Livia de Souza Botelho Lima

**Avaliação de fatores virológicos associados
ao desenvolvimento de carcinoma
hepatocelular (CHC) em pacientes com
hepatite B crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Dr. João Renato Rebello Pinho

**São Paulo
2016**

Livia de Souza Botelho Lima

**Avaliação de fatores virológicos associados
ao desenvolvimento de carcinoma
hepatocelular (CHC) em pacientes com
hepatite B crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Dr. João Renato Rebello Pinho

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Livia de Souza Botelho

Avaliação de fatores virológicos associados ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) em pacientes com hepatite B crônica / Livia de Souza Botelho Lima. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: João Renato Rebello Pinho.

Descritores: 1.Hepatite B crônica 2.Carcinoma hepatocelular 3.Genótipo
4.Mutação 5.Vírus da hepatite B 6.Cirrose hepática

USP/FM/DBD-008/16

Dedicatória

Aos meus pais, marido,
filhos, irmãs, orientadores
e colaboradores minha
eterna gratidão.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a **DEUS** por todas as coisas que já acontecerem em minha vida, e por este momento tão especial que estou passando.

Gostaria de agradecer a meu **pai Maurício Gasparini Botelho**, minha **mãe M^a Luiza C. S. Botelho**, por serem os melhores pais do mundo. Obrigada pai e mãe pelo carinho e amor incondicional que sempre tiveram por mim, pela educação, por investir nos meus estudos (mesmo eu estando casada) e por nunca deixarem faltar nada. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês, tenho vocês como um espelho, onde quero sempre levar comigo exemplos de bom caráter, humildade e honestidade. Vocês são tudo em minha vida.

Obrigada meu **marido Sebastião Kalel V. de Lima** por toda paciência e renúncia para eu conseguir realizar o meu sonho, você foi fundamental nessa vitória, mesmo não concordando com muitas coisas você sempre me apoiou, obrigada pela linda família que construímos nesses anos de mestrado, com o nascimento da nossa primogênita **Laura Lima** que hoje está com dois anos e agora com a espera do nosso menino **Kaleb** que já está para chegar. Vocês são minha realização.

Obrigada minhas irmãs **Túlia de S. Botelho Almeida** e **Isabela de S. Botelho Alcântara** por tudo que vocês representam para mim, obrigada pelos incentivos, pela força e pelo amor que vocês sempre mostraram ter por mim.

Obrigada **Dr. João Renato Rebello Pinho** pela oportunidade, confiança e orientação para realizar este trabalho. Muito obrigada também pela compreensão e paciência em muitas fases desse processo.

Obrigada **Michele Soares Gomes Gouvêa** e **Fernanda de Mello Malta** pelo enorme carinho, conselhos e acolhimento em um momento muito difícil e desgastante deste processo. Vocês foram fundamentais para a conclusão deste trabalho, serei eternamente grata por tudo.

Gostaria de agradecer aos médicos e os laboratórios que contribuíram de forma direta e indireta para montarmos a casuística que compôs este estudo. Obrigada **Dra. Denise Paranaguá** pela realização dos exames de ultrassonografia e elastografia hepática, também gostaria de agradecer o carinho, atenção e conselhos que você me deu. Obrigada **Dra. Luciana Kikuchi** pela ajuda na seleção e confirmação dos pacientes que entraram no estudo. Obrigada **Dra. Ana Catharina de Seixas Santos Nastri** pela ajuda na busca de dados de tratamento dos pacientes selecionados para o estudo. Obrigada **Dr. Nairo Massazaku Sumita** pela colaboração na realização dos exames sorológico e bioquímicos no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. Obrigada **Dra. Suzane Kioko Ono, Dra. Aline Chagas, Dra. Regiane Saraiva de Alencar, Dra. Claudia Tani, Dr. Venâncio Avancini Alves** por contribuírem de alguma forma para a realização deste trabalho. Gostaria de agradecer novamente o **Dr. João Renato** pela autorização de realizar os exames de carga viral dos pacientes do estudo no Laboratório de Técnicas Especiais do Setor de Biologia Molecular do Hospital Israelita Albert Einstein. E a **Dr. Rubia A. Ferraz Santana** que realizou estes exames. Também gostaria de agradecer a oportunidade de realizar os experimentos no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical “João De Alves de Queiroz e Castorina Bittencourt Alves” LIM-07 do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Obrigada aos pacientes que se disponibilizaram para participar e colaborar com este estudo.

Muito obrigada amigos e colegas do laboratório pela parceria, apoio, companheirismos, risadas, etc. Vocês foram especiais e importantes nesta jornada. Muito obrigada por tudo **Ariana Carolina Ferreira, João Paulo Moreira, Ketti Gleyzer de Oliveira, Carolina Noble, Karine Vieira Gaspareto, Max Diego Cruz Santos e Cris Nakhle.**

Gostaria de agradecer a **Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) que nos forneceu os recursos financeiros necessários para o desenvolvimento do projeto de pesquisa e pela bolsa de estudo por oito meses, Também gostaria de agradecer a **CAPES** pela bolsa de mestrado oferecida após o termino na minha bolsa FAPESP.

Obrigada **Márcio Augusto Diniz** pela ajuda nas análises estatísticas.

Agradeço aos professores que coordenaram o programa de pós-graduação Ciência em Gastreenterologia **Prof. Dr. Flair José Carrilho, Prof. Dr. Luiz Carneiro D’Albuquerque e Prof. Dr. José Jukemura.**

Obrigada **Vilma Libério** por todo apoio e orientação nesses anos de pós-graduação. Por fim, gostaria de agradecer Aos professores que participaram da banca de qualificação desta tese, por suas sugestões que contribuíram para que o trabalho fosse melhorado.

Muito obrigada **Dr. Mário Guimarães Pessoa, Dr. Antônio Eduardo Benedito Silva e Dr. José Eduardo Levi.**

“Pois será como a árvore
plantada junto a ribeiros
de águas, a qual dá o seu
fruto na estação própria e
cujas folhas não caem; e
tudo quanto fizer
prosperará”.

Salmos 1:3

Esta dissertação 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 Gráficos

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1. Epidemiologia da infecção pelo Vírus da Hepatite B	1
1.2. O Vírus da Hepatite B	3
1.3. Aspectos clínicos da infecção pelo HBV	7
1.4. Replicação do genoma do HBV	9
1.5. Genótipos do HBV	10
1.6. Importância clínica dos genótipos do HBV	12
1.7. Tratamento	13
1.8. Carcinoma hepatocelular (CHC) e fatores de riscos	15
1.9. HBV e hepatocarcinogênese	16
1.10. Carga Viral do HBV e Hepatocarcinogênese	18
1.11. Mutações no genoma do HBV e Hepatocarcinogênese	19
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo Principal	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. Casuística e Métodos	23
3.1. População de estudo	23
3.2. Procedimentos laboratoriais	25
3.3. Análise das sequências	32
3.4. Análise estatística	32
4. Resultados	34
4.1. Dados demográficos, laboratoriais, virológicos e clínicos (tratamento) dos pacientes selecionados para o estudo	34
4.2. Fatores de risco para desenvolvimento de CHC da população de estudo	37
4.3. Amplificação e sequenciamento das regiões S/Pol e pré-core/core do HBV	38
4.4. Análise filogenética das sequências S/Pol e classificação dos subgenótipos do HBV nas amostras dos pacientes incluídos no estudo	41
4.5. Análise de mutações na região dos genes pré-core/core	45
5. Discussão	50
6. Conclusões	59
7. Referências Bibliográficas	60

Apêndice

Lista de Figuras

Figura 1-	Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B no mundo.....	3
Figura 2-	Diferentes partículas do HBV que podem ser encontradas no soro de um indivíduo infectado.....	5
Figura 3-	Estrutura do vírus da hepatite B.....	6
Figura 4-	Esquema da estratégia de amplificação da região S/Pol.....	40
Figura 5-	Esquema da estratégia de amplificação da região pré-core/core.....	41
Figura 6-	Árvore filogenética das sequências classificadas como genótipo A	43
Figura 7-	Árvore filogenética das sequências classificadas como genótipo C, D ou F	44

Lista de Gráficos

Gráfico 1-	Frequência dos subgenótipos do HBV na casuística estudada	42
Gráfico 2-	Comparação das frequências da mutação T1768A	48
Gráfico 3-	Comparação das frequências das mutações C1766T + T1768A associadas.....	48
Gráfico 4-	Comparação das frequências da mutação G1888H (A/T/C).....	49

Lista de Quadros

Quadro 1-	Distribuição dos genótipos do HBV pelo mundo.....	11
------------------	---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Descrição dos dados demográficos e laboratoriais dos pacientes selecionados	35
Tabela 2-	Descrição dos exames laboratoriais dos pacientes selecionados para o estudo	35
Tabela 3-	Descrição dos dados sorológicos, virológicos e clínicos (tratamento) dos pacientes selecionados.....	37
Tabela 4-	Descrição dos fatores de riscos avaliados nos pacientes selecionados..	39
Tabela 5-	Número de mutações encontradas na região pré-core/core em cada grupo de paciente estudado.....	46
Tabela 6-	Regressão logística simples das mutações observadas nas cepas de HBV isoladas de pacientes dos dois grupos avaliados.....	49

Resumo

Lima LSB. Avaliação de fatores virológicos associados ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) em pacientes com hepatite B crônica [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O objetivo principal deste estudo foi avaliar fatores virais associados com a evolução para o carcinoma hepatocelular (CHC) em pacientes com hepatite B crônica. Para tanto caracterizamos os subgenótipos do HBV, investigamos a ocorrência de mutações nos genes pré-core/core do HBV associadas à presença de CHC avaliamos por análise filogenética a associação de linhagens virais com a ocorrência de CHC e por fim a associação de outros fatores de risco com o desenvolvimento de CHC. Foram incluídos 119 amostras de soro de pacientes com infecção crônica pelo HBV, destas amostras 60 pertencem ao grupo 1 (CHC), que são pacientes com diagnóstico confirmado de carcinoma hepatocelular e 59 amostras pertencem ao grupo 2 (sem CHC) que são pacientes com hepatite crônica sem detecção prévia de nódulos hepáticos. Foram obtidas informações acerca da idade, sexo e naturalidade. Além disso, os pacientes responderam a um questionário sobre fatores de riscos associados ao desenvolvimento de CHC. Foram realizados exames bioquímicos, sorológicos, determinação da carga viral, e amplificação por *nested* PCR e sequenciamento das regiões S/polimerase e pré-core/core do genoma viral para posterior caracterização dos genótipos/subgenótipos do HBV e pesquisa de mutações associadas com evolução da doença hepática. Em relação à idade e sexo não houve grande variação entre os grupos. Quanto à naturalidade a maioria era procedente da região sudeste, seguido pela região nordeste; e por fim seis pacientes eram procedentes de outros países. Com base no sobrenome dos pacientes avaliou-se também a frequência de etnia oriental na casuística estudada, que foi similar nos 2 grupos. O perfil sorológico HBeAg negativo foi o mais frequente nos dois grupos de pacientes, assim como níveis de carga viral abaixo de 2.000 UI/mL. Em relação aos exames bioquímicos foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos níveis séricos de AFP ($p= 0,0013$), FA ($p= 0,0003$) e GGT ($p= 0,005$). Dentre os fatores de risco analisados neste estudo, o consumo de amendoim foi o único que apresentou significância estatística ($p= 0,003$). A região S/pol foi amplificada e sequenciada com sucesso em 58 amostras (28 do grupo 1 e 30 do grupo 2). Entre as 58 amostras analisadas 4 genótipos e 8 subgenótipos do HBV foram identificados, sendo o subgenótipo A1 o mais frequente nos dois grupos. Não se observou diferença estatisticamente significativa na distribuição dos subgenótipos entre os dois grupos de pacientes. Na topologia da árvore filogenética construída com sequências do HBV isoladas dos pacientes incluídos neste estudo e sequências disponíveis no GenBank não se observou padrões de agrupamento associados com o perfil clínico do paciente (com e sem CHC). Foram obtidas sequências de boa qualidade da região pré-core/core em 44 amostras, sendo 20 amostras do grupo 1 e 24 do grupo 2. Diversas das mutações investigadas foram identificadas na região pré-core/core, as quais foram avaliadas estatisticamente para verificar a existência de diferença na frequência das mesmas entre os grupos de pacientes

estudados. Entre as mutações identificadas se destacaram com significância estatística as seguintes mutações: T1768A ($p= 0,006$), a combinação das mutações C1766T + T1768A ($p= 0,043$) e G1888H ($p= 0,05$). Na análise de regressão logística simples foi possível identificar que a chance de um paciente do grupo 2 desenvolver CHC aumenta 14,7 vezes na presença de infecção por cepas do HBV com a mutação T1768A, enquanto que a infecção com cepas do HBV que albergam a mutação G1888H reduz tal chance 2,5 vezes.

Descritores: hepatite B crônica; carcinoma, hepatocelular; genótipo; mutação; vírus da hepatite B; cirrose hepática.

Summary

Lima LSB. *Virological evaluation factors associated with the development of hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with chronic hepatitis B* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

The aim of this study was to evaluate viral factors associated with the progression to hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with chronic hepatitis B. For this goal, we characterized HBV subgenotypes, investigated the occurrence of mutations in pre-core/core genes associated with progression to HCC, characterized HBV strains through phylogenetic analyzes and evaluated risk factors associated with HCC. Were included 119 serum samples from patients with chronic HBV infection that were classified in 2 groups: 60 patients with confirmed HCC diagnosis (group 1) and 59 patients with advanced hepatitis B liver disease without the detection of nodular liver lesions and without HCC (group 2). Data about the age, sex and geographic precedence were obtained from medical records. The patients also answered a questionnaire on risk factors for developing HCC. Biochemical, serological and viral load testing were performed in all samples. Moreover, S/polymerase and precore /core regions of HBV DNA were amplified by nested PCR and sequenced by Sanger method. Sequences were analyzed to identify HBV genotypes and subgenotypes and to detect mutations in the precore/core gene. Patient's age and sex did not differ between the two groups. Most of the patients came from the Southeast region, followed by the Northeast region; and six patients were from other countries. Based on the patient's surname, they were evaluated concerning Eastern ethnicity, which was similar in the 2 groups. Most of the patients included in this study were HBeAg negative and showed viral load bellow 2,000 IU/mL. Concerning the biochemistry assays, statistically significant differences in serum levels of AFP ($p = 0.0013$), AP ($p = 0.0003$) and GGT ($p = 0.005$) were found. Among the risk factors analyzed in this study, peanut consumption was the only one statistically significant ($p = 0.003$). The S/pol region was successfully amplified and sequenced in 58 samples (28 from Group 1 and 30 from Group 2). Among the 58 samples analyzed, 4 genotypes and 8 subgenotypes were identified, subgenotype A1 was the most frequent in both groups and there was no statistically significant difference in the distribution of them between the two groups. In the phylogenetic tree topology built with HBV sequences isolated from patients included in this study and sequences available in GenBank, it was not observed any clustering associated with the clinical profile of the patients (with or without HCC). Sequences of good quality from pre-core/core region were obtained from 44 samples, 20 from group 1 and 24 from group 2. These sequences were analyzed and several mutations were found among which stood out with statistical significance: T1768A ($p = 0.006$) C1766T + T1768A ($p = 0.043$) and G1888H ($p = 0.05$). In addition to the comparative analysis, the changes were subjected to a simple logistic regression analysis which found that the chance of a patient in group 2 developed HCC increases 14.7 times in the presence of HBV infection strains

with the T1768A mutation, while infection with HBV strains harboring the mutation G1888H reduces this chance by 2.5 times.

Descriptors: hepatitis B, chronic; carcinoma hepatocellular; genotype; mutation; hepatitis B virus; liver Cirrhosis.

1. Introdução

1.1. Epidemiologia da infecção pelo Vírus da Hepatite B

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) continua sendo um grave problema de saúde pública global. O HBV pode ser transmitido de forma vertical, quando uma mãe infectada transmite o vírus para o bebê no momento do nascimento, ou de forma horizontal pelo contato sexual ou pela via parenteral pelo contato com sangue contaminado, o que pode ocorrer através de pequenos ferimentos na pele e nas mucosas, compartilhamento de material para uso de drogas (seringas, agulhas, canudos, cachimbos, etc), compartilhamento de material de higiene pessoal (lâminas de barbear e depilar, escovas de dente, alicates de unha ou outros objetos perfurocortantes), utilização de objetos contaminados na realização de tatuagens e colocação de piercings. Hemodiálise, cirurgias e procedimentos odontológicos também constituem fonte de infecção quando medidas adequadas para se evitar contaminação não são adotadas; e por fim, através de transfusão sanguínea, risco que praticamente desapareceu desde que as doações passaram a ser adequadamente triadas para pesquisa desse e outros agentes. A infecção pelo HBV quando contraída no início da vida tem maior potencial de desenvolvimento de doença hepática crônica e evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular (1-3).

A prevalência do HBV varia nas diferentes partes do mundo, já que dependem da taxa de infecção crônica, da proporção de pessoas com o vírus em replicação ativa e da via de transmissão predominante em cada região (4).

Em termos globais, cerca de 2 bilhões de pessoas foram previamente infectadas pelo HBV, destes, 378 milhões se tornaram portadores crônicos (1). Estima-se que mundialmente ocorrem em torno de 600.000 mortes por ano devido a essa infecção (5).

Esses estudos epidemiológicos possibilitaram a identificação da prevalência de portadores crônicos do HBV em diferentes regiões do mundo, as quais foram divididas em áreas de alta, intermediária alta, intermediária baixa e baixa endemicidade (Figura 1) (1, 6). Em áreas de alta endemicidade, a prevalência do HBsAg é superior a 8%, enquanto que nas áreas de endemicidade intermediária alta a prevalência varia de 5-7%, nessas áreas a maioria dos indivíduos se infectam tanto no período perinatal como na infância. Nas áreas de endemicidade intermediária baixa, a prevalência do HBsAg varia de 2-4% e nas de baixa endemicidade é inferior a 2%, nessas áreas a infecção ocorre principalmente por transmissão sexual (6-8).

Os países que apresentam de alta a média endemicidade estão localizados na África Subsaariana, Sul e Sudeste Asiático e Noroeste da América do Sul. Entre as regiões de baixa e baixa a média endemicidade destacam-se alguns países das Américas, norte da África, Europa Ocidental, norte da Ásia e Oceania (9). Segundo o estudo do Ministério da Saúde, realizado com amostras oriundas das capitais dos estados, o Brasil atualmente tem baixa prevalência (10), o que é apenas uma verdade parcial, pois outros estudos mostram que algumas regiões no interior de estados da região

Amazônica, Sul do Espírito Santo e Oeste dos estados do Paraná e Santa Catarina apresentam padrões de endemicidade que vão de intermediário-baixo (2 a 4%) a alto (>8%) (11-14).

Figura 1- Prevalência da infecção crônica pelo vírus da hepatite B no mundo (9).

1.2. O Vírus da Hepatite B

O Vírus da hepatite B (HBV) está classificado na família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*. O HBV apresenta tropismo preferencial pelo fígado, sendo que ao entrar em contato com o corpo humano, o vírus circula primeiramente no sangue e replica-se nos hepatócitos gerando 10^{11} cópias por dia, pode sobreviver até uma semana fora do corpo humano e, no plasma, a vida média do vírus varia de um a três dias, enquanto nos hepatócitos a vida média varia de 10 a 100 dias (15, 16).

O HBV se caracteriza por ser um vírus DNA, cuja molécula é circular, parcialmente dupla fita, com cerca de 3200 pares de bases, que se replica através de um RNA intermediário mediante transcrição reversa (17).

O HBV pode ser encontrado no soro de pacientes infectados apresentando formas diferentes (Figura 2). A primeira é a partícula completa (partícula de Dane) com 42 a 47 nanômetros (nm) de diâmetro e nucleocapsídeo de 27 nm contendo a molécula de DNA e a polimerase viral; a segunda são as partículas incompletas esféricas com cerca de 17 a 25nm de diâmetro; e a terceira são as partículas incompletas cilíndricas com 20 a 22 nm de diâmetro e até 200 nm de comprimento. As partículas incompletas não possuem DNA, somente envelope viral, desta forma essas partículas não são infecciosas (17-19).

O envelope viral é constituído por membrana lipídica e proteínas de superfície: grande (L), média (M) e pequena (HBsAg) (Figura 3). O genoma apresenta 4 regiões de leitura aberta que se sobrepõem entre si: pré-S/S, pré-core/core, Polimerase e X. A região pré-S/S codifica as proteínas do envelope viral, sendo que a tradução das regiões pré-S1, pré-S2 e S formam a proteína grande (L); a proteína média (M) deriva da tradução das regiões pré-S2 e S; e a proteína pequena, conhecida também como HBsAg, forma-se a partir da tradução da região S. Esta é a principal proteína do envelope, que possui o epítipo antigênico “a”, contra o qual são dirigidos os anticorpos neutralizantes anti-HBs (17).

Figura 2 - Diferentes partículas do HBV que podem ser encontradas no soro de um indivíduo infectado. Adaptada, disponível em <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hep-bstruct.gif>, acesso: outubro de 2014.

O gene C codifica a proteína do nucleocapsídeo viral, sendo seu principal constituinte o HBcAg, que é uma proteína de 22 kDa de peso molecular. Esta proteína é formada por 183 aminoácidos, e várias subunidades desta proteína agregam-se formando o capsídeo, que tem a função de empacotar o RNA pré-genômico (RNApg) e a polimerase viral (17, 20, 21). Outro antígeno associado ao gene C, encontrado em forma solúvel no soro de indivíduos infectados pelo HBV, é o antígeno “e” (HBeAg). O HBeAg é derivado da proteólise de um precursor com regiões comuns ao HBcAg, com peso molecular de 17 kDa, formado quando a tradução se inicia na região pré-core. Sua sequência corresponde à proteína do capsídeo com a adição de 29 aminoácidos provenientes da região pré-core na extremidade amina, que sofre posterior hidrólise nas extremidades amina e carboxila. O HBeAg não é essencial para o vírus pois existem mutantes que não produzem esta proteína (22, 23).

A terceira região de leitura aberta é a maior região do genoma viral, contém 2.436 nucleotídeos e codifica a polimerase viral. Esta proteína possui 4 domínios: proteína terminal, na qual se encontra a região que se liga à extremidade 5' do DNA viral e é essencial para o início da síntese do DNA; espaçador, que não apresenta nenhuma função específica; DNA polimerase, com atividade de transcriptase reversa; e RNase H, que cliva RNA apresentado na forma de híbrido com DNA, como acontece durante o ciclo de replicação do HBV. A determinação da sequência nucleotídica do domínio de transcriptase reversa da DNA polimerase permite avaliar a resistência do HBV às drogas antivirais (17, 24).

Por último, a quarta região de leitura aberta é o gene X, possuindo 1386 pb. Este gene codifica a proteína X, que pode se ligar ao DNA e ativar promotores celulares (17, 24).

Figura 3- Estrutura do vírus da hepatite B. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis_B_virus, acessado: outubro de 2014.

1.3. Aspectos clínicos da infecção pelo HBV

A infecção aguda pelo HBV cursa de forma assintomática ou sintomática e de forma rara apresenta quadro agudo grave (fulminante). Uma média de 90 a 95% dos indivíduos adultos acometidos conseguem ter um controle imunológico adequado da infecção e inibir a replicação viral, mas cerca de 5 a 10% desenvolvem a forma crônica da doença, que no decorrer dos anos pode levar a complicações hepáticas ainda mais graves, como a cirrose e o carcinoma hepatocelular (25, 26).

A cronificação da infecção pelo HBV ocorre quando há persistência do HBsAg por mais de 6 meses. Grande parte dos portadores crônicos de HBsAg são assintomáticos e apresentam formas leves de envolvimento hepático, quando há sintomas, eles são inespecíficos, predominando fadiga, mal-estar geral e sintomas digestivos. Em uma parcela dos casos crônicos, após anos de evolução, pode aparecer cirrose, com surgimento de icterícia, edema, ascite, varizes de esôfago e alterações hematológicas. Também pode evoluir para carcinoma hepatocelular, às vezes sem passar pelo estágio de cirrose (25, 26).

A indicação de tratamento da infecção pelo HBV depende de diferentes fatores. De forma geral, ela se faz levando-se em consideração a carga viral do HBV, o nível das transaminases hepáticas e o grau de acometimento necro - inflamatório e de fibrose hepática ao exame anátomo - patológico do fígado. Aqueles pacientes HBsAg reagentes que durante seu seguimento clínico não apresentam indicação de tratamento, devem ser monitorados periodicamente através de avaliação clínica e laboratorial.

O curso natural da infecção crônica pelo HBV compreende quatro fases

distintas, nem sempre presentes em todos os casos (7). A primeira é definida como fase de imunotolerância, a qual é mais comumente vista em indivíduos que adquiriram o HBV por transmissão perinatal ou nos primeiros anos de vida (7) e é caracterizada pela presença sérica do HBsAg e do HBeAg, de altos níveis de HBV DNA, aminotransferases (ALT, AST) normais ou discretamente elevadas e sem lesões hepáticas significativas. Entre indivíduos expostos ao HBV por transmissão perinatal ou na infância, a fase de imunotolerância pode permanecer por 20 a 30 anos (7, 26, 27), porém, quando o indivíduo se infecta com o HBV durante a fase adulta, esta fase pode ser mais curta ou ausente (26).

A segunda fase é chamada de imunoativa ou de hepatite B crônica, caracterizada pela presença do HBeAg no soro, lesões no fígado, altos níveis de HBV DNA e aumento persistente nos níveis das aminotransferases. Esta fase ocorre após a transmissão horizontal entre crianças ou na fase adulta, também pode ocorrer tardiamente entre pessoas que adquiriram a infecção pelo HBV durante a transmissão vertical, iniciando logo após a fase de imunotolerância. Pacientes com hepatite B crônica HBeAg positivos podem apresentar soroconversão espontânea do HBeAg para o anti-HBe seguido por uma redução na replicação viral e ALT. Esta fase pode durar anos e resultar no desenvolvimento de complicações hepáticas (7, 28, 29).

A terceira fase é conhecida como portador inativo do HBV, na qual se observa a presença do anti-HBe no soro, títulos baixos ou indetectáveis do HBV DNA, ALT normal, mínima lesão histológica hepática, podendo assim o paciente permanecer por muitos anos ou por toda a vida.

E a quarta e última fase é a de reativação onde este quadro é

acompanhado usualmente de elevação da ALT e HBV DNA, ausência do HBeAg e reativação necroinflamatória do fígado em pessoas que sejam portadoras inativas do HBV ou que tenham recebido diagnóstico de hepatite B resolvida (infecção previa pelo HBV, sem sinais virológicos, bioquímicos ou evidência histológica de doença viral). Esses pacientes, em geral, apresentam idade elevada e possuem cepas do HBV com mutações que deletam a expressão de HBeAg, e são denominados portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo (7, 26-29).

1.4. Replicação do genoma do HBV

O HBV, apesar de possuir DNA como material genético, utiliza a transcrição reversa para propagar seu genoma. O HBV penetra nos hepatócitos ligando-se a um receptor celular específico, o polipeptídio de co-transporte taurocolato de sódio (NTCP), posteriormente ocorre a fusão da partícula viral com a membrana celular e penetração do nucleocapsídeo na célula, que transporta o DNA viral até o núcleo (30). No núcleo, ocorre a síntese completa da fita positiva e o DNA viral é convertido em uma molécula de DNA circular covalentemente fechada (cccDNA - do inglês “covalently closed circular DNA”).

Muitas cópias deste cccDNA são sintetizadas através de um ciclo viral intracelular para servir como molde para a formação do RNA pré-genômico e de RNAs mensageiros (mRNAs). Os mRNAs são responsáveis pela síntese de proteínas estruturais e não estruturais, entre as quais se encontra a polimerase

com função de transcriptase reversa, que desencadeia a formação do DNA viral a partir das moléculas de RNA pré-genômico. (31).

Após a síntese dos produtos dos genes virais e do RNA pré-genômico, esses são seletivamente encapsidados juntamente com a polimerase viral dentro das proteínas do core no citoplasma. Os nucleocapsídeos virais montados são envelopados e as partículas virais completas são exportadas por vesículas transportadoras para fora da célula. Como as proteínas do envelope são produzidas em grande quantidade a partir de mRNAs menores, ocorre a formação de partículas virais vazias (sem ácido nucléico), constituídas apenas por essas proteínas.

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. Algumas moléculas de HBV DNA podem ser integradas ao DNA dos hepatócitos, porém essa integração não é um passo essencial no ciclo de vida do vírus (32).

1.5. Genótipos do HBV

Atualmente, o HBV está classificado em 10 genótipos identificados por letras maiúsculas do alfabeto (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J) (33-35). Existe também o conceito de subgenótipos, dividindo os genótipos A, B, C, D, e F, que apresentam diversidade maior que 4%, mas inferior a 8% na sequência de nucleotídeos do genoma completo. No quadro 1, estão colocadas as regiões

do mundo onde os diferentes genótipos e subgenótipos do HBV são encontrados em maior frequência (Quadro 1).

Quadro 1 - Distribuição dos genótipos do HBV pelo mundo

GENÓTIPO	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
A	África, Europa e América
B/C	Sudeste Asiático, China e Japão
D*	Bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio
E	África Ocidental
F	América Central e do Sul
G	Europa e América
H	América Central e México
I	Vietnã, Laos e China
J**	Japão

*Ampla distribuição geográfica; ** um único caso descrito.

No Brasil os genótipos A, D e F circulam em todas as regiões (36, 37), sendo que o genótipo A é o mais prevalente em todo o Brasil com exceção da região Sul onde o genótipo D predomina. O genótipo F é mais frequente no Norte do país, especialmente entre populações indígenas (38). Em um estudo, envolvendo pacientes provenientes de diferentes regiões do Brasil, foi encontrado o genótipo A como sendo o mais frequente, seguido dos genótipos D, C, F e B. Outro estudo, realizados em Ribeirão Preto, revelou os genótipos nas seguintes frequências: D - 56,5%, A - 41,3%, e F - 2,2% (39).

Entre pacientes com hepatite B encaminhados a hospitais públicos de Belém, Pará, encontrou-se predomínio do genótipo A (89,1%), seguido dos genótipos F (8,7%) e D (2,2%) (40). Em uma comunidade semi-isolada da

Bacia Amazônica, em Cachoeira Porteira, Pará, encontrou-se os genótipos A (63,6%), D (18,2%) e F (1,9%) (41).

Em um estudo realizado em Porto Velho, Rondônia, foi encontrada maior prevalência para o subgenótipo A1 (37,1%), seguido de D3 (22,8%), F2a (20,0%), D4 (17,1%) e D2 (2,8%) (42). Em Salvador, os seguintes genótipos foram encontrados em hepatites agudas: A (87,5%); D (10,0%) e F (2,5%) (43); enquanto que em hepatites crônicas foram encontrados os genótipos A (86,8%), F (11,8%) e B (1,6%) (44). No estado de Santa Catarina, avaliando a presença dos genótipos do HBV entre pacientes hemodialisados, foram encontrados A (30,6%), D (57,1%) e F (12,2%) (36). Estes estudos mostram que os genótipos A, D e F são de fato os mais prevalentes no país, e ainda auxiliam a mapear a história da infecção pelo HBV no Brasil.

1.6. Importância clínica dos genótipos do HBV

Diversos estudos têm avaliado o impacto dos genótipos do HBV sobre a patogênese e o curso clínico da doença. Foi observado que os pacientes com infecção pelo genótipo A do HBV apresentam altas taxas de resposta ao tratamento com interferon e eliminação do HBsAg, além de apresentarem doença hepática menos grave que a causada pelo genótipo D, o qual também apresenta menor resposta ao tratamento. Melhor resposta ao tratamento com interferon também foi observada para o genótipo B em relação ao C (45).

Alguns estudos consideram que o genótipo D está mais associado com hepatites fulminantes que os outros genótipos (45). Ainda se tratando do genótipo D, um estudo de variabilidade genética intra-paciente comparativa

entre diferentes genótipos observou que, de maneira geral, o genótipo D apresenta maior variabilidade do que o A, o que pode impactar na evolução clínica da doença (46). Já os pacientes infectados com genótipo B apresentam maiores taxas de soroconversão precoce para HBeAg do que os com genótipo C. Além disso, os pacientes infectados com o genótipo B mostram um maior índice de soroconversão espontânea após seguimento prolongado.

Sabe-se também que os genótipos se correlacionam com as regiões geográficas, motivo pelo qual são boas ferramentas para estudos epidemiológicos (33). Existem genótipos associados a distintas regiões geográficas do mundo, de tal maneira que sua discriminação permite conhecer a origem da cepa. Ademais, em países com alta taxa de migração diversos genótipos virais podem ser encontrados (47, 48).

Sobre a evolução clínica da doença, alterações na estrutura genética podem resultar em diferentes níveis de patogenicidade do HBV (33). Alguns estudos já sugerem o genótipo C como fator de risco para desenvolvimento do CHC (49).

1.7. Tratamento

A grande população de indivíduos infectados pelo HBV com indicações para tratamento específico são pacientes com hepatite B crônica e cirrose hepática. O principal objetivo no tratamento da infecção crônica pelo HBV é o de suprimir a replicação viral antes que a doença evolua e ocorra dano irreversível ao fígado (28).

Diversos medicamentos têm sido utilizados no tratamento da infecção crônica pelo HBV. O Interferon foi a primeira droga aprovada. Esse medicamento possui atividade antiviral e imunomoduladora, tais ações são de grande importância para o tratamento do HBV. A terapia com Interferon deve ser considerada em pacientes com hepatite B crônica ou cirróticos, com evidências de replicação viral (HBeAg e HBV DNA positivos) e doença hepática ativa (aminotransferases elevadas e atividade necroinflamatória) (28).

O Interferon possui duas apresentações (Interferon-alfa e Interferon-alfa peguilado). O Interferon-alfa foi o primeiro a ser desenvolvido seguido do Interferon-alfa peguilado que o substituiu por apresentar melhores propriedades farmacocinéticas e menos frequência de injeções com eficácia igual (50).

A descoberta de que o HBV utiliza a enzima transcriptase reversa no seu ciclo de replicação celular, levou ao uso de medicações inibidoras dessa enzima, sendo conhecidos como análogos nucleos(t)ídeos (AN), como a lamivudina, adefovir, entecavir, telbivudina e tenofovir (50).

Os AN são medicamentos de uso oral que atuam primeiramente 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 do medicamento leva a inibição rápida e potente da replicação viral, porém não consegue eliminar por completo o cccDNA viral das células hepáticas infectadas. Portanto, no uso de AN existe a necessidade de tratamento em longo prazo, podendo levar a seleção de cepas do HBV resistentes à ação desses medicamentos causando prejuízo no sucesso do tratamento (50).

1.8. Carcinoma hepatocelular (CHC) e fatores de riscos

O CHC é um dos principais tumores malignos representando cerca de 5% de todas as neoplasias malignas. Ele é considerado como o quinto e oitavo tipo de câncer mais frequente entre os homens e as mulheres, respectivamente (51).

As três mais importantes causas do CHC são as infecções crônicas por HBV e HCV e a cirrose alcoólica (52). Os fatores que aumentam os riscos de desenvolver CHC são idade avançada, sexo masculino, doença hepática crônica, cirrose, exposição a aflatoxinas e diabetes mellitus (53-55).

Vários estudos demonstraram que os níveis séricos do HBV DNA, bem como outros fatores virológicos, estão associados ao desenvolvimento do CHC (56).

A exposição a aflatoxinas também constitui um fator de risco importante para o desenvolvimento de CHC. Aflatoxina é a denominação dada a um grupo de micotoxinas que compreendem um conjunto complexo de substâncias tóxicas e compostos químicos venenosos, produzidos por fungos (***Aspergillus flavus***, ***Aspergillus parasiticus*** e ***Aspergillus niger***) que se desenvolvem em vários alimentos, principalmente em grãos (57, 58).

A contaminação por micotoxinas pode variar de acordo com as condições ambientais (nutrientes, luz, oxigênio, temperatura, pH, umidade relativa do ar e do substrato), métodos de processamento, produção e armazenamento dos produtos (59). Alguns produtos alimentícios podem conter aflatoxinas como amendoim, milho, feijão, arroz, trigo, entre outros. Dentre eles, o amendoim é o mais frequentemente encontrado com aflatoxinas (60).

As aflatoxinas são classificadas em quatro formas principais: B1, B2, G1 e G2. A aflatoxina B1 (AFB1) apresenta elevada hepatotoxicidade e maiores concentrações nos substratos, seguida de G1, B2 e G2 (61, 62).

O CHC em consequência da toxicidade crônica de AFB1 apresenta grande amplitude geográfica e incidência maior entre homens. A exposição a AFB1 também potencializa o risco de carcinoma hepático associado ao HBV (63, 64).

1.9. HBV e hepatocarcinogênese

O HBV causa CHC por vias diretas e indiretas. No segundo caso, como o vírus provoca lesão crônica dos hepatócitos, com contínua inflamação e atividade de necro-regeneração, ocorre acúmulo de mutações potencialmente críticas no genoma dos hepatócitos, com posterior transformação maligna e expansão clonal, levando ao desenvolvimento do CHC (56, 65).

O HBV tem demonstrado ser um vírus oncogênico, o que é observado pela maior incidência do CHC nas regiões com maior prevalência do HBsAg (66), além das evidências biológicas associando o HBV da marmota (WHBV) com o desenvolvimento de CHC. Nesse estudo 100% dos animais infectados com WHBV desenvolveram CHC (67).

Um dos mecanismos de oncogênese pelo HBV é a integração do genoma viral ao do hospedeiro, que pode levar à ativação de genes celulares. Esta observação é corroborada pelo fato de que as sequências integradas do HBV DNA podem ser encontradas em cerca de 80% dos casos de CHC relacionados com a infecção pelo HBV (68).

A integração do HBV DNA também pode ser encontrada em tecidos não cancerosos. Esta ocorre de forma múltipla em vários locais aleatórios do genoma do hospedeiro, sendo que pode ocorrer também durante os estágios iniciais da infecção. A integração do HBV DNA pode ter várias consequências mutagênicas no genoma do hospedeiro, incluindo a duplicação invertida de grande porte, deleções, amplificações e translocações, que podem resultar em instabilidade cromossômica (69). A transformação maligna ocorre quando uma alteração genética confere uma vantagem de crescimento seletivo para a célula afetada. Surpreendentemente, a integração do HBV DNA perto de oncogenes conhecidos parece ser um evento raro. O HBV pode se integrar em genes que são responsáveis pelo controle da proliferação e diferenciação celular, como o gene da telomerase humana hTERT, MAPKI, o gene da ciclina A e o gene do fator de necrose tumoral associado ao receptor da proteína I (68).

De todas as proteínas do HBV, a proteína HBx tem gerado o maior interesse na hepatocarcinogênese associada a esse vírus. Cerca de 95% dos pacientes com cirrose e displasia relacionadas ao HBV são positivos na imunohistoquímica para HBx, a qual é expressa em 70% dos pacientes com CHC. Esta proteína possui atividade transativadora de promotores de genes virais e celulares, mas o mecanismo preciso pelo qual ela está relacionada com o CHC ainda não foi elucidado (56).

Além da proteína HBx, outros elementos genéticos do HBV têm sido associados à hepatocarcinogênese. Estes incluem o gene truncado pré-S2/S, que codifica um grupo de proteínas reguladoras ativadoras de transcrição, a partir da mesma região genômica que codifica as proteínas do envelope do

vírus (70, 71). Estes ativadores de transcrição sofrem fosforilação pela proteína quinase C, com subsequente ativação das vias de sinalização responsáveis pela ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B. A ativação dessas vias pode causar um aumento na proliferação de hepatócitos. Além disso, a superprodução de proteínas do envelope, particularmente LHBs e MHBs, podem levar à superacumulação destas no citoplasma dos hepatócitos, causando o aparecimento histológico de hepatócitos em vidro fosco (72), o que pode causar estresse celular e aumentar a predisposição das células para sofrer transformação maligna (56).

1.10. Carga Viral do HBV e Hepatocarcinogênese

Além do mecanismo de hepatocarcinogênese em nível molecular, outros fatores virais estão associados ao risco elevado de desenvolvimento de CHC. O mais importante e talvez clinicamente mais relevante é o nível de HBV DNA (carga viral).

Estudos prévios têm demonstrado que altos níveis HBV DNA são associados a um risco maior de CHC (73, 74). Carga viral superior a 2000 UI/mL se mostrou como um forte fator preditor de evolução para o CHC, embora níveis mais baixos de HBV DNA ainda apontem para o risco de desenvolvimento de CHC. Existe uma clara concordância entre o nível de HBV DNA no paciente (significando maior replicação viral) e o risco de desenvolvimento de CHC (75). Da mesma forma, foi relatado que um elevado nível de HBV DNA, especificamente para o genótipo C, é um fator preditor de risco para metástases ou recorrência de CHC (76).

Embora a positividade do HBeAg já tenha sido considerada como um fator de risco, não foi mostrada como um fator preditor independente de outros fatores para o CHC em estudos recentes, sendo um fator dependente tanto dos níveis de DNA como do genótipo do HBV (73, 77). Os genótipos D e C com carga viral elevada tem se mostrado como fatores preditores independentes de desenvolvimento de CHC (74, 78). Da mesma forma o genótipo C, incluindo os subgenótipos C1 e C2 são associados com maior risco de cirrose e CHC nas pessoas mais velhas comparado com o genótipo B. O subgenótipo B2 tem sido associado à CHC em jovens não cirróticos (79-81).

1.11. Mutações no genoma do HBV e Hepatocarcinogênese

As mutações comumente relatadas associadas ao CHC são mutações na região pré-S/S (pré-S1 e pré-S2) e várias mutações na região pré-core/core: dupla mutação no promotor do core A1762T/G1764A, G1896A, T1753V (A, C ou G) e C1653T (82-86). As deleções entre os nucleotídeos 2842-104 e 3206-60 da região pré-S/S foram relatadas em pacientes com CHC, em 48,0% e 28,6% destes pacientes, respectivamente (86).

Também se encontrou que as mutações na região pré-S/S podem aumentar em 3,77 vezes o risco de CHC, enquanto que diversas mutações na região pré-core/core tem o mesmo efeito: C1653T (2,76 vezes), T1753V (2,35 vezes), e a dupla mutação A1762T/G1764A (3,79 vezes) (86). Da mesma forma, tem sido caracterizado que a presença de mais de uma dessas mutações (sinergismo) podem aumentar ainda mais o risco de CHC (86).

Outras mutações diferentes nos genes S e X e na região pré-core/core encontradas nos genótipos B, C1 e C2 foram associadas com CHC em um trabalho realizado em Hong Kong avaliando diferentes regiões do genoma do HBV: C1165T, T2712C/A/G e A/T2525C no genótipo B; T31C, T53C e A1499G no subgenótipo C2 e G1613A, G1899A, T2170C/G e T2441C no subgenótipo C1 (87).

O gene X do HBV genótipo C apresentou uma mutação no codon 38 (prolina para serina), a qual foi identificada como um fator de risco para o desenvolvimento do CHC (88). Também uma mutação no codon 31 desse gene tem sido fortemente associada ao CHC em Taiwan (89). Mutações no HBx (M130K e V131I) foram associadas com diferentes evoluções da hepatite B em casos infectados com genótipo F (90). Dessa forma, estes estudos sugerem que os diferentes genótipos do HBV podem, através da variabilidade que apresentam no seu genoma, ter mecanismos diferentes de hepatocarcinogênese.

Recentemente, linhagens de genótipo F do HBV (genótipo mais comum na América Espanhola) com numerosas inserções ou deleções nas regiões pré-S e no promotor basal do core, e os genótipos D e B6 com a mutação G1896A foram associadas com diferentes evoluções da infecção viral (91). Existem menos dados sobre a associação de genótipos virais e CHC no continente americano, em particular, em relação ao genótipo F. O genótipo F foi associado no Alaska com o desenvolvimento de CHC, mas nenhuma mutação foi relacionada com esta evolução clínica (92).

No Brasil, a frequência dos genótipos A, D e F é elevada, mas pouco se conhece sobre sua associação com o CHC. Até o presente momento, nenhum

estudo foi realizado no estado de São Paulo caracterizando os genótipos e subgenótipos do HBV, encontrados em pacientes com CHC, como também no Brasil ainda não foram determinadas mutações específicas presentes no genoma desse vírus que possam estar associadas com a evolução para CHC. Dessa maneira, no presente estudo foram determinadas as diferenças no perfil de mutações entre os diferentes genótipos virais encontrados na população estudada, assim como, a relação dessas mutações com evolução para o CHC.

2. Objetivos

1.12. Objetivo Principal

- Avaliar fatores virais associados com a evolução para o CHC em pacientes com hepatite B crônica.

1.13. Objetivos Específicos

- Determinar os subgenótipos do HBV;
- Pesquisa de mutações nos genes pré-core/core do HBV associadas à evolução para CHC;
- Caracterização de possíveis linhagens virais de HBV associadas com CHC através de análises filogenéticas;
- Analisar fatores de risco que possam levar ao desenvolvimento do CHC.

3. Casuística e Métodos

1.14. População de estudo

A coorte de pacientes estudada compreende pacientes acompanhados no ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - ICESP da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A realização deste projeto foi aprovada pelo comitê de ética do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq 0255/11). Os pacientes foram selecionados através da análise dos prontuários disponíveis no ambulatório de Gastroenterologia e aqueles que se enquadraram no perfil foram convidados a participar do estudo. Após lerem e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderem a um questionário sobre fatores de risco (consumo de amendoim, milho, soja, álcool, história de carcinoma hepatocelular na família e presença de diabetes), os pacientes foram submetidos à coleta de sangue. A inclusão dos pacientes no estudo foi realizada no período de 2011 a 2012.

Os pacientes selecionados foram divididos em 2 grupos após avaliação clínica e laboratorial realizada pela equipe médica responsável do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da FMUSP:

Grupo 1 (CHC): pacientes com infecção crônica pelo HBV e com diagnóstico confirmado de carcinoma hepatocelular (n=60). Este diagnóstico foi

realizado por meio de tomografia computadorizada (TC) na maioria dos pacientes (78,3%), ressonância magnética (11,7%) e biópsia hepática (5,0%), seguindo as orientações recentemente publicadas (93).

Entre esses pacientes 78,3% (47/60) apresentavam diagnóstico de cirrose hepática. Em relação ao número e tamanho dos tumores identificados a maioria (70%; 42/60) dos pacientes no momento do diagnóstico apresentava tumor único de tamanho variando de 1 a 9 cm (média de 3,4 cm). Nove pacientes (15%) apresentaram 2 tumores variando de 1 a 9 cm (média de 5 cm) e 4 casos apresentaram mais de três tumores com variação de 3 a 7 cm (média 4,8 cm).

Grupo 2 (pacientes com doença hepática avançada F3/F4 sem CHC): pacientes com hepatite crônica pelo HBV sem diagnóstico prévio de nódulos hepáticos (n=59). Esses pacientes foram selecionados para compor este grupo após realização de exames de Elastografia hepática (FibroScan) e Ultrassonografia para avaliação do nível de fibrose, presença de cirrose e para confirmar a ausência de nódulos hepáticos.

Após 6 meses da inclusão no estudo estes pacientes foram submetidos novamente à realização de ultrassonografia para avaliação de possível avanço da doença hepática, aqueles que desenvolveram nódulos hepáticos foram incluídos no grupo 1 e submetidos a nova coleta de sangue para realização dos procedimentos laboratoriais.

A maioria (89,8%; 53/59) dos pacientes incluídos neste grupo apresentaram diagnóstico de cirrose hepática, o qual foi baseado na ultrassonografia e/ou elastografia hepática e exames bioquímicos.

Pacientes que apresentaram coinfeção por HCV ou HIV e que tiveram esquistossomose foram excluídos do estudo.

1.15. Procedimentos laboratoriais

Após a coleta de sangue dos pacientes selecionados, as amostras foram encaminhadas para os respectivos laboratórios para a realização dos exames laboratoriais específicos:

- Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP: realização dos exames bioquímicos e pesquisa de marcadores sorológicos de infecção pelo HBV (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc, HBeAg, anti-HBe);
- Laboratório de Técnicas Especiais – Setor de Biologia Molecular - Hospital Israelita Albert Einstein para a detecção e quantificação do HBV DNA (carga viral).
- Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo: exames de biologia molecular para caracterização genética do HBV (genotipagem e mutações)

Exames Bioquímicos

As amostras coletadas foram submetidas à realização dos seguintes exames bioquímicos: fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama GT (GGT), bilirrubina total,

albumina, colesterol, bem como um exame hematológico (contagem de plaquetas) .

Os exames bioquímicos foram realizadas no equipamento Cobas 8000 módulo C702 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) utilizando os conjuntos diagnósticos específicos para este sistema. Para a fosfatase alcalina, gama GT, bilirrubina total e colesterol foram usados métodos colorimétricos; para dosagem de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase utilizou-se o método de ultravioleta; para contagem de plaquetas utilizou-se o método automatizado no analisador hematológico Sysmex XT (Sysmex Corporation, Kobe, Japão).

Os valores de referência dos exames bioquímicos segundo o laboratório são: FA (mulher 35 a 104 U/L e homem 40 a 129 U/L), AST (mulher inferior a 31 U/L e homem inferior a 37 U/L), ALT (mulher inferior a 31 U/L e homem inferior a 41 U/L), GGT (mulher 5 a 36 U/L e homem 8 a 61 U/L), Bilirrubina total 0,20 a 1,00 mg/dL, Albumina 3,4 a 4,8 g/dL, Plaquetas 140-450 mil/mm³, Alfaetoproteína até 10,0 ng/mL e Colesterol (desejável: inferior a 200 mg/dL; limítrofe: 200-239 mg/dL; elevado: superior ou igual a 240 mg/dL).

Marcadores sorológicos

A pesquisa de marcadores sorológicos de infecção pelo HBV foi realizada no equipamento Roche Elecsys 2010 (MODULAR ANALYTICS E170) utilizando os kits específicos para cada marcador.

Quantificação do HBV DNA

O HBV DNA foi quantificado a partir de 0,2 mL de soro utilizando-se o kit Abbott Real Time HBV cujo limite de detecção e de quantificação é 15 UI/mL (94). Em algumas amostras com menos de 15 UI/mL, foi possível a detecção do HBV DNA, mas não a quantificação.

Caracterização genética do HBV

Extração do DNA viral

O HBV DNA foi extraído a partir do soro de cada paciente utilizando o QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Para este procedimento foi utilizado 1 mL de soro, que foi concentrado por centrifugação a 13.200 rpm em centrífuga refrigerada (4 °C) durante 1 hora. Ao término da centrifugação, foi retirado parte do sobrenadante, restando o volume final de 200 µL. Essa etapa foi a única modificação do protocolo original do fabricante.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Em paralelo ao exame de quantificação do HBV DNA foram realizadas reações de amplificação do genoma do HBV em todas as amostras coletadas. Foram realizadas amplificações por PCR das regiões S e polimerase (S/Pol) para caracterização dos genótipos e subgenótipos do HBV, e das regiões pré-

core/core para pesquisa de mutações específicas previamente associadas com desenvolvimento de CHC.

As reações foram realizadas utilizando-se iniciadores específicos para as regiões de interesse do genoma do HBV e a enzima Platinum Taq DNA polimerase (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), conforme as orientações descritas pelo fabricante. Para os ciclos de variação de temperatura foi utilizado o termociclador Mastercycler® EP Gradient S (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Para se avaliar a ocorrência de contaminação cruzada entre as amostras e de reagentes, e dessa forma evitar resultados falso-positivos, foram incluídos controles negativos (água) entre cada 6 amostras analisadas. Foi também utilizado um controle positivo para monitoramento da qualidade e confiabilidade dos resultados.

Amplificação das regiões S/polimerase do HBV DNA

Para a amplificação da região S/Pol foram utilizados iniciadores que amplificam um fragmento de 1306 pares de base (pb). No caso de insucesso na amplificação dessa região foi realizada a amplificação de um fragmento de 734 pb da mesma região genômica. Por fim, nos casos que também não foi possível amplificar esse fragmento, foi realizada PCR para amplificação de um fragmento de 419 pb.

Os iniciadores utilizados na primeira etapa de amplificação da região S/Pol foram: PS3132_F (5'-CCT CCY GCH TCY ACC AAT CG-3'; nt 3132-3151) e 2920M_R (5'-ACG TCC CKC GHA GRA TCC AG-3'; nt 1471- 1398) e

para a segunda etapa de amplificação os iniciadores foram: PS3201_F (5'-CAY CCH CAG GCM ATG CAG TGG-3'; nt 3201- 3221) e P1285_R (5'-CWA GGA GTT CCG CAG TAT GG-3'; nt 1285- 1266) (95). Para as duas etapas de PCR foram realizados ciclos de variação de temperatura em termociclador, uma incubação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos a 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 de 734 pb da região S/Pol os iniciadores utilizados para a primeira etapa foram: FHBS1_F (5'-GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTC-3'; nt 244-267) e RADE1_R (5'-TGC GTC AGC AAA CAC TTG GC-3') e para a segunda etapa os primers utilizados foram: FHBS2_F (5'-CGT GGT GGA CTT CTC TCA ATT TTC-3'; nt 255- 278) e RADE2_R (5'-CAT ACT TTC CAA TCA ATA GG-3') (41). Para as duas etapas de PCR foram realizados ciclos de variação de temperatura em termociclador, uma incubação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos; 56°C (primeira etapa) ou 50°C (segunda etapa) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto.

A amplificação de 416 pb da região do gene S foi realizada com os iniciadores FHBS1_F e RHBS1_R (5'-AAA TKG CAC TAG TAA ACT GAG CCA-3'; nt 266- 691) para a primeira etapa, e para a segunda etapa os primers foram utilizados FHBS2_F e RHBS2_R (5'-GCC ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC-3'; nt 648- 671) (37). Para as duas etapas de amplificação foram realizados ciclos de variação de temperatura em termociclador, uma incubação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida de 29 ciclos a 94°C por 30 segundos; 56°C

(primeira etapa) ou 50°C (segunda etapa) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto.

Amplificação das regiões pré-core/core do HBV DNA

Os iniciadores utilizados para a amplificação da região pré-core/core foram: HBV core 1 (5'-GCA TGG AGA CCA CCG TGA AC-3'; nt 1606-1625) e core 2 (5'-GGA AAG AAG TCA GAA GGC AA-3'; nt 1955-1974) na primeira etapa, e para a segunda etapa os primers utilizados foram: HBV core 3 (5'-CAT AAG AGGACT CTT GGA ACT-3'; nt 1653-1672) e core 4 (5'-GGC AAA AAA GAG AGT AAC TC-3'; nt 1940-1959) (96, 97). Para as duas etapas de amplificação foram realizados ciclos de variação de temperatura em termociclador, uma incubação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos; 55°C (primeira e segunda etapa) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto.

Identificação e quantificação do produto da PCR

Após a amplificação, a identificação do produto obtido foi realizada por eletroforese em gel de agarose. Para isto, foram misturados 4 µL do produto final da PCR com 1 µL do tampão 10X Bluejuice Gel Loading Buffer (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a mistura foi aplicada em gel de agarose 2% preparada com tampão TAE 1X corado com brometo de etídeo. Também foi aplicado no gel um padrão de tamanho e de massa (Low DNA Mass Ladder, InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

permitindo avaliar o tamanho e a concentração do amplicon obtido na reação de PCR.

Sequenciamento

Os amplicons gerados foram inicialmente purificados usando a enzima ExoSAP (ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit, GE Healthcare) e então submetidos a reação de sequenciamento. A técnica de sequenciamento empregada foi a derivada da metodologia de Sanger et al., (98) onde utilizou-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o *kit* ABI Prism^R BigDyeTM Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA); a eletroforese capilar foi realizada no Sequenciador Automático ABI 3500 (Applied Biosystems). Foram geradas sequências a partir das duas fitas de DNA (sense e antisense) para garantir a melhor qualidade nos resultados obtidos.

Para o sequenciamento da região S/Pol (1306pb) foram utilizados três pares de iniciadores: **1-** PS3201 F e HBV 477 R (5' GGA CAV ACG GGC AAC ATA CCT T 3'; nt 477- 456); **2-** L372 F (5' TCG YTG GAT GTR TCT GCG GCG TTT TAT 3'; nt 370- 396) e RADE R (5' TCR CAN ACY TTC CAR TCA ATN GG 3'; nt 989- 9700; **3-** P781 F (5' GAR TCC CTT TWT RCC KCT RTT ACC 3'; nt 781- 804) e P1285 R (95). Para o sequenciamento do fragmento de 734pb foram utilizados os dois pares de iniciadores: **1-** FHBS2 F e RHBS2; **2-** 5'LAM5 F (5' TGC RYY TGT ATT CCC ATC CCA TC 3') e RADE 2 R (41); e para o sequenciamento das regiões do gene S (416pb) e do pré-core/core foram os mesmos iniciadores usados no segundo ciclo de amplificação.

1.16. Análise das sequências

Inicialmente a qualidade das sequências foi analisada 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 utilizando-se o programa CAP3. Ambos os programas estão disponíveis no site *Electropherogram quality analysis* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

Para a classificação dos genótipos e subgenótipos 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 (99). Posteriormente, o alinhamento foi submetido à análise filogenética utilizando-se o programa BEAST v.1.7.3 (100).

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, 1814-1816 (códon de iniciação do pré-core), 1858, 1862, 1888, 1899.

1.17. Análise estatística

As análises descritivas foram realizadas de acordo com a natureza das variáveis e os resultados foram apresentados em tabelas para melhor interpretação das informações. A comparação das variáveis quantitativas entre

os grupos foi realizada utilizando o teste Mann Whitney e para a comparação das variáveis qualitativas foi utilizado o teste de Fisher (1922). Por fim, a regressão Logística (McCullagh e Nelder, 1989) foi utilizada para estimar as razões de chances acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança 95%. Todos os cálculos foram realizados através do pacote estatístico R, versão 3.1.2 (R Core Team, 2014) e o nível de significância considerado foi 5%.

4. Resultados

1.18. Dados demográficos, laboratoriais, virológicos e clínicos (tratamento) dos pacientes selecionados para o estudo

Foram obtidas informações dos pacientes selecionados para o estudo acerca da idade, sexo, naturalidade e etnia oriental (Tabela 1). Em relação à idade e sexo não houve grande variação entre os grupos. Quanto à naturalidade a maioria era natural da região sudeste, seguido pela região nordeste; e por fim seis pacientes eram procedentes de outros países. Com base no sobrenome dos pacientes avaliou-se também a frequência de etnia oriental na casuística estudada, que foi similar nos dois grupos (Tabela 1).

Os resultados dos exames laboratoriais realizados no dia da inclusão dos pacientes no estudos estão descritos na tabela 2. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos níveis séricos de AFP, FA e GGT (Tabela 2).

Tabela 1 - Descrição das características demográficas dos pacientes selecionados

Características	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=59)	P
Idade (anos); mediana (25-75%)	58 (51-67,7)	58 (48-62)	0,106
Gênero; n (%)			
Masculino	52 (87)	46 (78)	0,237
Feminino	8 (13)	13 (22)	
Naturalidade (Região Brasileira); n (%)			
Nordeste	14 (23)	12 (20,3)	0,128
Centro-Oeste	2 (3)	2 (3,4)	
Sudeste	36 (60)	41 (69,5)	
Sul	2 (3)	4 (6,8)	
Outros Países	6*(10)	0	
Etnia; n (%)			
Não-oriental	51 (85)	48 (81,4)	0,631
Oriental	9 (15)	11 (18,6)	

*Japão, Portugal e Coreia do Sul

Tabela 2 - Descrição dos exames laboratoriais dos pacientes selecionados para o estudo

	Grupo 1	Grupo 2	P
Dosagens; mediana (25-75%)			
AFP (ng/mL)	4,5 (2,08-58,2)	2,6 (1,75-3,6)	0,0013
FA (U/L)	105 (76,7-163,8)	77 (57-100)	0,0003
AST (U/L)	36,5 (24,2-57,7)	33 (24-46)	0,535
ALT (U/L)	30,5 (19,5-46,7)	30 (22-45)	0,969
GGT (U/L)	80,5 (28,2-176)	37 (22-81)	0,005
Bilirrubina total (mg/dL)	0,82 (0,55-1,12)	0,76 (0,45-1,2)	0,567
Albumina (g/dL)	4,5 (3,8-4,8)	4,6 (4,3-4,9)	0,135
Plaquetas (mil/mm3)	131 (86,7-186,5)	112 (65,5-180,5)	0,238
Colesterol (mg/dL)	173 (147-207)	156 (135-201)	0,451

Na tabela 3 são apresentados os resultados da pesquisa de marcadores sorológicos da infecção pelo HBV e da determinação dos níveis de HBV DNA.

Todos os pacientes apresentaram positividade para o HBsAg e anti-HBs, com exceção de 13 (22%) pacientes do grupo 1 (CHC) nos quais esse marcador não foi detectado. Desses pacientes 3 apresentaram soroconversão para o anti-HBs.

O perfil sorológico HBeAg negativo foi o mais frequente em ambos os grupos. O HBV DNA estava detectável em 40% e 51% dos pacientes do grupo 1 e 2, respectivamente. Dentre esses pacientes a maioria apresentou níveis de carga viral abaixo de 2000 UI/mL (Tabela 3).

Foram coletadas do prontuário médico informações acerca da realização de tratamento prévio ou em andamento com análogos nucleos(t)ídeos, a saber: lamivudina, adefovir, entecavir e tenofovir (Tabela 3).

A maioria dos pacientes (82%; 98/119) de ambos os grupos tinham histórico ou estavam em tratamento com esses medicamentos. Monoterapia com lamivudina, adefovir, entecavir ou tenofovir foi a opção de tratamento para 38,7% (38/98), 2% (2/98), 16,3% (16/98) e 14,2% (14/98) dos pacientes, respectivamente. Para os demais pacientes os esquemas terapêuticos utilizados foram os seguintes: lamivudina + adefovir (11,2%;11/98), lamivudina + entecavir (3%; 3/98), lamivudina + tenofovir (13,2%;13/98).

Tabela 3 - Descrição dos dados sorológicos, virológicos e clínicos (tratamento) dos pacientes selecionados

Variável	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=59)	P valor
HBsAg; n (%)			
Positivo	47 (78)	59 (100)	0,0001
Negativo	13 (22)	0	
Anti-HBs; n (%)			
Positivo	7 (12)	4 (7)	0,528
Negativo	52 (88)	54 (93)	
HBeAg; n (%)			
Positivo	10 (19)	9 (15)	0,621
Negativo	43 (81)	49 (85)	
Anti-HBe; n (%)			
Positivo	39 (75)	43 (74)	1
Negativo	13 (25)	15 (26)	
HBV DNA n (%)			
Detectado	24 (40)	31 (51)	0,200
Não detectado	36 (60)	28 (49)	
Níveis de carga viral UI/mL ; n (%)			
< 15 (não quantificável)	3 (12)	10 (32)	0,105
15 a < 2.000	16 (67)	19 (61)	
> 2.000	5 (21)	2 (6)	
Tratamento com NA; n (%)			
Sim	49 (83)	49 (84)	1
Não	10 (17)	9 (16)	

1.19. Fatores de risco para desenvolvimento de CHC da população de estudo

As informações acerca dos fatores de risco para desenvolvimento de CHC foram obtidas através de questionário aplicado aos pacientes

selecionados para o estudo. Foram obtidas informações sobre o consumo de amendoim, milho, soja, álcool, história de CHC na família e presença de diabetes (Tabela 4), e dentre esses o consumo de amendoim foi o único que apresentou significância estatística ($P=0,003$).

1.20. Amplificação e sequenciamento das regiões S/Pol e pré-core/core do HBV

Em paralelo ao exame de detecção e quantificação do HBV DNA, foram realizadas reações para amplificação de regiões específicas do genoma viral em todas as amostras coletadas ($n=119$). As amostras positivas nas reações de PCR foram posteriormente submetidas ao sequenciamento.

Os resultados da amplificação das regiões S/Pol estão resumidos na figura 4. No total foi possível amplificar a região S/Pol do HBV de 58 amostras (28 do grupo 1 e 30 do grupo 2), sendo que sequências com qualidade para posterior caracterização dos subgenótipos do HBV foram obtidas de 54 amostras, sendo 25 do grupo 1 e 29 do grupo 2.

Todas as amostras foram também submetidas à reação de PCR para amplificação da região pré-core/core. Os resultados da amplificação da região pré-core/core estão demonstrados na figura 5. Essa região genômica foi amplificada com sucesso em um total de 52 amostras, sendo 26 de cada grupo, e foram obtidas sequências com qualidade para posterior análise de mutação de 44 amostras, sendo 20 amostras do grupo 1 e 24 do grupo 2.

Tabela 4 - Descrição dos fatores de riscos avaliados nos pacientes selecionados

		Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=59)	P valor
Fatores de risco; n (%)				
Amendoim				
	sim	46 (84)	34 (57,6)	0,003
	não	9 (16)	25 (42,4)	
Milho				
	sim	44 (80)	45 (76,3)	0,657
	não	11 (20)	14 (23,7)	
Soja				
	sim	27 (49)	28 (47,5)	1
	não	28 (51)	31 (52,5)	
Álcool				
	sim	31 (56)	32 (54,2)	0,852
	não	24 (44)	27 (45,8)	
Histórico de CHC na família				
	sim	13 (24)	13 (22)	1
	não	42 (76)	46 (78)	
Diabetes				
	sim	13 (24)	12 (20,3)	0,821
	não	42 (76)	47 (79,7)

Figura 4 - Esquema da estratégia de amplificação das regiões S/Pol do genoma do HBV e resultados obtidos.

Figura 5 - Esquema da estratégia de amplificação da região pré-core/core do genoma do HBV e resultados obtidos.

1.21. Análise filogenética das sequências S/Pol e classificação dos subgenótipos do HBV nas amostras dos pacientes incluídos no estudo

A partir da análise das sequências consenso da região S/Pol foi possível determinar o genótipo/subgenótipo de cada amostra. Na casuística estudada foram encontrados 8 diferentes subgenótipos (Figuras 6 e 7): A1, A2, C2, D1, D2, D3, F1b e F2a sendo o A1 o mais frequente (53,7%), seguido pelo D3 (14,8%) e F2a (12,9%).

O gráfico 1 mostra a distribuição dos subgenótipos do HBV em cada um dos grupos de pacientes estudados, onde é possível observar a predominância do A1 em ambos os grupos. O subgenótipo D3 foi o segundo mais frequente no grupo 2, enquanto que no grupo 1 foi o subgenótipo F2a, mas essas diferenças não apresentaram significância estatística na comparação entre os grupos.

Na topologia da árvore filogenética construída com sequências do HBV isoladas dos pacientes incluídos neste estudo e sequências disponíveis no GenBank não se observou padrões de agrupamento associados com o perfil clínico do paciente (com e sem CHC). Como é possível observar por exemplo dentro dos clados dos subgenótipos A1, D3 e F2a, que foram os mais frequentes na casuística estudada, as cepas de HBV isoladas de pacientes com e sem CHC apresentam estreita relação filogenética agrupando frequentemente no mesmo cluster (Figuras 6 e 7).

Gráfico 1 - Frequência dos subgenótipos do HBV na casuística estudada

Figura 6 – Árvore filogenética das sequências classificadas como genótipo A. Análise realizada com sequências da região S/Pol do HBV DNA isolado de pacientes com CHC e sem CHC incluídos neste estudo (n=54) juntamente com sequências dos diferentes subgenótipos do HBV disponíveis no GenBank (n=194). Os valores de probabilidade posterior são apresentados acima dos ramos principais. Os clados dos subgenótipos A1 e A2 estão mostrados em detalhes, os clados dos demais genótipos e subgenótipos estão colapsados. As sequências caracterizadas neste estudo estão destacadas em vermelho (pacientes com CHC – Grupo 1) e em azul (pacientes sem CHC – Grupo 2). As sequências retiradas do GenBank são identificadas pelo subgenótipo, seguido pelo número de acesso e origem geográfica.

Figura 7 – Árvore filogenética das sequências classificadas como genótipo C, D ou F. Análise realizada com sequências da região S/Pol do HBV DNA isolado de pacientes com CHC e sem CHC incluídos neste estudo (n=54) juntamente com sequências dos diferentes subgenótipos do HBV disponíveis no GenBank (n=194). Os valores de probabilidade posterior são apresentados acima dos ramos principais. Os clados dos subgenótipos C2, D1, D2, D3, F1a e F2a estão mostrados em detalhes, os clados dos demais genótipos e subgenótipos estão colapsados. As sequências caracterizadas neste estudo estão destacadas em vermelho (pacientes com CHC – Grupo 1) e em azul (pacientes sem CHC – Grupo 2). As sequências retiradas do GenBank são identificadas pelo subgenótipo, seguido pelo número de acesso e origem geográfica.

1.22. Análise de mutações na região dos genes pré-core/core

Foram obtidas sequências de boa qualidade da região pré-core/core em 44 amostras. Essas sequências foram submetidas à análise e as mutações encontradas estão descritas na tabela 5.

Foram realizados testes estatísticos para verificar se existe distribuição diferenciada dessas mutações entre os grupos de pacientes estudados. Nessa análise, as frequências de três mutações se destacaram com significância estatística: a mutação T1768A (Gráfico 2), a combinação das mutações C1766T + T1768A (Gráfico 3) e a mutação G1888H (Gráfico 4).

Além da análise comparativa, as mutações foram submetidas a uma análise de regressão logística simples (Tabela 6) a qual identificou que a chance de um paciente do grupo 2 desenvolver CHC aumenta 14,7 vezes na presença de infecção por cepas do HBV com a mutação T1768A (IC95%: 1,6 – 131,8), enquanto que a infecção com cepas do HBV que albergam a mutação G1888H reduz tal chance 2,5 vezes (IC95%: 0,5 – 12,5).

Tabela 5 – Número de mutações encontradas na região pré-core/core em cada grupo de paciente estudado

Mutação	Grupo 1 (n= 20)	Grupo 2 (n=24)*
C1653T		
Presente	0/20	0/22
Ausente	20/20	22/22
T1753V (C/A/G)		
Presente	10 ^{&} /20	7/24 [%]
Ausente	10/20	17/24
A1762T		
Presente	12/20	18/24
Ausente	8/20	6/24
G1764A		
Presente	17/20	18/23
Ausente	3/20	5/23
A1762T + G1764A		
Presente	12/20	18/23
Ausente	8/20	5/23
C1766T/G		
Presente	4/20 [%]	1/23 ^{\$}
Ausente	16/20	22/23
C1766T + A1762T + G1764A		
Presente	0/20	0/23
Ausente	20/20	23/23
T1768A		
Presente	8/20	1/23
Ausente	12/20	22/23
C1766T + T1768A		
Presente	4/20	0/22
Ausente	16/20	22/22

*Não foram obtidas sequências de qualidade cobrindo estas mutações em alguns casos deste grupo; [%] todas com C1766T; [&] C1766G

Tabela 5 - Número de mutações encontradas na região pré-core/core em cada grupo de paciente estudado (continuação)

Mutação	Grupo 1 (n= 20)	Grupo 2 (n=24)
1814-1816		
Presente	3/20	1/24
Ausente	17/20	23/24
G1862T/C		
Presente	10/20	15/24
Ausente	10/20	9/24
G1888H (A/T/C)		
Presente	3/20 [#]	11/24 ^{&}
Ausente	17/20	13/24
G1896A		
Presente	5/20	4/24
Ausente	15/20	20/24
G1899A		
Presente	3/20	4/24
Ausente	17/20	20/24
G1896A + G1899A		
Presente	2/20	2/24
Ausente	18/20	22/24

[#] 1 amostra com G1888A e 2 com G1888T;

[&] 7 amostras com G1888A, 3 com G1888T e 1 com G1888C

Gráfico 2 - Comparação das frequências da mutação T1768A **Gráfico 3** - Comparação das frequências das mutações C1766T + T1768A associadas

Gráfico 4 - Comparação das frequências da mutação G1888H (A/T/C) **Tabela 6** - Regressão logística simples das mutações observadas nas cepas de HBV isoladas de pacientes dos dois grupos avaliados

Mutação	Grupo 1 x Grupo 2			
	OR	95% CI		P
A1762T	0,5	0,14	1,81	0,291
G1764A	1,57	0,33	7,63	0,573
A1762T + G1764A	0,42	0,11	1,58	0,199
C1766T/G	5,5	0,56	53,97	0,143
T1768A	14,67	1,63	131,79	0,016
1814+1816	4,06	0,39	42,48	0,242
G1862T/C	0,6	0,18	2	0,406
G1888H	0,21*	0,05	0,9	0,036
G1896A	1,67	0,38	7,29	0,497
G1899A	0,88	0,17	4,51	0,88
G1896A+G1899A	1,22	0,16	9,55	0,848

OR: razão de chances; CI: intervalo de confiança; P: valor de p ($p < 0,05$)

*2,5 menor risco de evoluir para CHC;

5. Discussão

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar fatores virais associados com a evolução para o CHC em pacientes com hepatite B crônica. Para isso foram incluídos pacientes com infecção crônica pelo HBV e carcinoma hepatocelular e pacientes com hepatite B crônica sem CHC.

O estudo foi realizado com pacientes procedentes da cidade de São Paulo, onde até o presente momento não existe estudo semelhante. Dos pacientes incluídos no estudo a maioria era natural da região Sudeste, seguido pela região Nordeste e seis pacientes eram procedentes de outros países.

Além de avaliarmos os fatores virológicos também avaliamos as características da população e outros fatores que podem influenciar ou acelerar o processo de desenvolvimento para o CHC. A etnia oriental foi uma das características avaliadas, uma vez que já foi demonstrado em estudos anteriores realizados em São Paulo que indivíduos de origem oriental apresentam elevada prevalência de infecção pelo HBV e histórico de infecção adquirida principalmente pela via vertical, o que favorece a evolução para a cronicidade e consequentemente o desenvolvimento de formas mais avançadas de doença hepática e CHC (101). Contudo, no presente estudo não observamos maior frequência de indivíduos de etnia oriental no grupo de pacientes com CHC.

Em relação aos resultados dos exames bioquímicos foram observadas alterações em alguns marcadores, contudo essas alterações então dentro do

que é esperado no quadro clínico dos pacientes de acordo com a gravidade da doença hepática.

Neste estudo foram incluídos pacientes portadores de hepatite B crônica, embora nem todos no momento da coleta apresentassem positividade para o HBsAg. Nesses casos considerou-se o histórico clínico de persistência do HBsAg por mais de 6 meses documentado no prontuário do paciente.

Apenas pacientes com CHC apresentaram negatividade do HBsAg, a qual foi observada com uma frequência de 22% nesse grupo. Entre esses, apenas um paciente apresentou HBV DNA detectável, caracterizando um quadro de hepatite B oculta. Alguns estudos relatam que 30 a 35% de indivíduos HBsAg negativos portadores de hepatite B crônica com ou sem CHC apresentam positividade o HBV DNA (102-106).

A presença do anti-HBc no soro, com HBsAg negativo pode também indicar o controle da infecção viral aparente quando acompanhada pelo anti-HBs, no presente estudo dos 13 pacientes com HBsAg negativo apenas 3 apresentaram soroconversão para o anti-HBs. Entretanto, o HBV permanece viável dentro dos hepatócitos, devido a formação do cccDNA e ademais, depois que o CHC se desenvolve, as alterações celulares provavelmente induzidas pelo HBV continuam mesmo na ausência da replicação viral.

O perfil sorológico HBeAg negativo foi o mais frequente em ambos os grupos. O perfil HBeAg negativo é particularmente frequente em nosso país, como demonstrado por Gomes-Gouveia e colaboradores (107). Nesta população, pacientes com HBeAg negativo é o perfil esperado para infecções antigas que apresentam baixa replicação viral, o que está de acordo com os resultados de carga viral obtidos. O HBV DNA estava detectável em 40% e

51% dos pacientes do grupo 1 e 2, respectivamente. A elevada taxa de indetectabilidade do HBV DNA certamente foi aumentada pelo histórico de tratamento dos pacientes, fato observado em 82% da casuística e explica a dificuldade encontrada para amplificação das regiões de interesse do HBV DNA.

Em relação a outros fatores de risco associados com o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, se observou que em ambos os grupos analisados o sexo masculino e a idade mais avançada (média de 58 anos) foram frequentes, que são descritos como fatores de risco para o desenvolvimento do CHC (53-55). O CHC é a sexta neoplasia mais frequente mundialmente, é uma doença maligna que ocupa o quinto lugar entre os homens e o oitavo entre as mulheres. Neste estudo houve maior frequência de indivíduos do sexo masculino no grupo de pacientes com CHC, assim como no grupo sem CHC, o que é justificável por se tratar de um grupo com doença hepática avançada, no qual 88,9% dos indivíduos são portadores de cirrose hepática. Os pacientes foram obtidos em um serviço terciário e foram selecionados para este estudo exatamente aqueles casos com formas mais avançadas da doença.

Neste estudo, o consumo de amendoim apresentou significância estatística na comparação entre os dois grupos, sendo mais frequente entre indivíduos com CHC. Sabe-se que as aflatoxinas são substâncias tóxicas resultantes da atividade metabólica de fungos que se desenvolvem em alimentos e produtos agrícolas. Em condições favoráveis de temperatura, umidade e pH, essas toxinas podem intoxicar seres humanos e animais. A intoxicação pode ocorrer pelo consumo desses grãos contaminados (principalmente amendoim, milho, etc) (108, 109). A aflatoxina B1 (AFB1), é

extremamente tóxica, cancerígena, é um potencial imunossupressor, e exposição a altas concentrações desta aflatoxina podem produzir graves danos no fígado, em particular, o CHC. Esta exposição associada ao vírus da hepatite B potencializa ainda mais o risco de desenvolver CHC (59, 109).

Na casuística estudada foi detectada uma ampla diversidade genética do HBV, oito subgenótipos foram identificados. O subgenótipo A1 foi o mais frequente em ambos os grupos, 52% (G1) e 55% (G2), seguido pelo D3, 8% no G1 e 21% no G2 e por fim F2a em 20% dos pacientes do G1 e em 7% do G2. Os subgenótipos A2, C2, D1, D2, F1a e F4 foram observados em frequências que variam de 4% a 10% entre os grupos. Tais resultados estão de acordo com a literatura acerca da distribuição dos genótipos e subgenótipos no Brasil, onde o genótipo A é o mais prevalente, seguido dos genótipos D e F (36-38, 95, 110).

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 e outro estudo realizado na África-Subsaariana relata que o subgenótipo A1 tem sido associado com elevada taxa de CHC comparado com os outros genótipos (29, 111, 112).

Um estudo realizado no Alasca com pacientes com hepatite B crônica com CHC e sem CHC observou que a relação do genótipo F com o desenvolvimento do CHC foi altamente significativo e que esse genótipo foi encontrado com maior frequência em pacientes que já apresentavam CHC (92).

Estudos realizados na Ásia observaram que portadores de hepatite B crônica com genótipo C apresentam doença mais grave no fígado se

comparados com os portadores do genótipo B. E que o subgenótipo C2 foi independentemente associado a maior risco de desenvolvimento do CHC (29, 49, 111-113).

Não foi por nós encontrada nenhuma relação entre genótipos e os grupos 1 (CHC) e 2 (maior parte dos pacientes com cirrose hepática). Como colocado nos três parágrafos acima, o CHC foi relacionado com genótipo D na Índia, subgenótipo A1 na África Subsaariana e genótipo F no Alasca.

Em nosso trabalho, foram selecionados pacientes em fase adiantada da doença, pois mesmo entre o grupo 2 a maior parte dos pacientes já era portador de cirrose hepática e talvez por este motivo não foi possível identificar nenhuma diferença. Um outro trabalho deve ser realizado em nosso serviço analisando pacientes em formas menos avançadas da doença a fim de verificarmos se conseguimos identificar alguma diferença entre os genótipos encontrados em nossos pacientes com hepatite B em fase inicial daqueles com CHC.

O número de casos estudados com CHC também não foi tão grande assim, o que pode explicar a ausência de significância estatística de nossos resultados. Estudos multicêntricos são necessários para se estabelecer definitivamente se não existe mesmo alguma correlação entre os genótipos virais e o desenvolvimento de CHC.

Numerosos estudos sugerem que certas mutações no genoma do HBV podem ser associadas com o desenvolvimento de CHC. A região pré-core/ core sobrepõe-se com o gene X do HBV (HBx), que tem sido associado com hepatocarcinogênese. As mutações T1753V, e A1762T/G1764A estão posicionadas em locais que sobrepõem ao HBx. A proteína X é um regulador

multifuncional que modula a transcrição, o progresso do ciclo celular, degradação da proteína, apoptose e vias de transdução de sinal (114). As mutações na região pré-core/core, que se sobrepõe à sequência de codificação para o gene X, podem resultar em alterações de aminoácidos na proteína X (115) e tais alterações na proteína X poderiam contribuir para o desenvolvimento de CHC (116, 117).

Estas mutações citadas foram encontradas na nossa casuística sendo que a mutação T1753V foi encontrada em 50% (10/20) dos pacientes do grupo 1 e (29%) 7/24 dos pacientes do grupo 2 e a dupla mutação A1762T/G1764A foi observada em 60% (12/20) dos pacientes do grupo 1 e 78% (18/23) dos pacientes do grupo 2.

Em um estudo realizado na Tailândia, observou-se que as mutações A1762T/G1764A podem ser as principais variantes de HBV associadas com o desenvolvimento do CHC, e a mutação T1753V também pode desempenhar um papel importante, embora menor, no CHC, descartando assim sua associação direta no desenvolvimento do CHC. Esse estudo mostrou que a mutação T1753V aparece após o paciente ter desenvolvido CHC, sugerindo que a emergência dessa mutação está associada ao quadro mais avançado da doença (118). Outro estudo também realizado na Tailândia relata que a mutação T1753V não foi associada com um maior risco de desenvolver CHC (82).

Em nosso estudo, não se observou associação estatisticamente significativa dessas mutações com o desenvolvimento de CHC. Em um trabalho prévio de nosso grupo analisando pacientes portadores crônicos com hepatite B, mas ainda sem tratamento, mutações T1753A/C/G foram encontradas em

19,2% dos casos (107), enquanto que no presente trabalho esta mutação foi encontrada em 50% dos pacientes do grupo 1 (CHC) e em 29,2% dos pacientes do grupo 2. Talvez esta mutação tenha significado na evolução mais precoce da hepatite B, o que poderá ser esclarecido com a comparação destes três grupos em um outro trabalho.

Além da associação com o CHC, tem sido relatado que o desenvolvimento das mutações A1762T / G1764A está associado com os genótipos do HBV e a sua prevalência é mais elevada no genótipo C do que genótipo B (118, 119).

No presente estudo, de 5 pacientes que apresentaram o genótipo C entre os grupos, 4 tinham a dupla mutação A1762T / G1764A, estando de acordo com os estudos publicados até o presente momento (dados não mostrados).

Em um estudo realizado em Qidong na China com a coorte de 18000 homens, observaram a presença da dupla mutação C1766T / T1768A nos pacientes que apresentavam CHC, o que foi significativamente maior em pacientes com CHC que os indivíduos controle (82). No nosso estudo esta dupla mutação C1766T / T1768A apresentou significância estatística ($P=0,043$) na comparação dos grupos e pode se observar que esta dupla mutação só foi encontrada nos pacientes com CHC (Grupo 1). Dado o formato de nosso estudo, em que casos com doença precoce pelo HBV não foram estudados, estas mutações podem ter um papel importante no desenvolvimento do CHC relacionado com HBV. Em um trabalho prévio realizado em nosso grupo com portadores crônicos do HBV ainda sem tratamento, a mutação C1766T foi encontrada em 15,6% dos pacientes (107), enquanto que no presente estudo a

mutação C1766T/G foi encontrada em 20% (4/20) dos pacientes do grupo 1 (todas com C1766T) e 4,3% (1/23) dos pacientes do grupo 2 (C1766G). Sendo assim, esta associação precisa ser melhor estudada comparando-se com uma população da mesma origem geográfica e de preferência pareada para os mesmos genótipos.

A mutação T1768A tem sido associada ao aumento do risco de desenvolver carcinoma hepatocelular e também é observado com frequência em pacientes com CHC (120). No presente estudo a mutação T1768A foi significativamente associada ($P= 0,006$) com a presença do CHC, e através da análise de regressão logística simples identificamos que a chance de um paciente do grupo 2 desenvolver CHC aumenta 14,7 vezes na presença de infecção por cepas do HBV com a mutação T1768A. No trabalho previamente citado de nosso grupo (107), esta mutação foi encontrada em 10,4% dos pacientes com hepatite crônica B, contra 40% dos pacientes do grupo 1 e 4,3% dos pacientes do grupo 2 incluídos neste estudo.

E por fim, a mutação G1888A/T/C foi significativamente ($P= 0,05$) associada com menor risco de evoluir para CHC.

A presença da mutação G1888A foi associada à baixa carga viral e esta mutação é uma característica do subgenótipo A1 (121, 122). No presente estudo a alteração mais frequente nessa posição foi a substituição de G por A, contudo substituições para T e C também foram observadas. Embora nenhum estudo tenha sido realizado que sugira o mesmo papel para outras alterações nessa posição, as mesmas foram consideradas em nossa análise.

Em nosso estudo alterações na posição 1888 foram observadas somente nos pacientes com subgenótipo A1, o que confirma que esta mutação

é uma característica desse subgenótipo. E através da análise de regressão logística simples identificamos que a presença da mutação G1888A/T/C reduz 2,5 vezes a chance de desenvolver CHC. Sugerindo que a associação dessa mutação com a baixa carga viral, pode justificar o nosso achado de sua presença estar associada ao menor risco de evoluir a doença para o CHC. A mutação G1888A foi encontrada em 45,6% dos pacientes com hepatite crônica B (107), enquanto que G1888A/T/C foi encontrado em 15% dos pacientes do grupo 1 e em 45,3% dos pacientes do grupo 2 neste trabalho, sugerindo de fato um papel para esta mutação na evolução da cirrose para o CHC.

Importante adicionar que estas relações entre mutações e diferentes evoluções da hepatite B dependem de diversos fatores tanto do vírus como do hospedeiro, o que podem tornar estas análises mais complexas. Além das diferentes susceptibilidades dos grupos populacionais ao CHC, que não foram abordadas neste trabalho, a evolução da hepatite B para o carcinoma hepatocelular também depende de características genéticas virais que abrangem tanto o genótipo viral como mutações específicas que foram abordadas neste trabalho.

6. Conclusões

- As cepas do HBV que circulam na população estudada apresentaram grande variabilidade genética , uma vez que foram encontrados 8 subgenótipos do HBV;
- Dentre os subgenótipos encontrados o A1 foi o mais frequente em ambos os grupos;
- Observou-se diferença, embora não significativa, na distribuição dos subgenótipos F2a e D3 entre os dois grupos, sendo o F2a mais frequente no grupo de pacientes com CHC (G1) e o D3 no grupo de pacientes sem CHC (G2);
- Na análise filogenética da região S/Pol não foram observados padrões de agrupamento que pudessem representar linhagens do HBV associadas com CHC;
- As mutações T1768A, C1766T + T1768A e a G1888A/T/C na região pré-core/core do HBV foram associadas ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Sendo que as mutações T1768A e a C1766T + T1768A foram associada com a presença de CHC e a mutação G1888A/T/C associada com menor risco de evoluir para CHC;
- Entre os fatores de risco avaliados, o consumo de amendoim foi associado com a presença de CHC.

7. Referências Bibliográficas

1. Franco E, Bagnato B, Marino MG, Meleleo C, Serino L, Zaratti L. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol*. 2012;4(3):74-80.
2. Kwon SY, Lee CH. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Korean J Hepatol*. 2011;17(2):87-95.
3. Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2009;373(9663):582-92.
4. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):351-66.
5. WHO. Prevention & Control of Viral Hepatitis Infection: Framework for Global Action. World Health Organization; 2012.
6. WHO. Hepatitis B World Health Organization; 2008.
7. Nebbia G, Peppia D, Maini MK. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. *Qjm*. 2012;105(2):109-13.
8. Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis*. 2010;14(1):1-21, vii.
9. McMahon BJ. Chronic hepatitis B virus infection. *The Medical clinics of North America*. 2014;98(1):39-54.
10. Pereira LMMB, Ximenes RA, Moreira RC, Braga MC, Montarroyos UR. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. 2010.
11. Braga WS, Castilho Mda C, Borges FG, Martinho AC, Rodrigues IS, Azevedo EP, et al. Prevalence of hepatitis B virus infection and carriage after nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(1):13-7.
12. Bertolini DA, Pinho JR, Saraceni CP, Moreira RC, Granato CF, Carrilho FJ. Prevalence of serological markers of hepatitis B virus in pregnant women from Parana State, Brazil. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2006;39(8):1083-90.
13. Kiesslich D, Fraiji NA, Crispim MA, Pereira FR, Martinho AC, Campello SC, et al. Prevalence of serologic and molecular markers of hepatitis B virus

infection among pregnant women in Amazonas State, Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2003;12(3):155-64.

14. Souto FJ. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015.

15. Locarnini S. Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis. *J Hepatol*. 2003;39 Suppl 1:S124-32.

16. Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*. 2004;24 Suppl 1:3-10.

17. Sanchez LV, Tanaka Y, Maldonado M, Mizokami M, Panduro A. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of mexican patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G. *Intervirology*. 2007;50(1):9-15.

18. Glebe D, Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*. 2013;33(2):103-12.

19. Kann M. GW. Hepadnaviridae: Structure and molecular virology. In: Zuckerman A. J. THC, editor. *Viral Hepatitis*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998.

20. Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, et al. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*. 1994;77(6):943-50.

21. Tiollais P, Charnay P, Vyas GN. Biology of hepatitis B virus. *Science*. 1981;213(4506):406-11.

22. Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F. Hepatitis B virus mutants. *Intervirology*. 1999;42(2-3):69-80.

23. Uy A, Bruss V, Gerlich WH, Kochel HG, Thomssen R. Precore sequence of hepatitis B virus inducing e antigen and membrane association of the viral core protein. *Virology*. 1986;155(1):89-96.

24. Koike K, Takada S. Biochemistry and functions of hepatitis B virus X protein. *Intervirology*. 1995;38(1-2):89-99.

25. Barone AA. Hepatite Crônica pelo Vírus B. In: ARAUJO ESAd, editor. *O ABC das Hepatites: manual clínico para o manuseio e prevenção da hepatite B*. São Paulo: Bristol-Myers Squibb; 2008. p. 6-10.

26. Ferreira MSB, A.S. Avanços no Tratamento da Hepatite pelo Vírus B. *R Soc Bras Med Trop*. 2007;451-62.

27. Fonseca JC. [History of viral hepatitis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(3):322-30.

28. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology*. 2009;50(3):661-2.
29. McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2009;49(5 Suppl):S45-55.
30. Baumert TF, Meredith L, Ni Y, Felmlee DJ, McKeating JA, Urban S. Entry of hepatitis B and C viruses - recent progress and future impact. *Current opinion in virology*. 2014;4:58-65.
31. Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*. 2009;49(5 Suppl):S13-21.
32. Nassal M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology*. 1999;42(2-3):100-16.
33. Kramvis A, Kew MC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatol Res*. 2007;37(s1):S9-S19.
34. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004;47(6):289-309.
35. Yu H, Yuan Q, Ge SX, Wang HY, Zhang YL, Chen QR, et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One*. 2010;5(2):e9297.
36. Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JR, Mello IM, Bertolini DA, Lemos MF, et al. Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health*. 2004;4:13.
37. 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. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2455-60.
38. Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC microbiology*. 2007;7:103.
39. Rezende RE, Fonseca BA, Ramalho LN, Zucoloto S, Pinho JR, Bertolini DA, et al. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol*. 2005;32(1):53-9.
40. Conde SR, Moia Lde J, Barbosa MS, Amaral Ido S, Miranda EC, Soares Mdo C, et al. [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]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37 Suppl 2:33-9.

41. Gomes-Gouvea MS, Soares MC, Bensabath G, de Carvalho-Mello IM, Brito EM, Souza OS, et al. 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*. 2009;90(Pt 11):2638-43.
42. Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Vieira DS, Pinho JR, Carrilho FJ, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. *Virol J*. 2010;7:315.
43. Lyra AC, Pinho JR, Mello IM, de MMF, Gomes MM, Di Bisceglie AM, et al. Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among patients with acute viral hepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(1):81-2.
44. Ribeiro NR, Campos GS, Angelo AL, Braga EL, Santana N, Gomes MM, et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. *Liver Int*. 2006;26(6):636-42.
45. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol*. 2005;32(2):102-12.
46. Solmone M, Vincenti D, Prosperi MC, Bruselles A, Ippolito G, Capobianchi MR. Use of massively parallel ultradeep pyrosequencing to characterize the genetic diversity of hepatitis B virus in drug-resistant and drug-naive patients and to detect minor variants in reverse transcriptase and hepatitis B S antigen. *J Virol*. 2009;83(4):1718-26.
47. Campos RH, Mbayed VA, Pineiro YLFG. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. *J Clin Virol*. 2005;34 Suppl 2:S8-S13.
48. Kato H, Gish RG, Bzowej N, Newsom M, Sugauchi F, Tanaka Y, et al. Eight genotypes (A-H) of hepatitis B virus infecting patients from San Francisco and their demographic, clinical, and virological characteristics. *J Med Virol*. 2004;73(4):516-21.
49. Liu CJ, Kao JH, Chen DS. Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes. *Liver Int*. 2005;25(6):1097-107.
50. Kwon H, Lok AS. Hepatitis B therapy. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2011;8(5):275-84.
51. Stewart BW KP. World cancer report In: Câncer GIAfRo, editor.: World Health Organization; 2003.
52. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S35-50.
53. Bosch FX, Ribes J, Cleries R, Diaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*. 2005;9(2):191-211, v.

54. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S27-34.
55. Kensler TW, Egner PA, Wang JB, Zhu YR, Zhang BC, Lu PX, et al. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S310-8.
56. Fung J, Lai CL, Yuen MF. Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(11):964-70.
57. Bok JW, Keller NP. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell*. 2004;3(2):527-35.
58. Yu J, Cleveland TE, Nierman WC, Bennett JW. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Rev Iberoam Micol*. 2005;22(4):194-202.
59. Zlotowski PC, A.M.R.; Rozza, D.B.; Driemeier, D.; Mallmann, C.A.; Migliavacca, F.A. . Surto de aflatoxicose em suínos nos Estados do Rio Grande do Sul. . *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2004;4(4):207-10.
60. Bruno RLA. Qualidade fisiológica e microflora de sementes de amendoim cv. Br- 1 durante o armazenamento. *Revista de Oleaginosa e Fibrosa*. 2000:141-52.
61. Chiavaro E, Dall'Asta C, Galaverna G, Biancardi A, Gambarelli E, Dossena A, et al. New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *J Chromatogr A*. 2001;937(1-2):31-40.
62. Diniz SPSS. *Micotoxinas*. 2002:181.
63. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 2001;167(2):101-34.
64. Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 1992;339(8799):943-6.
65. Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathol Biol (Paris)*. 2010;58(4):273-7.
66. Maillard E. Epidemiology, natural history and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Radiother*. 2011;15(1):3-6.
67. Buendia MA. Hepatitis B viruses and hepatocellular carcinoma. *Adv Cancer Res*. 1992;59:167-226.

68. Bonilla Guerrero R, Roberts LR. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2005;42(5):760-77.
69. Kremsdorf D, Soussan P, Paterlini-Brechot P, Brechot C. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene.* 2006;25(27):3823-33.
70. Kekule AS, Lauer U, Weiss L, Luber B, Hofschneider PH. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature.* 1993;361(6414):742-5.
71. Tai PC, Suk FM, Gerlich WH, Neurath AR, Shih C. Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. *Virology.* 2002;292(1):44-58.
72. Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, et al. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology.* 1993;18(1):47-53.
73. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *Jama.* 2006;295(1):65-73.
74. Chen G, Lin W, Shen F, Iloeje UH, London WT, Evans AA. Past HBV viral load as predictor of mortality and morbidity from HCC and chronic liver disease in a prospective study. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(8):1797-803.
75. Fung J, Yuen MF, Yuen JC, Wong DK, Lai CL. Low serum HBV DNA levels and development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(3):377-82.
76. Huang Y, Wang Z, An S, Zhou B, Zhou Y, Chan HL, et al. Role of hepatitis B virus genotypes and quantitative HBV DNA in metastasis and recurrence of hepatocellular carcinoma. *J Med Virol.* 2008;80(4):591-7.
77. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2002;347(3):168-74.
78. Chan HL, Hui AY, Wong ML, Tse AM, Hung LC, Wong VW, et al. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2004;53(10):1494-8.
79. Ni YH, Chang MH, Wang KJ, Hsu HY, Chen HL, Kao JH, et al. Clinical relevance of hepatitis B virus genotype in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;127(6):1733-8.

80. Yin J, Zhang H, Li C, Gao C, He Y, Zhai Y, et al. Role of hepatitis B virus genotype mixture, subgenotypes C2 and B2 on hepatocellular carcinoma: compared with chronic hepatitis B and asymptomatic carrier state in the same area. *Carcinogenesis*. 2008;29(9):1685-91.
81. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(4):265-72.
82. Qu LS, Liu TT, Jin F, Guo YM, Chen TY, Ni ZP, et al. Combined pre-S deletion and core promoter mutations related to hepatocellular carcinoma: A nested case-control study in China. *Hepatol Res*. 2010;41(1):54-63.
83. Wang Z, Tanaka Y, Huang Y, Kurbanov F, Chen J, Zeng G, et al. Clinical and virological characteristics of hepatitis B virus subgenotypes Ba, C1, and C2 in China. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1491-6.
84. Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Wong DK, Hui CK, Wong BC, et al. Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2003;37(3):562-7.
85. Yuen MF, Tanaka Y, Mizokami M, Yuen JC, Wong DK, Yuan HJ, et al. Role of hepatitis B virus genotypes Ba and C, core promoter and precore mutations on hepatocellular carcinoma: a case control study. *Carcinogenesis*. 2004;25(9):1593-8.
86. Liu SJ, Zhang HW, Gu CY, Yin JH, He YC, Xie JX, et al. Associations Between Hepatitis B Virus Mutations and the Risk of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Jnci-J Natl Cancer I*. 2009;101(15):1066-82.
87. Sung JJ, Tsoi KK, Wong VW, Li KC, Chan HL. Meta-analysis: Treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(9):1067-77.
88. Muroyama R, Kato N, Yoshida H, Otsuka M, Moriyama M, Wang Y, et al. Nucleotide change of codon 38 in the X gene of hepatitis B virus genotype C is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2006;45(6):805-12.
89. Yeh CT, Shen CH, Tai DI, Chu CM, Liaw YF. Identification and characterization of a prevalent hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2000;19(46):5213-20.
90. Leon B, Taylor L, Vargas M, Luftig RB, Albertazzi F, Herrero L, et al. HBx M130K and V131I (T-A) mutations in HBV genotype F during a follow-up study in chronic carriers. *Virology*. 2005;2:60.
91. Solar K MG, Børresen ML, Koch A, McMahon BJ, Simons B, Osiowy C. Association between hepatitis B virus longitudinal genetic variability and

clinical outcome in circumpolar indigenous population. *Hepatology*. 2010(AASLD).

92. Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE, et al. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *J Infect Dis*. 2007;195(1):5-11.

93. Liver EAS, Liver EAS, Canc EORT. EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma (vol 56, pg 908, 2012). *Journal of Hepatology*. 2012;56(6):1430-.

94. Thibault V, Pichoud C, Mullen C, Rhoads J, Smith JB, Bitbol A, et al. Characterization of a new sensitive PCR assay for quantification of viral DNA isolated from patients with hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):3948-53.

95. Gomes-Gouvea MS, Ferreira AC, Teixeira R, Andrade JR, Ferreira AS, Barros LM, et al. HBV carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naive patients. *Antiviral therapy*. 2015;20(4):387-95.

96. Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol*. 1989;27(9):1930-3.

97. Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, et al. The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection. *J Gen Virol*. 1995;76 (Pt 12):3159-64.

98. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.

99. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999;41:95-8.

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

101. Ono-Nita SK, Carrilho FJ, Cardoso RA, Nita ME, da Silva LC. Searching for chronic hepatitis B patients in a low prevalence area--role of racial origin. *BMC family practice*. 2004;5:7.

102. Berasain C, Betes M, Panizo A, Ruiz J, Herrero JI, Civeira MP, et al. Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasaemia of unknown aetiology. *Gut*. 2000;47(3):429-35.

103. Chemin I, Zoulim F, Merle P, Arkhis A, Chevallier M, Kay A, et al. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. *Journal of Hepatology*. 2001;34(3):447-54.
104. Medrano FJ, Sanchez-Quijano A, Pineda J, Lissen E. Isolated anti-HBc and hepatitis B virus occult infection. *Vox sanguinis*. 1991;61(2):140.
105. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2004;11(1):18-25.
106. Weber B, Muhlbacher A, Melchior W. Detection of an acute asymptomatic HBsAg negative hepatitis B virus infection in a blood donor by HBV DNA testing. *J Clin Virol*. 2005;32(1):67-70.
107. 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: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.
108. Cougot D, Neuveut C, Buendia MA. HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol*. 2005;34 Suppl 1:S75-8.
109. Kew MC. Prevention of hepatocellular carcinoma. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2005;7(1):16-25.
110. Bertolini DA, Gomes-Gouvea MS, Guedes de Carvalho-Mello IM, Saraceni CP, Sitnik R, Graziotin FG, et al. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect Genet Evol*. 2012;12(6):1295-304.
111. Tanwar S, Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis? *Current gastroenterology reports*. 2012;14(1):37-46.
112. Kim BK, Revill PA, Ahn SH. HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antiviral therapy*. 2011;16(8):1169-86.
113. Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26 Suppl 1:123-30.
114. Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer science*. 2006;97(10):977-83.
115. Wai CT, Fontana RJ. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants, and mutants. *Clin Liver Dis*. 2004;8(2):321-52, vi.

116. Quarleri J. Core promoter: a critical region where the hepatitis B virus makes decisions. *World J Gastroenterol*. 2014;20(2):425-35.
117. Ng SA, Lee C. Hepatitis B virus X gene and hepatocarcinogenesis. *Journal of gastroenterology*. 2011;46(8):974-90.
118. Tangkijvanich P, Sa-Nguanmoo P, Mahachai V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. A case-control study on sequence variations in the enhancer II/core promoter/precore and X genes of hepatitis B virus in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology international*. 2010;4(3):577-84.
119. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology*. 2003;124(2):327-34.
120. Yan J, Yao Z, Hu K, Zhong Y, Li M, Xiong Z, et al. Hepatitis B Virus Core Promoter A1762T/G1764A (TA)/T1753A/T1768A Mutations Contribute to Hepatocarcinogenesis by Dereulating Skp2 and P53. *Digestive diseases and sciences*. 2015;60(5):1315-24.
121. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol*. 2008;80(1):27-46.
122. Kimbi GC, Kew MC, Kramvis A. The effect of the G1888A mutation of subgenotype A1 of hepatitis B virus on the translation of the core protein. *Virus research*. 2012;163(1):334-40.

Apêndice

1

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../..... CIDADE DE NASCIMENTO:
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

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 (.....)

QUESTIONÁRIO:

I. AVALIAÇÃO DE FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DO CHC

1. Você tem Diabetes? Sim ____ Não ____
2. Você consome: Amendoim? Sim ____ Não ____ / Milho? Sim ____ Não ____ / Soja? Sim ____ Não ____
3. Tem história de Carcinoma Hepatocelular na sua família? Sim ____ Não ____

II. DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA AVALIAÇÃO DE FATORES VIROLÓGICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC) EM PACIENTES COM HEPATITE B CRÔNICA

PESQUISADORA: LIVIA DE SOUZA BOTELHO LIMA

CARGO/FUNÇÃO: ALUNA DE MESTRADO

RESPONSÁVEL (ORIENTADOR): JOÃO RENATO REBELLO PINHO

CARGO/FUNÇÃO: MEDICO INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 51496

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA - FMUSP

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	x	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : QUATRO ANOS

III. ESCLARECIMENTOS

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

Este é um convite para sua participação de uma pesquisa sobre sua doença hepática, a hepatite B.

2

O motivo para esse convite, é que você vai realizar uma coleta de sangue, a pedido do médico que o atende e acompanha. Nós gostaríamos de solicitar sua permissão para coletar uma amostra adicional de sangue para realizar estudos adicionais sobre sua doença sobre aspectos ainda não esclarecidos até esse momento.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados

A sua participação nesse estudo é voluntária e só poderá acontecer caso você tenha que realizar coleta de sangue a pedido de seu médico. Caso você concorde, uma amostra de sangue será coletada e será enviada para a realização de exames especiais, que não são normalmente realizados. Essa coleta adicional não aumenta o risco de complicação da coleta de sangue e não prejudica o exame que seu médico está solicitando.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados

Coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos

O único risco é o risco de qualquer coleta de sangue. Poderá ocorrer um hematoma, dor local ou até uma infecção no local da coleta de sangue.

5 – Benefícios para o participante

Você não terá nenhum benefício direto e nem receberá nenhum tipo de pagamento caso concorde em participar.

A realização desse estudo pretende esclarecer os mecanismos pelos quais o vírus da hepatite B pode causar carcinoma hepatocelular nos pacientes. O desenvolvimento de pesquisas como essa é que permite que novos tratamentos possam ser oferecidos a pacientes com essa doença e possam chegar a retardar a evolução para essa fase da doença.

Sua participação é importante, pois só com o auxílio de pessoas que concordem com procedimentos como esse, é que os pesquisadores podem desenvolver pesquisas mais rapidamente e com maior chance de sucesso.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:

Nenhum outro procedimento alternativo é sugerido. Você fará parte de um grupo de pacientes que estarão colaborando de forma voluntária nesse pesquisa.

7 – Garantia de acesso: 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 **Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo** Telefone(s) (11) 3061-8218 ou (11) 3061-8217. 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 ramal26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição

Conforme já dito anteriormente, sua participação é totalmente livre e você poderá retirar sua autorização para participação nesse estudo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo para você.

09 – Direito de confidencialidade

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores

Caso seja de seu interesse, todas as informações finais relativas a esse estudo poderão ser repassadas a você, quando o estudo for finalizado. Da mesma forma, antes de assinar esse documento, não deixe de fazer quaisquer perguntas que achar necessário, sobre o que não estiver bem esclarecido e compreendido.

A equipe envolvida nesse estudo estará à disposição para esclarecer suas dúvidas, em qualquer momento que você achar necessário.

11 – Despesas e compensações:

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Nenhuma informação obtida a partir de seus exames será divulgada de forma a identificá-lo e todas essas informações serão tratadas com sigilo absoluto e serão de conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na condução dele.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Avaliação de fatores virológicos associados ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) em pacientes com hepatite B crônica”**

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 permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

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 ____/____/____