HBsAg	Neg/Pos	I	S	S	I
SP_81	3.3	A1	rtT184S	sL176V	Neg/Pos	S	S	S	S

Síglas: S= sensível; R= resistente, I= intermediário; ND= não determinado; * = códon de parada; LAM= lamivudina; ADV= adefovir; ETV= entecavir; TDF= tenofovir

4.7 - Pesquisa de mutações no HBsAg

Neste estudo a frequência de mutações (substituição de aminoácido, códon de parada prematura, deleções ou inserções) em todas as regiões do HBsAg foi investigada, contudo o principal foco foi a região MHR onde ocorrem mutações que foram previamente associadas a alterações na proteína que reduzem a afinidade da mesma com o anti-HBs promovendo o escape de sua ação neutralizante. Além disso, foram mapeadas todas as alterações nessa região que não eram características específicas de subgenótipo.

Considerando os subgenótipos mais frequentes (A1, A2, D2, D3, D4 e F2a) na casuística estudada observou-se que mutações na região do determinante "a" foram significativamente ($<0,001$) mais frequentes nos subgenótipos D2, D3 e D4, o que também foi observado para os subgenótipos F2a e D2/D3 em relação à frequência de mutações na região N-terminal e C-terminal, respectivamente (Tabela 5). Embora não tenham sido incluídos nesta análise, os subgenótipos menos frequentes (A3, B1, B2, C2, D1, D?, E F4 e G) na casuística também apresentaram mutações nas diferentes regiões do HBsAg.

Tabela 5 – Frequência de mutações nas diferentes regiões do HBsAg de acordo com os subgenótipos do HBV mais frequentes na casuística estudada

Variável	Subgenótipo												Total		p
	A1		A2		D2		D3		D4		F2a				
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Mutações no gene S															0,504
Ausente	100	22,4	7	30,4	5	15,6	21	20,6	12	33,3	7	21,9	152	22,6	
Presente	347	77,6	16	69,6	27	84,4	81	79,4	24	66,7	25	78,1	520	77,4	
Mutações no MHR (aa 100 a 169)															0,089
Ausente	287	64,2	19	82,6	18	56,3	73	71,6	24	66,7	26	81,3	447	66,5	
Presente	160	35,8	4	17,4	14	43,8	29	28,4	12	33,3	6	18,8	225	33,5	
Mutações no determinante a (aa 124 - 147)															<0,001#
Ausente	412	92,2	20	87,0	25	78,1	80	78,4	25	69,4	29	90,6	591	87,9	
Presente	35	7,8	3	13,0	7	21,9	22	21,6	11	30,6	3	9,4	81	12,1	
Mutações MHR relacionadas com escape vacinal															0,319#
Ausente	415	92,8	19	82,6	30	93,8	92	90,2	30	83,3	29	90,6	615	91,5	
Presente	32	7,2	4	17,4	2	6,3	10	9,8	6	16,7	3	9,4	57	8,5	
Mutações região N terminal (aa 1 a 99)															0,024
Ausente	213	47,7	10	43,5	20	62,5	49	48,0	24	66,7	9	28,1	325	48,4	
Presente	234	52,3	13	56,5	12	37,5	53	52,0	12	33,3	23	71,9	347	51,6	
Mutações na região C-terminal (aa 170 a 226)															<0,001
Ausente	249	55,7	13	56,5	9	28,1	38	37,3	21	58,3	24	75,0	354	52,7	
Presente	198	44,3	10	43,5	23	71,9	64	62,7	15	41,7	8	25,0	318	47,3	

Resultado do teste qui-quadrado; # Resultado do teste da razão de verossimilhanças

Cepas do HBV com mutações dentro da principal região hidrofílica do HBsAg foram encontradas em 33,6% (236/702) das amostras analisadas. Na maioria dos casos (72,8%; 172/236) uma única mutação foi identificada, 17,4% (41/236) apresentaram 2 mutações, e 9,7% (23/236) apresentaram 3 ou mais mutações nessa região.

As mutações observadas ocorreram em 49 dos 70 resíduos de aminoácidos da região MHR, sendo que 18 desses estão localizados dentro da região do determinante "a" (Figura 13). A maioria (68%; 160/236) das cepas do HBV com mutações nessa região eram subgenótipo A1 e a mutação mais frequentemente observada entre esses casos foi na posição 100 do HBsAg (sY100C), a qual foi observada em 61,3% (98/160) das amostras HBV/A1 com mutações na MHR.

Em duas amostras foram identificadas cepas do HBV com deleções na região MHR: uma (HBV/A1) apresentava deleção de 8 aminoácidos entre as posições 113 – 122 e outra (HBV/D2) uma deleção de 9 aminoácidos entre as posições 108 – 118. Cepas do HBV com inserções nessa região foram encontradas em 4 amostras, as seguintes inserções foram identificadas: 4 ou 1 aa (TTTT/T) entre as posições 115-116 (2 HBV/A1); 4 aa (TTTS) entre as posições 117 – 118 (HBV/A1); e 3 aa entre as posições 116 – 117 (HBV/B2).

A figura 14 apresenta a frequência de mutações nas diferentes posições da região MHR.

A tabela 6 mostra a frequência de mutações na MHR de acordo com características demográficas (idade) dos pacientes, subgenótipo e variáveis laboratoriais (carga viral, perfil HBeAg). Não se observou associação entre presença de mutações nessa região e qualquer uma das variáveis avaliadas.

Figura 13 – Estrutura esquemática da principal região hidrofílica do HBsAg com as posições onde foram observadas mutações (destacadas em cor de rosa). Abaixo estão relacionadas as mutações encontradas em cada posição.

Figura 14 – Frequência de mutações nas diferentes posições da região MHR do HBsAg

Tabela 6 – Frequência de mutações na região MHR do HBsAg de acordo com característica demográficas (idade) dos pacientes, variáveis laboratoriais (carga viral e perfil HBeAg) e subgenótipo do HBV

Variável	Mutações no MHR (aa 100 a 169)				Total		
	Negativo		Positivo				
	n	%	n	%	n	%	
Idade (anos)							0,535**
média (DP)	44,7	(16,8)	45,6	(14,1)	45,0	(15,9)	
mediana (mín.; máx.)	42	(1; 88)	43	(13; 82)	43	(1; 88)	
Grupo de carga viral (UI/ml)							0,120
< 2000	176	38,3	95	40,3	271	38,9	
2000 a 20000	141	30,7	57	24,2	198	28,4	
> 20000 e ≤ 10000000	79	17,2	55	23,3	134	19,3	
> 10000000	64	13,9	29	12,3	93	13,4	
Subgenótipo							0,140
A1	287	61,6	160	67,8	447	63,7	0,0898
A2	19	4,1	4	1,7	23	3,3	
D2	18	3,9	14	5,9	32	4,6	
D3	73	15,7	29	12,3	102	14,5	
D4	24	5,2	12	5,1	36	5,1	
F2a	26	5,6	6	2,5	32	4,6	
Outros (A3, B1, B2, C2, D1, D2, E, F4, G)	19	4,1	11	4,7	30	4,3	
HBeAg							0,576
Negativo	380	84,6	190	83,0	570	84,1	
Positivo	69	15,4	39	17,0	108	15,9	

Resultado do teste qui-quadrado; ** Resultado do teste t-Student; & Resultado sem considerar a categoria "Outros"

4.7.1 - Mutações na região MHR relacionadas com alterações clinicamente significantes no HBsAg

Cinquenta e sete (8,5%) das 702 amostras analisadas apresentaram cepas do HBV com mutações na região MHR previamente relacionadas com alteração da antigenicidade do HBsAg e escape dos anticorpos anti-HBs ou com prejuízo na secreção do HBsAg, e consequentemente das partículas virais. Essas mutações foram observadas em 20 posições da região MHR do HBsAg (dentro e fora do determinante "a"), as quais estão relacionadas no quadro 6 juntamente com a frequência de acordo com o subgenótipo e a implicação clínica.

Quadro 6 - Mutações no HBsAg (MHR) que afetam a antigenicidade e secreção da proteína

Posição MHR	Aminoácido consenso (Genótipo ou subgenótipo)	Mutação	Número de amostras com mutações	Genótipo ou Subgenótipo	Implicação clínica
100	Y	Y100S	2	D3	Prejudica a secreção do HBsAg
101	Q	Q101H	5	A1 (4), D4 (1)	Falha na detecção do HBsAg
105	P L (C, F, H) T (C)	P105R	1	D3	Falha na detecção do HBsAg
118	T (A, B, C, D, E, F, G, H)	T118R	1	D3	Escape do anti-HBs (Vacinal e HBIg)
		V118A	2	D2	Escape do anti-HBs (HBIg)
119	G	G119R	4	A1	Prejudica a secreção do HBsAg e da partícula viral
		G119E	1	D3	Prejudica a secreção do HBsAg e da partícula viral
120	P	P120T	1	D2	Escape do anti-HBs (HBIg) e falha na detecção do HBsAg
		P120S	2	D3	Escape do anti-HBs (vacinal) e falha na detecção do HBsAg
122		K122N	1	A1	Falha na detecção do HBsAg
126	T (A, B, D, E, F, G, H)	T126I	1	D3	Escape do anti-HBs (vacinal) e falha na detecção do HBsAg
128	A (A, B, C, D, E, F, G, H) AV (D2)	A128T	1	A1	Falha na detecção do HBsAg
129		Q129H	1	A1	Escape do anti-HBs (vacinal e HBIg), Falha na detecção do HBsAg
		Q129R	1	D4	Escape do anti-HBs (vacinal), prejudica a secreção do HBsAg e da partícula viral
130	G	G130R	1	D3	Escape do anti-HBs (HBIg) e falha na detecção do HBsAg
		G130N	3	A1 (2), D3 (1)	Escape do anti-HBs (HBIg) e falha na detecção do HBsAg
133	M	M133T	12	A1 (7), D3 (3), D4 (2)	Escape do anti-HBs (vacinal) e falha na detecção do HBsAg
		M133L	3	A1 (1), A2 (1), D3 (1)	Escape do anti-HBs (Vacinal e HBIg)
		M133I	5	A1 (3), A2 (1), D3 (1)	Escape do anti-HBs (HBIg) e falha na detecção do HBsAg

Quadro 6 – Continuação

Posição MHR	Aminoácido consenso (Genótipo ou subgenótipo)	Mutação	Número de amostras com mutações	Genótipo ou Subgenótipo	Implicação clínica
134	F (A, B, C, E, F, H)	Y134N	4	D2 (1), D3 (1), D4 (2)	Falha na detecção do HBsAg
		F134L	4	A1	Falha na detecção do HBsAg
		F134Y	1	A1	Escape do anti-HBs (HBIG)
136		S136P	1	A1	Prejudica a secreção do HBsAg e da partícula viral
140	T (A, B, C, D, G, H)	T140I	3	A1 (2), D4 (1)	Prejudica a secreção do HBsAg e da partícula viral
		S140T	3	F2a	Escape do anti-HBs (HBIG)
143	S (C, D, E, F, G, H)	S143L	1	D	Escape vacinal e falha na detecção do HBsAg
144	D	D144E	2	D3, E	Falha na detecção do HBsAg
		D144A	1	D4	Escape do anti-HBs (vacinal e HBIG), falha na detecção do HBsAg, prejudica a secreção do HBsAg e da partícula viral
		D144G	4	A1	Escape do anti-HBs (HBIG)
145	G	G145R	3	A1 (2), E (1)	Escape do anti-HBs (vacinal e HBIG), falha na detecção do HBsAg, prejudica a secreção do HBsAg e da partícula viral
		G145A	3	A1	Escape do anti-HBs (vacinal) e falha na detecção do HBsAg
164	E	E164D	2	A2	Falha na detecção do HBsAg
169	R	R169P	1	A1	Prejudica a secreção do HBsAg e da partícula viral

4.7.2- Alterações do códon de iniciação do HBsAg e presença de códons de parada prematura fora da região MHR

Cepas do HBV com mutações no códon de iniciação do HBsAg foram encontradas em 7 amostras (6 HBV/A1 e 1 HBV/A2). As seguintes substituições foram observadas: sM1K (n=1), sM1R (n=1), sM1T (n=3), sM1V (n=2).

Mutações que geram códons de parada dentro da região codificante do HBsAg foram identificadas dentro da região MHR, como já mostrado anteriormente, e também nas regiões do gene que codificam as porções C e N terminal da proteína.

Cepas do HBV com códons de parada nessas regiões foram encontradas em 4,7% (33/702) dos pacientes. Esses códons de parada (*) foram observados nas seguintes posições da proteína HBs: sS61* (n=1), sC69* (n=3), sL94* (1), sC138* (1), sW172* (n=1), sW182* (n=6), sW196* (n=1), sW201* (n=2), sL216* (n=16) e sY225* (n=1). Cepas HBV/A1 apresentaram mais frequentemente esse tipo de alteração (n=22: sS61*, sL94*, sW172*, sW182*, sW196*, sW201*, sL216*), mas elas também foram observadas em cepas dos genótipos/subgenótipos A2 (n=2: sW182*), D2 (n=1: sC69*), D3 (n=4: sC138*, sL216*, sY225*), E (n=1: sL216*) e F2a (n=2: sC69*).

4.7.3 - Pacientes com positividade simultânea para o HBsAg e anti-HBs: análise da sequência do HBsAg

A pesquisa do anti-HBs foi realizada em 596 das 702 amostras incluídas neste estudo e o padrão atípico com soropositividade simultânea para o HBsAg e anti-HBs foi encontrado em 8,7% (52/596) dos pacientes.

Considerou-se positividade para o anti-HBs quando os níveis desses anticorpos foram superiores a 10,0 mUI/ml. A concentração de anti-HBs nas amostras positivas variaram de 11,8 a >1000 mUI/mL (média de 155,3 mUI/mL).

Foi avaliado a associação entre a presença do anti-HBs com idade dos pacientes, variáveis laboratoriais (perfil HBeAg e carga viral) e características virológicas (subgenótipo e presença de mutações nas diferentes regiões do

HBsAg). Não foi observado associação entre as variáveis avaliadas e o perfil HBsAg/anti-HBs positivo, com exceção do subgenótipo viral. Os genótipos/subgenótipos A1, D3, F2a, D, D1 e C2 foram identificados nos casos com positividade simultânea, sendo que o HBV/A1 apresentou associação estatisticamente significante ($p=0,004$) com o perfil HBsAg/anti-HBs positivo (Tabela 7).

Tabela 7 – Comparação de idade, variáveis laboratoriais (carga viral e perfil HBeAg) e características virológicas (subgenótipo e mutações nas diferentes regiões do HBsAg) entre os grupos com e sem positividade simultânea para HBsAg e anti-HBs

Variável	Anti-HBs				Total		
	Negativo		Positivo				
	n	%	n	%	n	%	
Idade (anos)							0,535**
média (DP)	46,2	(16,1)	44,6	(13,3)	46,1	(15,9)	
mediana (mín.; máx.)	44	(13; 88)	43	(22; 77)	44	(13; 88)	
Subgenótipo							0,004#
A1	325	59,7	39	75,0	364	61,1	0,003&
A2	17	3,1	0	0,0	17	2,9	
D2	30	5,5	0	0,0	30	5,0	
D3	90	16,5	8	15,4	98	16,4	
D4	35	6,4	0	0,0	35	5,9	
F2a	25	4,6	1	1,9	26	4,4	
Outros (A3, B1, B2, C2, D1, D2, E, F4, G)	22	4,0	4	7,7	26	4,4	
HBeAg							0,741
Negativo	459	84,5	44	86,3	503	84,7	
Positivo	84	15,5	7	13,7	91	15,3	
Grupo de carga viral (UI/ml)							0,853
< 2000	217	39,9	22	42,3	239	40,1	
2000 a 20000	151	27,8	16	30,8	167	28,0	
> 20000 e ≤10000000	104	19,1	9	17,3	113	19,0	
> 10000000	72	13,2	5	9,6	77	12,9	
Mutações no gene S							0,270
Ausente	111	20,4	14	26,9	125	21,0	
Presente	433	79,6	38	73,1	471	79,0	
Mutações no MHR (aa 100 a 169)							0,631
Ausente	348	64,0	35	67,3	383	64,3	
Presente	196	36,0	17	32,7	213	35,7	
Mutações no determinante a (aa 124 - 147)							0,895
Ausente	464	85,3	44	84,6	508	85,2	
Presente	80	14,7	8	15,4	88	14,8	
Mutações MHR relacionadas com escape vacinal							0,616*
Ausente	494	90,8	46	88,5	540	90,6	
Presente	50	9,2	6	11,5	56	9,4	
Mutações região N terminal (aa 1 a 99)							0,782
Ausente	262	48,2	24	46,2	286	48,0	
Presente	282	51,8	28	53,8	310	52,0	
Mutações na região C-terminal (aa 170 a 226)							0,511
Ausente	277	50,9	24	46,2	301	50,5	
Presente	267	49,1	28	53,8	295	49,5	

Resultado do teste qui-quadrado; ** Resultado do teste t-Student; # Resultado do teste da razão de verossimilhanças;

* Resultado do teste exato de Fisher; & Resultado sem considerar a categoria "Outros"

4.8 - Associação entre os subgenótipos do HBV e características demográficas dos pacientes (idade, sexo, cor, naturalidade e procedência)

Foram incluídos nesta análise apenas os pacientes infectados com o subgenótipos encontrados com maior frequência na população estudada (A1, A2, D2, D3, D4 e F2a) e dos quais havia informações disponíveis.

Para todas as características avaliadas observamos diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes subgenótipos, exceção apenas do sexo (Tabela 8). Em relação à idade entre os portadores dos subgenótipos D2 e D3 a média de idade foi superior àquela observada entre os portadores dos demais subgenótipos (57,3 - 61,2 vs 38,3 - 44,3). Quanto à cor da pele observou-se uma predominância dos subgenótipos D2 e D3 entre brancos e D4 entre pardos.

Em relação à naturalidade vale a pena ressaltar que os dados avaliados são referentes apenas aos pacientes procedentes de Minas Gerais, Ribeirão Preto e Rio Grande do Sul. Nesses casos observou-se que os pacientes infectados com o subgenótipo A1 eram naturais principalmente do Sudeste (76,5%) e aqueles infectados pelos subgenótipos D2 e D3 eram em sua maioria, 77,8 e 71,9% respectivamente, naturais da região Sul do país. Entre os portadores de A2 e F2a a maioria era natural do Sudeste e Sul do país e entre os casos infectados com D4, 66,7% era natural do Sudeste.

Quanto à procedência os casos com subgenótipo A1 foram procedentes principalmente da região Sudeste (58,8%), Nordeste (20,8%) e Norte (17,7%). Os casos A2 em sua maioria eram procedentes do Sudeste (47,8%) e nenhum caso era procedente do Nordeste. Os portadores dos subgenótipos D2 e D3 eram principalmente procedentes da região Sul do país, seguido pela região Sudeste. Já os casos portadores de subgenótipo D4 eram procedentes principalmente do Nordeste. Por fim entre os portadores de F2a a maioria era procedente do Sudeste (53,1%), seguido pelo Norte (21,9%) e Nordeste (18,8%).

Tabela 8 – Associação entre os subgenótipos do HBV, características demográficas dos pacientes (idade, sexo, cor, naturalidade e procedência) e perfil sorológico do HBeAg

Variável	Subgenótipo												Total	p	
	A1		A2		D2		D3		D4		F2a				
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
Idade (anos)															<0,001**
média (DP)	42,2 (13,5)		44,3 (21,2)		61,2 (14,5)		57,3 (17,2)		38,3 (13,9)		41,2 (18,3)		44,9 (16,0)		
mediana (mín.; máx.)	41 (14; 82)		42 (1; 82)		59 (31; 80)		59,5 (22; 88)		39,5 (13; 78)		38 (19; 77)		43 (1; 88)		
Sexo															0,485
Masculino	228	55,3	11	52,4	14	45,2	51	51,0	14	40,0	14	48,3	332	52,9	
Feminino	184	44,7	10	47,6	17	54,8	49	49,0	21	60,0	15	51,7	296	47,1	
Cor da pele															<0,001#
Branco	79	30,2	7	46,7	16	88,9	55	88,7	4	12,5	6	42,9	167	41,4	
Pardo	120	45,8	5	33,3	0	0,0	5	8,1	24	75,0	6	42,9	160	39,7	
Negro	61	23,3	3	20,0	2	11,1	2	3,2	4	12,5	2	14,3	74	18,4	
Amarelo	2	0,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,5	
Naturalidade (Região Brasileira)															<0,001#
Norte	6	3,1	0	0,0	0	0,0	1	1,8	0	0,0	0	0,0	7	2,4	
Nordeste	21	10,7	3	20,0	0	0,0	0	0,0	1	33,3	1	12,5	26	8,8	
Centro-Oeste	4	2,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	12,5	5	1,7	
Sudeste	150	76,5	7	46,7	4	22,2	15	26,3	2	66,7	4	50,0	182	61,3	
Sul	14	7,1	5	33,3	14	77,8	41	71,9	0	0,0	2	25,0	76	25,6	
Outros países	1	0,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,3	
Procedência (Região Brasileira)															<0,001#
Norte	79	17,7	8	34,8	0	0,0	5	4,9	1	2,8	7	21,9	100	14,9	
Nordeste	93	20,8	0	0,0	1	3,1	3	2,9	29	80,6	6	18,8	132	19,6	
Sudeste	263	58,8	11	47,8	14	43,8	38	37,3	6	16,7	17	53,1	349	51,9	
Sul	12	2,7	4	17,4	17	53,1	56	54,9	0	0,0	2	6,3	91	13,5	
HBeAg															0,006#
Negativo	364	85,0	13	59,1	25	80,6	93	92,1	27	75,0	24	80,0	546	84,3	
Positivo	64	15,0	9	40,9	6	19,4	8	7,9	9	25,0	6	20,0	102	15,7	

Resultado do teste qui-quadrado; # Resultado do teste da razão de verossimilhanças; ** Resultado da ANOVA

4.9 - Associação entre os subgenótipos do HBV, perfil sorológico do HBeAg, e mutações na região do promotor basal do core (BCP) e genes pré-core/core

O perfil sorológico HBeAg negativo foi o mais frequente (84,1%; 570/678) na casuística estudada independente do subgenótipo .

Entre os subgenótipos mais prevalentes esse perfil foi mais frequente entre os portadores dos subgenótipos A1 (85%), D2 (80,6%), D3 (92,1%) e F2a (80%). A positividade para o HBeAg foi observada em maior proporção entre os pacientes infectados pelos subgenótipos A2 (40,9%) e D4 (25%) ($p=0,006$) (Tabela 8).

Todas as amostras ($n=702$) nas quais foi possível realizar a identificação do genótipo/subgenótipo do HBV foram submetidas à caracterização do gene pré-core/core, que foi sequenciado com sucesso em 542 amostras. As sequências obtidas foram submetidas à análise para caracterização de alterações de nucleotídeos em posições específicas (1653, 1753, 1762, 1764, 1766, 1768, 1809-1812, 1814-1816, 1858, 1862, 1888, 1899) e foram feitas análises estatísticas para avaliar a correlação entre o subgenótipo do HBV e a presença de mutações nessas posições, para isso apenas as amostras dos subgenótipos mais frequentes na casuística (A1, A2, D2, D3, D4 e F2a) foram incluídas.

Os resultados dessa análise serão descritos a seguir.

Posições 1653 e 1753

Neste estudo a mutação C1653T não foi encontrada em nenhuma das amostras analisadas. Alterações na posição 1753 foram encontradas em todas as amostras, com exceção das HBV/A2, sendo mais frequente nas cepas do HBV subgenótipo F2a (31,8%), seguido pelo HBV/D2 (28,6%) ($p=0,044$) (Tabela 9).

Posições 1762/1764

No presente estudo a dupla mutação A1762T/G1764A foi identificada em todos os subgenótipos com frequências que variaram de 17,6% a 72,7%. A presença dessa dupla mutação foi significativamente mais frequente no subgenótipo e F2a (72,7%) seguido pelo A1 (48%) ($p<0,001$) (Tabela 9).

Posição 1766

A frequência dessa mutação isoladamente entre os diferentes subgenótipos caracterizados aqui variou de 0% a 22,7% e foi mais frequente entre nas cepas HBV/F2a (22,7%) e A1 (19,9%) ($p<0,001$). Já a frequência dessa mutação associada à dupla mutação A1762T/G1764A foi menor, variou de 0% no HBV/D2 a 13,6% no F2a, contudo sem significância estatística (Tabela 9).

Posição 1768

Essa mutação foi encontrada com pouca frequência na casuística avaliada e ocorreu apenas nas amostras pertencentes aos subgenótipos A1, D3, D4 e F2a, sendo significativamente mais frequente entre os subgenótipo A1 (15%) e F2a (13,6%) ($p<0,001$) (Tabela 9).

Posições 1809-1812

A presença de mutações nessa região apresentou associação significativa com subgenótipo A1 ($p<0,001$), sendo encontradas em 97,9% (334/341) dos casos. Entre esses 30,2% (101/334) apresentaram a tripla mutação nas posições 1809, 1811 e 1812 e 61,7% (206/334) a dupla mutação nas posições 1809 e 1812.

Entre os demais subgenótipos a frequência variou de 3,6% no HBV/D2 a 22,7% entre os casos F2a (Tabela 9).

Posições 1814-1816

Alterações em uma dessas três posições foram identificadas em 14,8% das amostras, incluindo todos os subgenótipos analisados. A presença dessa mutação foi mais frequente no subgenótipo A1 (17%) e menos frequente no D4 (3,6%), mas não apresentou associação significativa com qualquer subgenótipo (Tabela 9).

Posição 1862

Entre as amostras analisadas neste trabalho foi observada a mutação G1862T, sendo significativamente associada com o subgenótipo A1 ($p < 0,001$) (Tabela 9).

Posição 1888

No presente estudo a presença da mutação G1888A apresentou associação significativa com o subgenótipo A1, sendo encontrada em 64,8% dos casos ($p < 0,001$). Nos demais subgenótipos avaliados essa mutação não foi observada entre os casos HBV/D2 e sua frequência variou de 7,1% no D4 a 13,6% no F2a (Tabela 9).

Posições 1858, 1896 e 1899

Neste estudo foi identificado que a presença de T na posição 1858 foi associada com os subgenótipos D2, D3 e D4, sendo ausente no F2a e pouco frequente entre os casos HBV/A1 (2,9%) e A2 (5,6%) ($p < 0,001$). Da mesma forma as mutações G1896A e/ou G1899A foram associadas com os subgenótipos D2, D3 e D4 ($p < 0,001$). A presença das duas mutações associadas (G1896A + G1899A) não foi observada nos casos não HBV/D (D2, D3 e D4), a G1896A foi observada apenas em algumas amostras A1 (1,2%) e a G1899A foi observada em todos os genótipos não HBV/D com frequências que variaram de 2,3% no HBV/A1 a 5,6% no HBV/A2 (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequência de mutações nas regiões pré-core/core nos subgenótipos mais frequentes na casuística estudada

Variável	Subgenótipo												Total	p	
	A1		A2		D2		D3		D4		F2a				
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
Mutação T1753V (C, A ou G)															0,044#
Ausente	262	81,1	18	100,0	20	71,4	63	82,9	22	78,6	15	68,2	400	80,8	
Presente	61	18,9	0	0,0	8	28,6	13	17,1	6	21,4	7	31,8	95	19,2	
Mutação A1762T															<0,001
Ausente	163	50,5	15	83,3	21	75,0	54	72,0	21	77,8	5	22,7	279	56,6	
Presente	160	49,5	3	16,7	7	25,0	21	28,0	6	22,2	17	77,3	214	43,4	
Mutação G1764A															<0,001
Ausente	136	42,4	13	76,5	15	55,6	46	62,2	22	78,6	6	27,3	238	48,7	
Presente	185	57,6	4	23,5	12	44,4	28	37,8	6	21,4	16	72,7	251	51,3	
Mutação A1762T + G1764A															<0,001
Ausente	166	52,0	14	82,4	20	74,1	54	73,0	22	81,5	6	27,3	282	58,0	
Presente	153	48,0	3	17,6	7	25,9	20	27,0	5	18,5	16	72,7	204	42,0	
Mutação C1766T															<0,001#
Ausente	253	80,1	15	88,2	27	100,0	70	95,9	24	92,3	17	77,3	406	84,4	
Presente	63	19,9	2	11,8	0	0,0	3	4,1	2	7,7	5	22,7	75	15,6	
Mutação A1762T + G1764A + C1766T															0,173#
Ausente	298	95,2	16	94,1	27	100,0	72	98,6	24	96,0	19	86,4	456	95,6	
Presente	15	4,8	1	5,9	0	0,0	1	1,4	1	4,0	3	13,6	21	4,4	
Mutação T1768A															<0,001#
Ausente	238	85,0	17	100,0	28	100,0	75	98,7	27	96,4	19	86,4	404	89,6	
Presente	42	15,0	0	0,0	0	0,0	1	1,3	1	3,6	3	13,6	47	10,4	
Mutação 1809-1812															<0,001
Ausente	7	2,1	15	83,3	27	96,4	64	83,1	25	89,3	17	77,3	155	30,2	
Presente	334	97,9	3	16,7	1	3,6	13	16,9	3	10,7	5	22,7	359	69,8	
Mutação 1814-1816															0,204#
Ausente	284	83,0	17	94,4	25	89,3	67	87,0	27	96,4	19	86,4	439	85,2	
Presente	58	17,0	1	5,6	3	10,7	10	13,0	1	3,6	3	13,6	76	14,8	
Base na posição 1858															<0,001#
C	334	97,1	17	94,4	0	0,0	8	10,4	3	10,7	22	100,0	384	74,3	
T	10	2,9	1	5,6	28	100,0	69	89,6	25	89,3	0	0,0	133	25,7	
Mutação G1862T															<0,001
Ausente	5	1,5	15	83,3	28	100,0	72	93,5	25	89,3	19	86,4	164	31,7	
Presente	339	98,5	3	16,7	0	0,0	5	6,5	3	10,7	3	13,6	353	68,3	
Mutação G1888A															<0,001
Ausente	121	35,2	16	88,9	28	100,0	71	92,2	26	92,9	19	86,4	281	54,4	
Presente	223	64,8	2	11,1	0	0,0	6	7,8	2	7,1	3	13,6	236	45,6	
Mutação G1896A															<0,001#
Ausente	340	98,8	18	100,0	12	42,9	30	39,0	14	50,0	22	100,0	436	84,3	
Presente	4	1,2	0	0,0	16	57,1	47	61,0	14	50,0	0	0,0	81	15,7	
Mutação G1899A															<0,001#
Ausente	336	97,7	17	94,4	19	67,9	46	59,7	19	67,9	21	95,5	458	88,6	
Presente	8	2,3	1	5,6	9	32,1	31	40,3	9	32,1	1	4,5	59	11,4	
Mutação G1896 + G1899A															<0,001#
Ausente	344	100,0	18	100,0	20	71,4	53	68,8	21	75,0	22	100,0	478	92,5	
Presente	0	0,0	0	0,0	8	28,6	24	31,2	7	25,0	0	0,0	39	7,5	

Resultado do teste qui-quadrado; # Resultado do teste da razão de verossimilhanças

DISCUSSÃO

5 – Discussão

Diversidade genética do HBV nas regiões brasileiras estudadas

O presente estudo teve por objetivo principal avaliar a presença de cepas do HBV resistentes aos análogos nucleos(t)ídeos utilizados no tratamento da hepatite B crônica entre pacientes nunca submetidos a tratamento com esses medicamentos no Brasil. Para isso foram incluídas amostras de pacientes com HBC, virgens de tratamento com AN procedentes de sete diferentes estados brasileiros.

Na casuística estudada foi detectada uma ampla diversidade genética do HBV, quinze diferentes genótipos ou subgenótipos foram identificados. O subgenótipo A1 foi o mais frequente (63,7%), seguido pelo HBV/D3 (14,5%), os subgenótipos A2, D2, D4 e F2a foram observados em frequências que variaram de 3,3 a 5,1%, e todos os demais (A3, B1, B2, C2, D1 e D com subgenótipo não classificado, E, F4 e G) conjuntamente foram observados em 4,2% dos casos. Tais resultados estão de acordo com trabalhos publicados anteriormente acerca da distribuição dos genótipos e subgenótipos no Brasil e, portanto confirmam que a amostra incluída neste estudo é representativa das cepas do HBV circulantes no país (Alvarado-Mora et al., 2011b; Araujo et al., 2004; Bertolini et al., 2012; Bottecchia et al., 2008b; Carrilho et al., 2004; da Silva et al., 2010; Gomes-Gouvea et al., 2009; Hubschen et al., 2009; Mello et al., 2007; Mendes-Correa et al., 2010; Motta-Castro et al., 2008; Moura et al., 2013; Ribeiro et al., 2006; Santos et al., 2010; Sitnik et al., 2004; Sitnik et al., 2007; Tonetto et al., 2009; Viana et al., 2005; Victoria et al., 2008).

Além de ter confirmado os dados observados em estudos já publicados o presente trabalho mostrou a presença de subgenótipos não encontrados anteriormente como o A3, B1 e B2. O HBV/A3 só foi encontrado em um paciente angolano e não foi identificado anteriormente no Brasil. Este é um subgenótipo frequente na África, não está disseminado no Brasil e, assim como o genótipo E, é encontrado apenas em indivíduos procedentes do continente Africano (Kramvis and Kew, 2007a; Sitnik et al., 2007). Por outro

lado, o genótipo B já foi identificado no Brasil anteriormente em uns poucos indivíduos descendentes de orientais, contudo nesses casos não foi realizada uma análise que possibilitasse a caracterização do subgenótipo (Sitnik et al., 2004).

Apesar de haver alguns estudos já publicados acerca da distribuição dos subgenótipos do HBV no Brasil, o presente estudo trouxe diversas contribuições para esse campo do conhecimento pelas seguintes razões: a) realizou caracterização de cepas do HBV em regiões pouco estudadas anteriormente; b) caracterizou um número considerável de amostras da maioria das regiões estudadas; c) foi utilizada uma metodologia que permite a identificação de forma acurada dos subgenótipos do HBV, além de possibilitar o estudo das relações filogenéticas com sequências isoladas em diferentes regiões. Portanto, além de termos gerado novas informações, também contribuímos para sanar as deficiências e complementar informações geradas em alguns dos estudos anteriores que apresentavam determinadas limitações: a) caracterização de pequeno número de amostras (Alvarado-Mora et al., 2011b; Gomes-Gouvea et al., 2009); b) uso de técnicas de genotipagem baseadas em RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism" ou Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), não permitindo o estudo das relações filogenéticas entre as sequências com outras isoladas em diferentes regiões do país e do mundo (Araujo et al., 2004; Mello et al., 2007); c) caracterização de pequenas regiões genômicas, o que deixa o resultados das análises pouco precisos (Bertolini et al., 2012; Mello et al., 2007; Motta-Castro et al., 2008; Victoria et al., 2008); d) estudo de populações específicas (Quilombos) (Alvarado-Mora et al., 2011b; Motta-Castro et al., 2008).

Um achado particularmente interessante em relação á distribuição dos subgenótipos do HBV que encontramos neste estudo foi a elevada frequência do HBV/D4 no Maranhão, onde esse subgenótipo foi encontrado em 24% dos casos. Considerando a frequência desse subgenótipo entre os casos de genótipo D (33/119) encontrados no Maranhão, o HBV/D4 correspondeu a 88% (29/33) deles.

A introdução do genótipo D no Brasil tem sido relacionada com a imigração Europeia que ocorreu intensamente durante o período de 1872 a 1975 (Bertolini et al., 2012). Considerando os subgenótipos do genótipo D que circulam na Europa e as análises filogenéticas das sequências do HBV/D encontradas no Brasil, inclusive aquelas caracterizadas neste estudo, é possível afirmar que apenas a introdução dos subgenótipos D2 e D3 está relacionada a esse fato histórico (Schaefer, 2007). Este fato também é confirmado pelo histórico epidemiológico de diversos pacientes procedentes do Rio Grande do Sul incluídos neste estudo, que relataram serem descendentes de imigrantes europeus e terem contraído a infecção pelo HBV verticalmente.

Por outro lado o subgenótipo D4 presente no Brasil parece ter uma origem diferente. Os estudos realizados até o momento mostram que o subgenótipo D4 não está amplamente distribuído no mundo, foi encontrado em poucos casos na Austrália, Papua Nova Guiné (Norder et al., 2004), Ruanda (Hubschen et al., 2009) e Canadá (Osiowy et al., 2011). Mais recentemente um estudo realizado no Haiti mostrou que esse subgenótipo foi o mais frequente entre os casos de genótipo D, correspondendo a 80% (29/36) dos casos classificados como HBV/D (Andernach et al., 2009b). HBV/D4 também foi encontrado na Martinica, correspondendo a 57% (4/7) dos casos de genótipo D (Brichler et al., 2013).

É possível que a presença do HBV/D4 em regiões distintas da América Latina seja o reflexo da sua dispersão em decorrência das rotas de tráfico de escravos da África para o Brasil e Haiti. Tal hipótese é corroborada pela coinfeção de dois pacientes maranhenses infectados pelo HBV/D4 com o vírus da hepatite delta genótipo 8, o qual só foi encontrado até o momento em indivíduos de origem africana (Barros et al., 2011).

Embora não haja relatos de elevada frequência do HBV/D4 na África atualmente, pois há apenas a descrição de um caso em Ruanda, é possível que esse subgenótipo estivesse presente em diferentes regiões desse continente no passado. Recentemente, um recombinante deste subgenótipo (D6/D4) foi identificado no Sudão, que pode representar um remanescente da cepa D4

original (Yousif et al., 2013). Outro fato que sugere que esse subgenótipo circula há muito tempo, é sua presença entre populações nativas da Austrália e Papua Nova Guinéa (Norder et al., 2004) e em populações nativas canadenses (Inuit) (Osiowy et al., 2011).

O subgenótipo D4 parece não ser comum na maioria das regiões do Brasil já investigadas, pois nos estudos publicados anteriormente esse subgenótipo só foi encontrado em um caso no Amazonas (Gomes-Gouvea et al., 2009), um em Santa Catarina (Reis et al., 2011) e em Rondônia com frequência de 17,1% (6/35), o que correspondeu a 40% dos casos de genótipo D (15/35) encontrados nessa casuística (Santos et al., 2010).

No presente estudo, o subgenótipo D4 foi encontrado também em um pequeno número de pacientes não procedentes do Maranhão: 3 eram de São Paulo (Capital), 1 de Ribeirão Preto, 1 do Pará e 2 de Minas Gerais. As sequências D4 isoladas em São Paulo e Pará agruparam mais próximas das amostras procedentes do Maranhão, sugerindo a introdução do D4 nessas duas regiões por migrantes maranhenses, o que também foi claramente observado no caso da amostra isolada anteriormente no Amazonas (Gomes-Gouvea et al., 2009).

A amostra procedente de Ribeirão Preto agrupou junto com aquela isolada em Santa Catarina, sugerindo uma origem comum dessas cepas. As sequências isoladas em Rondônia também agruparam em um cluster monofilético separado das sequências do Maranhão evidenciando uma origem distinta. Embora essas sequências tenham apresentado um agrupamento característico, elas formaram um clado monofilético bem suportado de sequências brasileiras (valor de probabilidade posterior=1). O que não se observou no agrupamento das duas sequências D4 isoladas em Minas Gerais, que agruparam juntas fora do clado formado por todas as demais sequências D4 brasileiras, sugerindo uma origem distinta dessa cepa. Essas sequências foram isoladas de dois pacientes relacionados entre si (irmãos), um deles natural da Bahia, que relatam ter contraído a infecção no momento do nascimento. A mãe desses pacientes também era natural da Bahia, em Minas

Gerais, foi diagnosticada como portadora de cirrose e evoluiu para o óbito em decorrência das complicações.

É interessante observar que as topologias das árvores filogenéticas sugerem uma forte subdivisão geográfica das sequências HBV/D4, o que pode ser resultado da introdução de diferentes cepas de HBV/D4 em cada região, as quais evoluíram independentemente (efeito fundador). Em relação às sequências brasileiras, essa característica é muito clara nas sequências isoladas no Maranhão, Rondônia e Minas Gerais.

A comparação de algumas variáveis demográficas, laboratoriais e clínicas entre os pacientes procedentes do Maranhão portadores de HBV/A1 e D4 mostrou que entre os portadores de HBV/D4 a frequência de casos na fase de imunotolerância foi significativamente maior que a observada entre os portadores de HBV/A1 [7/29 (24%) vs. 3/80 (4%), $p=0,003$]. Considerando-se que não foi observada nenhuma diferença significativa em relação à média de idade dos portadores de HBV/A1 e D4 (42 ± 12 vs 38 ± 13 , $p=0,13$) e que a soroconversão do HBeAg para o anti-HBe é um evento que ocorre tardiamente nos casos HBV/D4, sugerimos que os portadores desse subgenótipo foram infectados verticalmente (Barros et al., 2014). Os casos de infecção pelo HBV/D4 encontrados em Minas Gerais reforçam essa hipótese, contudo estudos com um número maior de pacientes necessitam ser realizados para a confirmação desse achado.

Presença de cepas do HBV com mutações de resistência aos AN em pacientes virgens de tratamento

Como exposto anteriormente, o mecanismo de replicação do HBV promove a introdução de mutações no seu genoma, o que juntamente com a elevada taxa de replicação do vírus resulta na produção de uma população viral altamente heterogênea em um mesmo paciente. Os vírus que compõem essa população possuem genomas estreitamente relacionados, que podem diferir entre si apenas pela presença de uma única mutação, ao que

denominamos de quasispécies virais (Rodriguez-Frias et al., 2013; Zoulim and Locarnini, 2009).

Algumas das mutações introduzidas podem conferir vantagens adaptativas às cepas virais que as possuem diante de uma pressão seletiva específica, este é o caso das mutações de que conferem resistência aos AN (Rodriguez-Frias et al., 2013; Zoulim and Locarnini, 2009).

Cepas com essas mutações são geradas naturalmente durante o ciclo replicativo do vírus e em decorrência da sua capacidade replicativa reduzida em relação à cepa selvagem, geralmente constituem um pequeno percentual da população viral. Com a introdução da pressão seletiva exercida pelos AN essas cepas vão lentamente se expandindo, na maioria das vezes adquirindo mutações compensatórias que melhoram a sua capacidade replicativa e então se tornam a população viral dominante (Zoulim and Locarnini, 2009).

Com a seleção de cepas resistentes, os benefícios alcançados pela redução da carga viral após a introdução do AN logo são perdidos. Surge então a necessidade de manejo adequado do tratamento para prevenir a evolução da doença, o que inclui a caracterização da mutação envolvida na resistência e/ou o uso de um AN sem relação estrutural com o utilizado anteriormente, prevenindo dessa forma a ausência de resposta pela presença de mutações de resistência cruzada (EASL, 2012; Lok and McMahon, 2009; Zoulim and Locarnini, 2009).

Neste estudo foi realizada a caracterização da polimerase de cepas do HBV isoladas de pacientes nunca submetidos a tratamento com AN e para isso foi empregada a técnica de sequenciamento automatizado direto pela metodologia de Sanger, a qual permite identificar o nucleotídeo mais comum (acima de 20% do total) presente nos genomas da população viral. Com o sequenciamento direto se obtém uma sequência conhecida como sequência consenso, que representa o conjunto de nucleotídeos mais frequente nas diferentes posições dos diversos genomas analisados (Rodriguez-Frias et al., 2013).

Observamos que cepas do HBV com mutações na polimerase são frequentes entre pacientes virgens de tratamento com AN, uma vez que 39% (276/702) deles estavam infectados com cepas com pelo menos uma mutação nas regiões analisadas (RT – domínios A-E e interdomínios B-C/C-D). Por outro lado, a frequência de pacientes infectados com cepas portando mutações com impacto conhecido na resistência aos AN foi muito menor. Em apenas 1,6% (11/702) dos pacientes essas variantes foram detectadas, as quais apresentavam mutações de resistência (rtS202G, rtM204V/I, rtA194T, rtM250I, rtA181T/S, e rtT184S) associadas ou não a mutações compensatórias (rtL80I, rtV173L, rtL180M, e rtV207I).

O padrão de mutações observado em cepas do HBV isoladas de nove desses pacientes confere resistência total ou parcial à lamivudina, adefovir, entecavir ou adefovir (Tabela 4). Também foram encontrados vírus com as mutações relacionadas com resistência ao entecavir (rtT184S ou rtM250I) em dois pacientes, contudo essas mutações só desempenham papel na resistência quando associadas à mutação na posição rt204 (rtM204V/I), que não foi observada nesses casos. É possível que cepas do HBV com ambas as mutações (rtM204V/I+rtT184S ou rtM250I) estejam presentes na população viral desses pacientes em uma quantidade não detectada pela metodologia utilizada.

Além da baixa sensibilidade para detecção de mutações presentes em um pequeno número de variantes, outra limitação da metodologia de sequenciamento direto é sua incapacidade de análise de haplótipos, ou seja, prever a presença de mutações no mesmo genoma viral (Rodriguez-Frias et al., 2013). Portanto, é muito provável que as mutações que foram encontradas em associação no presente estudo realmente estejam presentes no mesmo genoma viral, mas não podemos ter certeza.

Estudos realizados em diferentes países utilizando a mesma metodologia que a nossa para a pesquisa de cepas do HBV com resistência em pacientes não tratados também encontraram essas variantes em um pequeno número de casos, com frequências variando de 0 a 4,5% (Quadro 4). Na África do Sul, um estudo avaliou a presença de cepas do HBV com

mutação de resistência à lamivudina na posição rt204 em pacientes ainda não previamente tratados com nenhum antiviral (mesmo com a presença de infecção conjunta pelo HIV em muitos deles). Neste estudo, foi observado que 20% dos pacientes monoinfectados e 50% dos coinfectados com HIV estavam infectados com essas variantes (Selabe et al., 2007). Esse resultado pode estar relacionado com características regionais da infecção (frequência de diferentes genótipos virais), dados epidemiológicos (frequência de transmissão sexual e outras vias não comuns em outras regiões), prevalência de AIDS (o que implica no uso mais frequente de drogas para tratamento do HIV, como a lamivudina) e manejo da doença (frequência do monitoramento da eficácia do tratamento para as duas infecções). É possível que a presença de cepas do HBV com mutações de resistência seja muito diferente em países com elevada prevalência de HIV, comparado com aqueles onde essa infecção é menos frequente. Um estudo realizado pelo nosso grupo comparou a frequência de cepas do HBV com mutações de resistência entre pacientes com HBC em tratamento com lamivudina sem e com coinfecção pelo HIV e encontrou que cepas resistentes são mais frequentes entre os pacientes coinfectados pelo HIV do que naqueles sem coinfecção (61,8% vs. 42,9%; $p=0,007$) (Mendes-Correa et al., dados não publicados).

Outros estudos têm sido realizados com o mesmo objetivo que o presente estudo, porém empregando outras técnicas moleculares que são montadas para a detecção de mutações específicas. Com o uso dessas técnicas alguns estudos encontraram frequências baixas (0 a 5,1%) similares àquelas descritas em quase todos os estudos que empregaram sequenciamento direto. Entretanto, quatro outros estudos detectaram a presença dessas cepas em 18,3% a 42,8% dos pacientes avaliados (Quadro 3). Tal divergência nos resultados pode de fato estar relacionada à maior frequência de cepas resistentes entre pacientes não tratados nessas regiões, mas também e principalmente à diferença na sensibilidade das técnicas utilizadas em relação à técnica de sequenciamento direto.

Dentre essas outras técnicas moleculares, a mais amplamente conhecida e empregada é a de hibridização reversa (INNO-LiPA, Innogenetics), uma vez que está disponível comercialmente. Essa metodologia é capaz de detectar mutações de resistência quando a cepa viral mutante constitui pelo menos 5% da população viral. Contudo, tem duas principais limitações: 1- necessidade de cargas virais mais altas ($> 4 \log_{10}$ cópias/ml) para manter a sua sensibilidade; 2- não permite a identificação de outras mutações que não aquelas pré-determinadas nas sondas utilizadas (Degertekin et al., 2009; Rodriguez-Frias et al., 2013).

Atualmente tem sido empregada uma nova tecnologia de sequenciamento no estudo da variabilidade de genomas virais denominada de sequenciamento de nova geração, a qual permite identificar genomas de cepas virais que compõem baixíssimos percentuais ($< 1\%$) da população viral. Além disso, essa metodologia é capaz de quantificar a proporção de cepas com mutação ou sem, e alguns equipamentos são capazes de identificar a ocorrência concomitante de mutações no mesmo genoma viral (Rodriguez-Frias et al., 2013).

Ainda são poucos os estudos realizados usando essa metodologia que avaliaram a presença de cepas com mutações de resistência em pacientes virgens de tratamento, além disso, o número de pacientes incluídos nesses estudos também é pequeno (4 a 45 casos) (Ko et al., 2012; Margeridon-Thermet et al., 2013; Nishijima et al., 2012; Rodriguez et al., 2013). Mas a maioria deles estudos relata a detecção de cepas resistentes nesses pacientes, contudo nunca constituindo um percentual considerável da população viral. A maioria das cepas resistentes encontradas constituía $< 1\%$ da população viral (Ko et al., 2012; Nishijima et al., 2012; Rodriguez et al., 2013).

A significância clínica dessa população minoritária de cepas do HBV com mutações de resistência permanece indefinida (Menzo et al., 2009; Rodriguez-Frias et al., 2013). Um estudo recente mostrou que após a falha virológica durante o tratamento com lamivudina as cepas com resistência detectadas não eram as mesmas detectadas antes do início da terapia,

sugerindo que o baixo percentual de variantes detectadas antes da introdução do tratamento com AN não determina necessariamente as variantes selecionadas responsáveis pela falha virológica (Rodriguez-Frias et al., 2013).

A detecção de cepas do HBV com mutações de resistência pelo método de sequenciamento direto indica que essas variantes constituem um percentual significativo ($> 20\%$) da população viral. Esse diagnóstico em pacientes nunca submetidos ao tratamento com AN pode ser resultado de seleção por outros mecanismos que não o tratamento (pressão imunológica exercida sobre o HBsAg que levou à seleção de cepas com mutações no gene S que resultaram em mutações na polimerase). Contudo, também pode ser o resultado de infecção com cepas resistentes contraída de um indivíduo sob tratamento com AN.

Um estudo realizado no Brasil que utilizou pirosequenciamento para caracterizar a população de HBV em pacientes submetidos a tratamento com AN (86,4% com LAM e 13,6% com LAM+ADV+TDF) mostrou que 76% desses pacientes apresentavam apenas cepas com mutações de resistência (Mello et al., 2012a), o que sugere que pacientes em tratamento podem ser fonte de infecção para indivíduos susceptíveis, transmitindo exclusivamente cepas resistentes. A capacidade de transmissão de HBV com mutações de resistência já foi demonstrada em um modelo de chimpanzé (Kamili et al., 2009) e também já foram relatados alguns casos de infecção aguda em humanos (Morando et al., 2013; Trevino et al., 2009; Xu et al., 2010).

Uma explicação para a baixa frequência de pacientes virgens de tratamento infectados por cepas resistentes é o baixo nível de persistência dessas variantes na ausência da pressão seletiva do AN. Margeridon-Thermet e colaboradores (2013) utilizando a metodologia de sequenciamento de nova geração avaliaram a persistência de cepas do HBV com mutações de resistência à lamivudina em pacientes que haviam descontinuado o tratamento e demonstraram que o nível de persistência é baixo e a probabilidade de detecção dessas variantes foi inversamente associada com o tempo após a descontinuação do tratamento. Contudo, os autores ressaltam que a reversão

da dominância da população viral resistente para a população de cepas selvagens é um processo lento, assim como também é o processo de emergência de cepas resistentes. Contudo, esse processo pode ser ainda mais lento quando a cepa resistente durante o período de terapia adquiriu mutações benéficas que melhoraram sua capacidade replicativa (Margeridon-Thermet et al., 2013).

A presença de cepas do HBV com mutações de resistência constituindo uma significativa proporção da população viral em pacientes virgens de tratamento poderá (dependendo do AN utilizado) comprometer a resposta ao tratamento quando houver necessidade de iniciá-lo. Embora a detecção desse evento seja rara é necessário ter em mente que ocorre e considerar essa hipótese em casos de não resposta primária ao tratamento com AN.

O monitoramento adequado do tratamento com AN pode prevenir a seleção de resistência viral e consequentemente a disseminação das mesmas, o que tem importância não apenas do ponto de vista clínico, mas também epidemiológico uma vez que alguns desses HBV resistentes também possuem capacidade de escapar da neutralização de anticorpos anti-HBs e potencialmente infectar indivíduos vacinados (Kamili et al., 2009; Kirkwood, 2006; Zoulim and Locarnini, 2009).

Neste estudo também encontramos em 7,7% (54/702) dos pacientes estudados cepas do HBV com mutações descritas como potencialmente associadas com resistência ao adefovir (rtS85A, rtV214A, rtQ215S, rtL217R, rtI233V, rtN238T, rtN238D, e rtN248H). Cepas com as mutações rtQ215S e rtI233V foram observadas mais frequentemente, em 1,9% e 1,6% dos pacientes, respectivamente. Outros estudos também observaram que a ocorrência de cepas do HBV com essas mutações entre indivíduos não tratados com AN não é algo incomum.

Alguns estudos tem sugerido que essas mutações representam apenas polimorfismos naturais comuns em alguns genótipos, sem importância no desenvolvimento de resistência ao adefovir. Por exemplo, a mutação rtL217R é característica do subgenótipo A2 e alterações nas posições rt215 e rt233

parecem ser mais comuns no genótipo D (Amini-Bavil-Olyaei et al., 2009a; Borroto-Esoda et al., 2007; Bottecchia et al., 2008a; De Maddalena et al., 2007). No presente estudo também observamos que alterações nessas posições e em outras associadas com resistência ao adefovir (rt214 e rt238) foram encontradas com maior frequência nas sequências genótipo D (Quadro 4), o que reforça a hipótese dessas mutações representarem apenas polimorfismos naturais sem importância clínica.

A associação dessas mutações com resistência ao adefovir pode estar relacionada ao fato desse medicamento ser um AN com menor potência, e ter sido amplamente utilizado na Europa e na América do Norte, onde a presença do genótipo D é muito frequente.

Outras mutações sem significado clínico conhecido foram observadas em posições (rt84, rt181, rt194, rt214, rt215, rt218, rt219, rt233, rt237, rt238, e rt248) onde ocorrem algumas das mutações que foram potencialmente associadas com resistência ao adefovir ou mutações que conferem resistência (Quadro 5). Cepas do HBV com alguma dessas mutações foram encontradas em 7,3% (51/702) dos pacientes.

O papel dessas mutações, assim como o daquelas potencialmente associadas com resistência ao adefovir, ainda precisa ser melhor definido considerando o pool genético das cepas virais, pois estudos tem mostrado que uma mutação individual, embora crucialmente fundamental, não é suficiente para explicar a variação de respostas à terapia antiviral com AN (Khudyakov, 2010). Da mesma forma, o papel da mutação rtS219A na resistência ao entecavir (Karatayli et al., 2012), a qual foi encontrada em cepas do HBV isoladas de 2,6% dos pacientes incluídos neste estudo, precisa ser mais claramente definido.

Os avanços das técnicas de sequenciamento de nova geração e das análises dos dados gerados possibilitarão lançar luz aos aspectos ainda obscuros da diversidade genética do HBV.

Este estudo gerou uma rica fonte de informação acerca das características da polimerase das cepas do HBV circulantes no Brasil entre

pacientes virgens de tratamento. Essas informações poderão ser úteis na avaliação dos protocolos de diretrizes terapêuticas utilizados em nosso país e na avaliação de novas mutações que possam ser encontradas, ajudando a definir se uma determinada mutação representa um polimorfismo comum a determinado genótipo circulante ou representa uma nova mutação potencialmente associada à resistência a determinado AN.

Variabilidade do HBsAg dos diferentes genótipos/subgenótipos do HBV circulantes nas regiões brasileiras estudadas: implicações clínicas e epidemiológicas

Neste estudo a variabilidade do HBsAg, especificamente da principal região hidrofílica (MHR), nas cepas do HBV circulantes no Brasil, foi avaliada com o objetivo de conhecer a frequência de indivíduos infectados com variantes que alberguem mutações que levam à redução ou perda da afinidade do HBsAg com o anti-HBs.

Mutações na região MHR foram detectadas em 33,6% (236/702) dos pacientes, sendo que na maioria dos isolados (72,8%;172/236) apenas uma mutação foi identificada. Isso sugere que embora o HBsAg esteja exposto à constante pressão imunológica, a necessidade de conservar a polimerase viral é um fator limitante para a ocorrência de mutações em determinadas regiões do gene S.

Interessante que dentre as mutações na MHR, a mais frequente foi a mudança de uma tirosina (Y) para cisteína (C) na posição 100 (sY100C), que foi observada apenas em amostras HBV/A1. Cepas do HBV/A1 com essa mutação foram detectadas em 22% (98/447) dos pacientes infectados com esse subgenótipo.

Essa mutação já foi encontrada anteriormente no Brasil em cepas HBV/A1 isoladas de casos com hepatite B oculta, o que inicialmente conduziu à hipótese da mesma representar uma mutação que reduz a afinidade HBsAg/anti-HBs (Motta-Castro et al., 2008). Posteriormente a investigação detalhada do papel dessa mutação na alteração da estrutura do HBsAg

demonstrou que ela, de forma isolada, não afeta a detecção e/ou a secreção do HBsAg (Mello et al., 2011).

Como não observamos a presença dessa mutação em sequências HBV/A1 obtidas em outros países, esta parece ser um polimorfismo característico de algumas cepas A1 circulantes no Brasil.

Cepas com mutações que conferem alteração na antigenicidade e escape aos anticorpos anti-HBs ou que prejudiquem a secreção do HBsAg foram detectadas em 8,5% (57/702) das amostras analisadas.

A emergência de vírus com mutações que alteram a antigenicidade do HBsAg é principalmente observada em casos nos quais foi introduzida pressão seletiva (por vacina ou imunoglobulina hiperimune). No entanto, a presença dessas cepas em pacientes com HBC tem sido detectada em diversos países com frequências que variam em torno de 10,8 a 12,5% (Alavian et al., 2013; Avellon and Echevarria, 2006). Essas mutações podem ter sido selecionadas pela resposta imune (anti-HBs) natural do hospedeiro e refletem o mecanismo de escape desenvolvido pelo vírus para evadir a detecção pelo sistema imune do hospedeiro.

A detecção do HBsAg com mutações que alteram a sua estrutura é possível quando os testes sorológicos são otimizados para detectar essas mutações (Alavian et al., 2013; Verheyen et al., 2012). Portanto, conhecer as variantes do HBsAg que circulam em uma determinada região é importante para se avaliar se os métodos de diagnóstico sorológicos utilizados estão adequados para esse fim.

Embora diversas das mutações encontradas neste estudo estejam associadas com falhas na detecção do HBsAg, esse antígeno foi detectado em todos os pacientes portadores dessas variantes. Esse resultado pode refletir a capacidade do teste sorológico utilizado para detecção do HBsAg com alterações ou é o resultado da presença de antígenos produzidos pela população de vírus selvagens, que possivelmente constituem um percentual considerável das quasispécies virais.

Variantes com mutações que reduzem a afinidade HBsAg/anti-HBs também representam um problema para a quantificação do HBsAg, que tem sido utilizado como um biomarcador do prognóstico e da resposta ao tratamento da HBC, uma vez que os níveis de HBsAg detectados podem representar apenas as proteínas que o kit tem capacidade de detectar. Isso conduzirá a interpretações errôneas e poderá levar a condutas incorretas na prática clínica.

Huang e colaboradores (2012) estudando três grupos de pacientes (hepatite B oculta, níveis de HBsAg ≤ 100 UI/ml e >100 UI/ml) observaram que a frequência de mutações na MHR estava negativamente correlacionada com os níveis de HBsAg no soro (Huang et al., 2012).

Um estudo recente comparou a capacidade de dois ensaios (Architect, Abbott e Elecsys, Roche) para quantificação de HBsAg com diferentes mutações que reduzem a afinidade com o anti-HBs e demonstrou que ambos puderam detectar os mutantes testados, mas houve discrepâncias significantes entre eles quanto à quantificação de HBsAg com determinadas mutações. Os autores sugerem que essas discrepâncias devem ser consideradas quando amostras de um mesmo paciente, colhidas em momentos diferentes, forem testadas com diferentes ensaios (Verheyen et al., 2012).

O impacto das mutações no HBsAg no diagnóstico da hepatite B pode ser contornado pela adequação dos testes utilizados e pelo uso de métodos de biologia molecular. Contudo, os efeitos adversos sobre a imunização direta ou indireta podem ser significantes, uma vez que a presença de elevados níveis de anti-HBs fornece um ambiente ideal para a seleção dessas variantes, e consequente estabelecimento de infecção. Vale ressaltar que neste estudo detectamos em três pacientes cepas do HBV com a mutação G145R, a mais frequentemente descrita em casos de infecção pós-vacinal ou pós-tratamento com HBIg.

No Brasil não temos muitas informações acerca da presença de cepas do HBV com mutações de escape do anti-HBs em indivíduos vacinados ou entre pacientes transplantados que tenham recebido tratamento com HBIg.

Um estudo realizado no Paraná avaliou a presença de marcadores de infecção pelo HBV entre crianças nascidas de mães com HBsAg positivo que receberam vacina e/ou HBIg, e encontrou apenas um caso com evidência sorológica (HBsAg) e molecular (HBV DNA) de infecção pelo HBV. A análise do gene S do HBV isolado dessa criança mostrou a presença de mutações que provocaram alterações significantes no HBsAg, as quais já haviam sido associadas a escape vacinal em outros países, contudo a mutação G145R não foi detectada (Bertolini et al., 2010). Estudos que avaliem essa questão, especialmente nas áreas de elevada prevalência do HBV, são necessários para que possamos compreender o real impacto das cepas com mutações de escape em nosso meio.

Outro aspecto que pode ser influenciado pela ocorrência de mutações no HBsAg avaliado no presente estudo foi a detecção de anticorpos anti-HBs em pacientes com HBsAg também detectável, perfil que foi encontrado em 8,7% dos pacientes.

Sabe-se que os anticorpos anti-HBs estão presentes no indivíduo com infecção crônica, mas na forma de imunocomplexos com o HBsAg, não sendo portanto detectáveis. O achado do perfil sorológico HBsAg/anti-HBs positivo há anos levanta questionamentos, uma vez que não condiz com o conhecimento estabelecido acerca da evolução clássica da hepatite B onde a detecção do anti-HBs indica o clareamento da infecção e imunidade contra o vírus.

Esse perfil sorológico incomum tem sido encontrado em pacientes com HBC em diferentes países com frequências variáveis (2,8 a 8,9%), e diversos estudos tem avaliado a variabilidade do gene S do HBV nesses casos, particularmente na região do determinante "a", e alguns deles tem encontrado relação com a presença de mutações associadas à falha no reconhecimento do HBsAg pelo anti-HBs (Chen et al., 2011; Colson et al., 2007; Lada et al., 2006; Zhang et al., 2007).

Na casuística que avaliamos não observamos associação entre a detecção do anti-HBs e a presença de mutações em qualquer região do

HBsAg, resultado que também tem sido obtido por outros pesquisadores (Zhang et al., 2007).

Embora os resultados sejam divergentes, a hipótese da presença de cepas com mutações no gene S ainda é uma das mais aceitas para explicar o mecanismo envolvido na origem desse perfil sorológico. Novos estudos envolvendo o uso do sequenciamento de nova geração possibilitarão a caracterização da população viral desses pacientes e poderão trazer respostas mais conclusivas a essa questão.

A associação da positividade do anti-HBs com o subgenótipo A1 encontrada em nosso estudo não tem uma explicação plausível, considerando que não observamos maior frequência de mutações em qualquer região do HBsAg entre as cepas desse subgenótipo.

A detecção de cepas do HBV com mutações que geram códons de parada dentro da região codificante do HBsAg também foi um resultado que nos chamou a atenção neste estudo, pois 4,7% (33/702) dos pacientes estavam infectados com essas variantes. A presença dessas mutações leva à síntese de proteínas de superfície (proteínas L, M e S) truncadas, algumas das quais sem as regiões essenciais para montagem do envelope viral e secreção das partículas virais.

Cepas do HBV com mutações no gene S que geram códons de parada prematura são frequentemente encontradas, particularmente em pacientes sob terapia com AN, uma vez que algumas das mutações selecionadas por esses medicamentos geram essas alterações no HBsAg: rtA181T/ sW172*, rtT184M/ sL176*, rtM204I/ sW196*, rtV/F/L/M207I/ sW199* (Hamkar et al., 2010; Lai et al., 2009; Lee et al., 2012a; Rodriguez-Frias et al., 2013; Zoulim and Locarnini, 2009).

Assim como os pacientes infectados com cepas do HBV com mutações de escape, esses pacientes também apresentaram HBsAg detectável, o que é explicado pela presença de cepas selvagens na população viral dos pacientes. Alguns estudos tem demonstrado a coexistência desses mutantes com cepas selvagens na população viral e sugerido que a ocorrência de

transcomplementação é necessária para a emergência e manutenção de cepas com proteínas de superfície defeituosas (Lee et al., 2012a; Rodriguez-Frias et al., 2013).

Contudo, outros estudos tem encontrado essas variantes em casos de hepatite B oculta, sugerindo que nesses casos a produção de HBsAg está reduzida, o que implica em níveis de HBsAg abaixo daqueles detectáveis pelos testes imunoenzimáticos e reduzida secreção viral caracterizando os baixos níveis de HBV DNA observados nos casos de hepatite B oculta (Hamkar et al., 2010).

Diversos trabalhos tem sugerido que o acúmulo intracelular dessas proteínas de superfície truncadas pode resultar no stress celular e ativação de vias celulares oncogênicas, o que aumenta o risco de desenvolvimento de CHC (Huang et al., 2014; Lai et al., 2009; Lee et al., 2012a). Um desses estudos avaliou a presença de cepas do HBV com mutações no gene S que resultam em códon de parada prematura em pacientes com diferentes estágios de doença hepática (CHC, cirrose, hepatite crônica e portador inativo) e demonstrou que a prevalência das mesmas foi maior entre os pacientes com doença hepática mais avançada (cirrose e CHC) do que naqueles com formas menos severas da doença [31,8% (56/176 pacientes vs. 17,3% (17/99 pacientes); $p=0,010$]. Além disso, os resultados dos testes *in vitro* com linhagem celulares para expressão do HBsAg com sW182* mostraram fortes evidências da relação dessas proteínas com o CHC (Lee et al., 2012a).

Um aspecto interessante descrito acerca das cepas com a mutação sW172*, que é gerada pela presença da mutação de resistência rtA181T, é que além das mesmas apresentarem uma secreção defeituosa, elas têm capacidade de promover a redução da secreção das cepas selvagens (efeito dominante negativo), o que promove a redução da carga viral. A implicação clínica disso é que a seleção dessas variantes pode mascarar o diagnóstico da resistência se apenas a carga viral for utilizada na investigação.

Características dos genes pré-core/core dos genótipos/subgenótipos mais frequentes nas regiões brasileiras estudadas

A evolução clínica da infecção parece depender em alguns aspectos do genótipo ou subgenótipo do HBV que infecta o paciente, o que é um reflexo da presença de algumas mutações específicas que apresentam maior probabilidade de serem desenvolvidas em um genótipo ou subgenótipo do que em outros. Entre essas mutações, aquelas que ocorrem nos genes pré-core/core são as que têm sido mais estudadas e correlacionadas com esses aspectos.

No Brasil ainda são escassos os estudos que tenham realizado associações entre mutações nesses genes e os genótipos do HBV e quanto à associação com subgenótipos não há nenhum estudo publicado até o momento. Além disso, a presença de umas poucas mutações tem sido avaliada (Conde et al., 2004; De Castro et al., 2001; Eloy et al., 2013; Mendes-Correa et al., 2010; Rezende et al., 2005; Sitnik et al., 2004).

Neste estudo identificamos algumas características em posições específicas nos genes pré-core/core dos principais genótipos e subgenótipos do HBV identificados nas diferentes regiões brasileiras estudadas. Essas mutações têm sido associadas com alterações na capacidade replicativa do HBV (aumento ou redução), ausência ou redução da síntese do HBeAg e/ou evolução clínica da hepatite B crônica.

A presença de uma Timina (T) na posição 1653 caracterizando a mutação C1653T tem sido associada com risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, assim como a alteração de um T na posição 1753 para V (C, A ou G) (Ito et al., 2006; Liu et al., 2009).

Neste estudo, a mutação C1653T não foi encontrada e considerando a representatividade desta casuística, sugere-se que esta não seja comum entre as cepas circulantes no Brasil. A maioria dos estudos que descreve a associação dessa mutação com CHC foi realizada em regiões da Ásia e no geral a maior parte da casuística desses estudos é composta por casos infectados pelo genótipo C (Ito et al., 2006; Liu et al., 2009). É possível que a

mutação C1653T seja uma característica desse genótipo que aumente o risco de desenvolvimento de CHC, embora também já tenha sido identificada em casos com CHC infectados por outros genótipos: A1 (40%), A2 (15%), B1 (25%), B2 (25%) (Ito et al., 2006).

Já as mutações na posição 1753 foram encontradas em cepas do HBV isoladas de 19% (95/495) dos pacientes estudados, sendo mais frequentes nos subgenótipo F2a (31,8%) e HBV/D2 (28,6%) e ausentes no subgenótipo A2. Assim com a mutação C1653T, a associação das mutações na posição 1753 com desenvolvimento de CHC tem sido descrita principalmente em casos infectados com genótipo B e C (Liu et al., 2009).

Duas outras mutações associadas à evolução clínica da infecção são as que ocorrem nas posições 1766 e 1768. A alteração de C para T na posição 1766 (C1766T) tem sido relacionada principalmente com aumento da replicação viral quanto associada à dupla mutação A1762T/G1764A. Alguns estudos têm relacionado a presença dessa mutação com evolução da infecção pelo HBV para insuficiência hepática aguda. Na posição 1768 a mutação que comumente tem sido encontrada é a substituição de T por A (T1768A) e a presença da mesma tem sido associada com desfechos similares aqueles descritos para a mutação na posição 1766 (Quarleri, 2014). Essas mutações também têm sido associadas com o desenvolvimento de CHC (Gopalakrishnan et al., 2013).

Os resultados observados em nosso estudo sugerem que estas mutações não são muito frequentes entre os genótipos e subgenótipos avaliados, sendo que presença delas foi mais associada com os subgenótipos A1 e F2a. Um estudo realizado na Índia mostrou que as mutações C1766T e T1768A foram significativamente associadas com CHC e encontradas predominantemente no subgenótipo A1 (Gopalakrishnan et al., 2013). É possível que a presença dessas mutações não só em HBV/A1, mas também em HBV/F2a representem sinais de maior patogenicidade entre as cepas desses subgenótipos.

Vale ressaltar que o subgenótipo A1 tem sido associado com elevadas taxas de CHC na África-Subsaariana, o que também foi observado em outro estudo realizado na Índia (Gopalakrishnan et al., 2013; Kew et al., 2005). Neste último foi avaliada a associação de CHC com a presença de mutações no genoma do HBV e as mutações C1766T/T1768A foram significativamente associadas com o genótipo A1 e com o CHC (Gopalakrishnan et al., 2013).

Um estudo realizado recentemente no Rio de Janeiro que avaliou cepas do HBV isoladas de pacientes com e sem CHC não encontrou associação significativa entre um subgenótipo específico e/ou mutações nos genes pré-core/core com evolução da doença (Araujo et al., 2014). Entretanto, o número de casos avaliado nesse estudo foi muito pequeno, necessitando que mais estudos sejam realizados no Brasil para que possamos concluir se as mutações observadas no presente estudo e em outros estudos têm alguma associação com o desenvolvimento de doença hepática avançada em nosso meio.

No presente estudo foram também pesquisadas as mutações que ocorrem nos genes PCC que estão associadas com a redução ou ausência da síntese do HBeAg. Neste estudo o perfil HBeAg negativo foi predominante, independente do subgenótipo do HBV. O perfil de mutações nos genes PCC associado a cada subgenótipo sugere que há mecanismos distintos envolvidos na negatividade do HBeAg dependendo do subgenótipo.

As mutações A1762T e G1764A, localizadas dentro do promotor basal do core (BCP), estão envolvidas na supressão da síntese do HBeAg. Essas alterações provocam interferência na transcrição do RNA mensageiro dessa proteína, que é regulada pelo BCP (Quarleri, 2014). Na casuística avaliada no presente estudo, a presença da dupla mutação A1762T/G1764A foi significativamente mais frequente no subgenótipo F2a (72,7%), embora sua frequência também tenha sido considerável no HBV/A1 (48%). A associação das mutações no BCP com o genótipo F já haviam sido descritas no Brasil e parece ser o principal mecanismo utilizado pelas cepas desse subgenótipo para o alterações na síntese do HBeAg (Sitnik et al., 2004).

Diferente do que foi observado neste estudo, a frequência dessas mutações foi bem menor (37,5%) em casos de genótipo F isolados na Argentina (Franca et al., 2004). Essa divergência pode estar relacionada com o subgenótipo do genótipo F, uma vez que na Argentina há maior prevalência dos subgenótipos F1b e F4 (Mello et al., 2013).

Mutações nas posições 1809 a 1812, que se localizam um pouco antes do códon de iniciação do gene pré-core, têm sido relacionadas com prejuízos na expressão do HBeAg. Experimentos de transfecção demonstraram que a expressão do HBeAg foi severamente prejudicada pela presença de mutações concomitantes nas posições 1809, 1811 e 1812 (G1809T, A1811T/C e C1812T), e sofreu redução moderada (semelhante á observada na presença das mutações A1762T/G1764A) pela presença de dupla mutação nas posições 1809 e 1812 (G1809T/A e C1812T) (Kramvis and Kew, 2007b).

Em nosso estudo, a presença de mutações nas posições 1809 a 1812 foi significativamente associada com o subgenótipo A1. Mutações nessa região têm sido descritas como características das cepas HBV/A1 circulantes na África, particularmente África do Sul. Dupla ou tripla mutação na região 1809-1812 foram encontradas em cerca de 80% de cepas HBV/A1 caracterizadas na África do Sul (Kimbi et al., 2004).

Entre os demais subgenótipos também observamos mutações na região 1809-1812, sendo menos frequentes no subgenótipo D2 (3,6%) e mais frequentes no F2a (22,7%).

Mutações no códon de iniciação do gene pré-core (posições 1814 a 1816) parecem também ser um mecanismo de não produção do HBeAg desenvolvido por alguns dos subgenótipos caracterizados neste estudo, mas não um dos mais importantes uma vez que sua frequência foi bem menor que as demais mutações associadas com esse perfil.

A mutação mais significativa e que ocorre com maior frequência no gene pré-core é substituição de G por A na posição 1896 (G1896A) gerando um códon de parada prematura, que aborta a síntese do HBeAg. A região pré-core tem um importante papel na replicação viral, pois o RNA pré-genômico

(RNAPg) forma uma estrutura em alça nesta região através do pareamento entre os nucleotídeos das posições 1855 a 1858 com os nucleotídeos das posições 1896 a 1899. Esta estrutura é o local de interação entre a polimerase e o RNAPg, o que constitui o primeiro passo da encapsidação do RNAPg nas partículas de core (Tong et al., 2013).

A frequência da mutação G1896A varia entre os diferentes genótipos, pois depende do nucleotídeo na posição 1858, oposta ao nucleotídeo 1896 na alça do sinal de encapsidação, sendo portanto mais frequente entre os genótipos que apresentam T nessa posição que forma um pareamento estável com um A na posição 1896. Esta mutação também pode aumentar a estabilidade da estrutura em alça do sinal de encapsidação (ϵ) do RNAPg, o que aumenta a capacidade replicativa do vírus (Tong et al., 2013).

Outra mutação que comumente é identificada nessa região ocorre na posição 1899, caracterizada também pela substituição de um G para A gerando da mesma forma um códon de parada prematura que aborta a síntese do HBeAg. Da mesma forma essa mutação aumenta a estabilidade do ϵ por gerar um pareamento estável adicional (Tong et al., 2013).

Neste estudo a presença de uma citosina (C) na posição 1858 foi associada com os subgenótipos A1, A2 e F2a, nos quais essa característica foi observada com frequência de 97,1%, 94,4% e 100%, respectivamente. Por outro lado, a presença de timina (T) foi associada com os subgenótipos D2, D3 e D4. Consequentemente as mutações G1896A e/ou G1899A foram associadas com os subgenótipos D2, D3 e D4, e pouco frequentes ou ausentes nos subgenótipos A1, A2 e F2a.

Os resultados observados confirmam os achados publicados anteriormente que sugerem a presença das mutações G1896A e/ou G1899A como um dos principais mecanismos desenvolvidos pelo genótipo D para abolir a síntese do HBeAg (Kim et al., 2011). Também mostram que diferente do que é observado em casos de genótipo F em outros países, essas mutações não são associadas ao subgenótipo F2a circulante no Brasil (Arauz Ruiz et al., 1997; Franca et al., 2004).

A ocorrência de duas mutações nos gene pré-core/core, que têm sido associadas a características do subgenótipo A1, foram também analisadas. A primeira ocorre na posição 1862 (G1862T) e parece afetar a produção do HBeAg no momento pós-traducional interferindo na clivagem do peptídeo sinal presente na proteína precursora (p25) do HBeAg (Kramvis and Kew, 2007b).

Entre as amostras analisadas neste trabalho a mutação G1862T foi significativamente associada com o subgenótipo A1, sendo encontrada em 98,5% das cepas HBV/A1. Nos demais subgenótipos analisados a presença dessa mutação não foi observada (HBV/D2) ou encontrada em frequência bem mais baixa variando de 6,5% no HBV/D3 a 16,7% no HBV/A2.

A segunda ocorre na posição 1888, caracterizada pela substituição de uma guanina (G) por adenina (A) (G1888A). No presente estudo essa mutação apresentou associação significativa com o subgenótipo A1, sendo encontrada em 64,8% dos casos, enquanto que nos demais subgenótipos sua frequência foi baixa.

O mecanismo de ação da mutação G1888A atuando na redução da expressão da proteína do core (HBcAg) parece contribuir para redução da carga viral do HBV, o que levou a sugerir a associação da mutação G1888A com os níveis relativamente baixos de carga viral observados entre indivíduos infectado pelo subgenótipo A1 (Kimb et al., 2012). Ainda precisa ser analisado o quanto a presença dessa mutação nas cepas HBV/A1 circulantes no Brasil estão associadas com redução da carga viral.

Diversas características genéticas das cepas do HBV circulantes nas regiões brasileiras estudadas foram mapeadas neste estudo em pacientes virgens de tratamento, mas este trabalho não analisou o quanto as mutações observadas estão relacionadas com os efeitos descritos em estudos realizados em outros países. Para esta avaliação, estudos envolvendo casuísticas compostas por pacientes com diferentes graus de doença hepática são necessários.

CONCLUSÕES

5 – Conclusões

- As cepas do HBV que circulam nas diferentes regiões brasileiras estudadas apresentaram grande variabilidade genética, sendo que sete genótipos foram encontrados: A, B, C, D, E, F, e G;
- Dentre os genótipos mais frequentes (A, D e F), o genótipo D foi o que apresentou maior diversidade: 4 subgenótipos foram identificados (D1, D2, D3 e D4);
- As diferentes regiões do Brasil estudadas apresentam características específicas quanto à distribuição dos genótipos e subgenótipos do HBV refletindo a influência da formação histórica de sua população e do fluxo migratório mais recente;
- Entre pacientes com hepatite B crônica, virgens de tratamento, em diferentes regiões do Brasil a frequência de cepas do HBV com mutações de resistência aos AN foi baixa (1,6%);
- O padrão de mutações (rtL80I ou rtL180M + rtM204V/I) que confere resistência total à lamivudina e parcial ao entecavir foi o mais frequente (0,7%), seguido pela mutação (rtA194T) associada com resistência ao tenofovir (0,3%) e a de resistência cruzada (rtT181T/S) à lamivudina, adefovir e tenofovir (0,3%);
- Cepas do HBV com mutações no HBsAg que conferem grande impacto na antigenicidade dessa proteína foram observadas em 8,5% das amostras analisadas;
- Na casuística estudada não observamos associação entre a presença de mutações no HBsAg com falhas na detecção desse antígeno;

- Neste estudo o perfil sorológico com positividade simultânea para o HBsAg e anti-HBs não foi associado com a presença de mutações no gene S;
- O perfil sorológico HBeAg negativo foi o mais frequente (84,1%) na casuística estudada, independente do subgenótipo. Contudo, entre os pacientes infectados pelos subgenótipos A2 e D4 foram observadas as maiores taxas de positividade para o HBeAg: 40,9% e 25%, respectivamente;
- Dentre as mutações nos genes pré-core/core associadas com redução ou falha na expressão do HBeAg, as mutações A1762T/T1764A estiveram associadas aos subgenótipos A1 e F2a; G1862T e mutações nas posições 1809 - 1812 ao subgenótipo A1; e G1896A e/ou G1899A aos subgenótipos D2, D3 e D4;
- As mutações C1766T e T1768A estiveram associadas aos subgenótipos A1 e F2a;
- A mutação G1888A esteve associada ao subgenótipo A1;

ANEXOS

6 – Anexos

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido

1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Prevalência de resistência primária aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite B entre pacientes com infecção crônica pelo Vírus da Hepatite B não submetidos a tratamento**
2. PESQUISADOR : **João Renato Rebello Pinho**
3. CARGO/FUNÇÃO: **Médico** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **51.496**
UNIDADE DO HCFMUSP: **Departamento de Gastroenterologia**
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO ☒	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐	RISCO MAIOR ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **3 anos**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

As informações seguintes estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo

Neste estudo temos por objetivo pesquisar a existência de vírus da hepatite B com resistência aos medicamentos utilizados para tratar a hepatite B infectando pacientes que são portadores crônicos desse vírus e que nunca foram submetidos a qualquer tratamento para a Hepatite B. Os resultados que serão obtidos irão mostrar se é essencial a realização da pesquisa de mutações de resistência aos medicamentos utilizados no tratamento da hepatite B antes de iniciar o tratamento do paciente. Essa informação é de grande importância, pois no caso de um paciente receber tratamento com um determinado medicamento para o qual o vírus que ele possui apresenta resistência não haverá redução na quantidade de vírus no seu organismo, o que pode favorecer uma pior evolução da doença.

Para poder participar deste estudo, você precisa ser um portador crônico do vírus da hepatite B e nunca ter recebido qualquer tratamento para essa doença. O seu médico irá avaliar se você tem essas características, e após a explicação de todos os procedimentos, você poderá decidir se quer ou não participar.

Caso você deseje participar do estudo, uma amostra de seu sangue será coletada para que alguns exames relativos à sua infecção pelo vírus da hepatite B sejam realizados. Esses exames são o sequenciamento do DNA do vírus e a quantificação do mesmo. Isso significa que será realizada uma contagem da quantidade de vírus da hepatite B e também se procurará conhecer o tipo de vírus B que você tem e se ele apresenta mutações que determinam resistência aos medicamentos usados para o tratamento da hepatite B. Esses exames não são realizados de forma rotineira no tratamento de pessoas com seu problema.

Os riscos envolvidos na coleta de sangue são: hematoma no local da punção e dor. Não há nenhum outro meio de obtermos as informações para o seu seguimento ou tratamento além das medidas que esse estudo propõe.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. João Renato Rebello Pinho, que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 500/ 2º andar – Instituto de Medicina Tropical. Telefone (11) 3061-8218.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

Todo o paciente que participa desta pesquisa tem o direito de perguntar sobre o andamento de nossos estudos, resultados e avanços. Tem também a garantia de que os resultados são sigilosos e que esses resultados e seu sangue (que pode ficar armazenado em nosso laboratório para futuras pesquisas) serão somente utilizados com finalidades bem aceitas pelas normas de ética científica mundiais. Além disso, você é livre para retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, podendo se recusar a participar desta pesquisa sem que isso lhe traga prejuízos no tratamento que recebe da equipe médica. A sua participação no estudo é voluntária, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização das pesquisas não serão de sua responsabilidade.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **"Prevalência de resistência primária aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite B entre pacientes com infecção crônica pelo Vírus da Hepatite B não submetidos a tratamento"**. Eu discuti com o Dr. João Renato Rebello Pinho sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos

Assinatura da testemunha _____ Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO B - Parecer do comitê de ética e pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19.05.10, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **036/10** intitulado: "PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTIVIRAIS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA HEPATITE B ENTRE PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO VIRUS DA HEPATITE B NÃO SUBMETIDOS A TRATAMENTO" inclusive seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, apresentado pelo Departamento de Gastroenterologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: João Renato Rabello Pinho

Pesquisador (a) Executante: Michele Soares Gomes Gouvêia

CEP-FMUSP, 19 de maio de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil

Lena Maria Fonseca Barros ^{a,1}, Michele Soares Gomes-Gouvêa ^{b,*,1}, Anna Kramvis ^c, Maria Cássia Jacintho Mendes-Corrêa ^d, Alessandro dos Santos ^a, Letícia Alana Barros Souza ^a, Max Diego Cruz Santos ^a, Flair José Carrilho ^b, Arnaldo de Jesus Domicini ^a, João Renato Rebello Pinho ^{b,2}, Adalgisa de Souza Paiva Ferreira ^{a,2}

^a Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

^b Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, São Paulo Institute of Tropical Medicine and Department of Gastroenterology, School of Medicine, University of São Paulo, Brazil

^c Hepatitis Virus Diversity Research Programme, Department of Internal Medicine, School of Clinical Medicine, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa

^d Department of Infectious Diseases, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 January 2014

Received in revised form 21 February 2014

Accepted 10 March 2014

Available online 16 March 2014

Keywords:

Phylogenetics
Subgenotype A1
Subgenotype D4
Slave trade
Maranhão
Brazil

ABSTRACT

In this study, we determined the prevalence of HBV subgenotypes in Maranhão state, located in north-eastern Brazil, where the population is heterogeneous, with a high proportion of African descendants. HBV was detected in 119 of 133 (89.5%) chronic hepatitis B patients, including 103 (86.5%) who were HBeAg-negative. Using phylogenetic analysis of the S/Polymerase region of HBV DNA, subgenotype A1 was found to be the most prevalent (67%), followed by genotype D (28%; subgenotype D4 was detected in 24%, D3 in 3%, and D2 in 1%). Genotype F, clustering with subgenotype F2a, was found in six (5%) patients. The topology of the phylogenetic tree showed that HBV/A1 sequences did not cluster together, suggesting that more than one strain was introduced into Maranhão. On the other hand, HBV/D4 sequences formed a monophyletic cluster, suggesting a single entry of this strain in this population. This study showed that HBV/A1 was the only subgenotype of HBV/A present in the population from Maranhão and indicated that in this region HBV/A1 was not restricted to an Afro-descendant community where it was previously reported, but is widely distributed among general population of HBV chronic carriers.

Unexpectedly, we found a high frequency of HBV subgenotype D4. Together with previously reported data on the distribution of HBV/D4 in the world, these findings suggest that this subgenotype was more prevalent in the African continent in the past and may have been introduced in Maranhão by means of the slave trade during the late XVIII century, when the largest number of African slaves arrived to this region.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Globally, the prevalence of chronic hepatitis B (CHB) varies considerably, with areas of high (>8%), intermediate (2–7%) and low (<2%) endemicity (WHO, 2002). A recent epidemiological study, carried out among a representative sample of the Brazilian population showed an HBsAg prevalence of less than 1% in

Northeast and Central-West regions (Pereira et al., 2009). However, in other regions, including some areas of the Amazon, south and southwest regions, hepatitis B virus (HBV) infection is hyperendemic and poses a serious health threat (Bertolini et al., 2006; Braga et al., 2012; Souto, 1999).

Brazil is a very large country and in several areas the epidemiological picture of HBV infection is unknown, especially in smaller cities or rural communities, where large reservoirs of HBV infection may persist. Maranhão state is located in the northeastern region of Brazil, is divided in 217 counties (Fig. 1), and has a population of approximately 6,794,301 inhabitants (<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ma>). Population from Maranhão is one of the most heterogeneous in the country, with a high proportion of African descendants. In the few epidemiological studies carried

* Corresponding author. Address: Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, Instituto de Medicina Tropical, FMUSP, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 500, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 1130618218.

E-mail address: gomesmic@yahoo.com.br (M.S. Gomes-Gouvêa).

¹ These authors contributed equally to this work.

² These authors also contributed equally to this work.

Fig. 1. Geographic location of Maranhão state in Brazil.

out to estimate HBV prevalence in this state, was observed that it was variable, depending on the studied group: a low HBV prevalence (0.5–0.9%) was found in two studies among the urban population from São Luís, the capital of Maranhão state (Pereira et al., 2009; Souza et al., 2012); whereas an intermediate prevalence (2.8%) was found in a rural area (Buriticupu) (El Khouri et al., 2010) and a surprisingly high prevalence (12.5%) reported in an African descendant population from another rural area (Frechal) (Alvarado-Mora et al., 2011).

HBV is currently classified into ten genotypes (A–J) based on a difference in genomic sequence of 7.5% or more and some of them have been further classified into subgenotypes (Kramvis et al., 2008; Norder et al., 2004). Most HBV genotypes and some of their subgenotypes have characteristic geographic distribution around

the world and a strong correlation with ethnicity (Kramvis et al., 2008; Kurbanov et al., 2010; Norder et al., 2004). Moreover, genotypes/subgenotypes can affect the natural course of infection and response to antiviral treatment (Cooksley, 2010; Kramvis and Kew, 2005; Lin and Kao, 2011).

Knowledge of HBV genotypes/subgenotypes prevalence in a geographical region is also important to understand the routes of HBV dissemination and to establish efficient strategies to prevent and control HBV infection. Genotypes B and C have been related to vertical transmission while subgenotype A1 and genotypes D, E, F and H are more related to horizontal transmission during early childhood. HBV/A2 has been frequently involved in sexual transmission and is more prone to establish chronic disease in adults. Like HBV/A2, genotype G infection is associated with sexual

transmission as a risk factor for infection and is frequently found in men who have sex with men (Araújo et al., 2011).

Genotypes A, D and F are the HBV genotypes more prevalent in Brazil (Bertolini et al., 2012; Gomes-Gouvea et al., 2009; Mello et al., 2007; Moura et al., 2013; Santos et al., 2010; Sitnik et al., 2004; Victoria et al., 2008). Although studies in particular regions of the country have shown the predominance of HBV subgenotypes A1, D3 and F2a (Bertolini et al., 2012; Gomes-Gouvea et al., 2009; Mello et al., 2007; Moura et al., 2013; Santos et al., 2010; Victoria et al., 2008), this information remains poorly understood in most of Brazilian regions. Specifically in Maranhão state, there is just one study that characterized the distribution of HBV subgenotypes in an Afro-descendant community where only HBV/A1 was identified (Alvarado-Mora et al., 2011), however the extent of its distribution in this state is unknown.

The aim of this study was to characterize the HBV genotypes and subgenotypes in chronic hepatitis B carriers from different regions of Maranhão state and to relate this data with demographic and clinical features of the patients.

2. Patients and methods

2.1. Patients

The study population included 133 patients with chronic hepatitis B from Maranhão state, in the northeast of Brazil. These patients were followed up at the Center for Liver Studies of the University Hospital, Federal University of Maranhão (HUUFMA) at São Luís, the capital city of Maranhão state. The local ethics committee approved this study and written informed consent was obtained from all patients included.

Demographic, clinical and laboratory data of the patients were retrieved from their medical files. All patients were HBsAg positive, for at least 6 months prior to inclusion in the study, and tested negative for hepatitis C virus or human immunodeficiency virus antibodies. The serum samples were collected during January 2008 to February 2010.

Chronic hepatitis B status was defined according to the following criteria:

- (1) Inactive carrier: positive HBsAg, negative HBeAg, positive anti-HBe, normal alanine aminotransferase (ALT) levels and HBV DNA below 2000 IU/mL;
- (2) Chronic hepatitis B: positive HBsAg, positive HBeAg, and high ALT levels; or positive HBsAg, negative HBeAg, positive anti-HBe and HBV DNA higher than 2000 IU/mL;
- (3) Liver cirrhosis: positive HBsAg with positive or negative HBeAg regardless of the viral load; signs or symptoms of advanced liver disease (ascites and/or presence of esophageal varices) or histological diagnosis of liver cirrhosis;
- (4) Immune tolerance: positive HBsAg and HBeAg with normal ALT levels and HBV DNA above 10^7 IU/mL.

2.2. Serological assays

Serum samples were tested for hepatitis B markers (HBsAg, total anti-HBc, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits (DiaSorin, Italy).

2.3. HBV DNA amplification and quantification

HBV DNA was extracted from 200 μ L serum using the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen). Viral load was quantified by real-time PCR assay as described previously (Sitnik et al., 2010). Absolute

quantification of HBV DNA was performed with an ABI PRISM 7300 (Life Technologies) real-time analyzer using universal cycling conditions. The limit of detection of this assay was established in 50 IU/mL, but it can detect samples with viral load below this value (Sitnik et al., 2010).

For genotype identification, a fragment of 1306 base pairs (bp), comprising the whole HBsAg and part of the Polymerase coding genes, was amplified by nested PCR. For this, we used the enzyme Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and the primers PS3132F (5' CCT CCY GCH TCY ACC AAT CG 3'; nt 3132–3151 from the *EcoRI* site) and 2920RM (5' ACG TCC CKC GHA GRA TCC AG 3'; nt 1417–1398) for the first-round PCR, and PS3201F (5' CAY CCH CAG GCM ATG CAG TGG 3'; nt 3201–3221) and P1285R (5' CWA GGA GTT CCG CAG TAT GG 3'; nt 1285–1266) for the second round. PCR was carried out for 35 cycles of 94 °C for 30 s, 48 °C (first round) or 54 °C (second round) for 30 s, and 72 °C for 1 min and 40 s.

PCR products from the second-round reaction (nested PCR) were purified using Charge Switch® PCR Clean-Up Kit (Invitrogen) and were then sequenced using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Three inner and partially overlapping sequences were obtained in sense and antisense directions using three sets of primers: 1 – PS3201F and HBV477R (5' GGA CAV ACG GGC AAC ATA CCT T 3'; nt 477–456); 2 – L372 (5' – TCG YTG GAT GTR TCT GCG GCG TTT TAT – 3'; nt 370–396) and RADE2M (5' – TGR CAN ACY TTC CAR TCA ATN GG – 3'; nt 989–970); 3 – P781F (5' GAR TCC CTT TWT RCC KCT RTT ACC 3'; nt 781–804), and P1285R. Sequencing was carried out on an automated ABI 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

The quality of each electropherogram was evaluated using the Phred–Phrap software (Ewing and Green, 1998; Ewing et al., 1998) and consensus sequences were obtained from the alignment of these six sequences, for each single patient, using CAP3 software available at the web page *Electropherogram quality analysis Phred* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

2.4. HBV genotyping and subgenotyping

Sequences were aligned and edited using BioEdit (v. 7.0.8) and the integrated CLUSTAL W program. HBV genotypes and subgenotypes were classified by phylogenetic reconstructions using published reference sequences from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Bayesian phylogenetic analyses were conducted using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulation implemented in BEAST v.1.6.1 (Drummond and Rambaut, 2007) under uncorrelated lognormal relaxed molecular clock using the model of nucleotide substitution (GTR + G + I). The MCMC chains were run for 10 million generations, and sampled every 1000 steps. The maximum clade credibility (MCC) tree was obtained from summarizing the 10,000 substitution trees and then 10% of burn-in was removed using Tree Annotator v.1.6.1 (Drummond and Rambaut, 2007).

HBV serotypes were deduced base on the presence of amino acids at positions 122, 127, 134 and 160 of S protein coding by S gene sequence: *adw2* (Lys¹²², Pro¹²⁷ and Lys¹⁶⁰); *ayw2* (Arg¹²², Pro¹²⁷, Tyr¹³⁴ and Lys¹⁶⁰); *ayw3* (Arg¹²², Thr¹²⁷, Tyr¹³⁴ and Lys¹⁶⁰); *adw4* (Lys¹²², Leu¹²⁷ and Lys¹⁶⁰) (Norder et al., 2004).

2.5. Nucleotide sequence accession numbers

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences described in this study are JF298901, JF298903, JN983831–JN983947 for S/POL sequences and KJ470884–KJ470898 for complete genome sequences.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses to compare subgenotypes and different variables were performed. HBV/F2a, D2 and D3 subgenotypes were excluded from the statistical analysis because there were too few cases. Qualitative variables (gender and chronic HBV infection stage) were compared using Chi square test, *t*-test and Mann–Whitney were used to determine for significant differences in age and viral load values between subgenotype A1 and D4 groups, respectively. Differences were considered significant for *p* values less than 0.05. The statistical analysis software used was SPSS software, version 17.0.

3. Results

3.1. Clinical and demographic characteristics of HBV DNA positive patients

Out of the 133 patients included in this study, 119 (89%) were HBV DNA positive: 53% were male with mean age 40.5 (SD = 13) years. Considering the geographical origin inside Maranhão state, most of them (76%; 90/119) were from São Luís metropolitan area, which includes four cities: São Luís (capital of the state), São José de Ribamar, Raposa, and Paço do Lumiar. The remaining patients (24%; 28/119) were from 24 different small cities located in other areas of the state.

HBeAg-negative patients were predominant (86.5%; 103/119) and most of these (85%; 88/103) had viral loads varying from <2000 to 20,000 IU/mL (mean 2,565 IU/mL; SD 3857). On the other hand, higher viral loads (>20,000 IU/mL) were predominantly found in HBeAg-positive patients. The majority of the patients were classified as inactive carriers (46%; 55/119) or as chronic hepatitis (33%; 39/119).

3.2. HBV genotype and subgenotype distribution

Genotype A was the most prevalent (67%; 80/119), followed by genotypes D (28%; 33/119) and F (5%; 6/119). The phylogeny of genotype A sequences showed that all strains belonged to subgenotype A1, but grouped in different clusters of the HBV/A1 branch. HBV/A1 sequences from Maranhão mainly grouped together with sequences isolated from other regions of Brazil, but only some clusters were well supported (Fig. 2). All HBV/A1 strains were classified as serotype *adw2*.

HBV/D4 was the most frequent subgenotype of genotype D from Maranhão (24%; 29/119). Subgenotypes D2 (*ayw2*) and D3 (*ayw2/ayw3*) were found in a few cases with a frequency of 0.8% (1/119) and 2.4% (3/119), respectively (Fig. 3a and Supplementary Fig. S1). The HBV/D4 (*ayw2*) sequences isolated in Maranhão grouped in a monophyletic cluster with strong support (a posterior probability = 0.93) and clustered closer to HBV/D4 strains previously isolated in other Brazilian regions, but more distantly to other HBV/D4 strains from other countries. To confirm the subgenotype classification of the D4 isolates from Maranhão state, the complete genomes of fifteen isolates were sequenced and the phylogenetic analysis of the complete genomes showed similar grouping to that of *S/POL* genes (Fig. 3b). Moreover, the genetic diversity based on complete genome was less than 4.0% compared to previously characterized HBV/D4, confirming their subgenotype classification as D4.

HBV/F2a (*adw4*) was the unique subgenotype of genotype F found in Maranhão state. Most sequences clustered together with other F2a sequences previously isolated from two other Brazilian regions: Rondônia and Amazonas states (Supplementary Fig. S1).

3.3. HBV subgenotypes and demographic, clinical and laboratory characteristics of the patients

Table 1 shows HBV subgenotype distribution of 119 patients according gender, age, race (based in skin color), geographical origin, HBeAg profile, clinical status and HBV DNA levels. Overall, subgenotypes A1 and D4 comprised 92% of study population and a statistical comparison of demographical (gender and age), clinical and laboratorial data of these patients was performed. Patients infected with HBV/D4 presented a higher frequency of HBeAg-positive status than those infected with HBV/A1 [8/29 (28%) vs. 8/80 (10%), *p* = 0.02] and were more frequently found in the immune tolerance stage of chronic HBV infection [7/29 (24%) vs. 3/80 (4%), *p* = 0.003]. There was no significant difference in gender, age and viral load median.

4. Discussion

This study determined the distribution of HBV genotypes and subgenotypes in Maranhão state. This state is the fourth most populous state of the Northeast region and its population is one of the most heterogeneous in Brazil, with a high proportion of African descendants, who live in isolated or semi-isolated rural communities.

The HBV genotype distribution in Maranhão state was similar to that reported in other Brazilian regions, showing a higher prevalence of genotype A, followed by genotypes D and F (Bertolini et al., 2012; Gomes-Gouveia et al., 2009; Mello et al., 2007; Moura et al., 2013; Santos et al., 2010; Sitnik et al., 2004; Victoria et al., 2008). However, molecular characterization at the subgenotype level revealed a relatively high prevalence of subgenotypes A1 and D4. It is noteworthy, that the population analyzed in this study was representative of HBV carriers from whole Maranhão state because the patients were recruited from a liver disease referral center that monitors the entire state.

To date only two subgenotypes of genotype A (A1 and A2) have been found in Brazil and in Brazilian regions, where data is available, HBV/A1 has been the single or most prevalent subgenotype of genotype A (Bertolini et al., 2012; Gomes-Gouveia et al., 2009; Mello et al., 2007; Moura et al., 2013; Santos et al., 2010; Victoria et al., 2008). The present study showed that under the period of study only HBV/A1 was circulating in Maranhão state and was the most prevalent (67%) subgenotype in this state. This result indicates that in Maranhão HBV/A1 was not restricted to an Afro-descendant community, where it was previously reported (Alvarado-Mora et al., 2011), but was widely distributed among the general population of HBV chronic carriers.

Phylogeographic studies of HBV sequences from different countries suggest that genotypes/subgenotypes can be used to trace human migrations (Kramvis and Paraskevis, 2013). Because of the presence of HBV/A1 in some regions of Africa and its distribution among Brazilian communities that are formed mostly by descendants of African slaves (Quilombos), it has been postulated that HBV/A1 was introduced in Brazil by African slaves, who arrived in Brazil between the 16th and 19th centuries (Alvarado-Mora et al., 2011; Araujo et al., 2004; Motta-Castro et al., 2008).

Brazil is a country with continental dimensions and different regions have diverse population histories, cultural habits and environmental characteristics. These features can influence the HBV genotype/subgenotype distribution and/or the spread of a specific HBV strain. Therefore it is important not to only know the genotype/subgenotype distribution in each region but also to study the phylogenetic relationship among the isolates identified.

The clustering pattern of HBV/A1 sequences from Maranhão state suggests different entries of this subgenotype into the state.

Fig. 2. Maximum clade credibility (MCC) tree estimated by Bayesian analysis of HBV sequences that partially comprise HBsAg and DNA polymerase coding regions (S/POL). HBV/A1 sequences characterized in this study are highlighted in red and sequences obtained from GenBank are identified by their accession number followed by geographic origin. The collapsed clades correspond to sequences of the other HBV genotypes (B, C, D, E, F, G, H) and subgenotypes of genotype A (A2–A7). Posterior probability values are shown above their respective key nodes. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 3. Maximum clade credibility (MCC) tree estimated by Bayesian analysis of (A) HBV sequences that partially comprise HBsAg/DNA polymerase coding regions (S/POL) and (B) complete genome sequences. HBV/D4 sequences characterized in this study are highlighted in red and sequences obtained from GenBank are identified by their accession number followed by geographic origin. The collapsed clades correspond to sequences of the other HBV genotypes (A, B, C, E, F, G, H) and the subgenotypes of genotype D (D1, D2, D3, D5, D6, D7/D8). Posterior probability values are shown above their respective key nodes. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Characteristics and HBV genotypes/subgenotypes of 119 chronic HBsAg carriers from Maranhão state.

Variables	HBV Subgenotypes					
	A1	D2	D3	D4	F2a	Total
<i>N</i> (%)	80 (67%)	1 (1%)	3 (3%)	29 (24%)	6 (5%)	119
Male Gender	42 (53%)	0	2 (67%)	10 (34%)	3 (50%)	57 (52%)
Mean age (years)	41.8	49	38	37.6	38.3	40.6
<i>Race</i> [*]						
Pardo	50 (63%)	0	2 (67%)	22 (76%)	4 (67%)	78 (66%)
Black	18 (23%)	0	0	4 (14%)	1 (17%)	23 (19%)
White	12 (15%)	1 (100%)	1 (33%)	3 (10%)	1 (17%)	18 (15%)
<i>Origin</i>						
Metropolitan area of São Luís ^{**}	63 (79%)	0	3 (100%)	19 (66%)	6 (100%)	91 (76%)
Other cities	17 (21%)	1 (100%)	0	10 (34%)	0	28 (24%)
<i>HBeAg</i>						
Positive	8 (10%)	0	0	8 (28%)	0	16 (13%)
Negative	72 (90%)	1 (100%)	3 (100%)	21 (72%)	6 (100%)	103 (87%)
<i>Diagnosis</i>						
Inactive carrier	37 (46%)	1 (100%)	2 (67%)	12 (41%)	3 (50%)	55 (46%)
Chronic hepatitis	29 (36%)	0	1 (33%)	6 (21%)	3 (50%)	39 (33%)
Cirrhosis	11 (14%)	0	0	4 (14%)	0	15 (13%)
Immune tolerance	3 (4%)	0	0	7 (24%)	0	10 (8%)
<i>HBV DNA levels</i>						
<2000 IU/mL	41 (51%)	1 (100%)	2 (67%)	13 (45%)	3 (50%)	60 (50%)
2000–20,000 IU/mL	24 (30%)	0	0	4 (14%)	2 (33%)	30 (25%)
>20,000 IU/mL	7 (9%)	0	1 (33%)	5 (17%)	1 (17%)	14 (12%)
>10,000,000 IU/mL	8 (10%)	0	0	7 (24%)	0	15 (13%)

^{*} Based on the skin color.

^{**} São Luís, São José de Ribamar, Raposa and Paço do Lumiar.

The phylogenetic analysis shows that HBV/A1 sequences isolated from other regions of Brazil also have this characteristic. This pattern may be a result of the introduction of different strains by slaves originating from diverse African regions or may be as a result of internal migration of infected slaves in Brazil (Klein, 1986). On the other hand, a recent study shows that HBV/A1 sequences, isolated in Pernambuco, another state in Northeastern Brazil, have a different phylogenetic grouping pattern, indicating that most of HBV/A1, introduced in this region, came from a common strain (Moura et al., 2013).

HBV genotype D, the second most common (28%) genotype found in Maranhão, is highly prevalent in southern Brazil and in some southeastern areas (Bertolini et al., 2012; Mello et al., 2007; Sitnik et al., 2004). This genotype has been observed throughout the world, but it predominates in northeastern Europe, the Mediterranean basin, northern Africa, and the Middle East (Schaefer, 2007; Yousif and Kramvis, 2013). The presence of genotype D in Brazil, especially in southern and in southeastern regions has been mainly attributed to the European migration that occurred during the years 1872–1975 (Bertolini et al., 2012; Mello et al., 2007).

In Maranhão state, three subgenotypes of genotype D were found, D2, D3 and D4. Unexpectedly subgenotype D4 was found in 88% of the cases harboring genotype D, whereas D1 and D2 were found in 3% and 9%, respectively. Subgenotype D4 has previously not been found frequently in Brazil (Mello et al., 2007). Subgenotype D4 has been identified in only a few cases in the Amazonas (Gomes-Gouvea et al., 2009) and Rondônia (Santos et al., 2010), states in the Amazon region of Brazil.

The occurrence of the few cases of HBV/D2 and D3 in Maranhão may be attributed to the internal migration of carriers from other Brazilian regions, where these subgenotypes are prevalent, as occurred in some regions of the Central West and North of the country (Mello et al., 2007; Santos et al., 2010; Souto, 2004). On the other hand, the presence of HBV/D4 in Maranhão is not as a result of European immigration because this subgenotype has not been found in Europe (Schaefer, 2007). Subgenotype D4 is not very common, with a few sequences identified from patients in Australia, Papua New Guinea (Norder et al., 2004), Rwanda (Hubschen et al., 2009) and Canada (Osiowy et al., 2011). In Haiti, HBV/D4 was found as the most frequent subgenotype of genotype D, corresponding to 80% (29/36) of samples classified as HBV/D (36/179) (Andernach et al., 2009) and to 57% (4/7) in another study (Brichler et al., 2013). The presence of HBV/D4 in two different regions in Latin America might reflect its dispersal as a result of the slave trade routes from Africa to Haiti and Brazil (Silva, 2008). The possible African origin of HBV/D4 circulating in Maranhão is supported by the fact that we found an African genotype of hepatitis delta virus (HDV-8) co-infecting two of the patients who were HBV/D4 carriers (Barros et al., 2011). Although currently HBV/D4 has not been reported frequently in Africa, having been described only in Rwanda (Hubschen et al., 2009), it is possible that this subgenotype was distributed in different regions of the African continent in the past. A recombinant of subgenotype D4 has been identified in the Sudan (Yousif et al., 2013). It is possible that D4 originated in Africa but has subsequently been replaced by other subgenotypes of D and the recombinant is a remnant of the original strain/s (Yousif et al., 2013). The fact that HBV/D4 is found in aboriginal populations in Papua New Guinea and Australia (Norder et al., 2004) and in the Canadian Inuit population (Osiowy et al., 2011) suggests that this is an early subgenotype dating from the time of the early human intercontinental migrations (Hudjashov et al., 2007). The HBV/D4 sequences from Maranhão grouped in a specific monophyletic cluster (with high posterior probability), indicating that a single virus entered this population, establishing a founder effect. It is possible that subgenotype D4 has a wider

global distribution and more research is required, especially in Africa, the Americas and Australasia. Moreover, the effect of subgenotype D4 on clinical manifestation has not been researched. In this study we observed that among HBV/D4 carriers the frequency of immune tolerant status was higher than among HBV/A1 carriers. Since there is not a statistically significant difference between the mean age of HBV/A1 and D4 carriers (42 ± 12 vs. 38 ± 13 , $p = 0.13$), HBeAg seroconversion to anti-HBe was a late event in cases of HBV/D4 infection and we may infer that perinatal transmission of the virus occurred in these cases. Studies with larger numbers of individuals infected with this subgenotype are required to confirm this observation.

As expected, the frequency of genotype F in Maranhão was low, corresponding to 5% of the cases. Accordingly, the prevalence of this genotype is low in most of the Brazilian regions and increases in the western Amazon region (Bertolini et al., 2012; Gomes-Gouvea et al., 2009; Mello et al., 2007; Santos et al., 2010; Sitnik et al., 2004; Victoria et al., 2008). Genotype F is considered indigenous to America because it has been found among Amerindians, mainly in South America, and is a most prevalent genotype in some countries of this region (Alvarado Mora et al., 2011; Devesa et al., 2008; Mello et al., 2007; Nakano et al., 2001; Pezzano et al., 2011; Venegas et al., 2008). The low prevalence of HBV genotype F in most of regions of Brazil may be related to a lower contribution of Amerindians to the formation of the Brazilian population, as demonstrated by genomic ancestry studies (Pena et al., 2011).

5. Conclusions

This study shows the distribution of HBV genotypes and subgenotypes in Maranhão state. In this region, the prevalence of HBV genotypes is similar to those reported in other Brazilian regions, where this was studied, with a predominance of genotypes A and D, and a lower prevalence of genotype F. However, the subgenotype distribution shows some specific characteristics, with a high frequency of HBV subgenotype D4 that is uncommon in other regions of Brazil. The great genetic variability of HBV strains circulating in Brazil needs to be taken into account when national guidelines, on how to treat patients with chronic hepatitis B, are formulated.

Acknowledgments

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) – grant 2010/50081-9 and 2010/51208-2; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão – FAPEMA (APP-2009/00950) and Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão – Departamento de Vigilância Epidemiológica.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.007>.

References

- Alvarado Mora, M.V., Romano, C.M., Gomes-Gouvea, M.S., Gutierrez, M.F., Botelho, L., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., 2011. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: a Bayesian inference on the genotype F. *Infect. Genet. Evol.* 11, 103–108.
- Alvarado-Mora, M.V., Botelho, L., Gomes-Gouvea, M.S., de Souza, V.F., Nascimento, M.C., Pannuti, C.S., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., 2011. Detection of Hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhão, Brazil. *Virology* 415, 415.
- Andernach, I.E., Nolte, C., Pape, J.W., Muller, C.P., 2009. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1222–1228.

- Araujo, N.M., Mello, F.C., Yoshida, C.F., Niel, C., Gomes, S.A., 2004. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. *Arch. Virol.* 149, 1383–1395.
- Araujo, N.M., Waizbort, R., Kay, A., 2011. Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: how viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1199–1207.
- Barros, L.M., Gomes-Gouveia, M.S., Pinho, J.R., Alvarado-Mora, M.V., Dos Santos, A., Mendes-Correa, M.C., Caldas, A.J., Sousa, M.T., Santos, M.D., Ferreira, A.S., 2011. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? *Virus Res.* 160, 333–339.
- Bertolini, D.A., Pinho, J.R., Saraceni, C.P., Moreira, R.C., Granato, C.F., Carrilho, F.J., 2006. Prevalence of serological markers of hepatitis B virus in pregnant women from Parana State, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 1083–1090.
- Bertolini, D.A., Gomes-Gouveia, M.S., Guedes de Carvalho-Mello, I.M., Saraceni, C.P., Sitnik, R., Grazziotin, F.G., Laurino, J.P., Fagundes, N.J., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., 2012. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect. Genet. Evol.* J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 12, 1295–1304.
- Braga, W.S., Castilho Mda, C., Borges, F.G., Martinho, A.C., Rodrigues, L.S., Azevedo, E.P., Sczufca, M., Menezes, P.R., 2012. Prevalence of hepatitis B virus infection and carriage after nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 13–17.
- Brichler, S., Lagathu, G., Chekarau, M.A., Le Gal, F., Edouard, A., Deny, P., Cesaïre, R., Gordien, E., 2013. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.* 94, 2318–2329.
- Cooksley, W.G., 2010. Do we need to determine viral genotype in treating chronic hepatitis B? *J. Viral Hepat.* 17, 601–610.
- Devesa, M., Loureiro, C.L., Rivas, Y., Monsalve, F., Cardona, N., Duarte, M.C., Poblete, F., Gutierrez, M.F., Botto, C., Pujol, F.H., 2008. Subgenotype diversity of hepatitis B virus genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J. Med. Virol.* 80, 20–26.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- El Khouri, M., Cordieiro, Q., Luz, D.A., Duarte, L.S., Gama, M.E., Corbett, C.E., 2010. Endemic hepatitis B and C virus infection in a Brazilian Eastern Amazon region. *Arg. Gastroenterol.* 47, 35–41.
- Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186–194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendt, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175–185.
- Gomes-Gouveia, M.S., Soares, M.C.P., Bensabath, G., de Carvalho-Mello, I.M.V.G., Brito, E.M.F., Souza, O.S.C., Queiroz, A.T.L., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., 2009. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *J. Gen. Virol.* 90, 2638–2643.
- Hubschen, J.M., Mugabo, J., Peltier, C.A., Karasi, J.C., Sausy, A., Kirpach, P., Arendt, V., Muller, C.P., 2009. Exceptional genetic variability of hepatitis B virus indicates that Rwanda is east of an emerging African genotype E/A1 divide. *J. Med. Virol.* 81, 435–440.
- Hudjashov, G., Kivisild, T., Underhill, P.A., Endicott, P., Sanchez, J.J., Lin, A.A., Shen, P., Oefner, P., Renfrew, C., Villems, R., Forster, P., 2007. Revealing the prehistoric settlement of Australia by Y chromosome and mtDNA analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 8726–8730.
- Klein, H.S., 1986. Slavery and the Plantation Economy in Brazil and the Guyanas in the 19th Century. African Slavery in Latin America and the Caribbean. Oxford University Press, New York, p. 123.
- Kramvis, A., Kew, M.C., 2005. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J. Viral Hepat.* 12, 456–464.
- Kramvis, A., Paraskevis, D., 2013. Subgenotype A1 of HBV – tracing human migrations in and out of Africa. *Antivir. Ther.* 18, 513–521.
- Kramvis, A., Arakawa, K., Yu, M.C., Nogueira, R., Stram, D.O., Kew, M.C., 2008. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J. Med. Virol.* 80, 27–46.
- Kurbanov, F., Tanaka, Y., Mizokami, M., 2010. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol. Res.* 40, 14–30.
- Lin, C.L., Kao, J.H., 2011. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: recent advances. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26 (Suppl 1), 123–130.
- Mello, F.C., Souto, F.J., Nabuco, L.C., Villela-Nogueira, C.A., Coelho, H.S., Franz, H.C., Saraiva, J.C., Virgolino, H.A., Motta-Castro, A.R., Melo, M.M., Martins, R.M., Gomes, S.A., 2007. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol.* 7, 103.
- Motta-Castro, A.R., Martins, R.M., Araujo, N.M., Niel, C., Facholi, G.B., Lago, B.V., Mello, F.C., Gomes, S.A., 2008. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. *Arch. Virol.* 153, 2197–2205.
- Moura, I.F., Lopes, E.P., Alvarado-Mora, M.V., Pinho, J.R., Carrilho, F.J., 2013. Phylogenetic analysis and subgenotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 14, 195–199.
- Nakano, T., Lu, L., Hu, X., Mizokami, M., Orito, E., Shapiro, C., Hadler, S., Robertson, B., 2001. Characterization of hepatitis B virus genotypes among Yucpa Indians in Venezuela. *J. Gen. Virol.* 82, 359–365.
- Norder, H., Courouce, A.M., Coursaget, P., Echevarria, J.M., Lee, S.D., Mushahwar, I.K., Robertson, B.H., Locarnini, S., Magnius, L.O., 2004. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47, 289–309.
- Osiowy, C., Larke, B., Giles, E., 2011. Distinct geographical and demographic distribution of hepatitis B virus genotypes in the Canadian Arctic as revealed through an extensive molecular epidemiological survey. *J. Viral Hepat.* 18, e11–e19.
- Pena, S.D., Di Pietro, G., Fuchshuber-Moraes, M., Genro, J.P., Hutz, M.H., Kehdy Fde, S., Kohlrausch, F., Magno, L.A., Montenegro, R.C., Moraes, M.O., de Moraes, M.E., de Moraes, M.R., Ojopi, E.B., Perini, J.A., Racciopi, C., Ribeiro-Dos-Santos, A.K., Rios-Santos, F., Romano-Silva, M.A., Sortica, V.A., Suarez-Kurtz, G., 2011. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6, e17063.
- Pereira, L.M., Martelli, C.M., Merchan-Hamann, E., Montarroyos, U.R., Braga, M.C., de Lima, M.L., Cardoso, M.R., Turchi, M.D., Costa, M.A., de Alencar, L.C., Moreira, R.C., Figueiredo, G.M., Ximenes, R.A., 2009. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 240–247.
- Pezzano, S.C., Torres, C., Fainboim, H.A., Bouzas, M.B., Schroder, T., Giuliano, S.F., Paz, S., Alvarez, E., Campos, R.H., Mbayer, V.A., 2011. Hepatitis B virus in Buenos Aires, Argentina: genotypes, virological characteristics and clinical outcomes. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 223–231.
- Santos, A.O., Alvarado-Mora, M.V., Botelho, L., Vieira, D.S., Pinho, J.R., Carrilho, F.J., Honda, E.R., Salcedo, J.M., 2010. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. *Virol. J.* 7, 315.
- Schaefer, S., 2007. Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatol. Res.* 37, S20–S26.
- Silva, D.B.D.d., 2008. The Atlantic Slave Trade to Maranhão, 1680–1846: Volume, Routes and Organisation. Slavery Abolit. 29, 477–501.
- Sitnik, R., Pinho, J.R., Bertolini, D.A., Bernardini, A.P., Da Silva, L.C., Carrilho, F.J., 2004. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2455–2460.
- Sitnik, R., Paes, A., Mangueira, C.P., Pinho, J.R., 2010. A real-time quantitative assay for hepatitis B DNA virus (HBV) developed to detect all HBV genotypes. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 52, 119–124.
- Souto, F.J.D., 1999. Distribution of hepatitis B in Brazil: update of the epidemiologic mapping and proposals for its control. *GED: Gastroenterol. Endoscopia Dig.* 18, 143–150.
- Souto, F.J., 2004. Hepatitis B and the human migratory movements in the State of Mato Grosso, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37 (Suppl 2), 63–68.
- Souza, M.T., Pinho, T.L., Santos, M.D., Santos, A., Monteiro, V.L., Fonseca, L.M., Ferreira, P.A., Ferreira Ade, S., 2012. Prevalence of hepatitis B among pregnant women assisted at the public maternity hospitals of Sao Luis, Maranhao, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 16, 517–520.
- Venegas, M., Munoz, G., Hurtado, C., Alvarez, L., Velasco, M., Villanueva, R.A., Brahm, J., 2008. Prevalence of hepatitis B virus genotypes in chronic carriers in Santiago, Chile. *Arch. Virol.* 153, 2129–2132.
- Victoria, F.d.S., Oliveira, C.M., Victoria, M.B., Victoria, C.B., Ferreira, L.C., 2008. Characterization of HBeAg-negative chronic hepatitis B in western Brazilian Amazonia. *Braz. J. Infect. Dis.* 12, 27–37.
- World Health Organization (WHO), 2002. Global Alert and Response.**
- Yousif, M., Kramvis, A., 2013. Genotype D of hepatitis B virus and its subgenotypes: An update. *Hepatol. Res.* 43, 355–364.
- Yousif, M., Mudawi, H., Bakhiet, S., Glebe, D., Kramvis, A., 2013. Molecular characterization of hepatitis B virus in liver disease patients and asymptomatic carriers of the virus in Sudan. *BMC Infect. Dis.* 13, 328.

ANEXO D – Artigo submetido para publicação

TITLE PAGE

Title: Hepatitis B virus carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naïve patients

Author Names

Michele Soares Gomes-Gouvêa¹ – gomesmic@yahoo.com.br
 Ariana Carolina Ferreira¹ – ariana86carolina@hotmail.com
 Rosangela Teixeira³ – teixeira@medicina.ufmg.br
 José Rubens Andrade³ – dr_jrubens@yahoo.com.br
 Adalgisa de Souza Paiva Ferreira⁴ – adalgisaf@terra.com.br
 Lena Maria Fonseca Barros⁴ – lenafonsecamaria@ibest.com.br
 Rosamar Eulira Fontes Rezende⁵ – rosamarrezende@uol.com.br
 Ana Catharina de Seixas Santos Nasti^{1,2} – ana.cssn@gmail.com
 Andrea Gurgel Batista Leite⁶ – agbleite@gmail.com
 Leonora De Zorzi Piccoli⁶ – noiadzp@gmail.com
 Josiane Galvan⁶ – jgalvan@caxias.rs.gov.br
 Simone Regina Souza da Silva⁷ – simoneconde@interconnect.com.br
 Manoel do Carmo Pereira Soares⁸ – manoelsoares@iec.pa.gov.br
 Dimas Alexandre Kliemann⁹ – dimaskliemann@gmail.com
 Dennis Armando Bertolini¹⁰ – dabertolini18@gmail.com
 Aline Satie Oba Kunyoshi¹⁰ – alineoba@bol.com.br
 André Castro Lyra¹¹ – aclyra@live.com
 Marcio Katsumi Oikawa¹² – moikawa@gmail.com
 Luciano Vieira de Araújo¹³ – lvaraujo@gmail.com
 Flair José Carrilho¹ – ficarril@usp.br
 Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa^{2*} – cassiamc@uol.com.br
 João Renato Rebello Pinho^{1*} – jrrpinho@usp.br

*These two authors share senior authorship.

1 - Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, São Paulo Institute of Tropical Medicine and Department of Gastroenterology, School of Medicine, University of São Paulo, SP, Brazil

2 - Department of Infectious Diseases, Medical School, University of São Paulo, SP, Brazil;

3 - Department of Internal Medicine, Medical School, Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil;

4 - Center of Clinical Research, Federal University of Maranhão, MA, Brazil.

5 - Ambulatório de Hepatites da Secretária Municipal de Saúde de Ribeirão Preto, SP, Brasil;

6 - Serviço Municipal de Infectologia do Centro Especializado de Saúde de Caxias do Sul, RS, Brasil;

7- Santa Casa de Misericórdia do Pará, PA, Brasil;

8 - Serviço de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas, PA, Brasil

9- Hospital Nossa Senhora da Conceição, Serviço de Infectologia.

10 - Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

11 - Federal University of Bahia, Division of Gastroenterology & Hepatology, Department of Medicine, BA, Brazil.

12 - Universidade Federal do ABC - Centro de Matemática, Computação e Cognição, SP, Brazil

13 - Escola de Artes, Ciências e Humanidades- Universidade de São Paulo

Keywords: HBV, resistance, treatment-naïve, nucleos(t)ide analogues, treatment

FOOTNOTE PAGE

Contact Information

Michele Soares Gomes-Gouvêa

Mailing address: Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, Instituto de Medicina Tropical, FMUSP; Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 500; 05403-000 São Paulo, SP, Brazil.

E-mail: gomesmic@yahoo.com.br

List of Abbreviations:

NA, nucleos(t)ide analogues; RT, reverse transcriptase (RT); HBV, hepatitis B virus; CHB, chronic hepatitis B; LAM, lamivudine; TBV, telbivudine; ETV, entecavir; ADV, adefovir; TDF, tenofovir; HIV, human immunodeficiency virus; HBeAg, Hepatitis B e antigen; anti-HBe, antibodies against Hepatitis B e antigen; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PCR, polymerase chain reaction; HBs, Hepatitis B surface protein

Financial Support:

FAPESP (São Paulo Research Foundation): 2010/50081-9 and 2010/51208-2

Alves de Queiroz Family Fund for Research

Abstract

Nucleos(t)ide analogue (NA) treatment causes selection pressure for hepatitis B virus (HBV) strains carrying mutations conferring NA resistance. The selection of these variants is associated with treatment failure. Drug-resistance mutations occur in the reverse transcriptase (RT) region of the HBV polymerase gene and spontaneously arise during viral replication. These mutations can also alter the HBs protein and some reduce binding to HBs antibodies. Therefore, the spread of NA-resistant HBV may impact the efficacy of antiviral treatment and hepatitis B immunization programs. In this study, we used direct sequencing to assess the occurrence of HBV carrying known mutations that confer NA resistance in the largest cohort of treatment-naïve patients with chronic hepatitis B (CHB) to date. HBV DNA was detectable or successfully sequenced in 702 (95.1%) patients; the RT region of these samples was subjected to mutational analysis. There was high genetic variability among the HBV samples analyzed; seven genotypes and 12 subgenotypes were identified. HBV strains harboring mutations conferring NA resistance alone (rtS202G, rtM204V/I, rtA194T, rtM250I, rtA181T/S, rtT184S) or combined with compensatory mutations (rtL80I, rtV173L, rtL180M, rtV207I) were identified in 1.6% (11/702) of the patients. Isolates harboring mutations potentially associated with adefovir resistance (rtS85A, rtL217R, rtI233V, rtN238T, rtN238D, rtN248H, rtV214A, and rtQ215S) or entecavir resistance (rtS219A) were identified in 7.7% (54/702) and 2.6% (16/702) of the patients, respectively. There is a low frequency of HBV NA-resistant strains as major population of HBV quasispecies among CHB treatment-naïve patients in Brazil, as was found in other countries. These findings suggest that the spread and natural selection of drug-resistant HBV is an uncommon event and/or most of these strains remain unstable in the absence of NA selective pressure.

Introduction

Although universal hepatitis B vaccination has lowered the prevalence of hepatitis B virus (HBV) over the past 30 years, it still remains a serious health threat in many regions worldwide (1), where chronic hepatitis B (CHB) patients have higher risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) (2). Global prevalence of HBV infection varies considerably and is divided into high ($\geq 8\%$); intermediate (2–7%), and low ($< 2\%$) endemic areas (1). A recent Brazilian epidemiological study found low (0.37%) prevalence of HBV infection in the capital cities of Northeastern and Central-Western Brazilian states (3). Nevertheless, prevalence of HBV is non-uniform, as infection is hyperendemic in some inland areas of many Brazilian states (1). The Brazilian Ministry of Health estimates that approximately 600,000 people are chronically infected in Brazil (4).

Treatments have been developed and approved for CHB that significantly reduce morbidity and mortality, including two types of interferon (conventional and pegylated- $\alpha 2a$) and five nucleos(t)ide analogues (NA): lamivudine (LAM), telbivudine (TBV), entecavir (ETV), adefovir (ADV), and tenofovir (TDF) (2). Until 2009 in Brazil lamivudine and interferon- α were the only drugs provided by the Brazilian government for CHB treatment. In 2010, nucleos(t)ide analogues (NAs) ADV, ETV, and TNF were incorporated when the Brazilian Ministry of Health also released national guidelines for CHB treatment (5).

NAs competitively bind to the HBV polymerase to inhibit its activity, suppressing replication, but development of drug resistance during long-term therapy is a common problem (6). NA treatment causes selection pressure for HBV strains carrying mutations conferring drug resistance, which is associated with treatment failure (6). Drug-resistance mutations occur in the reverse transcriptase (RT) region of the HBV polymerase gene and spontaneously arise during viral replication. Sequential monotherapy can select for multidrug-resistant HBV strains with mutations in the polymerase gene that can also modify the amino acid sequence of the HBs protein (HBsAg) (6). Some of these mutations in HBsAg reduce binding to HBs antibodies from hepatitis B vaccination, bypassing the neutralizing activity of these antibodies (antibody escape) and successfully infecting HBV-vaccinated individuals. The infectivity of LAM-resistant mutant rtV173L+rtL180M+rtM204V (producing sE164D and sI195M in HBsAg) was demonstrated in vaccinated chimpanzees, thus the spread of HBV-resistant mutants with potential HBs antibody escape may affect antiviral treatment efficacy and hepatitis B immunization programs (7).

HBV with drug resistance mutations has been identified in different countries among cases of acute infection and CHB patients who have never undergone NA treatment (8-26). In Brazil were reported that among CHB patients undergoing NA treatment with LAM monotherapy (66.7%) or combined

with TDF, ADV, or ETV (14.7%), 54% were infected with HBV strains harboring drug resistance mutations and most (55.6%) exhibited viral loads above 10^5 copies/mL (27). The extent to which these HBV strains have spread and their transmission in our country are still unknown. Therefore in this study we assessed the occurrence of HBV with known mutations conferring NA resistance in a large cohort of CHB treatment-naïve patients by direct sequencing.

Patients and methods

Patients

This study included serum samples isolated from 779 CHB patients who were followed at eight centers located in different Brazilian regions (Figure 1). The samples were collected between 2006 and 2011 and all of the patients tested negative for human immunodeficiency virus (HIV) and had never been exposed to any oral anti-HBV drugs. The ethics committees approved this study and written informed consent was obtained from all of the patients. Hepatitis B e antigen (HBeAg) and its antibodies (anti-HBe) were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits (DiaSorin, Italy).

HBV DNA extraction and quantification

HBV DNA was extracted from 200 μ L of serum samples using a QiaAmp DNA mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and the extracted DNA was eluted in 50 μ L of elution buffer. HBV DNA was detected and quantified by real-time PCR assay (28).

HBV polymerase gene (RT region) characterization

We characterized the HBV polymerase sequences in all of the samples with detectable HBV DNA. Initially, a fragment (1,306 bp) of HBV polymerase covering the entire RT region (344 amino acids) was amplified by nested PCR. Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and the following primers were used in the PCR amplifications: PS3132F (5' CCT CCY GCH TCY ACC AAT CG 3'; nt 3132 – 3151) and 2920RM (5' ACG TCC CKC GHA GRA TCC AG 3'; nt 1417 – 1398) for the first round; and PS3201F (5' CAY CCH CAG GCM ATG CAG TGG 3'; nt 3201 – 3221) and P1285R (5' CWA GGA GTT CCG CAG TAT GG 3'; nt 1285 – 1266) for the second round. There were 35 cycles for both rounds, as follows: 94 °C for 30 seconds, 48 °C (first round) or 54 °C (second round) for 30 seconds, and 72 °C for 1 minute and 40 seconds.

The amplified PCR products were purified using an ExoSAP-IT PCR Clean-up kit (GE Healthcare) and then sequenced using a BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Three inner and partially overlapping sequences were obtained in forward and reverse directions (six

total) using the following three primer pairs: 1 - PS3201F and HBV477R (5' GGA CAV ACG GGC AAC ATA CCT T 3'; nt 477 – 456); 2 - L372 (5' - TCG YTG GAT GTR TCT GCG GCG TTT TAT - 3'; nt 370 – 396) and RADE2M (5' - TGR CAN ACY TTC CAR TCA ATN GG - 3'; nt 989 – 970); 3 - P781F (5' GAR TCC CTT TWT RCC KCT RTT ACC 3'; nt 781 – 804), and P1285R. We sequenced the DNA using an automated ABI 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Genotyping and HBV polymerase sequence analysis

The quality of each electropherogram was evaluated using the Phred-Phrap software, and consensus sequences were obtained by aligning six sequences per patient using the web-based CAP3 software available on the Embrapa website (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

The sequences were aligned and edited using the BioEdit software (v. 7.0.8) and the integrated CLUSTALW program. HBV genotypes and subgenotypes were determined by phylogenetic analysis using published sequences available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) as reference sequences.

To analyze the mutations, the nucleotide sequences were translated to amino acids and compared with a dataset containing sequences representing the different known subgenotypes and genotypes. The consensus sequences were constructed based on the most frequent amino acid found at each position. Differences between each sequence and consensus reference genotype/subgenotype sequence were classified as mutations.

The analysis of mutations in the HBV polymerase RT region was limited to amino acids from domains A to E, including those located between domains B–C and C–D, where the presence of specific mutations is associated with NA resistance. Each amino acid in the polymerase RT region was numbered following the previously standardized genotype-independent numbering system (29).

Results

Virological characteristics of the study patients

HBV DNA was detectable in 741 (95.1%) treatment-naïve CHB patients analyzed and RT region was successfully amplified and/or sequenced in 702 of these samples, which were subjected to mutational analysis. These patients were from different regions of Brazil (Figure 1).

The median HBV DNA level among these 702 samples was 3.8 log₁₀ IU/mL (1.7 – 7.9 log₁₀ IU/mL), but it was not possible to accurately measure the viral load in 60 samples because the HBV DNA levels were higher than the linear range of the assay (> 8 log₁₀ IU/mL).

Among the patients with detectable HBV DNA, from 678 we had enough serum samples to determine HBeAg/Anti-HBe serological status. HBeAg was negative and Anti-HBe was positive in 84.1% (570/678) of the patients.

There was high genetic variability in the HBV samples analyzed in this study; seven genotypes and twelve subgenotypes were identified. HBV/A1 was the most frequent (63.7%, 447/702), followed by HBV/D3 (14.5%, 102/702). The remaining genotypes and subgenotypes were identified and their frequencies were as follows: A2 (3.3%, 23/702), A3 (0.1%, 1/702), B1 (0.1%, 1/702), B2 (0.1%, 1/702), C2 (0.9%, 6/702), D1 (0.9%, 6/702), D2 (4.6%, 32/702), D4 (5.1%, 36/702), D unclassified subgenotype (0.7%, 5/702), E (0.6%, 4/702), F2a (4.6%, 32/702), F4 (0.4%, 3/702), and G (0.4%, 3/702).

RT sequence variability

Based on the constructed genotype/subgenotype consensus sequences, 39% (276/702) of the samples had HBV with at least one mutation in the polymerase RT region. Most of these samples (66.3%, 183/276) had strains harboring mutations in only one of the RT domains or interdomains here analyzed. Mutations were observed in 56 of the 107 positions analyzed and among the regions examined, the C–D interdomain (amino acids 211–229) was most variable with mutations in 14 (73.7%) of its 19 positions (Table 1).

Figures 2 and 3 display the mutations found at these positions and their frequencies among the HBV strains characterized in this study. Considering all of the positions containing mutations, five (rt194, rt207, rt221, rt238, and rt253) exhibited higher polymorphism with four to six different mutations (Figures 2 and 3). In half of the positions (50%; 28/56), only one type of mutation was observed; 23.2% (13/56) exhibited two mutation types, and 5.4% (3/56) exhibited three mutation types (Figures 2 and 3). In 21 out of these 56 mutated positions, the mutations were associated with total (rt181, rt184, rt202, rt204, and rt250) or partial NA resistance (rt194); compensatory functions (rt80, rt173, rt180, and rt207); potentially related with adefovir resistance (rt84, rt85, rt214, rt215, rt217, rt218, rt233, rt237, rt238, and rt248), or entecavir resistance (rt219) (Figure 2).

Nucleotide analogue-related resistance mutations

In this study, we identified HBV strains harboring mutations that confer NA resistance in 1.6% (11/702) of the patients. Moreover, some of these strains also had compensatory mutations. Table 2 shows the resistance mutations observed in these samples, alterations in the corresponding codon of the HBs, HBV DNA levels, subgenotype, and the NA resistance profile. HBV DNA with

compensatory mutations alone (rtL180M/ rtV173L + rtL180M/ rtV207I) were found in 0.4% (3/702) of the patients.

Isolates harboring mutations potentially associated with adefovir resistance (rtS85A, rtL217R, rtI233V, rtN238T, rtN238D, rtN248H, rtV214A, rtQ215S) were identified in 7.7% (54/702) of the patients. Among these adefovir-related mutations, rtQ215S was the most frequent (13/54), followed by rtI233V (11/54). rtL217R was not considered a mutation in HBV/A2 cases because arginine (R) in this position is characteristic of HBV/A2 wild-type strain.

HBV strains with the rtS219A mutation were identified in 2.6% (16/702) of the patients. This mutation has been proposed as potentially related to entecavir resistance (30).

HBV samples from 7.3% (51/702) of the patients contained rare amino acid substitutions at positions rt84, rt181, rt194, rt214, rt215, rt218, rt219, rt233, rt237, rt238, and rt248 (Figure 3).

Discussion

Using the largest sample size to date (n=702), we investigated the occurrence of HBV with NA resistance mutations among CHB treatment-naïve patients. These patients were from different geographic regions in Brazil. Fifteen genotypes or subgenotypes were found among the patients, as follows: most (63.7%) of the strains were characterized as HBV/A1, followed by HBV/D3 (14.5%) subgenotype. HBV/A2, D2, D4, and F2a each had approximate frequencies ranging from 3.3 to 5.1% and the other strains identified (A3, B1, B2, C2, D1, D unclassified subgenotype, E, F4, and G) made up the remaining <5%. These results corroborate previously published data on HBV genotype distribution in Brazil and therefore confirm that the samples included in this study are representative of the HBV strains circulating within this country (31, 32). We also show that there is high genetic variability among HBV genotypes circulating in Brazil.

In the present study, we used population sequencing (direct PCR sequencing) to characterize the polymerase gene of the HBV strains, which detects the major population of HBV quasispecies (6, 29). Our results show that the presence of HBV strains harboring mutations in the polymerase RT region (domains A–E and interdomains B–C/C–D) is frequent among treatment-naïve patients, as 39% (276/702) of them were infected by HBV with at least one mutation. On the other hand, patients infected by HBV strains with mutations that impact NA resistance are less frequent. Only 1.6% (11/702) of the patients had HBV strains with mutations associated with NA resistance alone (rtS202G, rtM204V/I, rtA194T, rtM250I, rtA181T/S, and rtT184S) or together with compensatory mutations (rtL80I, rtV173L, rtL180M, and rtV207I). The mutation patterns in the HBV strains in nine of these patients confer total or partial

resistance to lamivudine, adefovir, entecavir, or tenofovir (Table 2). We identified mutations (rtT184S or rtM250I) related with entecavir resistance in two patients (33), which when combined with the presence of rtM204V/I has clinical effects, but this mutation was not observed in these cases. Whether these patients would develop resistance to entecavir if they were treated with this drug remains unknown.

Recent studies using population sequencing with HBV treatment-naïve patients from different countries have described frequencies of HBV strains with drug resistance mutations (NA resistance) ranging from 0 to 5.1%, only considering mutations with clear clinical significance (8-15, 17-23, 26). Just one study in South Africa that analyzed the presence of lamivudine-resistance mutations (at the YMDD motif) in samples from untreated HBV mono-infected and HBV/HIV co-infected patients found a higher frequency of drug-resistant HBV strains: 20% in mono-infected and 50% in co-infected patients (34). This high mutation rate can be related to regional characteristics of the infection (frequency of the different viral genotypes), epidemiological data (frequency of sexual and other transmission pathways), AIDS prevalence (implying higher frequency of use of drugs indicated for HIV infection, such as lamivudine), and disease management (frequency of monitoring treatment efficacy for both viral infections). We may infer that the presence of HBV drug resistance mutations is very different in countries with high HIV prevalence compared to those where HBV infection is less frequent.

HBV DNA replication involves reverse transcription of an intermediate RNA, allowing for mismatches to occur because HBV polymerase lacks a proofreading function. NA treatment causes selection pressure for NA-related mutations during this process (6). However, HBV strains harboring resistance mutations in untreated CHB patients may spontaneously arise and become dominant via other selection pressures (e.g., immunological pressure exerted on the overlapping surface antigen expressing gene) or may be directly acquired as the infecting strain from a patient under antiviral treatment. A study using pyrosequencing characterized the HBV population in NA-treated patients (86.4% LAM and 13.6% LAM + ADV or TDF) and found that the wild-type virus remained undetected in 76% of the patients carrying drug-resistant strains (35). These results suggest that HBV carriers undergoing NA treatment can be sources of infection for susceptible individuals, transmitting exclusively HBV strains that are drug-resistant mutants. The ability to transmit HBV with rtV173L+rtL180M+M204V mutations that confer LAM resistance was demonstrated in a chimpanzee model and in other studies reporting acute infection with drug-resistant HBV strains (16, 24, 25).

The selection of compensatory mutations improves the replication in resistant viruses and establishes resistance mutations in the HBV genetic archive in the hepatocyte nuclei as covalent closed circular DNA (cccDNA) (36), explaining how resistant strains may be maintained and transmitted to other

patients. The higher replication levels of these resulting HBV strains in patients undergoing continued therapy may increase the viral load, favoring transmission of resistant strains with higher fitness and increasing the odds of perpetuating them within those newly-infected. On the other hand, in the absence of compensatory mutations, the poor stability and impaired replicative fitness of these drug-resistant HBV strains may explain their low frequencies, even as minor population, in non-NA-treated patients.

Drug-resistant HBV variants as major population in untreated patients may affect the efficacy and outcome of NA treatment when it is introduced. Although rare, it is important to consider that primary treatment failure may result from pre-existing drug-resistant HBV variants and that the spread of these mutants must be continually assessed.

Monitoring the spread of these mutants is also important because of their ability to infect hepatitis B vaccinated individuals. Some nucleotide mutations in the overlapping genes S and POL can alter the amino acids in polymerase and HBs proteins. These changes occur more frequently at the carboxy-terminus of HBsAg, some of them leading to altered virus secretion, altered infectivity, and HBs antibody escape (6, 37). Among the HBV strains harboring NA resistance and/or compensatory mutations identified in this study, we also found mutations in the HBs protein (sE164D, sW172STOP, sI195M, sW196S, sW196STOP, sM198I, and sW199L) that are related to reduced binding to HBs antibodies (38).

Adefovir resistance is mainly mediated by mutations rtN236T or rtA181V/T (29), but several other mutations (rtL80V/I, rtV84M, rtS85A, rtV214A, rtQ215S, rtL217R, rtE218G, rtI233V, rtP237H, rtN238T/D/R, rtT240Y, and rtN248H) have also been suggested as potentially involved (39-44). Seven (rtS85A, rtV214A, rtQ215S, rtL217R, rtI233V, rtN238T, rtN238D, and rtN248H) of these 14 mutations were found in HBV strains isolated from treatment-naïve patients included in this study. HBV strains harboring any of these mutations were found in 7.7% (54/702) of the patients and among them the mutations rtQ215S and rtI233V occurred more frequently, 1.9% and 1.6%, respectively. Other studies have found these mutations in treatment-naïve patients and some are suggested to represent natural polymorphisms common in some genotypes (45-47). The rtL217R mutation is characteristic of HBV/A2 subgenotype and alterations at rt215 and rt233 positions seem more common among HBV genotype D (45, 48). In our study, we also observed that HBV genotype D sequences exhibited more frequent alterations at these positions and at others related to adefovir resistance, i.e., positions rt214 and rt238 (Figure 2). Finally, other clinical studies have demonstrated that response to adefovir treatment remained unaffected by the presence of some of these mutations at baseline, and *in vitro* tests showed that they neither impair viral replication efficiency nor susceptibility to adefovir (45, 46, 49). As adefovir, a less potent drug, was commonly used in North America and Europe, where genotype D was very

frequent, it is not surprising that many mutations were initially described and most likely only represent viral polymorphisms.

Additionally we observed different amino acid substitutions at positions rt84, rt181, rt194, rt214, rt215, rt218, rt219, rt233, rt237, rt238, and rt248 than those usually described (Figure 3). Fifty-one (7.3%) patients were infected with HBV strains harboring some uncommon mutations at these amino acid positions.

The role of the aforementioned mutations in NA treatment failure remains unclear and needs to be clarified, considering the genetic background of specific strains. Some studies have shown that individual mutations, although fundamentally crucial, are not enough to explain varied therapy results (50). Similarly, the role of the rtS219A mutation in entecavir resistance must be further evaluated because it was found in HBV strains from 2.6% of the treatment-naïve patients included in our study.

In summary, this study showed that HBV strains harboring resistance mutations can comprise the major population of HBV quasispecies in treatment-naïve patients. In Brazil, there is a very low frequency of untreated patients who are infected with these strains. These findings suggest that the spread and natural selection of drug-resistant HBV is an uncommon event and/or most of these strains remain unstable in the absence of NA selective pressure.

This study generates important information about the characteristics of RT sequences of HBV strains circulating in some Brazilian regions among treatment-naïve patients. This information will be useful in evaluating the treatment guidelines and determining if the mutations identified in a specific HBV sequence isolated from a CHB patient are common polymorphisms or represent potentially new drug resistance mutations.

Figure legends

Figure 1 – Sample contribution (%) according to Brazilian states.

Figure 2 – Mutations related to nucleo(s)tide analogue (NA) resistance in hepatitis B virus (HBV) polymerase gene (RT region – domains A–E and interdomains B–C, C–D) from HBV DNA samples isolated from 702 treatment-naïve chronic hepatitis B (CHB) patients. First column shows the RT region analyzed; column 2 shows the positions where mutations that act in NA resistance or have been suggested as potentially involved in adefovir or entecavir resistance were found; columns 3–17 show the amino acid found at each position according to genotype or subgenotype and the superscripts represent the frequency of each mutation; and column 18 shows the amino acid at each position and the overall frequency of each mutation (superscripts).

The consensus amino acids for each genotype or subgenotype are bolded on the first line of each position and the mutations found are shown in color according to their role, as follows: mutations conferring total or partial NA resistance (red); compensatory mutations (green); mutations suggested as potentially involved in adefovir or entecavir resistance (blue); new mutation patterns observed at these positions (black).

Figure 3 – Mutations not associated with nucleo(s)tide analogue (NA) resistance in hepatitis B virus (HBV) polymerase gene (RT region – domains A–E and interdomains B–C, C–D) from HBV DNA samples isolated from 702 treatment-naïve chronic hepatitis B (CHB) patients.

First column shows the RT region analyzed; column 2 shows the positions where mutations were found; columns 3–17 show the amino acid found at each position according to genotype or subgenotype and the superscripts represent the frequency of each mutation; column 18 shows the amino acid at each position and the overall frequency of each mutation (superscripts). The consensus amino acids for each genotype or subgenotype are bolded on the first line of each position and the mutations are shown in black.

Figure 1

Figure 2-

RT Region	Position	HBV/A1 (N=447)	HBV/A2 (N=23)	HBV/A3 (N=1)	HBV/B1 (N=1)	HBV/B2 (N=1)	HBV/C2 (N=6)	HBV/D1 (N=6)	HBV/D2 (N=32)	HBV/D3 (N=102)	HBV/D4 (N=36)	HBV/D (N=5)	HBV/E (N=4)	HBV/F2a (N=32)	HBV/F4 (N=3)	HBV/G (N=3)	Total (702)
Domain A (aa 75 - 91)	80	L	L	L	L	L	L	L	L ^{3.1}	L	L	L	L	L	L	L	L ^{0.1}
	84	V ^{0.2}	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V ^{0.1}
	85	S ^{0.4}	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S ^{0.3}
Domain B (aa 163 - 189)	173	V	V ^{0.7}	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V ^{0.3}
	180	L ^{0.2}	L ^{0.3}	L	L	L	L	L	L ^{0.2}	L	L	L	L	L ^{0.1}	L	L	L ^{0.7}
	181	A ^{0.2}	A	A	A	A	A	A	A	A ^{1.0}	A	A	A	A	A	A	A ^{0.1}
	184	T ^{0.2}	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T ^{0.1}
Interdomain B - C (aa 190 - 199)	194	A ^{0.2}	A	A	A	A	A	A	A	A ^{1.0}	A	A	A	A ^{0.1}	A	A	A ^{0.3}
		T ^{0.2}															T ^{0.1}
Domain C (aa 200 - 210)	202	S	S	S	S	S	S	S	S	S ^{0.2}	S	S	S	S	S	S	S ^{0.3}
	204	M ^{0.2}	M	M	M	M	M	M	M ^{0.1}	M ^{0.2}	M	M	M	M ^{0.1}	M	M	M ^{0.3}
	207	V ^{0.9}	V	V	V	V	V	V	V	V ^{1.0}	V	V	V	L	L ^{0.3}	V	V ^{0.8}
Interdomain C-D (aa 211 - 229)	214	V ^{0.9}	V	V	V	V	V	V ^{0.7}	V	V ^{0.9}	V	V	V	V	V	V	V ^{0.1}
		A ^{0.9}								A ^{1.0}							A ^{0.9}
		E ^{0.2}								E ^{0.2}							E ^{0.3}
	215	Q ^{0.4}	Q	Q	Q	Q	Q	Q ^{0.7}	Q ^{0.4}	Q ^{0.8}	Q ^{0.8}	Q ^{0.2}	Q	Q ^{0.1}	Q	Q	Q ^{0.6}
		H ^{0.4}						H ^{0.7}	H ^{0.4}	H ^{0.8}	H ^{0.8}	H ^{0.2}	H	H ^{0.1}	H	H	H ^{0.6}
		S ^{0.4}						S ^{0.7}	S ^{0.4}	S ^{0.8}	S ^{0.8}	S ^{0.2}	S	S ^{0.1}	S	S	S ^{0.6}
Domain D (aa 230 - 241)	217	L ^{0.4}	R	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L ^{0.1}
	218	E ^{0.7}	E	E	E	E	E	E	E ^{0.1}	E	E	E	E	E	E	E	E ^{0.6}
	219	S ^{1.6}	S ^{0.3}	S	S	S	S	S	S ^{0.3}	S ^{0.2}	S	S ^{0.2}	S	S ^{0.1}	S	S	S ^{0.3}
		T ^{0.2}															T ^{0.1}
	229	L ^{0.7}	L	L	L	L	L	L ^{0.7}	L	L ^{0.2}	L ^{0.2}	L	L	L ^{0.1}	L	L	L ^{1.0}
Domain E (aa 247 - 257)	233	I ^{0.2}	I	I	I	I	I	I ^{0.7}	I ^{0.4}	I ^{0.9}	I ^{0.8}	I ^{0.2}	I	I	I	I	I ^{1.6}
		V ^{0.2}						V ^{0.7}	V ^{0.4}	V ^{0.9}	V ^{0.8}	V ^{0.2}	V	V	V	V	V ^{0.1}
	237	P	P	P	P	P	P	P	P	P ^{1.0}	P	P	P	T ^{0.1}	T	P	P ^{0.1}
	238	N ^{1.6}	N	N	H	H	N	N ^{0.3}	N ^{0.1}	N ^{0.9}	N	N	N	S ^{0.1}	S ^{0.3}	N	N ^{0.1}
Domain E (aa 247 - 257)	248	H ^{0.9}						H ^{0.3}	H ^{0.1}	H ^{0.9}	H	H ^{0.2}	H	H ^{0.1}	H	H	H ^{0.7}
	250	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M ^{0.1}	M	M	M ^{0.1}

RT Region	Position	HBV/A1 (N=447)	HBV/A2 (N=23)	HBV/A3 (N=1)	HBV/B1 (N=1)	HBV/B2 (N=1)	HBV/C2 (N=6)	HBV/D1 (N=6)	HBV/D2 (N=32)	HBV/D3 (N=102)	HBV/D4 (N=36)	HBV/D (N=5)	HBV/E (N=4)	HBV/F2a (N=32)	HBV/F4 (N=3)	HBV/G (N=3)	Total (702)
Domain A (aa 75 - 91)	76	N D 1.8	N	N	N	N	N	N D 16.7	N D 3.1	N D 7.8	N	N D 20.0	N	N	N	N	N D 2.7
	78	S	S	S	S	S	S	S T 3.1	S	S	S Y 2.8	S	S	S T 6.3	S	S	S T 0.4 Y 0.1
	79	W V 0.2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W V 0.1
	88	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F Y 2.8	F	F	F	F	F	F Y 0.1
	91	I	I	I	L	I	I	L I 16.7	L I 15.8	L I 23.5	L	L I 20.0	L	L	L	I	L
Domain B (aa 163 - 189)	163	I	V	I	I	I	I	I	I	I V 3.9	I V 8.3	I	I	I	I	I	I V
	164	L M 1.1	L	L	L	L	L	L M 16.7	L	L M 5.9	L M 8.3	L	L	L	L	L	L M
	175	L I 0.2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L I 0.1
	183	F L 0.7	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F L 0.4
	185	S G 0.2	S	S	S	S	S	S G 6.3	S G 1.0	S	S	S	S	S	S T 33.3	S	S G 0.6 T 0.1
	186	A S 0.4 T 0.2	A	A	A	A	A	A	A S 2.0	A	A	A	A	A	A	A	A S 0.6 T 0.1
	187	I L 1.8 V 0.7	I L 4.3	I	I	I	I	I L 16.7	I L 6.3	I L 2.9 V 2.9	I	I	I	I	I	I	I L 2.1 V 0.9
	188	C Y 0.2	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C Y 0.1
Interdomain B - C (aa 190 - 199)	190	V	V	V	V	V	V	V	V	V M 1.0	V	V	V	V M 3.1	V	V	V M 0.3
	191	V I 0.7	V I 8.7	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V I 25.0	V	V	V	V I 0.9
	197	H N 0.2	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H N 0.1
	199	L V 0.2	L	L	L	L	L	L V 3.1	L	L	L	L	L	L	L	L	L V 0.3
Domain C (aa 200 - 210)	205	D N 0.2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D N 0.1
	209	L	L	L	L	L	L	L V 16.7	L	L	L	L	L	L	L	L	L V 0.1
Interdomain C-D (aa 211 - 229)	211	A T 0.4	A	A	A	A	A	A T 16.7	A T 6.3	A T 2.0	A	A	A	A	A	A	A T 1.0
	212	K R 1.1	K	K	K	K	K	K	K	K N 2.9	K	K	K	K	K	K	K R 0.7 N 0.4
	213	S T 0.9	S T 4.3	S	S	S	S	S T 16.7	S T 6.3	S T 1.0	S T 5.6	S	S T 25.0	S	S	S	S T 1.7
	220	L I 0.4	L	L	L	L	L	L	L	L I 1.0	L	L	L	L	L	L	L I 0.6
	221	Y F 0.7 C 0.2	Y	Y	Y	Y	F	F Y 16.7	F Y 6.3	F Y 5.9 S 1.0	F Y 2.8	F Y 20.0	Y	Y	Y	Y	F Y 0.1 S 0.1 C 0.1
	222	T A 0.2 S 0.2	T	T	A	T	T	T S 3.1	T S 1.0	T	T	T	T	T	T	T	T A 0.4 S 0.1
	225	T S 0.2	T A 4.3	T	T	T	T	T I 16.7	T	T S 2.0	T	T	T	T	T	T	T S 0.4 I 0.1 A 0.1
	226	N T 0.4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N T 0.3
Domain D (aa 230 - 241)	231	L	L	L	L	L	L	L V 16.7	L	L	L	L	L	V	V	L	L V
	234	H Q 0.7	H	H	H	H	H	H	H	H N 1.0	H	H	H	H	H	H	H Q 0.4 N 0.1
	235	L	L	L	L	L	L	L I 16.7	L	L I 2.9	L	L	L	L	L	L	L I 0.6
	241	K Q 0.4 R 0.2	K	K	K	K	K	K	K	K R 2.0	K	K	K	K	K	K	K R 0.4 Q 0.3
Domain E (aa 247 - 257)	253	V I 12.8 A 0.4 T 0.4	I	I	V	V	V E 16.7	V	V S 3.1	V I 1.0	V	V	V	V	V I 33.3	V	V I 0.3 A 0.3 T 1.1 E 0.1
	256	S	S	S	S	S	S C 16.7	C S 16.7 G 16.7	C S 3.1	C S 10.8 G 3.9	C S 5.6 G 2.8	C S 20.0	S	S	S	S	S C 0.9
	257	W	W	W	W	W	W	Y	Y H 3.1 F 3.1 Q 3.1	Y H 9.8	W	Y F 20.0	W	W	W	W	W Y 1.6 H 0.3 F 0.1 Q 0.1

Tables

Table 1 – Frequency of mutations in each transcriptase region domain of hepatitis B virus (HBV) polymerase

RT domain	No. of analyzed positions	No. of positions with mutations (%)	Positions with mutations
A (aa 75 - 91)	17	8 (47.1%)	rt76, rt78, rt79, rt80, rt84, rt85, rt88, rt91
B (aa 163 - 189)	27	12 (44.4%)	rt163, rt164, rt173, rt175, rt180, rt181, rt183, rt184, rt185, rt186, rt187, rt188
INTER B-C (aa 190 - 199)	10	5 (50%)	rt190, rt191, rt194, rt197, rt199
C (aa 200 - 210)	11	5 (45%)	rt202, rt204, rt205, rt207, rt209
INTER C-D (aa 211 - 229)	19	14 (73.7%)	rt211, rt212, rt213, rt214, rt215, rt217, rt218, rt219, rt220, rt221, rt222, rt225, rt226, rt229
D (aa 230 - 241)	12	6 (50%)	rt231, rt233, rt234, rt235, rt237, rt238, rt241
E (aa 247 - 257)	11	5 (45.5%)	rt248, rt250, rt253, rt256, rt257

Table 2 – Virological and resistance profile of patients infected with hepatitis B virus (HBV) strains harboring mutations conferring resistance to nucleo(s)tide analogue (NA) treatment

Samples	Viral load (log ₁₀ UI/ml)	Subgenotype	Resistance mutation in HBV polymerase RT region	HBsAg corresponding changes	HBeAg/ Anti-HBe status	Resistance profile			
						LMV	ADV	ETV	TNF
MA_8052	2.3	D3	rtL180M + rtS202G + rtM204V	sl195M	Neg/Pos	R	S	R	S
MA_8075	2.3	D3	rtL180M + rtS202G + rtM204V	sl195M	Neg/Pos	R	S	R	S
MA_8130	2.7	A1	rtA194T	no change in HBsAg	Neg/Pos	I	S	S	I
MG_206	4.2	F2a	rtL180M + rtM204I	sW196S	Pos/Neg	R	S	I	S
PA_16726	3.9	F2a	rtM250I	after the end of HBsAg	Neg/Pos	S	S	S	S
PA_16727	ND	A1	rtL180M + rtM204V + rtV207I	sl195M + sM198I + sW199L	Neg/Pos	R	S	I	S
PA_17071	6.0	A1	rtA181T + rtD205N	sW172STOP + sW196STOP	Neg/Pos	R	R	S	I
RP_54	2.2	D3	rtA181S	sW172F	Neg/Pos	R	R	S	I
SP_125	8.3	D2	rtL80I + rtM204I	sW196L	Pos/Neg	R	S	I	S
SP_15	2.7	F2a	rtA194T	no change in HBsAg	Neg/Pos	I	S	S	I
SP_81	3.3	A1	rtT184S	sL176V	Neg/Pos	S	S	S	S

Abbreviations:

S= sensitive; R= resistant, I= intermediary; ND= not determined

References

1. Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis* 2010;14:1-21, vii.
2. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 2009;50:661-662.
3. Pereira LM, Martelli CM, Merchan-Hamann E, Montarroyos UR, Braga MC, de Lima ML, Cardoso MR, et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:240-247.
4. Ministério da Saúde. Hepatites Virais no Brasil: Situação, Ações e Agenda. In: Departamento de DST AeHVSdVneSd, editor.; 2011.
5. Ministério da Saúde. Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for the Treatment of Chronic Viral Hepatitis and Coinfections. In: Departamento de DST AeHVSdVneSd, editor.; 2010.
6. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009;137:1593-1608 e1591-1592.
7. Kamili S, Sozzi V, Thompson G, Campbell K, Walker CM, Locarnini S, Krawczynski K. Efficacy of hepatitis B vaccine against antiviral drug-resistant hepatitis B virus mutants in the chimpanzee model. *Hepatology* 2009;49:1483-1491.
8. Alvarez Estevez M, Chueca-Porcuna N, Guillot-Suay V, Pena-Monje A, Garcia-Garcia F, Garcia-Garcia F. [Low prevalence of hepatitis B virus primary drug resistance in Southern Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013;31:520-522.
9. Han Y, Huang LH, Liu CM, Yang S, Li J, Lin ZM, Kong XF, et al. Characterization of hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in Chinese treatment naive patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:1417-1423.
10. Ismail AM, Samuel P, Eapen CE, Kannangai R, Abraham P. Antiviral resistance mutations and genotype-associated amino acid substitutions in treatment-naive hepatitis B virus-infected individuals from the Indian subcontinent. *Intervirology* 2012;55:36-44.
11. Jardi R, Rodriguez-Frias F, Schaper M, Ruiz G, Elefsiniotis I, Esteban R, Buti M. Hepatitis B virus polymerase variants associated with entecavir drug resistance in treatment-naive patients. *J Viral Hepat* 2007;14:835-840.
12. Li XG, Liu BM, Xu J, Liu XE, Ding H, Li T. Discrepancy of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase between nucleos(t)ide analogue-untreated and -treated patients with chronic hepatitis B in a hospital in China. *J Med Virol* 2012;84:207-216.
13. Liu BM, Li T, Xu J, Li XG, Dong JP, Yan P, Yang JX, et al. Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naive Chinese patients. *Antiviral Res* 2010;85:512-519.

14. Mantovani N, Cicero M, Santana LC, Silveira C, do Carmo EP, Ferreira PR, Caseiro MM, et al. Detection of lamivudine-resistant variants and mutations related to reduced antigenicity of HBsAg in individuals from the cities of Santos and Sao Paulo, Brazil. *Viol J* 2013;10:320.
15. Mohebbi SR, Amini-Bavil-Olyae S, Zali N, Damavand B, Azimzadeh P, Derakhshan F, Sabahi F, et al. Characterization of hepatitis B virus genome variability in Iranian patients with chronic infection, a nationwide study. *J Med Virol* 2012;84:414-423.
16. Morando F, Rosi S, Fasolato S, Cavallin M, Gola E, Gatta A, Angeli P. Severe acute hepatitis B in a treatment-naive patient with antiviral drug resistant mutations in the polymerase gene. *J Med Virol* 2013;85:210-213.
17. Nguyen MH, Garcia RT, Trinh HN, Nguyen HA, Nguyen KK, Nguyen LH, Levitt B. Prevalence of hepatitis B virus DNA polymerase mutations in treatment-naive patients with chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:1150-1158.
18. Pollicino T, Isgro G, Di Stefano R, Ferraro D, Maimone S, Brancatelli S, Squadrito G, et al. Variability of reverse transcriptase and overlapping S gene in hepatitis B virus isolates from untreated and lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients. *Antivir Ther* 2009;14:649-654.
19. Salpini R, Svicher V, Cento V, Gori C, Bertoli A, Scopelliti F, Micheli V, et al. Characterization of drug-resistance mutations in HBV D-genotype chronically infected patients, naive to antiviral drugs. *Antiviral Res* 2011;92:382-385.
20. Sayan M, Akhan SC. Antiviral drug-associated potential vaccine-escape hepatitis B virus mutants in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2011;15:e722-726.
21. Sayan M, Akhan SC, Meric M. Naturally occurring amino-acid substitutions to nucleos(t)ide analogues in treatment naive Turkish patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2010;17:23-27.
22. Sayan M, Senturk O, Akhan SC, Hulagu S, Cekmen MB. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2010;14 Suppl 3:e136-141.
23. Singla B, Chakraborti A, Sharma BK, Kapil S, Chawla YK, Arora SK, Das A, et al. Hepatitis B virus reverse transcriptase mutations in treatment Naive chronic hepatitis B patients. *J Med Virol* 2013;85:1155-1162.
24. Trevino A, Soriano V, Madejon A, Rodriguez C, Barros C, Botecchia M, Tuma P, et al. Short communication: transmission of hepatitis B viruses with lamivudine resistance mutations in newly diagnosed HIV individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:1273-1276.
25. Xu Z, Liu Y, Xu T, Chen L, Si L, Wang Y, Ren X, et al. Acute hepatitis B infection associated with drug-resistant hepatitis B virus. *J Clin Virol* 2010;48:270-274.

26. Zheng J, Zeng Z, Zhang D, Yu Y, Wang F, Pan CQ. Prevalence and significance of Hepatitis B reverse transcriptase mutants in different disease stages of untreated patients. *Liver Int* 2012;32:1535-1542.
27. Mello FC, Fernandes CA, Gomes Sde A. Antiviral therapy against chronic hepatitis B in Brazil: high rates of lamivudine resistance mutations and correlation with HBV genotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107:317-325.
28. Sitnik R, Paes A, Manguiera CP, Pinho JR. A real-time quantitative assay for hepatitis B DNA virus (HBV) developed to detect all HBV genotypes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2010;52:119-124.
29. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, Liaw YF, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007;46:254-265.
30. Karatayli E, Karatayli SC, Cinar K, Gokahmetoglu S, Guven K, Idilman R, Yurdaydin C, et al. Molecular characterization of a novel entecavir mutation pattern isolated from a multi-drug refractory patient with chronic hepatitis B infection. *J Clin Virol* 2012;53:130-134.
31. Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, Saraiva JC, et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 2007;7:103.
32. Sitnik R, Pinho JR, Bertolini DA, Bernardini AP, Da Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *Journal of clinical microbiology* 2004;42:2455-2460.
33. Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, Walsh AW, Weinheimer SP, Discotto L, Plym M, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3498-3507.
34. Selabe SG, Lukhwareni A, Song E, Leeuw YG, Burnett RJ, Mphahlele MJ. Mutations associated with lamivudine-resistance in therapy-naïve hepatitis B virus (HBV) infected patients with and without HIV co-infection: implications for antiretroviral therapy in HBV and HIV co-infected South African patients. *J Med Virol* 2007;79:1650-1654.
35. Mello FC, Lago BV, Lewis-Ximenez LL, Fernandes CA, Gomes SA. Detection of mixed populations of wild-type and YMDD hepatitis B variants by pyrosequencing in acutely and chronically infected patients. *BMC Microbiol* 2012;12:96.
36. Delaney WEt, Yang H, Westland CE, Das K, Arnold E, Gibbs CS, Miller MD, et al. The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *J Virol* 2003;77:11833-11841.
37. Yeh CT. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther* 2010;15:471-475.
38. Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgtton K, Zhuang H, Locarnini SA, Fyfe J, et al. Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* 2002;293:305-313.

39. Bartholomeusz A, Locarnini SA. Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects. *Semin Liver Dis* 2006;26:162-170.
40. Lee YS, Chung YH, Kim JA, Jin YJ, Park WH, Kim SE, Lee D, et al. rtL180M mutation of hepatitis B virus is closely associated with frequent virological resistance to adefovir dipivoxil therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:300-305.
41. Liu LJ, Wang JH, Du SC, Tian JH, Yang RF, Wei L. rtE218G, a novel hepatitis B virus mutation with resistance to adefovir dipivoxil in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2010;17 Suppl 1:66-72.
42. Qin B, Pei RJ, He TT, Huang ZH, Pan GS, Tu CY, Lu MJ, et al. Polymerase mutations rtN238R, rtT240Y and rtN248H of hepatitis B virus decrease susceptibility to adefovir. *Chinese Science Bulletin* 2013;58:1760-1766.
43. Schildgen O, Olotu C, Funk A, Zollner B, Helm M, Rockstroh JK, Sirma H. Selection and counterselection of the rtI233V adefovir resistance mutation during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2010;48:631-634.
44. Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006;13:427-434.
45. Amini-Bavil-Olyaei S, Herbers U, Mohebbi SR, Sabahi F, Zali MR, Luedde T, Trautwein C, et al. Prevalence, viral replication efficiency and antiviral drug susceptibility of rtQ215 polymerase mutations within the hepatitis B virus genome. *Journal of Hepatology* 2009;51:647-654.
46. Borroto-Esoda K, Miller MD, Arterburn S. Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials. *J Hepatol* 2007;47:492-498.
47. De Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E, Colzani D, Schiavini M, Milazzo L, Bernini F, et al. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology* 2007;365:113-124.
48. Bottecchia M, Madejon A, Sheldon J, Garcia-Samaniego J, Barreiro P, Soriano V. Hepatitis B virus genotype A2 harbours an L217R polymorphism which may account for a lower response to adefovir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008;62:626-627.
49. Curtis M, Zhu Y, Borroto-Esoda K. Hepatitis B virus containing the I233V mutation in the polymerase reverse-transcriptase domain remains sensitive to inhibition by adefovir. *J Infect Dis* 2007;196:1483-1486.
50. Khudyakov Y. Coevolution and HBV drug resistance. *Antivir Ther* 2010;15:505-515.

REFERÊNCIAS

7 – Referências bibliográficas

- Ahmed, F., Foster, G.R., 2010. Global hepatitis, migration and its impact on Western healthcare. *Gut* 59, 1009-1011.
- Akarsu, M., Sengonul, A., Tankurt, E., Sayiner, A.A., Topalak, O., Akpınar, H., Abacioglu, Y.H., 2006. YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay. *J Gastroenterol Hepatol* 21, 1783-1788.
- Alavian, S.M., Carman, W.F., Jazayeri, S.M., 2013. HBsAg variants: diagnostic-escape and diagnostic dilemma. *J Clin Virol* 57, 201-208.
- Alvarado Mora, M.V., Romano, C.M., Gomes-Gouvea, M.S., Gutierrez, M.F., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., 2010. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. *The Journal of general virology* 91, 501-508.
- Alvarado Mora, M.V., Romano, C.M., Gomes-Gouvea, M.S., Gutierrez, M.F., Botelho, L., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., 2011a. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: a Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol* 11, 103-108.
- Alvarado-Mora, M.V., Botelho, L., Gomes-Gouvea, M.S., de Souza, V.F., Nascimento, M.C., Pannuti, C.S., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., 2011b. Detection of Hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhao, Brazil. *Virol J* 8, 415.
- Alvarado-Mora, M.V., Pinho, J.R., 2013. Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antiviral therapy* 18, 459-465.
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Hosseini, S.Y., Sabahi, F., Alavian, S.M., 2008. Hepatitis B virus (HBV) genotype and YMDD motif mutation profile among patients infected with HBV and untreated with lamivudine. *Int J Infect Dis* 12, 83-87.
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Herbers, U., Mohebbi, S.R., Sabahi, F., Zali, M.R., Luedde, T., Trautwein, C., Tacke, F., 2009a. Prevalence, viral replication efficiency and antiviral drug susceptibility of rtQ215 polymerase mutations within the hepatitis B virus genome. *Journal of hepatology* 51, 647-654.
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Herbers, U., Sheldon, J., Luedde, T., Trautwein, C., Tacke, F., 2009b. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. *Hepatology* 49, 1158-1165.
- Andernach, I.E., Hubschen, J.M., Muller, C.P., 2009a. Hepatitis B virus: the genotype E puzzle. *Reviews in medical virology* 19, 231-240.
- Andernach, I.E., Nolte, C., Pape, J.W., Muller, C.P., 2009b. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerging infectious diseases* 15, 1222-1228.

- Araujo, N.M., Mello, F.C., Yoshida, C.F., Niel, C., Gomes, S.A., 2004. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. *Arch Virol* 149, 1383-1395.
- Araujo, N.M., Waizbort, R., Kay, A., 2011. Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: How viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. *Infection Genetics and Evolution* 11, 1199-1207.
- Araujo, O.C., Barros, J.J., do, O.K., Nabuco, L.C., Luz, C.A., Perez, R.M., Niel, C., Villela-Nogueira, C.A., Araujo, N.M., 2014. Genetic variability of hepatitis B and C viruses in Brazilian patients with and without hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 86, 217-223.
- Arauz Ruiz, P., Norder, H., Visona, K.A., Magnius, L.O., 1997. Genotype F prevails in HBV infected patients of Hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. *J Med Virol* 51, 305-312.
- Avellon, A., Echevarria, J.M., 2006. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J Med Virol* 78, 24-36.
- Baldick, C.J., Tenney, D.J., Mazzucco, C.E., Eggers, B.J., Rose, R.E., Pokornowski, K.A., Yu, C.F., Colonno, R.J., 2008. Comprehensive evaluation of hepatitis B virus reverse transcriptase substitutions associated with entecavir resistance. *Hepatology* 47, 1473-1482.
- Barros, L.M., Gomes-Gouvea, M.S., Kramvis, A., Mendes-Correa, M.C., Dos Santos, A., Souza, L.A., Santos, M.D., Carrilho, F.J., de Jesus Domicini, A., Pinho, J.R., de Souza Paiva Ferreira, A., 2014. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhao state, Northeast Brazil. *Infect Genet Evol* 24C, 68-75.
- Barros, L.M., Gomes-Gouvea, M.S., Pinho, J.R., Alvarado-Mora, M.V., Dos Santos, A., Mendes-Correa, M.C., Caldas, A.J., Sousa, M.T., Santos, M.D., Ferreira, A.S., 2011. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? *Virus Res* 160, 333-339.
- Bartholomeusz, A., Locarnini, S., 2006. Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *J Med Virol* 78 Suppl 1, S52-55.
- Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M.A., Neuveut, C., 2009. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Adv Cancer Res* 103, 75-109.
- Bertolini, D.A., Ribeiro, P.C., Lemos, M.F., Saraceni, C.P., Pinho, J.R., 2010. Characterization of a Hepatitis B virus strain in southwestern Parana, Brazil, presenting mutations previously associated with anti-HBs Resistance. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 52, 25-30.
- Bertolini, D.A., Gomes-Gouvea, M.S., Guedes de Carvalho-Mello, I.M., Saraceni, C.P., Sitnik, R., Graziotin, F.G., Laurino, J.P., Fagundes, N.J., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., 2012. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect Genet Evol* 12, 1295-1304.

Bo Qin, R.P., TingTing He, ZhaoHui Huang, GuoShao Pan, ChunYu Tu, MengJi Lu, XinWen Chen, 2013. Polymerase mutations rtN238R, rtT240Y and rtN248H of hepatitis B virus decrease susceptibility to adefovir. *Chinese Science Bulletin* 58, 1760-1766.

Borroto-Esoda, K., Miller, M.D., Arterburn, S., 2007. Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials. *Journal of hepatology* 47, 492-498.

Bottecchia, M., Madejon, A., Sheldon, J., Garcia-Samaniego, J., Barreiro, P., Soriano, V., 2008a. Hepatitis B virus genotype A2 harbours an L217R polymorphism which may account for a lower response to adefovir. *J Antimicrob Chemother* 62, 626-627.

Bottecchia, M., Souto, F.J., O, K.M., Amendola, M., Brandao, C.E., Niel, C., Gomes, S.A., 2008b. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. *BMC microbiology* 8, 11.

Braga, W.S., Brasil, L.M., Souza, R.A.B., Melo, M.S., Rosas, M.D.G., Castilho, M.C., Fonseca, J.C.F., 2004. Prevalência da infecção pelos vírus da hepatite B (VHB) e da hepatite Delta (VHD) em Lábrea, Rio Purus, Estado do Amazonas. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 13 Suppl 1, 35-46.

Brichler, S., Lagathu, G., Chekaraou, M.A., Le Gal, F., Edouard, A., Deny, P., Cesaire, R., Gordien, E., 2013. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *The Journal of general virology* 94, 2318-2329.

Carrilho, F.J., Moraes, C.R., Pinho, J.R., Mello, I.M., Bertolini, D.A., Lemos, M.F., Moreira, R.C., Bassit, L.C., Cardoso, R.A., Ribeiro-dos-Santos, G., Da Silva, L.C., 2004. Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health* 4, 13.

Carrouee-Durantel, S., Durantel, D., Werle-Lapostolle, B., Pichoud, C., Naesens, L., Neyts, J., Trepo, C., Zoulim, F., 2008. Suboptimal response to adefovir dipivoxil therapy for chronic hepatitis B in nucleoside-naïve patients is not due to pre-existing drug-resistant mutants. *Antiviral therapy* 13, 381-388.

Chen, M.T., Billaud, J.N., Sallberg, M., Guidotti, L.G., Chisari, F.V., Jones, J., Hughes, J., Milich, D.R., 2004. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *P Natl Acad Sci USA* 101, 14913-14918.

Chen, Y., Qian, F., Yuan, Q., Li, X., Wu, W., Guo, X., Li, L., 2011. Mutations in hepatitis B virus DNA from patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *J Clin Virol* 52, 198-203.

Clemente, C.M., Carrilho, F.J., Pinho, J.R., Ono-Nita, S.K., Da Silva, L.C., Moreira, R.C., Lemos, M.F., de Carvalho Mello, I.M., 2009. A phylogenetic study of hepatitis B virus in chronically infected Brazilian patients of Western and Asian descent. *Journal of gastroenterology* 44, 568-576.

Colson, P., Borentain, P., Motte, A., Henry, M., Moal, V., Botta-Fridlund, D., Tamalet, C., Gerolami, R., 2007. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers. *Virology* 367, 30-40.

Conde, S.R., Moia Lde, J., Barbosa, M.S., Amaral Ido, S., Miranda, E.C., Soares Mdo, C., Brito, E.M., Souza Odo, S., de Araujo, M.T., Demachki, S., Rebello, J.R., Mesquita, M.G., Denis, A.B., Ishak, R., 2004. [Prevalence of hepatitis B virus genotypes and the occurrence of precore mutation A-1896 and to correlate them with the clinical presentation of chronic hepatitis, in a population group of the Eastern Amazon region]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37 Suppl 2, 33-39.

Cooksley, W.G.E., 2010. Do we need to determine viral genotype in treating chronic hepatitis B? *J Viral Hepatitis* 17, 601-610.

Curtis, M., Zhu, Y., Borroto-Esoda, K., 2007. Hepatitis B virus containing the I233V mutation in the polymerase reverse-transcriptase domain remains sensitive to inhibition by adefovir. *J Infect Dis* 196, 1483-1486.

da Silva, A.C., Spina, A.M.M., Lemos, M.F., Oba, I.T., Guastini, C.D., Gomes-Gouvea, M.S., Pinho, J.R.R., Mendes-Correa, M.C.J., 2010. Hepatitis B genotype G and high frequency of lamivudine-resistance mutations among human immunodeficiency virus/hepatitis B virus co-infected patients in Brazil. *Mem I Oswaldo Cruz* 105, 770-778.

De Castro, L., Niel, C., Gomes, S.A., 2001. Low frequency of mutations in the core promoter and precore regions of hepatitis B virus in anti-HBe positive Brazilian carriers. *BMC Microbiol* 1, 10.

De Maddalena, C., Giambelli, C., Tanzi, E., Colzani, D., Schiavini, M., Milazzo, L., Bernini, F., Ebranati, E., Cargnel, A., Bruno, R., Galli, M., Zehender, G., 2007. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology* 365, 113-124.

De Mitri, M.S., Cassini, R., Bernardi, M., 2010. Hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis: molecular oncogenic potential of clear or occult infections. *Eur J Cancer* 46, 2178-2186.

Degertekin, B., Hussain, M., Tan, J., Oberhelman, K., Lok, A.S., 2009. Sensitivity and accuracy of an updated line probe assay (HBV DR v.3) in detecting mutations associated with hepatitis B antiviral resistance. *Journal of hepatology* 50, 42-48.

Delaney, W.E.t., Ray, A.S., Yang, H., Qi, X., Xiong, S., Zhu, Y., Miller, M.D., 2006. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2471-2477.

Devesa, M., Loureiro, C.L., Rivas, Y., Monsalve, F., Cardona, N., Duarte, M.C., Poblete, F., Gutierrez, M.F., Botto, C., Pujol, F.H., 2008. Subgenotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol* 80, 20-26.

Di Lello, F.A., Leone, F.G.P.Y., Munoz, G., Campos, R.H., 2009. Diversity of Hepatitis B and C Viruses in Chile. *Journal of Medical Virology* 81, 1887-1894.

Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7, 214.

Eloy, A.M., Moreira, R.C., Lemos, M.F., de Almeida Silva, J.L., Coelho, M.R., 2013. Hepatitis B virus in the State of Alagoas, Brazil: genotypes characterization and mutations of the precore and basal core promoter regions. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 17, 704-706.

Estevez, A.M., Chueca-Porcuna, N., Guillot-Suay, V., Pena-Monje, A., Garcia-Garcia, F., Garcia-Garcia, F., 2013. [Low prevalence of hepatitis B virus primary drug resistance in Southern Spain]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* 31, 520-522.

European Association for the Study of the Liver, 2012. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology* 57, 167-185.

Fonseca, J.C., 2010. [History of viral hepatitis]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43, 322-330.

Franca, P.H.C., Gonzalez, J.E., Munne, M.S., Brandao, L.H., Gouvea, V.S., Sablon, E., Vanderborght, B.O.M., 2004. Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected Argentinean blood donors. *J Clin Microbiol* 42, 5015-5021.

Fu, L., Cheng, Y.C., 1998. Role of additional mutations outside the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase in L(-)SddC (3TC) resistance. *Biochem Pharmacol* 55, 1567-1572.

Fung, S., Mazzulli, T., El-Kashab, M., Sherman, M., Popovic, V., 2009. Lamivudine-resistant mutation detected among treatment-naïve hepatitis B patients is common and may be associated with treatment failure. *The Canadian Journal of Gastroenterology* 23 Supplement SA 276.

Fung, S.K., Chae, H.B., Fontana, R.J., Conjeevaram, H., Marrero, J., Oberhelman, K., Hussain, M., Lok, A.S., 2006. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *Journal of hepatology* 44, 283-290.

Ganem, D., Prince, A.M., 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *The New England journal of medicine* 350, 1118-1129.

Gerlich, W.H., 2013. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology Journal* 10.

Ghany, M., Liang, T.J., 2007. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 132, 1574-1585.

Glebe, D., Bremer, C.M., 2013. The molecular virology of hepatitis B virus. *Seminars in liver disease* 33, 103-112.

Gomes-Gouvea, M.S., Soares, M.C.P., Bensabath, G., de Carvalho-Mello, I.M.V.G., Brito, E.M.F., Souza, O.S.C., Queiroz, A.T.L., Carrilho, F.J., Pinho, J.R.R., 2009. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *Journal of General Virology* 90, 2638-2643.

Gopalakrishnan, D., Keyter, M., Shenoy, K.T., Leena, K.B., Thayumanavan, L., Thomas, V., Vinayakumar, K., Panackel, C., Korah, A.T., Nair, R., Kramvis, A., 2013. Hepatitis B virus subgenotype A1 predominates in liver disease patients from Kerala, India. *World J Gastroenterol* 19, 9294-9306.

Guerrieri, F., Belloni, L., Pediconi, N., Levrero, M., 2013. Molecular mechanisms of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Seminars in liver disease* 33, 147-156.

Guirgis, B.S.S., Abbas, R.O., Azzazy, H.M.E., 2010. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *Int J Infect Dis* 14, E941-E953.

Haddad, R., Martinelli Ade, L., Uyemura, S.A., Yokosawa, J., 2010. 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. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43, 224-228.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.

Hamkar, R., Aghakhani, A., Soufian, S., Banifazl, M., Ghavami, N., Nadri, M., Sofian, M., Ahmadi, F., Razeghi, E., Eslamifar, A., Ramezani, A., 2010. Surface gene mutations of hepatitis B virus among high-risk patients with occult hepatitis B virus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66, 285-291.

Han, Y., Huang, L.H., Liu, C.M., Yang, S., Li, J., Lin, Z.M., Kong, X.F., Yu, D.M., Zhang, D.H., Jin, G.D., Lu, Z.M., Gong, Q.M., Zhang, X.X., 2009. Characterization of hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in Chinese treatment naive patients. *J Gastroen Hepatol* 24, 1417-1423.

Hayashi, K., Katano, Y., Ishigami, M., Itoh, A., Hirooka, Y., Nakano, I., Yoshioka, K., Yano, M., Toyoda, H., Kumada, T., Goto, H., 2010. Prevalence and clinical characterization of patients with acute hepatitis B induced by lamivudine-resistant strains. *J Gastroen Hepatol* 25, 745-749.

Huang, C.H., Yuan, Q., Chen, P.J., Zhang, Y.L., Chen, C.R., Zheng, Q.B., Yeh, S.H., Yu, H., Xue, Y., Chen, Y.X., Liu, P.G., Ge, S.X., Zhang, J., Xia, N.S., 2012. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *Journal of hepatology* 57, 720-729.

Huang, S.F., Chen, Y.T., Lee, W.C., Chang, I.C., Chiu, Y.T., Chang, Y., Tu, H.C., Yuh, C.H., Matsuura, I., Shih, L.Y., Lai, M.W., Wu, H.D., Chen, M.F., Yeh, C.T., 2014.

Identification of transforming hepatitis B virus s gene nonsense mutations derived from freely replicative viruses in hepatocellular carcinoma. *PloS one* 9, e89753.

Huang, Z.M., Huang, Q.W., Qin, Y.Q., He, Y.Z., Qin, H.J., Zhou, Y.N., Xu, X., Huang, M.J., 2005. YMDD mutations in patients with chronic hepatitis B untreated with antiviral medicines. *World J Gastroenterol* 11, 867-870.

Hubschen, J.M., Mugabo, J., Peltier, C.A., Karasi, J.C., Sausy, A., Kirpach, P., Arendt, V., Muller, C.P., 2009. Exceptional genetic variability of hepatitis B virus indicates that Rwanda is east of an emerging African genotype E/A1 divide. *J Med Virol* 81, 435-440.

Ismail, A.M., Samuel, P., Eapen, C.E., Kannangai, R., Abraham, P., 2012. Antiviral Resistance Mutations and Genotype-Associated Amino Acid Substitutions in Treatment-Naive Hepatitis B Virus-Infected Individuals from the Indian Subcontinent. *Intervirology* 55, 36-44.

Ito, K., Tanaka, Y., Orito, E., Sugiyama, M., Fujiwara, K., Sugauchi, F., Kato, T., Tokita, H., Izumi, N., Kato, M., Yuen, M.F., Lai, C.L., Gish, R.G., Ueda, R., Mizokami, M., 2006. T1653 mutation in the box alpha increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 42, 1-7.

Jardi, R., Rodriguez-Frias, F., Schaper, M., Ruiz, G., Elefsiniotis, I., Esteban, R., Buti, M., 2007. Hepatitis B virus polymerase variants associated with entecavir drug resistance in treatment-naive patients. *J Viral Hepat* 14, 835-840.

Ji, D., Liu, Y., Si, L.L., Li, L., Chen, G.F., Xin, S.J., Zhao, J.M., Xu, D., 2011. Variable influence of mutational patterns in reverse-transcriptase domain on replication capacity of hepatitis B virus isolates from antiviral-experienced patients. *Clin Chim Acta* 412, 305-313.

Ji, D., Liu, Y., Li, L., Xu, Z., Si, L.L., Dai, J.Z., Li, X., Wang, L., Yao, Z., Xin, S.J., Chen, G.F., Xu, D., 2012. The rtL229 substitutions in the reverse transcriptase region of hepatitis B virus (HBV) polymerase are potentially associated with lamivudine resistance as a compensatory mutation. *J Clin Virol* 54, 66-72.

Kamili, S., Sozzi, V., Thompson, G., Campbell, K., Walker, C.M., Locarnini, S., Krawczynski, K., 2009. Efficacy of hepatitis B vaccine against antiviral drug-resistant hepatitis B virus mutants in the chimpanzee model. *Hepatology* 49, 1483-1491.

Karatayli, E., Karayalcin, S., Karaaslan, H., Kayhan, H., Turkyilmaz, A.R., Sahin, F., Yurdaydin, C., Bozdayi, A.M., 2007. A novel mutation pattern emerging during lamivudine treatment shows cross-resistance to adefovir dipivoxil treatment. *Antiviral therapy* 12, 761-768.

Karatayli, E., Karatayli, S.C., Cinar, K., Gokahmetoglu, S., Guven, K., Idilman, R., Yurdaydin, C., Bozdayi, A.M., 2012. Molecular characterization of a novel entecavir mutation pattern isolated from a multi-drug refractory patient with chronic hepatitis B infection. *J Clin Virol* 53, 130-134.

Kew, M.C., Kramvis, A., Yu, M.C., Arakawa, K., Hodgkinson, J., 2005. Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-Saharan Africans. *J Med Virol* 75, 513-521.

Khudyakov, Y., 2010. Coevolution and HBV drug resistance. *Antiviral therapy* 15, 505-515.

Kim, B.K., Revill, P.A., Ahn, S.H., 2011. HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antiviral therapy* 16, 1169-1186.

Kimbi, G.C., Kramvis, A., Kew, M.C., 2004. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. *The Journal of general virology* 85, 1211-1220.

Kimbi, G.C., Kew, M.C., Kramvis, A., 2012. The effect of the G1888A mutation of subgenotype A1 of hepatitis B virus on the translation of the core protein. *Virus research* 163, 334-340.

Kirkwood, B.R.a.S., J. A. C 2006. *Essential medical statistics*, 2nd Edition ed. Blackwell Science, Massachusetts, USA.

Ko, S.Y., Oh, H.B., Park, C.W., Lee, H.C., Lee, J.E., 2012. Analysis of hepatitis B virus drug-resistant mutant haplotypes by ultra-deep pyrosequencing. *Clin Microbiol Infect* 18, E404-411.

Kobayashi, S., Ide, T., Sata, M., 2001. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *Journal of hepatology* 34, 584-586.

Kramvis, A., Arakawa, K., Yu, M.C., Nogueira, R., Stram, D.O., Kew, M.C., 2008. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 80, 27-46.

Kramvis, A., Kew, M., Francois, G., 2005. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 23, 2409-2423.

Kramvis, A., Kew, M.C., 2007a. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 37, S9-S19.

Kramvis, A., Kew, M.C., 2007b. Molecular characterization of subgenotype A1 (subgroup Aa) of hepatitis B virus. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 37, S27-32.

Kurbanov, F., Tanaka, Y., Kramvis, A., Simmonds, P., Mizokami, M., 2008. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol* 82, 8241-8242.

Kurbanov, F., Tanaka, Y., Mizokami, M., 2010. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatology Res* 40, 14-30.

Kwok, S., Higuchi, R., 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238.

Kwon, H., Lok, A.S., 2011. Hepatitis B therapy. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 8, 275-284.

Lada, O., Benhamou, Y., Poynard, T., Thibault, V., 2006. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of "a" determinant variants. *J Virol* 80, 2968-2975.

Lai, M.W., Huang, S.F., Hsu, C.W., Chang, M.H., Liaw, Y.F., Yeh, C.T., 2009. Identification of nonsense mutations in hepatitis B virus S gene in patients with hepatocellular carcinoma developed after lamivudine therapy. *Antiviral therapy* 14, 249-261.

Lee, C.Z., Lee, H.S., Huang, G.T., Yang, P.M., Sheu, J.C., 2006. Detection of YMDD mutation using mutant-specific primers in chronic hepatitis B patients before and after lamivudine treatment. *World J Gastroentero* 12, 5301-5305.

Lee, S.A., Kim, K., Kim, H., Kim, B.J., 2012a. Nucleotide change of codon 182 in the surface gene of hepatitis B virus genotype C leading to truncated surface protein is associated with progression of liver diseases. *Journal of hepatology* 56, 63-69.

Lee, Y.S., Chung, Y.H., Kim, J.A., Jin, Y.J., Park, W.H., Kim, S.E., Lee, D., Shim, J.H., Kim, K.M., Lim, Y.S., Lee, H.C., Suh, D.J., 2012b. rtL180M mutation of hepatitis B virus is closely associated with frequent virological resistance to adefovir dipivoxil therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 27, 300-305.

Lee, Y.S., Chung, Y.H., Kim, J.A., Kim, S.E., Shin, J.W., Kim, K.M., Lim, Y.S., Park, N.H., Lee, H.C., Suh, D.J., 2009. Hepatitis B virus with the rtL80V/I mutation is associated with a poor response to adefovir dipivoxil therapy. *Liver Int* 29, 552-556.

Li, X.G., Liu, B.M., Xu, J., Liu, X.E., Ding, H., Li, T., 2012. Discrepancy of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase between nucleos(t)ide analogue-untreated and -treated patients with chronic hepatitis B in a hospital in China. *J Med Virol* 84, 207-216.

Liang, T.J., 2009. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 49, S13-21.

Lin, C.L., Kao, J.H., 2011. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroen Hepatol* 26, 123-130.

Liu, B.M., Li, T., Xu, J., Li, X.G., Dong, J.P., Yan, P., Yang, J.X., Yan, L., Gao, Z.Y., Li, W.P., Sun, X.W., Wang, Y.H., Jiao, X.J., Hou, C.S., Zhuang, H., 2010a. Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naïve Chinese patients. *Antiviral research* 85, 512-519.

Liu, L.J., Wang, J.H., Du, S.C., Tian, J.H., Yang, R.F., Wei, L., 2010b. rtE218G, a novel hepatitis B virus mutation with resistance to adefovir dipivoxil in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 17 Suppl 1, 66-72.

Liu, S., Zhang, H., Gu, C., Yin, J., He, Y., Xie, J., Cao, G., 2009. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 101, 1066-1082.

Lobato, C., Tavares-Neto, J., Rios-Leite, M., Trepo, C., Vitvitski, L., Parvaz, P., Zoulim, F., D'Oliveira, A., Jr., Parana, R., 2006. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study. *J Gastroenterol Hepatol* 21, 863-868.

Locarnini, S., 2005. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Seminars in liver disease* 25 Suppl 1, 9-19.

Locarnini, S., Littlejohn, M., Aziz, M.N., Yuen, L., 2013. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Biol* 23, 561-575.

Locarnini, S., Mason, W.S., 2006. Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. *Journal of hepatology* 44, 422-431.

Locarnini, S.A., Yuen, L., 2010. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antiviral therapy* 15, 451-461.

Lok, A.S., McMahon, B.J., 2009. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 50, 661-662.

Lok, A.S., Zoulim, F., Locarnini, S., Bartholomeusz, A., Ghany, M.G., Pawlotsky, J.M., Liaw, Y.F., Mizokami, M., Kuiken, C., Hepatitis, B.V.D.R.W.G., 2007. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 46, 254-265.

Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O., Protzer, U., 2011. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *Journal of hepatology* 55, 996-1003.

Ludwig Amei D, G., Thomas , Adams, Ortwin , Baumann, Nannette, Hauck, Katarzyna, Fey, Holger, Hengel, Hartmut , Haussinger, Dieter, Erhardt, Andreas, 2008. Primary resistance mutations against nucleos(t)ide analogues in treatment naïve patients with HBV-infection. *Hepatology* 48, 701A.

Luo, Q.Z., Zhong, Y.D., Yang, Y.F., Xiong, Q.F., Hu, Z.L., Lu, W.M., Huang, P., Zhang, N., 2012. Clinical characteristics and chronicity of acute hepatitis B induced by lamivudine-resistant strains. *J Med Virol* 84, 1558-1561.

Mantovani, N., Cicero, M., Santana, L.C., Silveira, C., do Carmo, E.P., Abrao, P.R., Diaz, R.S., Caseiro, M.M., Komninakis, S.V., 2013. Detection of lamivudine-resistant variants and mutations related to reduced antigenicity of HBsAg in individuals from the cities of Santos and Sao Paulo, Brazil. *Virol J* 10, 320.

Margeridon-Thermet, S., Svarovskaia, E.S., Babrzadeh, F., Martin, R., Liu, T.F., Pacold, M., Reuman, E.C., Holmes, S.P., Borroto-Esoda, K., Shafer, R.W., 2013. Low-level persistence of drug resistance mutations in hepatitis B virus-infected subjects with a past history of Lamivudine treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 343-349.

Marin, J.A.M., Anduiza, C.I.A., Calderon, G.M., Rodriguez, S.C., Allen, J.L.F., Flores, R.A., Martinez, J.G., 2012. Prevalence and resistance pattern of genotype G and H in chronic hepatitis B and HIV co-infected patients in Mexico. *Ann Hepatol* 11, 47-51.

Marzio, D.H.D., Hann, H.W., 2014. Then and now: The progress in hepatitis B treatment over the past 20 years. *World J Gastroentero* 20, 401-413.

Matsuda, M., Suzuki, F., Suzuki, Y., Tsubota, A., Akuta, N., Hosaka, T., Someya, T., Kobayashi, M., Saitoh, S., Arase, Y., Satoh, J., Takagi, K., Kobayashi, M., Ikeda, K., Kumada, H., 2004. Low rate of YMDD motif mutations in polymerase gene of hepatitis B virus in chronically infected patients not treated with lamivudine. *Journal of gastroenterology* 39, 34-40.

McMahon, B.J., 2009a. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 3, 334-342.

McMahon, B.J., 2009b. The Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* 49, S45-S55.

Mello, F.C., Souto, F.J., Nabuco, L.C., Villela-Nogueira, C.A., Coelho, H.S., Franz, H.C., Saraiva, J.C., Virgolino, H.A., Motta-Castro, A.R., Melo, M.M., Martins, R.M., Gomes, S.A., 2007. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 7, 103.

Mello, F.C., Martel, N., Gomes, S.A., Araujo, N.M., 2011. Expression of Hepatitis B Virus Surface Antigen Containing Y100C Variant Frequently Detected in Occult HBV Infection. *Hepat Res Treat* 2011, 695859.

Mello, F.C., Lago, B.V., Lewis-Ximenez, L.L., Fernandes, C.A., Gomes, S.A., 2012a. Detection of mixed populations of wild-type and YMDD hepatitis B variants by pyrosequencing in acutely and chronically infected patients. *BMC Microbiol* 12, 96.

Mello, F.C.D., Fernandes, C.A., Gomes, S.D., 2012b. Antiviral therapy against chronic hepatitis B in Brazil: high rates of lamivudine resistance mutations and correlation with HBV genotypes. *Mem I Oswaldo Cruz* 107, 317-325.

Mello, F.C., Araujo, O.C., Lago, B.V., Motta-Castro, A.R., Moraes, M.T., Gomes, S.A., Bello, G., Araujo, N.M., 2013. Phylogeography and evolutionary history of hepatitis B virus genotype F in Brazil. *Virol J* 10, 236.

Mendes-Correa, M.C., Pinho, J.R., Locarnini, S., Yuen, L., Sitnik, R., Santana, R.A., Gomes-Gouvea, M.S., Leite, O.M., Martins, L.G., Silva, M.H., Gianini, R.J., Uip, D.E., 2010. High frequency of lamivudine resistance mutations in Brazilian patients co-infected with HIV and hepatitis B. *J Med Virol* 82, 1481-1488.

Menzo, S., Vincenti, D., Solmone, M., Prosperi, M., Bruselles, A., Abbate, I., Rozera, G., Capobianchi, M.R., 2009. Low-abundance drug resistance mutations: extending the HIV paradigm to hepatitis B virus. *J Infect Dis* 200, 1798-1799; author reply 1799-1800.

Merrill, R.M., Hunter, B.D., 2011. Seroprevalence of markers for hepatitis B viral infection. *Int J Infect Dis* 15, e78-121.

Ministério da Saúde, Brasil, 2002. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Hepatite Viral Crônica B: Interferon alfa, Lamivudina

Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011. HEPATITES VIRAIS NO BRASIL: SITUAÇÃO, AÇÕES E AGENDA.

Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2009. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções.

Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2011. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções.

Mirandola, S., Campagnolo, D., Bortoletto, G., Franceschini, L., Marcolongo, M., Alberti, A., 2011. Large-scale survey of naturally occurring HBV polymerase mutations associated with anti-HBV drug resistance in untreated patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepatitis* 18, E212-E216.

Mohebbi, S.R., Amini-Bavil-Olyaei, S., Zali, N., Damavand, B., Azimzadeh, P., Derakhshan, F., Sabahi, F., Zali, M.R., 2012. Characterization of hepatitis B virus genome variability in Iranian patients with chronic infection, a nationwide study. *J Med Virol* 84, 414-423.

Morando, F., Rosi, S., Fasolato, S., Cavallin, M., Gola, E., Gatta, A., Angeli, P., 2013. Severe acute hepatitis B in a treatment-naïve patient with antiviral drug resistant mutations in the polymerase gene. *J Med Virol* 85, 210-213.

Motta-Castro, A.R., Martins, R.M., Araujo, N.M., Niel, C., Facholi, G.B., Lago, B.V., Mello, F.C., Gomes, S.A., 2008. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. *Arch Virol* 153, 2197-2205.

Moura, I.F., Lopes, E.P., Alvarado-Mora, M.V., Pinho, J.R., Carrilho, F.J., 2013. Phylogenetic analysis and subgenotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. *Infect Genet Evol* 14, 195-199.

Nebbia, G., Peppia, D., Maini, M.K., 2012. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 105, 109-113.

Nguyen, M.H., Garcia, R.T., Trinh, H.N., Nguyen, H.A., Nguyen, K.K., Nguyen, L.H., Levitt, B., 2009. Prevalence of hepatitis B virus DNA polymerase mutations in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B. *Aliment Pharm Ther* 30, 1150-1158.

Nishijima, N., Marusawa, H., Ueda, Y., Takahashi, K., Nasu, A., Osaki, Y., Kou, T., Yazumi, S., Fujiwara, T., Tsuchiya, S., Shimizu, K., Uemoto, S., Chiba, T., 2012.

Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PloS one* 7, e35052.

Norder, H., Courouce, A.M., Coursaget, P., Echevarria, J.M., Lee, S.D., Mushahwar, I.K., Robertson, B.H., Locarnini, S., Magnius, L.O., 2004. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47, 289-309.

Nunes, H.M., Monteiro, M.R., Soares Mdo, C., 2007. [Prevalence of hepatitis B and D serological markers in the Parakana, Apyterewa Indian Reservation, Para State, Brazil]. *Cad Saude Publica* 23, 2756-2766.

Osiowy, C., Larke, B., Giles, E., 2011. Distinct geographical and demographic distribution of hepatitis B virus genotypes in the Canadian Arctic as revealed through an extensive molecular epidemiological survey. *J Viral Hepat* 18, e11-19.

Panduro, A., Maldonado-Gonzalez, M., Fierro, N.A., Roman, S., 2013. Distribution of HBV genotypes F and H in Mexico and Central America. *Antiviral therapy* 18, 475-484.

Passos, A.D., Gomes, U.A., Figueiredo, J.F., do Nascimento, M.M., de Oliveira, J.M., Gaspar, A.M., Yoshida, C.F., 1993. [Influence of migration on the prevalence of serologic hepatitis B markers in a rural community. 2. Comparative analysis of various characteristics of the population studied]. *Rev Saude Publica* 27, 36-42.

Pastor, R., Habersetzer, F., Fafi-Kremer, S., Doffoel, M., Baumert, T.F., Gut, J.P., Stoll-Keller, F., Schvoerer, E., 2009. Hepatitis B virus mutations potentially conferring adefovir/tenofovir resistance in treatment-naïve patients. *World J Gastroenterol* 15, 753-755.

Pereira, L.M., Martelli, C.M., Merchan-Hamann, E., Montarroyos, U.R., Braga, M.C., de Lima, M.L., Cardoso, M.R., Turchi, M.D., Costa, M.A., de Alencar, L.C., Moreira, R.C., Figueiredo, G.M., Ximenes, R.A., 2009. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 81, 240-247.

Pollicino, T., Isgro, G., Di Stefano, R., Ferraro, D., Maimone, S., Brancatelli, S., Squadrito, G., Di Marco, V., Craxi, A., Raimondo, G., 2009. Variability of reverse transcriptase and overlapping S gene in hepatitis B virus isolates from untreated and lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients. *Antiviral therapy* 14, 649-654.

Ponde, R.A., 2011. The underlying mechanisms for the "simultaneous HBsAg and anti-HBs serological profile". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30, 1325-1340.

Qin, B., Budeus, B., Cao, L., Wu, C., Wang, Y., Zhang, X., Rayner, S., Hoffmann, D., Lu, M., Chen, X., 2013. The amino acid substitutions rtP177G and rtF249A in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus polymerase reduce the susceptibility to tenofovir. *Antiviral research* 97, 93-100.

Quarleri, J., 2014. Core promoter: a critical region where the hepatitis B virus makes decisions. *World J Gastroenterol* 20, 425-435.

Reis, L.M., Soares, M.A., Franca, P.H., Soares, E.A., Bonvicino, C.R., 2011. Clonal analysis of hepatitis B viruses among blood donors from Joinville, Brazil: evidence of dual infections, intragenotype recombination and markers of risk for hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 83, 2103-2112.

Rezende, R.E., Fonseca, B.A., Ramalho, L.N., Zucoloto, S., Pinho, J.R., Bertolini, D.A., Martinelli, A.L., 2005. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 32, 53-59.

Ribeiro, N.R., Campos, G.S., Angelo, A.L., Braga, E.L., Santana, N., Gomes, M.M., Pinho, J.R., De Carvalho, W.A., Lyra, L.G., Lyra, A.C., 2006. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. *Liver Int* 26, 636-642.

Rodriguez, C., Chevaliez, S., Bensadoun, P., Pawlotsky, J.M., 2013. Characterization of the dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir by ultra-deep pyrosequencing. *Hepatology* 58, 890-901.

Rodriguez-Frias, F., Buti, M., Tabernero, D., Homs, M., 2013. Quasispecies structure, cornerstone of hepatitis B virus infection: mass sequencing approach. *World J Gastroenterol* 19, 6995-7023.

Salpini, R., Svicher, V., Cento, V., Gori, C., Bertoli, A., Scopelliti, F., Micheli, V., Cappiello, T., Spano, A., Rizzardini, G., De Sanctis, G.M., Sarrecchia, C., Angelico, M., Perno, C.F., 2011. Characterization of drug-resistance mutations in HBV D-genotype chronically infected patients, naive to antiviral drugs. *Antiviral research* 92, 382-385.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *P Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.

Santos, A.O., Alvarado-Mora, M.V., Botelho, L., Vieira, D.S., Pinho, J.R., Carrilho, F.J., Honda, E.R., Salcedo, J.M., 2010. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. *Virology journal* 7, 315.

Sayan, M., Akhan, S.C., 2011. Antiviral drug-associated potential vaccine-escape hepatitis B virus mutants in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 15, E722-E726.

Sayan, M., Akhan, S.C., Meric, M., 2010a. Naturally occurring amino-acid substitutions to nucleos(t)ide analogues in treatment naive Turkish patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 17, 23-27.

Sayan, M., Senturk, O., Akhan, S.C., Hulagu, S., Cekmen, M.B., 2010b. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 14, E136-E141.

Schaefer, S., 2007. Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 37, S20-26.

Schildgen, O., Schewe, C.K., Vogel, M., Daumer, M., Kaiser, R., Weitner, L., Matz, B., Rockstroh, J.K., 2004. Successful therapy of hepatitis B with tenofovir in HIV-infected patients failing previous adefovir and lamivudine treatment. *Aids* 18, 2325-2327.

Seeger, C., Mason, W.S., 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 51-68.

Selabe, S.G., Lukhwareni, A., Song, E., Leeuw, Y.G., Burnett, R.J., Mphahlele, M.J., 2007. Mutations associated with lamivudine-resistance in therapy-naïve hepatitis B virus (HBV) infected patients with and without HIV co-infection: implications for antiretroviral therapy in HBV and HIV co-infected South African patients. *J Med Virol* 79, 1650-1654.

Shaw, T., Bartholomeusz, A., Locarnini, S., 2006. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *Journal of hepatology* 44, 593-606.

Sheldon, J., Camino, N., Rodes, B., Bartholomeusz, A., Kuiper, M., Tacke, F., Nunez, M., Mauss, S., Lutz, T., Klausen, G., Locarnini, S., Soriano, V., 2005. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antiviral therapy* 10, 727-734.

Sheldon, J., Rodes, B., Zoulim, F., Bartholomeusz, A., Soriano, V., 2006. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 13, 427-434.

Shi, M., Yang, Z.J., Wang, R.S., Zhang, H., Zhu, Y.F., Xu, Y.P., Lin, Q.Y., Jin, L.J., 2006. Rapid quantitation of lamivudine-resistant mutants in lamivudine treated and untreated patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clinica Chimica Acta* 373, 172-175.

Shi, W., Zhang, Z., Ling, C., Zheng, W., Zhu, C., Carr, M.J., Higgins, D.G., 2013. Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infect Genet Evol* 16, 355-361.

Shouval, D., 2003. Hepatitis B vaccines. *Journal of hepatology* 39 Suppl 1, S70-76.

Singla, B., Chakraborti, A., Sharma, B.K., Kapil, S., Chawla, Y.K., Arora, S.K., Das, A., Dhiman, R.K., Duseja, A., 2013. Hepatitis B virus reverse transcriptase mutations in treatment Naïve chronic hepatitis B patients. *J Med Virol* 85, 1155-1162.

Sitnik, R., Pinho, J.R., Bertolini, D.A., Bernardini, A.P., Da Silva, L.C., Carrilho, F.J., 2004. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *J Clin Microbiol* 42, 2455-2460.

Sitnik, R., Sette, H., Jr., Santana, R.A., Menezes, L.C., Graca, C.H., Dastoli, G.T., Silbert, S., Pinho, J.R., 2007. Hepatitis B virus genotype E detected in Brazil in an African patient who is a frequent traveler. *Braz J Med Biol Res* 40, 1689-1692.

Sitnik, R., Paes, A., Manguiera, C.P., Pinho, J.R.R., 2010. A Real-Time Quantitative Assay for Hepatitis B DNA Virus (HBV) Developed to Detect All HBV Genotypes. *Rev Inst Med Trop Sp* 52, 119-124.

Souto, F.J.D., 1999. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. . GED 18, 143-150.

Souto, F.J., 2004. [Hepatitis B and the human migratory movements in the State of Mato Grosso, Brazil]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37 Suppl 2, 63-68.

Stuyver, L.J., Locarnini, S.A., Lok, A., Richman, D.D., Carman, W.F., Dienstag, J.L., Schinazi, R.F., 2001. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 33, 751-757.

Tan, Y.W., Ge, G.H., Zhao, W., Gan, J.H., Zhao, Y., Niu, Z.L., Zhang, D.J., Chen, L., Yu, X.J., Yang, L.J., 2012. YMDD motif mutations in chronic hepatitis B antiviral treatment naive patients: a multi-center study. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 16, 250-255.

Tanwar, S., Dusheiko, G., 2012. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis? *Current gastroenterology reports* 14, 37-46.

Taylor, B.C., Yuan, J.M., Shamliyan, T.A., Shaukat, A., Kane, R.L., Wilt, T.J., 2009. Clinical Outcomes in Adults with Chronic Hepatitis B in Association with Patient and Viral Characteristics: A Systematic Review of Evidence. *Hepatology* 49, S85-S95.

Te, H.S., Jensen, D.M., 2010. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis* 14, 1-21, vii.

Thibault, V., Aubron-Olivier, C., Agut, H., Katlama, C., 2002. Primary infection with a lamivudine-resistant hepatitis B virus. *Aids* 16, 131-133.

Tonetto, P.A., Goncales, N.S., Fais, V.C., Vigani, A.G., Goncales, E.S., Feltrin, A., Goncales, F.L., Jr., 2009. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. *Bmc Infect Dis* 9, 149.

Tong, S., Li, J., Wands, J.R., Wen, Y.-m., 2013. Hepatitis B virus genetic variants: biological properties and clinical implications. *Emerging Microbes and Infections* 2, 1-11.

Torres, C., Pineiro y Leone, F.G., Pezzano, S.C., Mbayed, V.A., Campos, R.H., 2011. New perspectives on the evolutionary history of hepatitis B virus genotype F. *Mol Phylogenet Evol* 59, 114-122.

Trevino, A., Soriano, V., Madejon, A., Rodriguez, C., Barros, C., Botecchia, M., Tuma, P., Del Romero, J., de Mendoza, C., 2009. Short communication: transmission of hepatitis B viruses with lamivudine resistance mutations in newly diagnosed HIV individuals. *AIDS research and human retroviruses* 25, 1273-1276.

van der Kuyl, A.C., Zorgdrager, F., Hogema, B., Bakker, M., Jurriaans, S., Back, N.K.T., Berkhout, B., Zaaijer, H.L., Cornelissen, M., 2013. High prevalence of hepatitis B virus dual infection with genotypes A and G in HIV-1 infected men in Amsterdam, the Netherlands, during 2000-2011. *Bmc Infect Dis* 13.

Verheyen, J., Neumann-Fraune, M., Berg, T., Kaiser, R., Obermeier, M., 2012. The detection of HBsAg mutants expressed in vitro using two different quantitative HBsAg assays. *J Clin Virol* 54, 279-281.

Viana, S., Parana, R., Moreira, R.C., Compri, A.P., Macedo, V., 2005. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 73, 808-814.

Victoria Fda, S., Oliveira, C.M., Victoria, M.B., Victoria, C.B., Ferreira, L.C., 2008. Characterization of HBeAg-negative chronic hepatitis B in western Brazilian Amazonia. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 12, 27-37.

Vutien, P., Trinh, H.N., Garcia, R.T., Nguyen, H.A., Levitt, B.S., Nguyen, K., da Silveira, E., Daugherty, T., Ahmed, A., Garcia, G., Lutchman, G.A., Nguyen, M.H., 2013. Mutations in HBV DNA Polymerase Associated With Nucleos(t)ide Resistance Are Rare in Treatment-naïve Patients. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*.

Walsh, R., Locarnini, S., 2012. Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise. *Yonsei Med J* 53, 875-885.

WHO, 2008. Hepatitis B. , World Health Organization Fact Sheet.

Xu, Z., Liu, Y., Xu, T., Chen, L., Si, L., Wang, Y., Ren, X., Zhong, Y., Zhao, J., Xu, D., 2010. Acute hepatitis B infection associated with drug-resistant hepatitis B virus. *J Clin Virol* 48, 270-274.

Yousif, M., Kramvis, A., 2013. Genotype D of hepatitis B virus and its subgenotypes: An update. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 43, 355-364.

Yousif, M., Mudawi, H., Bakhiet, S., Glebe, D., Kramvis, A., 2013. Molecular characterization of hepatitis B virus in liver disease patients and asymptomatic carriers of the virus in Sudan. *Bmc Infect Dis* 13, 328.

Zhang, J.M., Xu, Y., Wang, X.Y., Yin, Y.K., Wu, X.H., Weng, X.H., Lu, M., 2007. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis* 44, 1161-1169.

Zheng, J., Zeng, Z., Zhang, D., Yu, Y., Wang, F., Pan, C.Q., 2012. Prevalence and significance of Hepatitis B reverse transcriptase mutants in different disease stages of untreated patients. *Liver Int* 32, 1535-1542.

Zhu, Y., Curtis, M., Borroto-Esoda, K., 2011. The YMDD and rtA194T mutations result in decreased replication capacity in wild-type HBV as well as in HBV with precore and basal core promoter mutations. *Antivir Chem Chemother* 22, 13-22.

Zollner, B., Sterneck, M., Wursthorn, K., Petersen, J., Schroter, M., Laufs, R., Feucht, H.H., 2005. Prevalence, incidence, and clinical relevance of the reverse transcriptase

V207I mutation outside the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *J Clin Microbiol* 43, 2503-2505.

Zoulim, F., Locarnini, S., 2009. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 137, 1593-1608 e1591-1592.