

**TANIA QUEIROZ REUTER MOTTA**

**Caracterização epidemiológica, clínica e virológica da  
infecção pelo HBV entre pacientes do Espírito Santo,  
uma área endêmica no Sudeste do Brasil**

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

**Orientador**

Dr. João Renato Rebello Pinho

**Coorientadora**

Dra. Michele Soares Gomes Gouvêa

**São Paulo**

**2021**

**TANIA QUEIROZ REUTER MOTTA**

**Caracterização epidemiológica, clínica e virológica da  
infecção pelo HBV entre pacientes do Espírito Santo,  
uma área endêmica no Sudeste do Brasil**

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

**Orientador**

Dr. João Renato Rebello Pinho

**Coorientadora**

Dra. Michele Soares Gomes Gouvêa

**São Paulo**

**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Motta, Tania Queiroz Reuter  
Caracterização epidemiológica, clínica e virológica  
da infecção pelo HBV entre pacientes do Espírito  
Santo, uma área endêmica no Sudeste do Brasil /  
Tania Queiroz Reuter Motta. -- São Paulo, 2021.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Ciências em Gastroenterologia.  
Orientador: João Renato Rebello Pinho.  
Coorientadora: Michele Soares Gomes Gouvêa.

Descritores: 1.Hepatite B crônica 2.Vírus da  
hepatite B 3.Epidemiologia 4.Fases clínicas  
5.Genótipos 6.Subgenótipos 7.Mutação pré-core  
8.Promotor basal do core

USP/FM/DBD-438/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este projeto a DEUS, que me permitiu estar aqui. Divina presença Eu Sou, e ao AMOR divino que ora habita em mim.

Dedico ao ser humano, mestres incógnitos que, desde o início da minha caminhada nesta vida, me proporcionaram vivenciar e experienciar o despertar divino da consciência clara e ampla.

As palavras carregam em si o limitado, restrição do nosso EU. Quando cessam as palavras, inicia-se o nosso SER divino. Namastê!

# Agradecimentos

---

---

A caminhada é solitária, o despertar também, mas uma das belezas da vida é ter a certeza de que nunca estamos sós.

Gratidão pela VIDA, aqui e agora. Aos meus corpos, físico e sutis.

Gratidão pelo sopro de vida no ar, na água e no alimento, que me sustentam.

Gratidão ao Tempo, ilusório, porta para infinitas possibilidades.

Gratidão por experienciar momentos difíceis, que me fazem evoluir.

Gratidão por trabalhar, que me enobrece.

Gratidão pela família que me foi concedido constituir.

Gratidão, sem distinção, a TODAS as pessoas que passam pela minha jornada.

Gratidão por enxergar o DIVINO em tudo o que me rodeia.

Gratidão por sentir paz, quando bate meu coração, reflito o passado e desejo o futuro.

Gratidão por aceitar tudo o que vem a mim com AMOR.

Gratidão por emocionar-me com a perfeição do simples.

Gratidão por honrar a sabedoria e o conhecimento adquiridos nesta jornada.

Gratidão aos meus orientadores, João Renato e Michele, por TUDO, para sempre.

Gratidão aos pacientes que compartilharam seus males para este estudo.

Gratidão aos colegas de trabalho pelo incentivo e companheirismo.

Gratidão aos meus filhos, Carol, Doc e Adria, missão prioritária da minha vida.

Gratidão aos meus netos, Sofia, Benjamin e Gael, pureza que me abastece.

Gratidão aos meus irmãos, Luiz, Marcello, Cláudia e Márcia, espelhos da mamãe.

Gratidão ao meu pai, Guilherme, por me despertar a capacidade de perdoar.

Gratidão à tia Tê, por substituir a ausência da mamãe com AMOR de mãe.

Gratidão à dinda Mércia e à Mônica, pela eterna expressão de AMOR por mim.

Gratidão à Tedi, ao Jorge, à Jane, à Vera e à Aglaes, expressão da LUZ nesta vida.

Gratidão à Waltesia, à Ingrid, à Zilma, à Railda, ao Claudio, à Marta e à Sueli e aos colegas professores Penha, Graça, Jovana e David, irmãos de coração.

Gratidão a DEUS, uno em Si e em nós.

# Normatização

---

---

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

Referências: Adaptadas 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 Abreviaturas e Siglas.....	ix
Lista de Símbolos .....	xi
Lista de Tabelas .....	xii
Lista de Figuras .....	xiii
Lista de Quadros .....	xv
Resumo .....	xvi
Abstract .....	xviii
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Hepatite B: aspectos históricos .....	2
1.2 O vírus da hepatite B.....	3
1.3 Epidemiologia do HBV .....	7
1.4 Vias de transmissão do vírus da hepatite B.....	8
1.5 Patogenia e história natural da infecção pelo HBV .....	9
1.6 Tratamento da hepatite B crônica.....	12
1.7 Perspectivas na hepatite B crônica .....	13
2 OBJETIVOS .....	15
3 PACIENTES E MÉTODOS .....	17
3.1 Pacientes .....	18
3.1.1 População do estudo .....	18
3.1.2 Critérios de inclusão.....	18
3.1.3 Critérios de exclusão .....	18
3.2 Métodos .....	19
3.2.1 Avaliação laboratorial .....	22
3.2.2 Banco de dados .....	25
3.2.3 Análise estatística .....	26
4 RESULTADOS .....	27
4.1 População do estudo .....	28
4.2 Caracterização dos genótipos e subgenótipos do HBV .....	31
4.3 Avaliação de correlação entre os genótipos/subgenótipos do HBV e características demográficas, epidemiológicas, laboratoriais e clínicas dos indivíduos com hepatite B crônica avaliados.....	40
4.4 Frequência dos diferentes subgenótipos do HBV no Espírito Santo e em outros locais de nascimento.....	44



4.5	Avaliação da transmissão intrafamiliar do HBV no Espírito Santo por análise filogenética das sequências .....	46
4.6	Análise de mutações nas regiões genômicas do promotor basal do core (BCP) e pré-core (PC) .....	48
5	DISCUSSÃO .....	57
6	CONCLUSÕES .....	71
7	REFERÊNCIAS .....	75

# Listas

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferases
anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno c (core) do vírus da hepatite B
anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno e do vírus da hepatite B
anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
BCP	Promotor basal do core
BioDip	Biorepositório do Serviço de Doenças Infecciosas do HUCAM
CD4	Linfócitos T auxiliar
CD8	Linfócitos T citotóxico
CH	Cirrose hepática
CHC	Carcinoma hepatocelular
ddNTP	Didesoxinucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dp	Desvio-padrão
<i>EASL</i>	<i>European Association for the Study of Liver</i>
ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
HBcAg	Antígeno do core do vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno e do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B
HBV DNA	Ácido desoxirribonucleico do vírus da hepatite B
HBxAg	Antígeno x do vírus da hepatite B

HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HUCAM-UFES	Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes – Universidade Federal do Espírito Santo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMT FM USP	Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP
IFN	Interferon
LAM	Lamivudina
n	Número de pacientes
NUCs	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de bases
PEG IFN	Interferon peguilado
PCDT	Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
S/POL	Região S e polimerase do genoma do vírus da hepatite B
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences IBM 20.0</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TaqMan	Método de quantificação DNA do HBV por PCR
TBV	Telbivudina
UDI	Usuário de drogas intravenosas
UI/l	Unidades internacionais por litro
UI/mL	Unidades internacionais por mililitro
WHO	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

° C	Graus Celsius
%	Porcentagem
+	Positivo
-	Negativo
<	Menor que
>	Maior que
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características demográficas, epidemiológicas, laboratoriais e clínicas dos 587 indivíduos portadores crônicos do HBV em seguimento no HUCAM de janeiro de 2005 a julho de 2017 .....	30
<b>Tabela 2</b> - Características demográficas, epidemiológicas, laboratoriais e clínicas dos 202 indivíduos portadores do HBV, acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017, cujo genótipo/subgenótipo viral foi caracterizado .....	41
<b>Tabela 3</b> - Características demográficas, epidemiológicas, laboratoriais e clínicas dos 185 indivíduos portadores crônicos do HBV subgenótipo A1 ou D3 acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017 .....	43
<b>Tabela 4</b> - Frequência de mutações na região BCP e características clínicas, laboratoriais e virológicas dos indivíduos portadores do HBV acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017 .....	49
<b>Tabela 5</b> - Frequência de mutações na região PC e características clínicas, laboratoriais e virológicas dos indivíduos portadores do HBV acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017 .....	52
<b>Tabela 6</b> - Frequência de mutações na região BCP + PC e características clínicas, laboratoriais e virológicas dos indivíduos portadores do HBV acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017 .....	54
<b>Tabela 7</b> - Análise da presença e características clínicas das amostras com outras mutações dos indivíduos portadores HBV acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017 .....	56

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Genoma do HBV e fases de leitura aberta (ORFs) codificantes das proteínas virais. ....4
- Figura 2** - Mapa de divisão em macrorregiões do Estado do Espírito Santo de acordo com a distribuição por regionais de saúde da Secretaria de Saúde do Estado.....20
- Figura 3** - Distribuição dos subgenótipos, o HBV entre os 202 indivíduos portadores crônicos do HBV em seguimento no HUCAM de janeiro de 2005 a julho de 2017 .....31
- Figura 4** - Árvore filogenética de sequências de HBV subgenótipo A1 identificado entre portadores de hepatite B crônica procedentes do Estado do Espírito Santo (em azul). Sequências do *GenBank* são apresentadas por seu genótipo/subgenótipo correspondente, seguido pelo número de acesso e pela origem geográfica, e sequências isoladas de outros casos no Brasil estão destacadas em verde. Os valores de probabilidade posterior são mostrados nos ramos principais. Os ramos contendo sequências isoladas de familiares estão destacados à direita da árvore, onde F2, F5 e F7 se referem às sequências HBV/A1 isoladas de membros das famílias 2, 5 e 7, respectivamente .....33
- Figura 5** - Árvore filogenética de sequências de HBV subgenótipos A2 e F2a identificados entre portadores de hepatite B crônica procedentes do Estado do Espírito Santo (em azul). Sequências do *GenBank* são apresentadas por seu genótipo/subgenótipo correspondente, seguido pelo número de acesso e pela origem geográfica, e sequências isoladas de outros casos no Brasil estão destacadas em verde. Os valores de probabilidade posterior são mostrados nos ramos principais .....35
- Figura 6** - Árvore filogenética de sequências de HBV subgenótipo D3 identificado entre portadores de hepatite B crônica procedentes do Estado do Espírito Santo (em azul). Sequências do *GenBank* são apresentadas por seu genótipo/subgenótipo correspondente, seguido pelo número de acesso e pela origem geográfica, e sequências isoladas de outros casos no Brasil estão destacadas em verde. Os valores de probabilidade posterior são mostrados nos ramos principais. As sequências isoladas de familiares estão destacadas, onde F1, F3, F4, F6 e F9 se referem às

	sequências HBV/D3 isoladas de membros das famílias 1, 3, 4, 6 e 9, respectivamente .....	36
<b>Figura 7</b>	- Árvore filogenética de sequências de HBV subgenótipos D2 e D4 identificados entre portadores de hepatite B crônica procedentes do Estado do Espírito Santo (em azul). Sequências do <i>GenBank</i> são apresentadas por seu genótipo/subgenótipo correspondente, seguido pelo número de acesso e pela origem geográfica, e sequências isoladas de outros casos no Brasil estão destacadas em verde. Os valores de probabilidade posterior são mostrados nos ramos principais. As sequências isoladas de familiares estão destacadas, onde F2 se refere às sequências HBV/D4 isoladas de membros da família 2 .....	38
<b>Figura 8</b>	- Distribuição dos subgenótipos do HBV caracterizados no presente estudo por macrorregiões do Estado do ES .....	45

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Classificação das fases evolutivas da hepatite B crônica .....22
- Quadro 2** - Casos com histórico de transmissão intrafamiliar cujo subgenótipo do HBV foi caracterizado: relação familiar e resultado da análise filogenética das sequências do HBV caracterizadas.....47



## RESUMO

---

---

Motta TQR. *Caracterização epidemiológica, clínica e virológica da infecção pelo HBV entre pacientes do Espírito Santo, uma área endêmica no Sudeste do Brasil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

**Introdução:** A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) constitui problema de saúde pública global e é responsável por morbidade e mortalidade significativa. No Brasil, a endemicidade é geralmente baixa e moderada ou alta em algumas localidades, como em algumas áreas do Estado do Espírito Santo (ES). Fatores como idade no momento da infecção, genótipo do HBV, níveis de HBV DNA ao longo do tempo, mutações específicas no genoma viral e, possivelmente, polimorfismos na região do HLA do hospedeiro parecem influenciar a história natural do HBV. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi caracterizar os aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção pelo HBV no Estado do ES e analisar a distribuição dos genótipos, subgenótipos e variantes com mutações nas regiões do promotor basal do core (BCP) e pré-core (PC) e sua associação com padrões clínicos e epidemiológicos da doença. **Material e Métodos:** Foram analisados 587 indivíduos acompanhados no Ambulatório de Infectologia do HUCAM entre julho de 2005 e julho de 2017. Dados demográficos, epidemiológicos e clínicos foram extraídos do prontuário. A fase clínica da hepatite B crônica considerada neste estudo foi avaliada em julho de 2017. Genotipagem do HBV foi realizada pela amplificação e pelo sequenciamento da região S/POL do genoma viral. A caracterização das regiões PC e BCP foi também realizada por sequenciamento nucleotídico. **Resultados:** A mediana de idade na população estudada foi de 48 anos, sendo 52,6% do sexo masculino e predominantemente (78%) natural do Estado do Espírito Santo, sendo a maior parte destes (47,7%) natural da região metropolitana do Estado. A provável via de transmissão foi identificada em 66,8% dos indivíduos, sendo a provável transmissão vertical identificada em 36,6%, intrafamiliar em 19,6%, sexual em 7% e sanguínea em 3,6%. Quanto ao HBeAg, 94%, eram negativos e 6%, positivos. As fases clínicas HBeAg negativo predominaram, sendo 54,9% portadores inativos e 37,6% hepatite B crônica ativa HBeAg-. A fase de imunotolerância foi observada em 2,6% dos indivíduos, e 3,4% estavam na fase de hepatite B crônica ativa HBeAg+. Foi possível amplificar e sequenciar 202 amostras para a caracterização do genótipo/subgenótipo do HBV: o genótipo A foi identificado em 65,3% (A1 = 63,9% e A2 = 1,5%; genótipo D em 32,7% = 27,7% D3, 4% HBV/D4 e 1% D2) e o genótipo F em 2%. Comparando apenas os subgenótipos mais frequentes A1 e D3, encontramos associação significativa entre via de transmissão vertical e naturalidade fora do ES com o subgenótipo HBV/A1 e transmissão intrafamiliar e naturalidade no ES com o subgenótipo HBV/D3 ( $p < 0,001$ ). Entre os indivíduos nascidos no ES ( $n=155$ ), as frequências dos

subgenótipos foram similares às da população geral do estudo, entretanto, observamos aumento progressivo da frequência do subgenótipo A1 no sentido Sul-Norte do Estado e do subgenótipo D3 no sentido Norte-Sul do ES. De 202 amostras com genótipo/subgenótipo do HBV caracterizado, em 116, foi possível amplificar e sequenciar as regiões PC e BCP do HBV. A frequência de cepas com mutações BCP (nas posições A1762T e/ou G1764A) foi de 69% e na região PC (G1896A e/ou G1899A) foi de 24%. A frequência da mutação G1764A foi significativamente mais frequente no subgenótipo A1 em relação ao subgenótipo D3 ( $p=0,03$ ). Mutações na região PC foram significativamente mais frequentes ( $p<0,01$ ) no subgenótipo D3 (75%) do que no A1 (7%). Mutações nas regiões BCP + PC foram mais frequentes nas cepas genótipo D (48,1%) do que nas genótipo A (6,0%) -  $p<0,001$ . Na análise de associação entre outras mutações com relevância clínica na região da PC, mutações nas posições 1814-1816 foram mais frequentes nas formas clínicas HBeAg negativo ( $p=0,03$ ). Conclusões: Os achados deste estudo sugerem o papel central da transmissão familiar do HBV no Estado do ES, em população predominantemente urbana, formas clínicas HBeAg negativo, e os genótipos encontrados foram A, D e F, com predomínio do subgenótipo A1 associado com transmissão vertical e subgenótipo D3 com transmissão intrafamiliar. Não observamos associação entre genótipos/subgenótipos com idade, sexo, *status* do antígeno HBeAg, HBV DNA e fases clínicas da doença. A presença de mutações na região da BCP (A1762T/G1764A) e PC (G1896A/G1899A) não se associou com idade, *status* HBeAg ou fase clínica da doença. A análise de associação evidenciou que a presença da variante G1764A se associou com genótipo HBV/A e que a presença de mutações clássicas na região PC isolada ou a dupla (BCP + PC) de mutação se associou com o subgenótipo D3 e com a baixa carga viral do HBV. As cepas com alteração no códon de iniciação para síntese do HBeAg (1814-1816 da região PC) se associaram com formas clínicas HBeAg negativo, e a presença da mutação G1862T se associou com o subgenótipo A1.

**Descritores:** Hepatite B crônica; Vírus da hepatite B; Epidemiologia; Fases clínicas; Genótipos; Subgenótipos; Mutação pré-core; Promotor basal do core.

## ABSTRACT

---

---

Motta TQR. *Epidemiological, clinical and virological characterization of HBV infection among patients from Espírito Santo, an endemic area in Southeastern Brazil* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

**Introduction:** Hepatitis B virus (HBV) infection is a global public health problem and is responsible for significant morbidity and mortality. In Brazil, endemicity is generally low and moderate, or high in some localities such as in some areas of the state of Espírito Santo (ES). Factors such as age at infection, HBV genotype, HBV DNA levels over time, specific mutations in the viral genome, and possibly polymorphisms in the host's HLA region, seem to influence the natural history of HBV. **Objective:** The aim of this study was to characterize the clinical and epidemiological aspects of HBV infection in ES state, and to analyze the distribution of genotypes, subgenotypes and variants with mutations in the basal core (BCP) and pre-core (PC) promoter regions and its association with clinical and epidemiological patterns of the disease. **Material and Methods:** A total of 587 individuals followed at the HUCAM infectious diseases clinic between July 2005 and July 2017 were analyzed. Demographic, epidemiological, and clinical data were extracted from the medical records. The clinical phase of chronic hepatitis B considered in this study was evaluated in July 2017. HBV genotyping was performed by amplification and sequencing of the S/POL region of the viral genome. Characterization of the PC and BCP regions was also performed by nucleotide sequencing. **Results:** The median age in the studied population was 48 years, with 52.6% male and predominantly (78%) from the state of Espírito Santo, with most of these (47.7%) from the metropolitan region of State. The probable route of transmission was identified in 66.8% of the individuals, with probable vertical transmission being identified in 36.6%, intrafamilial in 19.6%, sexual in 7% and blood in 3.6%. As for HBeAg, 94% were negative and 6% positive. HBeAg negative clinical phases predominated, with 54.9% inactive carriers and 37.6% active chronic hepatitis B HBeAg-. The immunotolerance phase was observed in 2.6% of the individuals and 3.4% were in the HBeAg+ active chronic hepatitis B phase. It was possible to amplify and sequence 202 samples to characterize the HBV genotype/subgenotype: genotype A was identified in 65.3% (A1 = 63.9% and A2 = 1.5%); genotype D, in 32.7% (27.7% D3, 4% HBV/D4 and 1% D2) and genotype F in 2%. Comparing only the most frequent subgenotypes A1 and D3, we found a significant association between vertical transmission route and birth outside ES with HBV/A1 and intrafamilial transmission and birth in ES with HBV/D3 ( $p < 0.001$ ). Among individuals born in ES ( $n=155$ ), the frequencies of subgenotypes were similar to that of the general population of the study, however, we observed a progressive increase in the frequency of subgenotype A1 in the south-north direction of

the state and of subgenotype D3 in the north- south of ES. Of 202 samples with HBV genotype/subgenotype characterized, in 116 it was possible to amplify and sequence the PC and BCP regions of HBV. The frequency of strains with BCP mutations (in positions A1762T and/or G1764A) was 69% and in the PC region (G1896A and/or G1899A) it was 24%. The frequency of the G1764A mutation was significantly more frequent in the A1 subgenotype compared to the D3 subgenotype ( $p=0.03$ ). Mutations in the PC region were significantly more frequent ( $p<0.01$ ) in the D3 subgenotype (75%) than in the A1 (7%). Mutations in the BCP + PC regions were more frequent in genotype D (48.1%) than in genotype A (6.0%) strains -  $p<0.001$ . In the analysis of association between other mutations with clinical relevance in the PC region, mutations in positions 1814-1816 were more frequent in the HBeAg negative clinical forms ( $p=0.03$ ). **Conclusions:** The findings of this study suggest the central role of familial HBV transmission in ES, in a predominantly urban population, HBeAg negative clinical forms and the genotypes found were A, D and F, with a predominance of subgenotype A1 associated with vertical transmission and birth outside the state and subgenotype D3 with intrafamilial transmission. We did not observe an association between genotypes/subgenotypes with age, sex, HBeAg antigen status, HBV DNA, and clinical stages of the disease. The presence of mutations in the region of BCP (A1762T/G1764A) and PC (G1896A/G1899A) were not associated with age, HBeAg Status or clinical stage of the disease. The association analysis showed that the presence of the G1764A variant was associated with the HBV/A genotype and the presence of mutations in the PC region alone or double (BCP+PC) variants were associated with the D3 subgenotype and low HBV viral load. Strains with change in the initiation codon for HBeAg synthesis (1814-1816 from the PC region) were associated with HBeAg negative clinical forms, and the presence of the G1862T mutation was associated with the subgenotype A1.

**Descriptors:** Hepatitis B chronic; Hepatitis B virus; Epidemiology; Clinical phases; Genotypes; Subgenotypes; Precore mutant; Basal core promoter.

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Hepatite B: aspectos históricos

As primeiras evidências de eventos ictericos relacionados à etiologia viral das hepatites foram pouco convincentes até 1965, quando Blumberg e colaboradores descreveram o antígeno de superfície (HBsAg) do vírus da hepatite B (HBV) denominado antígeno Austrália e o relacionaram à doença icterica de transmissão parenteral em pacientes oncológicos politransfundidos (Blumberg et al., 1965; Blumberg et al., 1967). Nessa mesma época, um outro grupo de pesquisadores liderados por Krugman estudava as vias de transmissão, o quadro clínico e a imunologia relacionada à infecção, trazendo avanços significativos para o entendimento da história natural da doença (Krugman et al., 1962). Com os avanços da investigação dessa infecção, Dane e colaboradores descreveram a partícula completa do HBV (Dane et al., 1970). Posteriormente, foram descritos outros antígenos além do HBsAg, como o antígeno e (HBeAg) em 1972 (Magnius; Espmark, 1972) e logo depois o antígeno do capsídeo central ou core (HBcAg) em 1977 (Howard; Zuckerman, 1977), além da caracterização do material genético do vírus, ácido desoxirribonucleico (DNA), de fita dupla parcial (Robinson et al., 1974).

Hepatite B crônica é um problema de saúde pública que apresenta ampla diversidade na prevalência global. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu níveis de endemicidade de acordo com a prevalência do HBsAg, tanto em regiões como em populações, em quatro categorias: baixa (<2%), intermediária baixa (2-4%), intermediária alta (5-7%) e alta (≥8%).

A despeito de existir uma vacina efetiva contra o HBV, mais de 257 milhões de pessoas vivem com hepatite B crônica no mundo. A infecção crônica pelo HBV leva à inflamação hepática, com risco de cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Em contraste à redução na mortalidade

pelo vírus da imunodeficiência (HIV), tuberculose e malária, a mortalidade por HBV vem aumentando ao longo dos anos (WHO Hepatitis Report, 2017).

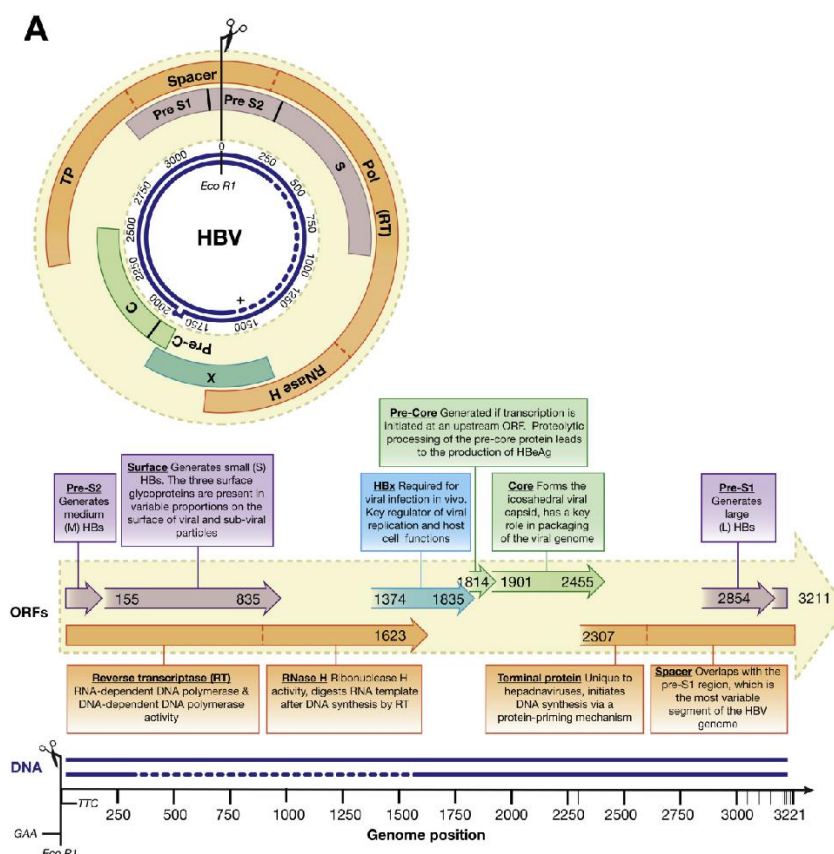
Estudos de biologia molecular do HBV proporcionaram um melhor entendimento da virologia e possibilitaram a descrição do genoma desse vírus no final da década de 1970 (Galibert et al., 1979). Após cerca de duas décadas, já era possível dosar a carga viral do HBV (HBV DNA) através de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), (Ranki et al., 1995). Esta inovação tecnológica tem sido utilizada na prática clínica atual como parte da propedêutica diagnóstica e do monitoramento terapêutico do HBV (Chevaliez et al., 2008).

As Nações Unidas lançaram um desafio global de eliminação da infecção pelo HBV como problema de saúde pública até 2030. Há, portanto, grande necessidade de melhorar toda a linha de cuidados da infecção pelo HBV para atingir as metas de eliminação (United Nations, 2012). Curar a infecção pelo HBV requer entendimento robusto e detalhado da sua sequência genética, função de seus diferentes genes e diversidade. Conhecer essa diversidade genética viral pode auxiliar no manejo do paciente por estratificação em grupos, seleção de terapias, identificação de cepas-droga ou vacina resistente e desenvolvimento de novas abordagens no monitoramento (McNaughton et al., 2019).

## 1.2 O vírus da hepatite B

O HBV é um dos menores vírus conhecidos que infectam humanos e pertence à família *Hepadnaviridae*. É um vírus esférico, com nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, dentro do qual se encontra o genoma, que é constituído por uma molécula de DNA dupla fita parcial e a enzima polimerase. É um vírus hepatotrópico, e as lesões hepáticas ocorrem por mecanismos imunomediados nos hepatócitos. Também é um vírus oncogênico reconhecido, conferindo maior risco de carcinoma hepatocelular (CHC) nos indivíduos cronicamente infectados do que na população geral. O

vírus circula no soro como uma partícula de camada dupla de 42 nm, com um componente de envelope externo (HBsAg) e um componente de nucleocapsídeo interno constituído pelo antígeno do core (HBcAg). O genoma de DNA fita dupla circular parcial possui 4 fases de leitura abertas (ORFs) – polimerase (Pol), superfície (pré S1, pré-S2 e S), pré-core/core (C) e X (Figura 1). O HBV produz 5 transcritos de ácido ribonucleico (RNA) com vários comprimentos, e traduzidos em 7 diferentes proteínas: três proteínas de superfície (proteínas pequena, média e grande), dois antígenos relacionados com o core (HBcAg e HBeAg), a polimerase e a pequena proteína regulatória X (HBxAg). Essa natureza compacta dos genomas dos hepadnavírus com várias ORFs possibilita que aproximadamente dois terços dos seus nucleotídeos possam ser codificados em mais de um elemento funcional (Locarnini et al., 2013).



FONTE: Adaptado de McNaughton AL et al. Gastroenterology. 2019 Jan;156(2):384-399.

**Figura 1** - Genoma do HBV e fases de leitura aberta (ORFs) codificantes das proteínas virais



A replicação do HBV se dá por mecanismos de transcrição reversa, por meio de um RNA intermediário, o RNA pré-genômico. A DNA polimerase viral possui atividade de transcriptase reversa e carece de mecanismos corretivos, pois não possui habilidade para revisão durante a replicação, facilitando substituições nucleotídicas em taxas superiores a outros vírus DNA, favorecendo, desta forma, a heterogeneidade nos genomas virais. Durante a infecção crônica e por diferentes mecanismos de pressão seletiva, podem surgir variantes do HBV com mutações capazes de escapar à detecção por procedimentos diagnósticos, profilaxia vacinal ou resposta terapêutica aos antivirais. Essa extraordinária diversidade genética, associada à alta capacidade de replicação viral, permite que o HBV se adapte às diferentes reações imunológicas em diferentes indivíduos e até em diferentes hospedeiros, como em espécies de outros primatas (Shaefer, 2007).

A partir de diferentes determinantes antigênicos do HBsAg, foi proposta a primeira classificação do HBV em 9 subtipos sorológicos: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *adw2*, *adw4*, *adrq+*, *adrq-* e *ayr* (Courouce-Pauty et al., 1983). Com os avanços das técnicas de biologia molecular, foi proposta uma nova forma de classificação com base na divergência da sequência de nucleotídeos do genoma completo ou da sequência parcial do gene S (Okamoto et al., 1988; Kramvis et al., 2005).

Com base na divergência nucleotídica >8% da sequência genômica do HBV, foram definidos 9 genótipos identificados por letras maiúsculas (de A até I); um décimo genótipo (J) foi caracterizado após isolamento em um único indivíduo portador de CHC (Kramvis, 2014; Tatematsu et al., 2009). Os genótipos do HBV foram posteriormente divididos em pelo menos 35 subgenótipos por divergência nucleotídica >4%, com ampla variação no número de subgenótipos descritos para cada genótipo (McNaughton et al., 2019).

Há diferentes teorias que procuram explicar a origem e a dispersão dos principais genótipos do HBV circulantes no Brasil e nas Américas

Central e do Norte, sem, no entanto, ser capazes de elucidar essa questão. Estudo recente avaliou possível origem e migração dos diferentes genótipos do HBV pelo mundo, que sugere que o genótipo A do HBV (HBV/A) originou-se provavelmente entre o Oriente Médio e a Ásia Central. Depois se espalhou pela África Central e, então, se dividiu em dois caminhos separados, um para a região Subsaariana Oriental e outro para o Sul. Muito tempo depois, pelo grande contingente de migração humana, possivelmente devido ao tráfico de escravos, disseminou-se para o Brasil, o Caribe e o subcontinente indiano. Já o genótipo D (HBV/D) parece ter formado *clusters* regionais. Análises filogenéticas sugeriram o Norte da África e o Oriente Médio como a provável origem do genótipo D. Entretanto, a partir de um conjunto de evidências atuais, a origem exata ainda não pode ser inferida com precisão (Kramvis, 2014; Kostaki et al., 2018; Godoy et al., 2020).

Atualmente, o genótipo A é encontrado com maior frequência na África Subsaariana (A1), no Norte Europeu (A2) e na África Ocidental (A3); o genótipo B é tipicamente encontrado no Japão (B1), no Leste Asiático (B2-5) e em populações indígenas do Ártico (B6); o genótipo C é mais encontrado no Sudeste Asiático (C1), na China, na Coreia e no Japão (C2) e em várias ilhas do Pacífico Sul (C3); o genótipo D (D1-4) é frequentemente encontrado na região mediterrânea, Norte da África, Oriente Médio, Índia e Rússia, além do Leste Europeu; o genótipo E, no Oeste da África; os genótipos F e H são encontrados nas Américas, mais frequentemente na América do Sul (F1-4) e no Alasca (F1), e o H na América Central, no México e nos Estados Unidos (EUA). O genótipo G é raro, e foi encontrado em coinfeção com outros genótipos do HBV (em especial com o genótipo A) nos EUA, na França e no Vietnã; o genótipo I foi recentemente descrito no Vietnã, e o genótipo J isolado em um único indivíduo com CHC por provável recombinação genética na região S do genótipo C de macacos Gibão (Locarnini, 2013; Kramvis, 2014; McNaughton et al., 2019).

Desde as primeiras publicações sobre genótipos do HBV no Brasil, os mais frequentemente encontrados têm sido o genótipo A, seguido pelos genótipos D e F (Araújo et al., 2004; Chachá et al., 2017; Crispim et al.,

2014; Gusatti et al., 2015; Mello et al., 2014; Moraes et al., 1996; Paoli et al., 2018; Rezende et al., 2005; Ribeiro et al., 2006; Sitnik et al., 2004). Os genótipos B e C já foram descritos no território brasileiro, particularmente em populações de origem asiática, e o genótipo G foi encontrado no Rio de Janeiro (Bottechia et al., 2008; Mello et al., 2014). Entretanto, ainda existem poucos estudos a respeito da distribuição dos diferentes subgenótipos na maior parte dos Estados brasileiros, bem como suas relações com possíveis desfechos clínicos.

### **1.3 Epidemiologia do HBV**

Trata-se de doença de distribuição universal, presente em todos os continentes, e endemicidade bem variável. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, em 2015, 240 milhões de pessoas, ou 3,5% da população mundial, viviam com hepatite B crônica. A distribuição geográfica/étnica do HBV no mundo leva em consideração o padrão de endemicidade, com base na prevalência do HBsAg na população geral, classificando-a em baixa (<2%), intermediária baixa (2-4%), intermediária alta (5-7%) e alta prevalência ( $\geq 8\%$ ) (WHO, 2015).

No Brasil, a prevalência de hepatite B crônica é considerada baixa. Estes dados foram confirmados em revisão recente, que evidenciou que, na maior parte dos estudos populacionais, as prevalências eram <1%. Entretanto, ainda permanecem regiões isoladas com prevalência intermediária e alta, particularmente no Estado do Amazonas. Prevalência intermediária fora da região amazônica foi demonstrada em populações específicas, como população de rua na cidade de São Paulo e em afrodescendentes no Estado do Mato Grosso do Sul (Souto, 2016).

No Espírito Santo, dados populacionais referentes à hepatite B crônica são escassos. Estudo populacional em mulheres jovens com HIV positivo acompanhadas num centro de referência em Vitória evidenciou prevalência de 0,9% em 1993 (Figueiredo, 2008). Estudo de análise

exploratória analisou distribuição espacial da hepatite B e identificou bolsões principalmente nas regiões Norte do Brasil e em alguns municípios do Estado de Santa Catarina, Paraná e Espírito Santo (Vivaldini et al., 2019).

#### **1.4 Vias de transmissão do vírus da hepatite B**

O HBV pode ser transmitido pelo contato com fluidos corporais, como sangue, saliva, sêmen e secreções vaginais de indivíduos infectados. Entretanto, a transmissão vertical e perinatal, bem como a transmissão horizontal no ambiente do domicílio, são as principais formas de contágio no mundo, particularmente nas populações com alta endemicidade da infecção (Fattovich et al., 2008).

No Brasil, dados a respeito da via de transmissão são escassos. O boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, recentemente atualizado, classificou a via sexual como predominante (21,3%), seguida pela transmissão vertical/intrafamiliar (5,1%). No entanto, em quase 60% dos casos notificados, não foi reportada a provável via de infecção (Brasil, 2020). Estudo populacional avaliando seis países da América Latina verificou aumento da prevalência de marcador sorológico de infecção pelo HBV (Anti-HBc) em indivíduos com 16 anos ou mais, sugerindo predomínio da via sexual na transmissão da hepatite B. Por outro lado, países como República Dominicana e Brasil (21,4% e 7,9% respectivamente) já apresentavam marcadores sorológicos de infecção pelo HBV bem elevados nos primeiros anos de vida, demonstrando a importância das vias vertical e intrafamiliar na transmissão do vírus da hepatite B (Silveira et al., 1999). Outra via de transmissão ainda importante a ser considerada no Brasil é a via sanguínea através da transfusão de hemoderivados contaminados, particularmente naqueles indivíduos que receberam transfusão antes de novembro de 1993, quando o Ministério da Saúde instituiu a obrigatoriedade da pesquisa do anti-HBc total para doadores de sangue, como também a inclusão da vacina contra o HBV no calendário vacinal do SUS. Ainda outras formas de transmissão do HBV que, embora tenham sido observadas com menor

frequência, são importantes vias de infecção em algumas situações são o compartilhamento de seringas e materiais contaminados entre usuários de drogas endovenosas, os acidentes de trabalho entre profissionais da área da saúde e os pacientes em hemodiálise.

### **1.5 Patogenia e história natural da infecção pelo HBV**

Como vírus não citopático, a imunopatogênese do HBV é mediada principalmente por resposta celular aos epítopos das proteínas do HBV expressas na superfície dos hepatócitos com consequente injúria no tecido hepático.

Para estabelecer a infecção, o HBV deve resistir a uma série de mecanismos de defesa do hospedeiro, iniciando pela resposta imune inata seguida pela resposta imune adaptativa. A resposta imune inata é facilitada através de receptores de reconhecimento-padrão, como lectina tipo C e opsoninas, além de receptores toll-like, entre outros. Nesse padrão de resposta imune inata, os IFNs têm um papel central. Os IFNs tipo I podem intensificar a atividade da célula natural killer (NK) e aumentar a expressão do maior complexo de histocompatibilidade I (MHC I), influenciando o desenvolvimento de linfócitos T e B. Além disso, IFNs II e III também contribuem como defesa imune antiviral. Após ultrapassar a resposta imune inata, o HBV enfrenta a resposta imune adaptativa antígeno-específica mediada por linfócitos B e T. Como parte da resposta adaptativa, os linfócitos B produzem anticorpos que se ligam aos vírus circulantes, facilitando, desta forma, a eliminação de sua entrada nas células-alvo, e os linfócitos T CD8 são como agentes efetores, reconhecem e matam as células infectadas que expressam os epítopos virais em sua superfície através do MHC I. Por outro lado, os linfócitos T CD4 são ativados por células que expressam epítopos virais através do complexo MHC II e que, em sua maioria, este complexo também se expressa como apresentador de antígenos. Desta forma, o linfócito T CD4 não atinge diretamente células infectadas que expressam o MHC II. Além disso, o linfócito T CD4 coordena

resposta imune adaptativa para linfócitos T e B, através da ativação de células dendríticas, linfócitos T helper e linfócitos T regulatórios. A infecção crônica pelo HBV se desenvolve por não ocorrer uma ação efetiva dos linfócitos T CD8 e CD4, e, por tolerância ou exaustão das múltiplas vias imunes regulatórias, não são desenvolvidos linfócitos T de memória eficientes. Essa replicação persistente pode desencadear respostas imunológicas fortes e contínuas contra o vírus e resultar em lesões graves no fígado (Chang; Liu, 2016).

A infecção crônica pelo HBV apresenta progressão não linear por 4 fases. A história natural e os desfechos clínicos variam amplamente entre os indivíduos infectados pelo HBV, e tanto fatores relacionados ao vírus (carga viral, mutações e genótipo) como ao ambiente e ao hospedeiro (idade da contaminação, sexo, imunossupressão, álcool e fatores genômicos) parecem afetar esses desfechos. A classificação dessas fases clínicas da hepatite B crônica é baseada em parâmetros clínicos, tais como sinais de hepatopatia avançada ou manifestações extra-hepáticas, bioquímicos (ALT), virológicos (HBV DNA, HBeAg) e grau de lesão hepática por inflamação e/ou fibrose (Fattovich et al., 2008; Ferraz et al., 2020).

Na primeira fase, caracterizada pela tolerância imune, há replicação viral ativa, evidenciada pela presença do HBeAg e das altas taxas do HBV DNA no soro, geralmente acima de 200.000 Unidades Internacionais por mililitros (UI/mL), não raro acima de  $10^7$  UI/mL ou até  $10^8$  UI/mL. O indivíduo é assintomático e não apresenta alterações significativas das aminotransferases ou lesão necroinflamatória no fígado. Essa fase, quando identificada durante o acompanhamento do indivíduo, é classificada como fase imunotolerante da hepatite B crônica.

A segunda fase é caracterizada pela presença de resposta imunológica exuberante, com inflamação e necrose dos hepatócitos. Nesta fase, permanecem detectáveis no soro o HBeAg e o HBV DNA com altas taxas de replicação, geralmente acima de 20.000 UI/mL, aminotransferases alteradas, particularmente a ALT. Há hepatite crônica ativa com lesão

hepática inflamatória e progressiva. Esta fase da infecção pode persistir por vários anos, podendo evoluir para cirrose hepática e suas complicações. Esta fase é classificada como hepatite crônica ativa HBeAg positivo.

A terceira fase é caracterizada por baixa ou nenhuma replicação viral e resolução do processo necroinflamatório. É um período em que há negatificação do HBeAg, surgimento do anti-HBe e ALT retornando aos níveis normais. Nesta fase, o HBsAg está presente no soro com baixos níveis de HBV DNA, geralmente inferior a 2.000 UI/mL ou até ausente de forma intermitente. Esta fase é reconhecida clinicamente como fase de portador inativo, na qual o indivíduo pode persistir por décadas.

Seguindo-se à fase de portador inativo, é possível uma quarta fase com retorno da replicação viral e reativação da doença, podendo até haver sororeversão do anti-HBe para HBeAg. No entanto, mais comumente, o HBeAg permanece indetectável no soro, embora a hepatite crônica esteja ativa, com a ALT elevada de forma intermitente ou persistente e a presença de atividade necroinflamatória no tecido hepático. Este padrão geralmente se associa à presença de vírus com mutações na região promotora basal do core (BCP) ou na região pré-core (PC) e é classificada clinicamente como hepatite crônica HBeAg negativo (Fattovich et al., 2008; Ferraz et al., 2020).

Vários fatores virais parecem influenciar a evolução da infecção pelo HBV incluindo genótipo (MacMahon, 2010), HBV DNA ao longo do tempo (Chen, 2006) e mutações virais específicas (Lau et al., 2021). Revisão recente demonstrou que os genótipos e subgenótipos do HBV apresentam padrões geográficos e vias de transmissão específicos; Kramvis, 2014). Estudos sobre desfechos clínicos, principalmente comparando os genótipos B e C na Ásia, demonstraram que indivíduos infectados com genótipo C apresentam soroconversão do HBeAg em uma idade mais avançada e são mais propensos a ser HBeAg positivos em qualquer idade do que o genótipo B (Kao, 2002). Estudos nos genótipos A e D são escassos, e não têm sido observadas diferenças entre os genótipos A e D em relação à taxa de soroconversão HBeAg/Anti-HBe. Entretanto, soroconversão S+/S- foi maior

no genótipo A em relação ao genótipo D (Sanchez-Tapias, 2002). Alguns estudos indicam haver associação entre variantes HBeAg negativas com piores prognósticos, enquanto outros sugerem que a emergência dessas variantes correlaciona com menor injúria hepática e clareamento viral. (Shi, 2012).

A caracterização dos genótipos e subgenótipos do HBV, assim como da variabilidade genética dessas cepas, é de grande utilidade em estudos epidemiológicos e para traçar a migração das populações (Terrault, 2018).

Ocorrências de variações naturais no genoma do HBV podem ter implicações clínicas e epidemiológicas. Vários mutantes de HBV, incluindo aqueles com mutações no promotor basal do core e no gene pré-core/core, ou com deleções no genes pré-S/S, foram relatados como associados à doença hepática progressiva e ao risco de desenvolvimento de CHC (Chotiyaputa; Lok, 2009; Lin; Kao, 2015;).

Recentemente, estudos de associação genômica ampliada (GWAS) identificaram polimorfismos associados aos diferentes desfechos de doenças em população asiática. Estes polimorfismos estão concentrados próximos à região do HLA e estão relacionados aos diversos aspectos da resposta imunológica do hospedeiro, como clareamento viral espontâneo, supressão viral e variação na resposta imune vacinal. Entretanto, estudos em outras populações de ancestrais não asiáticos portadores do HBV ainda são necessários para melhor entendimento da real influência desses fatores genéticos do hospedeiro nos desfechos clínicos da hepatite B crônica (McMahon, 2009; McMahon, 2009a; Akcay, 2018).

## **1.6 Tratamento da hepatite B crônica**

O objetivo principal do tratamento da hepatite B é reduzir o risco de progressão da doença hepática e de seus desfechos primários: cirrose, carcinoma hepatocelular (CHC) e óbito. Desfechos intermediários, como a



negativação do HBV DNA e a normalização da ALT, estão validados e têm sido utilizados como meta terapêutica de longo prazo.

A indicação de tratamento é baseada em fatores individuais (idade, gestação), familiares (comorbidades e história familiar), perfil sorológico (HBeAg), bioquímico (níveis de ALT), virológicos (HBV DNA) e intensidade da lesão hepática avaliada por métodos invasivos (biópsia hepática) e não invasivos, como Elastografia, APRI e FIB4. Com o objetivo de melhorar o entendimento e padronizar condutas, desde 2009, têm sido publicadas diretrizes sobre diagnóstico, manejo e tratamento da hepatite B crônica (Easl 2017; Terrault et al., 2018).

No Brasil, foram publicadas recentemente, diretrizes atualizadas sobre testagem, ferramentas diagnósticas, indicação de tratamento, esquemas terapêuticos e manejo em determinadas populações pela Sociedade Brasileira de Hepatologia e Sociedade Brasileira de Infectologia (Ferraz et al., 2020).

### **1.7 Perspectivas na hepatite B crônica**

A despeito da grande evolução no conhecimento do HBV nos últimos 50 anos, a disponibilidade de medidas profiláticas eficazes, como vacina, melhoria das ferramentas de diagnóstico, monitoramento e tratamento da hepatite B crônica, ainda permanecem alguns desafios para o efetivo controle e a eliminação da infecção pelo vírus da hepatite B. Entre esses desafios, temos as migrações populacionais entre áreas geográficas com diferentes prevalências dos diversos agentes infecciosos, entre eles o HBV, e a falta de acesso universal à profilaxia e ao tratamento (Locarnini, 2015).

Este trabalho visa contribuir para melhor caracterização dos aspectos clínicos, epidemiológicos e virológicos da hepatite B crônica no Estado do Espírito Santo, uma região geográfica que historicamente possui áreas onde a infecção pelo HBV alcança níveis de prevalência intermediária a alta. Acreditamos que essa contribuição será de grande importância para a

avaliação das políticas públicas adotadas atualmente para o manejo dos portadores de hepatite B crônica, o controle da disseminação do vírus e a prevenção da infecção na região.

---

---

**2 OBJETIVOS**

---

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Caracterização dos aspectos demográficos, epidemiológicos, laboratoriais, virológicos e clínicos dos portadores crônicos do HBV acompanhados no Serviço de Doenças Infecciosas do ambulatório de hepatite B do Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Espírito Santo (HUCAM-UFES).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar as formas clínicas da hepatite B crônica nos indivíduos acompanhados no Serviço de Doenças Infecciosas do HUCAM-UFES;
- Caracterizar os genótipos e subgenótipos do HBV circulantes nessa população;
- Avaliar a associação entre os genótipos e subgenótipos do HBV com padrões demográficos, epidemiológicos, laboratoriais e clínicos;
- Avaliar as características genéticas na região do promotor basal do core (BCP) e do gene pré-core dos genótipos/subgenótipos do HBV identificados na população estudada;
- Avaliar a associação entre as mutações das regiões do promotor basal do core (BCP) e pré-core (PC) com padrões demográficos, epidemiológicos, laboratoriais e clínicos.

---

---

## **3 PACIENTES E MÉTODOS**

---

---

### **3 PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1 Pacientes**

##### **3.1.1 População do estudo**

O estudo incluiu indivíduos de origem não asiática matriculados no ambulatório de hepatite B do Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFES. Foram recrutados os pacientes matriculados no serviço entre julho de 2005 e julho de 2017.

##### **3.1.2 Critérios de inclusão**

- Presença de HBsAg no soro por mais de seis meses;
- Disponibilidade de resultado dos marcadores sorológicos do HBV: HBeAg e Anti-HBe;
- Pelo menos uma determinação de HBV DNA quantitativo;
- Idade  $\geq$  18 anos.

##### **3.1.3 Critérios de exclusão**

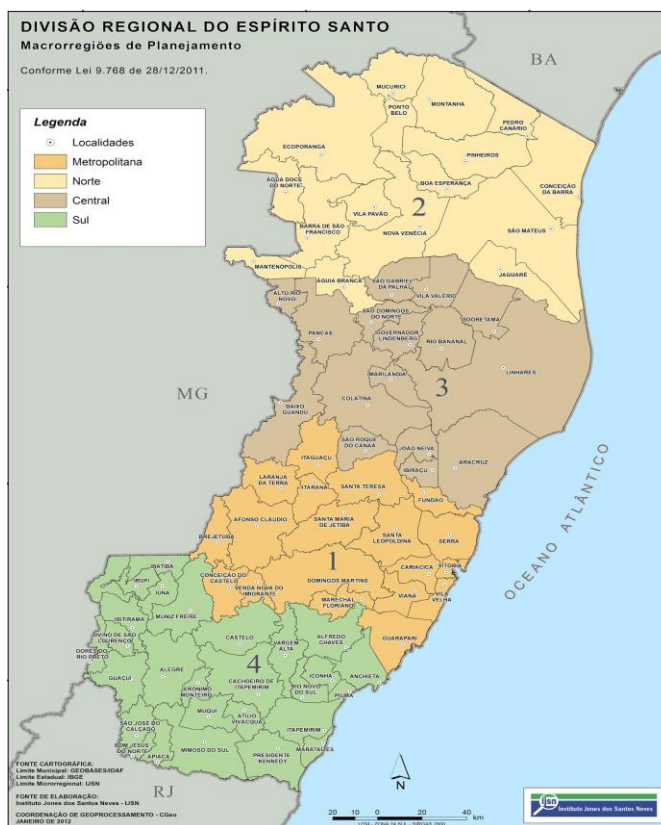
- Dados epidemiológicos e demográficos incompletos no prontuário médico;
- Seguimento por tempo inferior a 6 meses.

O uso abusivo de bebidas alcoólicas e comorbidades metabólicas não foi abordado neste estudo.

### 3.2 Métodos

O desenho do estudo é uma série de casos com avaliação retrospectiva dos indivíduos matriculados no Serviço de Doenças Infecciosas do HUCAM-UFES no período de 1º de julho de 2005 a 31 de julho de 2017, para fins de inclusão/exclusão do estudo.

Os dados demográficos (idade, sexo e macrorregião de nascimento), epidemiológicos (provável mecanismo de infecção pelo HBV, coinfeção com HIV, HCV), laboratoriais (*status* HBeAg, HBV DNA, ALT) e clínicos (fase clínica da hepatite B crônica) foram extraídos de documentos do prontuário, bem como das evoluções médicas durante todo o período de acompanhamento. Para a distribuição dos indivíduos por local de nascimento no Espírito Santo, foi utilizada a distribuição por regionais de saúde da Secretaria de Saúde do ES (Resolução CIB/SUS-ES nº 219, de 19 de novembro de 2011) em quatro macrorregiões: Norte, Central, Metropolitana e Sul (Figura 2).



**Figura 2 -** Mapa de divisão em macrorregiões do Estado do Espírito Santo de acordo com a distribuição por regionais de saúde da Secretaria de Saúde do Estado

A fonte provável de infecção foi extraída de dados de prontuário provenientes da investigação epidemiológica já padronizada no ambulatório e realizada sistematicamente nas primeiras consultas, com investigação dos familiares (pais, irmãos, cônjuge e filhos), e, quando possível, investigação sorológica de familiares duas gerações acima ou abaixo do caso-índice, conforme necessário.

A via de infecção pelo HBV foi categorizada como:

- *Vertical*: definida pela presença de mãe HBsAg positivo;
- *Intrafamiliar*: quando o pai era portador de hepatite B crônica, mãe suscetível ou evidência sorológica de portador de hepatite B crônica entre familiares residentes no domicílio do caso-índice;



- *Sanguínea*: por uso de drogas injetáveis ou inalatórias, por hemotransfusão;
- *Sexual* nos indivíduos com prática sexual não segura, múltiplos parceiros (mais de dois parceiros sexuais nos 6 meses anteriores ao diagnóstico), ausência de história familiar e marcadores de infecção pelo HBV negativos nos pais;
- Hepatite B de *fonte desconhecida*: quando o indivíduo não preencheu nenhum dos critérios acima ou quando não houve possibilidade de investigação familiar.

Quando mais de um critério foi encontrado, considerou-se aquele com maior potencial de infectividade.

A classificação da fase clínica da hepatite B crônica foi avaliada para todos os pacientes inclusos em um momento pontual do estudo: julho/2017. Para essa classificação, foram utilizados os seguintes critérios:

- Sorológicos: presença ou não do HBeAg e anticorpos Anti-HBe;
- Bioquímicos: duas medidas de ALT com intervalo mínimo de 30 dias;
- Viroológicos: última carga viral realizada para os pacientes sem tratamento. Para aqueles pacientes em uso de antivirais, foi considerada a carga viral imediatamente anterior ao início da terapia.

As fases evolutivas da infecção crônica pelo HBV consideradas neste estudo tiveram como base os critérios descritos no Quadro 1 pelas diretrizes terapêuticas para hepatite B e coinfeções (Ferraz et al., 2020).

**Quadro 1** - Classificação das fases evolutivas da hepatite B crônica

Marcador	1ª Fase	2ª Fase	3ª Fase	4ª Fase
	Imunotolerante	Hepatite Crônica ativa HBeAg+	Portador Inativo	Hepatite Crônica ativa HBeAg -
HBsAg	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
HBeAg	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
HBV DNA	>10 <sup>7</sup> UI/ml	10 <sup>4</sup> -10 <sup>7</sup> UI/ml	< 2.000 UI/ml	> 2.000 UI/ml
ALT	Normal	Elevada	Normal	Elevada
Histologia	Normal / mínima	Moderada / intensa	Normal / mínima	Moderada / intensa

Para cálculo de tempo de acompanhamento, foi utilizado o período entre a primeira consulta e a última consulta registrada em prontuário. Foi considerado como perda de seguimento de um determinado paciente quando o mesmo não compareceu em consulta médica no serviço por mais de 24 meses. O período de acompanhamento foi calculado em meses e agrupado em 4 categorias: <1 ano, <5 anos, >5 anos e perda de seguimento.

### 3.2.1 Avaliação Laboratorial

Foi realizada análise retrospectiva dos prontuários dos indivíduos incluídos no estudo para coletar dados laboratoriais incluindo níveis de alanina aminotransferase (ALT), pesquisa dos antígenos HBsAg e HBeAg e dos anticorpos anti-HBe e Anti-HBs e níveis de HBV DNA. Esses resultados foram utilizados como uma das ferramentas para classificar a fase clínica da hepatite B crônica.

Níveis séricos de ALT eram solicitados periodicamente a cada três ou seis meses e medidos por método automatizado de rotina do laboratório da instituição. Os valores descritos neste estudo foram aqueles utilizados para a classificação da fase clínica da hepatite B de cada paciente em julho de

2017. O limite do valor normal de ALT considerado foi de 35 UI/L e 25 UI/L, para homens e mulheres respectivamente (Terrault et al., 2018).

Os níveis de carga viral do HBV (HBV DNA quantitativo) eram avaliados trimestralmente no primeiro ano de acompanhamento e, a seguir, semestralmente, independentemente do início ou não do uso de antiviral. Para alimentar a base de dados, foram utilizados os laudos dos resultados anexados ao prontuário dos indivíduos. O resultado escolhido para o estudo foi o datado de julho de 2017 ou o último resultado de HBV DNA realizado pelo indivíduo. Para aqueles indivíduos sem laudo comprobatório de HBV DNA em prontuário, foi realizada busca ativa na plataforma de resultado de exames do Laboratório Central da Secretaria de Saúde (LACEN).

A técnica utilizada pelo LACEN para detectar e quantificar os níveis de HBV DNA foi *real-time polymerase chain reaction* (PCR), em tempo real, utilizando a metodologia TaqMan, com limite inferior de 10 UI/mL e superior de 1.000.000.000 UI/mL (ABBOTT, IL, USA).

Para a caracterização dos genótipos e subgenótipos do HBV, foram incluídos apenas aqueles indivíduos com amostra coletada disponível no Biorepositório do Serviço de Infectologia do HUCAM (BioDip) e com HBV DNA detectável.

A genotipagem foi realizada pela amplificação e pelo sequenciamento da região S e polimerase do genoma do HBV (S/POL), conforme descrito por Gomes-Gouvêa et al., 2015. Para a amplificação, utilizou-se a metodologia de *nested* PCR, sendo que, para a primeira PCR, foram usados os *primers* PS3132F e 2920RM, que geraram um fragmento de 1506 pares de base (pb), e, para a segunda PCR, foram os *primers* PS3201F e 1285R, que anelam internamente o amplicon gerado na primeira PCR, amplificando um fragmento de 1306 pb.

Para a amplificação das regiões BCP e pré-core do genoma do HBV, também foi aplicada a metodologia de *nested* PCR utilizando-se os *primers* 2032R e EP 1.1 para a primeira etapa de amplificação, gerando um

fragmento de 554 pb, e os *primers* 2017R e EP 2.1 para a segunda etapa de amplificação, gerando um fragmento de 501 pb (SITNIK, 2004).

Os amplicons gerados foram purificados com o Kit Charge Switch PCR Clean Up (Invitrogen), quantificados e, então, sequenciados. Para o sequenciamento, utilizou-se a técnica de sequenciamento derivada da metodologia de Sanger (Sanger et al., 1977), com didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o kit ABI PrismR BigDye™ Terminator (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A eletroforese foi realizada em sequenciador automático ABI PRISM 3500. Para o sequenciamento do fragmento de 1306 pares de base da região da polimerase, foram utilizados três pares de *primers* (PS3201 e HBV477, L372 e RADE2, P781F e P1285R), que geraram 6 sequências (3 sences e 3 antisenses) com cerca de 500 pares de base superponíveis. Para o sequenciamento da região pré-core/core (fragmento de 501 pb), foram utilizados os mesmos *primers* usados na segunda etapa de amplificação, que produziram sequências em ambos os sentidos da fita de DNA.

Para a análise das sequências do genoma do HBV geradas, inicialmente foi montada uma sequência-consenso das seis fitas (região S/Pol) ou duas fitas (região BCP e pré-core) de DNA obtidas no sequenciamento de cada amostra, utilizando-se o programa CAP3 disponível no site <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Posteriormente, as sequências-consenso foram alinhadas, utilizando-se o programa Clustal W integrado ao programa BioEdit, juntamente com sequências dos diferentes genótipos e subgenótipos do HBV obtidas no GenBank. As sequências da região S/Pol obtidas neste estudo foram submetidas à análise filogenética usando o programa BEAST v.1.8.3 com 10.000.000 etapas da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), amostragem de cada 1.000 passos, e rejeitando os primeiros passos como 1.000.000 *burn-in*. O programa FigTree v1.4.2 foi utilizado para visualização e edição das árvores filogenéticas.

Para a investigação da ocorrência de transmissão intrafamiliar, foram realizadas análises filogenéticas das sequências do HBV isoladas das amostras de indivíduos de uma mesma família, utilizando-se os dados da investigação epidemiológica do grau de parentesco desses indivíduos durante as consultas médicas, podendo se estender a duas gerações acima ou abaixo do caso-índice, de acordo com o caso.

A pesquisa de mutações nas regiões BCP e pré-core foi realizada pela análise visual do alinhamento das sequências de nucleotídeos. Na região do promotor basal do core, foram analisadas as posições 1762 e 1764; na região pré-core, as posições 1814-1816 (códon de iniciação do gene pré-core), 1858, 1862, 1888, 1896 e 1899. Foram consideradas mutações as seguintes substituições: A1762T, G1764A, qualquer alteração que promova a alteração do códon de iniciação ATG nas posições 1814-1816, na posição 1858, só foi avaliado o nucleotídeo presente, G1862T, G1888A, G1896A, G1899A. Para fins de análise, foram consideradas as mutações no BCP (A1762T, G1764A) e PC (G1896A, G1899A), classicamente associadas com redução ou ausência da síntese de HBeAg.

### **3.2.2 Banco de dados**

Foi construído um banco de dados no programa Excel 2007 (Microsoft Office, 2007) elaborado com as variáveis escolhidas para a coleta de dados. As informações obtidas na revisão dos prontuários e na execução das técnicas laboratoriais foram digitadas e armazenadas nesse banco para posterior análise estatística.

A revisão dos prontuários subsidiou informações acerca dos exames laboratoriais bioquímicos, sorológicos e virológicos para a classificação da fase evolutiva da hepatite B crônica.

### 3 2.3 Análise estatística

Foi realizada análise descritiva dos aspectos demográficos, epidemiológicos, laboratoriais e clínicos de toda a população do estudo: média e mediana de idade, proporção de sexo F:M, provável via de transmissão, região de nascimento, *status* do HBeAg +/-, presença de coinfeções com HIV e/ou HCV, nível de carga viral expressa em UI/mL e logaritmo na base 10, fase clínica da doença e uso de antiviral. Também foi descrita a média de carga viral nos pacientes virgens de tratamento e em uso de antiviral no momento da classificação da fase clínica da hepatite B crônica.

Os pacientes foram distribuídos em subgrupos, de acordo com a fase evolutiva da infecção crônica pelo HBV: imunotolerante, hepatite crônica HBeAg positivo, portador inativo, hepatite crônica HBeAg negativo. Foram comparados os dados demográficos, epidemiológicos e clínicos entre os subgrupos.

A frequência dos diferentes genótipos e subgenótipos do HBV encontrados foi analisada na casuística geral e depois avaliada de acordo com o local de nascimento dos indivíduos: nascidos no Espírito Santo ou em outras regiões do Brasil. Foram analisadas a presença e a frequência de mutações nas regiões BCP e PC nos diferentes genótipos e subgenótipos do HBV. O nível de significância utilizado em todos os testes estatísticos foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

Os resultados foram analisados utilizando-se os programas estatísticos GraphPadPrism (Software Inc. San Diego, CA, versão 5.01), Minitab (Minitab Inc., versão 17.3.1) e SPSS (IBM SPSS® Statistics, versão 23.0). Quando indicadas, foram procedidas as seguintes análises dos resultados obtidos: média, mediana, desvio-padrão, Teste Exato de Fisher, Teste do Qui quadrado, Teste não paramétrico de Mann Whitney e Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Pagano; Gauvreau, 2004a; Pagano; Gauvreau, 2004).

---

---

## **4 RESULTADOS**

---

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 População do estudo

Entre julho de 2005 e julho de 2017, 617 indivíduos portadores de hepatite B crônica pelo HBV estavam matriculados no Serviço de Doenças Infecciosas do HUCAM. Entretanto, 30 foram excluídos, sendo 20 por dados epidemiológicos incompletos, 9 por estarem em acompanhamento há menos de 6 meses e 1 paciente com HBsAg negativo, caracterizando um quadro de hepatite B oculta.

As características demográficas, epidemiológicas, laboratoriais e clínicas estão resumidas na Tabela 1.

A média de idade entre os 587 indivíduos elegíveis para o estudo foi de  $49,1 \pm 13,9$  anos e mediana de 48 anos (Intervalo Interquartil [IIQ] 38 - 60), sendo 52,6% (309/587) do sexo masculino e 47,4% (278/587) do sexo feminino. Quanto à macrorregião de nascimento, daqueles nascidos no Estado do Espírito Santo, a maioria (47,7%; n=280) era natural da região metropolitana, seguida pela região Sul (11,2%; n=66), central (10,4%; n=61) e Norte (8,5%; n=50). Cento e trinta indivíduos (22,1%) não eram nativos do Espírito Santo: a maioria (11,9%; n=70/587) era natural da região Sudeste do Brasil, seguida pela região Nordeste (8,5%; n=50), Sul (1%; n=6) e Centro-Oeste (0,5%; n=3). Somente 1 (0,2%) dos indivíduos era estrangeiro, natural de Portugal.

A provável via de infecção pelo HBV não foi identificada em cerca de 1/3 dos indivíduos (33,2%; 195/587). Entre os casos em que essa informação era conhecida (66,8%; 392/587), na maioria, o componente familiar foi predominante, sendo 36,6% (n=215/587) associados à provável transmissão vertical e 19,6% (n=115/587) associados à transmissão intrafamiliar. A transmissão associada às vias sexual ou sanguínea foi observada em menor frequência (7% e 3,6%) dos casos respectivamente.



A progressão da hepatite B crônica foi avaliada em julho de 2017 na população dos 587 indivíduos incluídos no estudo. Em relação às características laboratoriais no momento da classificação da fase clínica da hepatite B crônica, observou-se que a maioria (92,5%; 543/587) era HBeAg negativo e somente 35 (6%) indivíduos apresentaram HBeAg positivo. As duas avaliações da ALT revelaram mediana de 24,0 U/L (IIQ 17 - 45) e 28,8 U/L (IIQ 22 - 51,7), enquanto apresentaram os níveis de HBV DNA mediana de 1.517 UI/mL (IIQ 144 - 10.034) ou 3,16 Log<sub>10</sub> (IIQ 2,16 - 4,0).

Quanto à progressão da hepatite B crônica nessa população, foi observado que predominaram as fases clínicas com HBeAg negativo, sendo 322 (54,9%) classificados na fase de portador inativo e 221 (37,6%) na fase hepatite crônica ativa HBeAg negativo. Entre os indivíduos que foram classificados nas fases clínicas associadas com presença do antígeno HBeAg, 15 (2,6%) estavam na fase imunotolerante e 20 (3,4%) estavam na fase de hepatite crônica ativa HBeAg positivo.

A coinfeção com HIV e/ou HCV foi infrequente, sendo observada em 35 (5,9%) indivíduos, sendo 23 (3,9%) coinfectados por HBV/HIV, 7 (1,2%) coinfectados por HBV/HCV e 5 (0,8%) apresentaram tripla infecção por HBV/HIV/HCV.

Durante a coorte, 38,2% (224/587) dos indivíduos iniciaram tratamento com média de 47,9 ( $\pm$ 39,6) meses de terapia antiviral. A mediana do HBV DNA pré-tratamento para aqueles que iniciaram tratamento era de 9.900 UI/mL (IIQ 4.096 - 138.947), enquanto que, para aqueles que ainda não haviam iniciado tratamento até julho de 2017, a mediana era de 419 UI/mL (IIQ 117 - 1.906).

**Tabela 1** - Características demográficas, epidemiológicas, laboratoriais e clínicas dos 587 indivíduos portadores crônicos do HBV em seguimento no HUCAM de janeiro de 2005 a julho de 2017

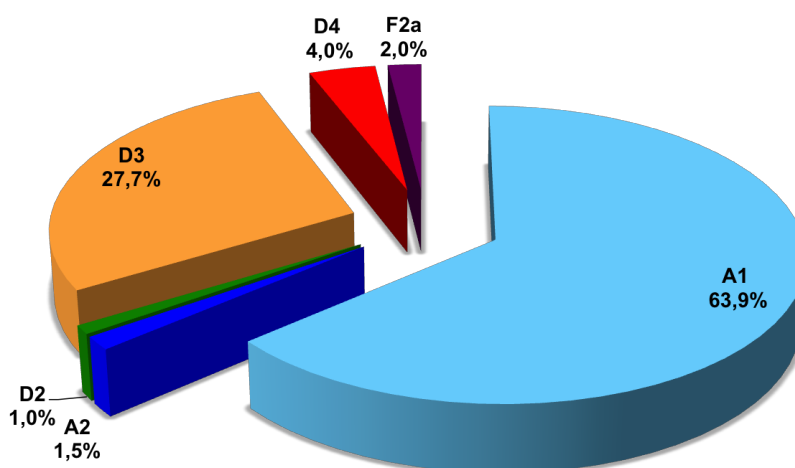
Variável	Total de indivíduos N= 587	%
Idade (anos)		
Média	49,1 ( $\pm$ 14,0)	
Mediana	48,0 (18-90)	
Sexo		
Masculino	309	52,6%
Feminino	278	47,4%
Região de Nascimento		
Metropolitana	280	47,7%
Norte	50	8,5%
Central	61	10,4%
Sul	66	11,2%
Outras	130	22,1%
Provável via de transmissão		
Vertical	215	36,6%
Intrafamiliar	115	19,6%
Sexual	41	7%
Sanguínea	21	3,6%
Desconhecida	195	33,2%
HBeAg na classificação clínica		
Negativo	552	94%
Positivo	35	6%
Fase clínica hepatite crônica		
Imunotolerante	15	2,6%
Hepatite ativa HBeAg +	20	3,4%
Portador inativo	322	54,9%
Hepatite ativa HBeAg -	221	37,6%
Não pode ser classificado	9	1,5%
ALT na classificação da fase clínica (U/L) (mediana)		
ALT 1	24,0	(17,0 - 45,0)
ALT 2	28,5	(22,0 - 51,7)
HBV DNA na classificação da fase clínica		
Mediana		
UI/mL	1.517	(IQ 144 - 10.034)
Log <sub>10</sub>	3,16	(IQ 2,15 - 4,00)
Coinfecção	35	6,0%
HBV/HIV	23	3,9%
HBV/HCV	7	1,2%
HBV/HIV/HCV	5	0,8%
Tratamento com antiviral		
Não	363	61,8%
Sim	224	38,2%
Tempo de antiviral (meses)		
Média	47,86 ( $\pm$ 39,6)	
Mediana	39,00	(IQ 17,2 - 64,0)
HBV DNA em uso antiviral		
Mediana		
UI/mL	9.900	(IQ 4.096 - 138.947)
Log <sub>10</sub>	3,99	(IQ 3,61 - 5,14)
HBV DNA sem uso de antiviral		
Mediana		
UI/mL	419	(IQ 117 - 1.906)
Log <sub>10</sub>	2,62	(IQ 2,06 - 3,28)

## 4.2 Caracterização dos genótipos e subgenótipos do HBV

Dentre os 587 indivíduos incluídos no estudo, 279 tinham amostra coletada disponível e com HBV DNA detectável, as quais foram submetidas aos procedimentos para a identificação do genótipo/subgenótipo do HBV.

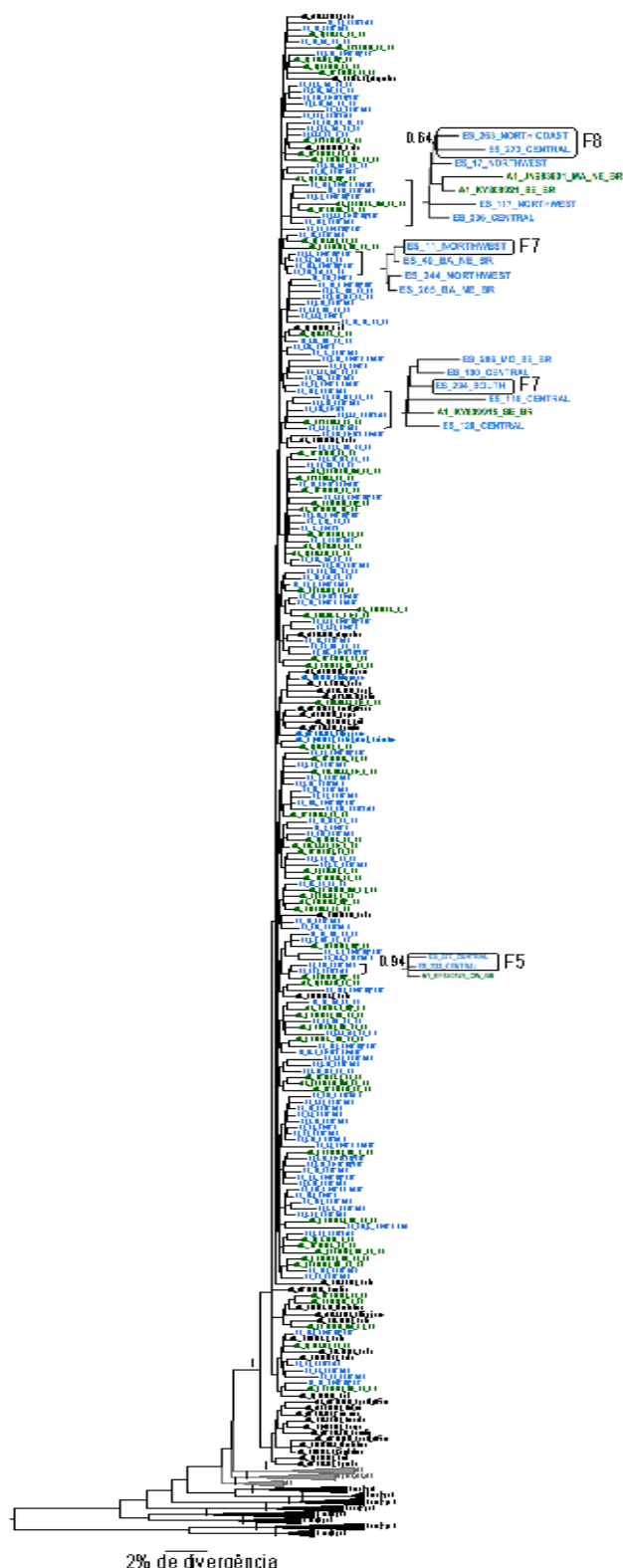
A amplificação e o sequenciamento da região S/Polimerase do genoma do HBV foram bem-sucedidos em 202 das 279 amostras analisadas, das quais foram obtidas sequências com qualidade adequada para a caracterização da variabilidade genética do vírus.

Entre os 202 indivíduos portadores crônicos do HBV, os genótipos A (subgenótipos A1 e A2), D (subgenótipos D2, D3 e D4) e F (subgenótipo F2a) foram encontrados (Figura 3). O genótipo A foi o mais frequente (65,3%;132/202), sendo 129 (63,9%) classificados como subgenótipo A1 e 3 (1,5%) como A2. O genótipo D foi identificado em 32,7% (66/202) dos casos, com predominância do subgenótipo D3 (27,7%; 56/202), seguido por D4 (4%; 8/202) e D2 (1%; 2/202). E, por fim, em 4 (2%) casos, foi identificado o genótipo F (subgenótipo F2a).



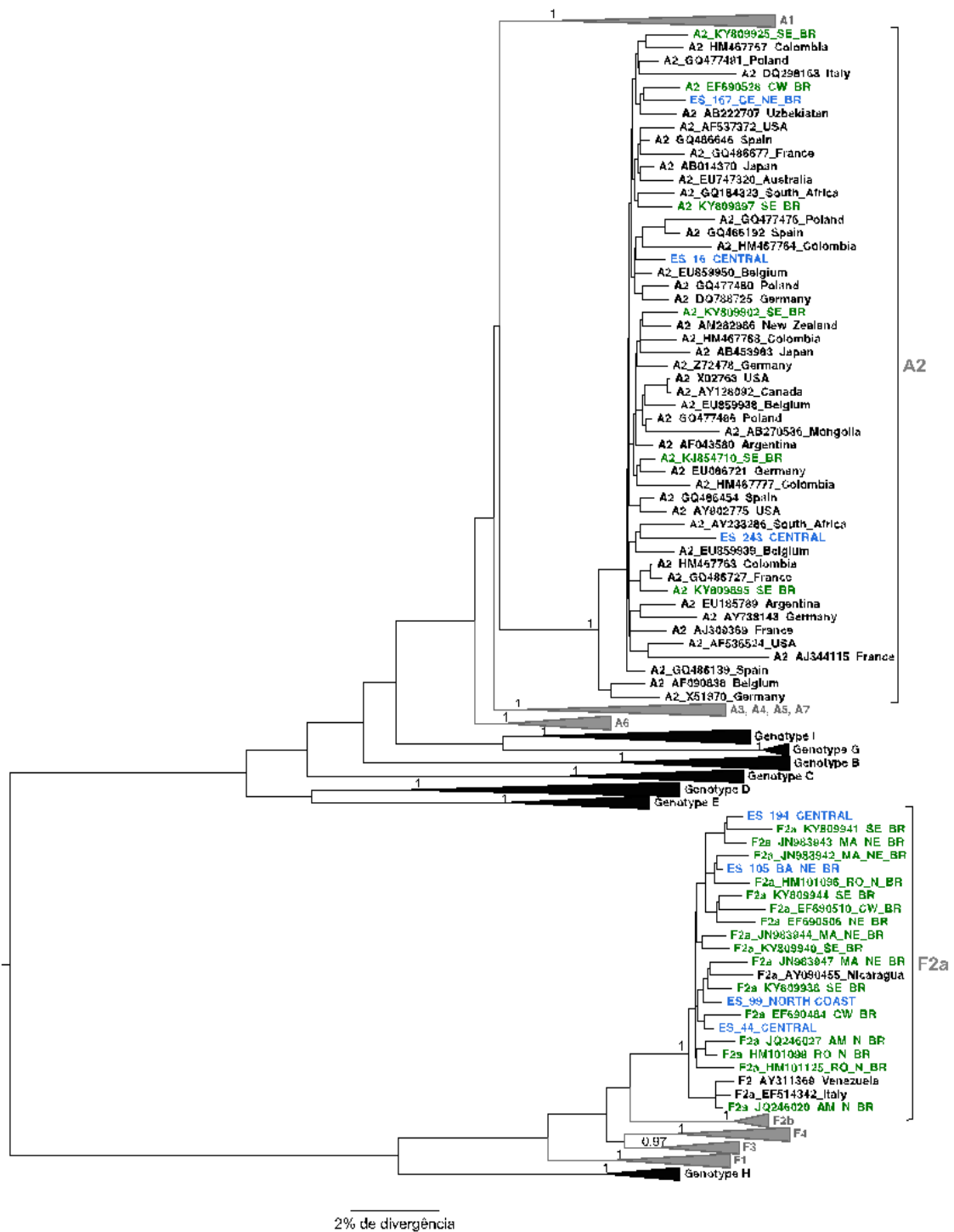
**Figura 3** - Distribuição dos subgenótipos, o HBV entre os 202 indivíduos portadores crônicos do HBV em seguimento no HUCAM de janeiro de 2005 a julho de 2017

A filogenia das sequências dos diferentes subgenótipos do HBV identificados no Espírito Santo (A1, A2, D2, D3, D4 e F2a) sugere que ocorreu a introdução de diferentes cepas desses subgenótipos no Estado, pois as sequências caracterizadas agruparam em diferentes *clusters* dentro do clado do respectivo genótipo, não há um agrupamento específico apenas com cepas do HBV isoladas no Estado do Espírito Santo (Figuras 4 a 7).

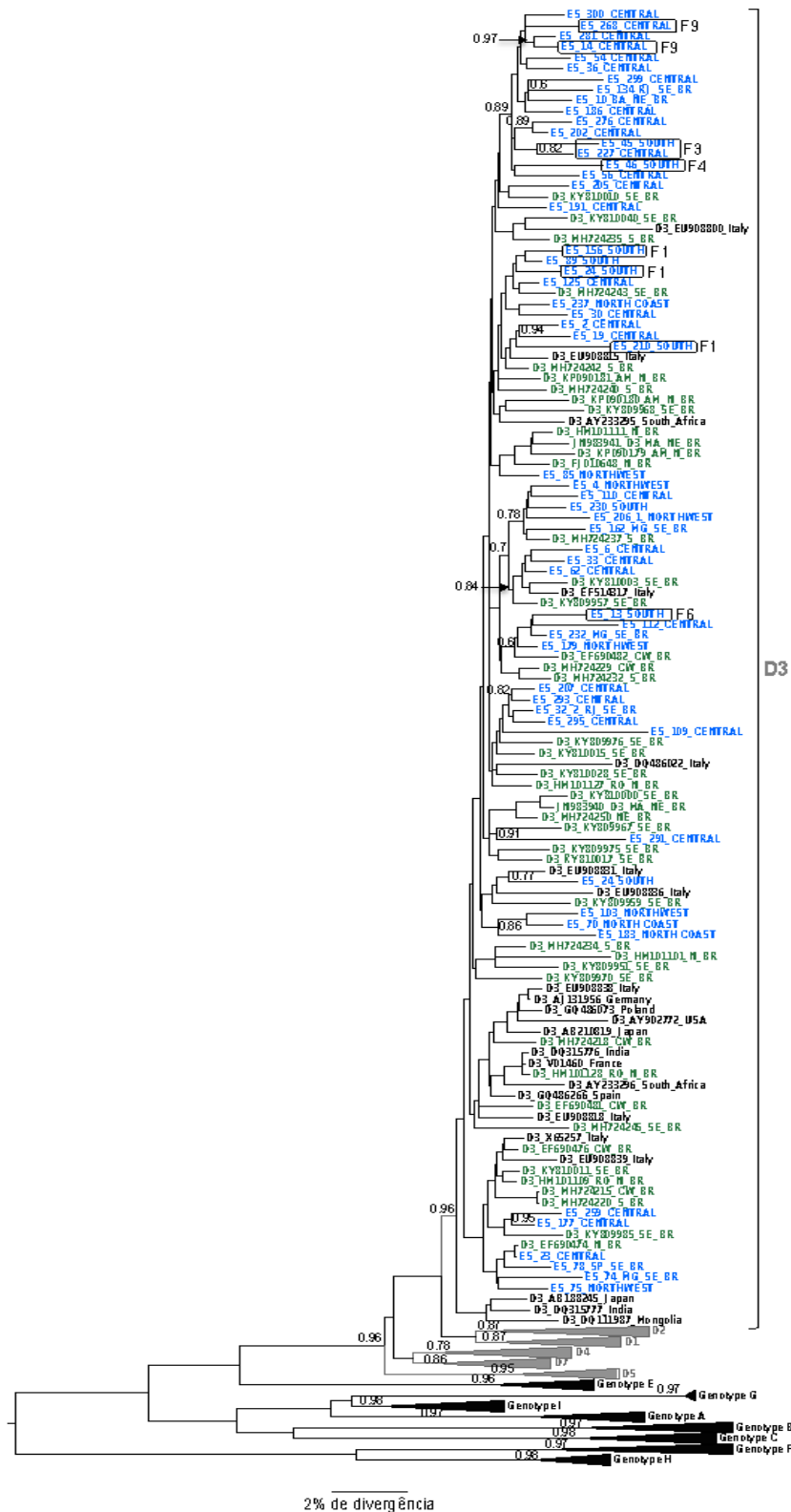


**Figura 4** - Árvore filogenética de seqüências de HBV subgenótipo A1 identificado entre portadores de hepatite B crônica procedentes do Estado do Espírito Santo (em azul). Seqüências do *GenBank* são apresentadas por seu genótipo/subgenótipo correspondente, seguido pelo número de acesso e pela origem geográfica, e seqüências isoladas de outros casos no Brasil

estão destacadas em verde. Os valores de probabilidade posterior são mostrados nos ramos principais. Os ramos contendo sequências isoladas de familiares estão destacados à direita da árvore, onde F2, F5 e F7 se referem às sequências HBV/A1 isoladas de membros das famílias 2, 5 e 7 respectivamente



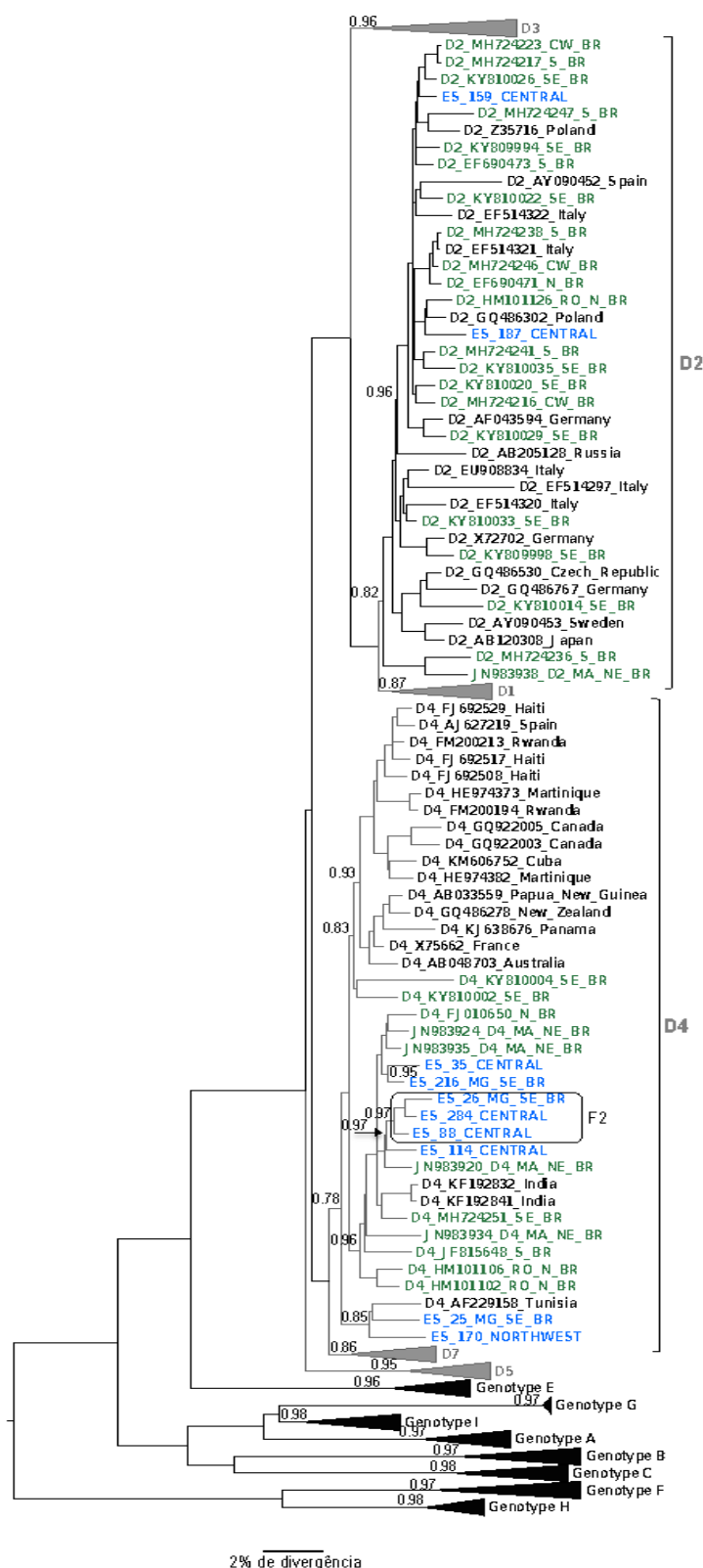
**Figura 5** - Árvore filogenética de sequências de HBV subgenótipos A2 e F2a identificados entre portadores de hepatite B crônica procedentes do Estado do Espírito Santo (em azul). Sequências do *GenBank* são apresentadas por seu genótipo/subgenótipo correspondente, seguido pelo número de acesso e pela origem geográfica, e sequências isoladas de outros casos no Brasil estão destacadas em verde. Os valores de probabilidade posterior são mostrados nos ramos principais



**Figura 6** - Árvore filogenética de sequências de HBV subgenótipo D3 identificado entre portadores de hepatite B crônica procedentes do Estado do Espírito Santo (em azul). Sequências da *GenBank* são apresentadas por seu genótipo/subgenótipo correspondente, seguido pelo número de acesso



e pela origem geográfica, e sequências isoladas de outros casos no Brasil estão destacadas em verde. Os valores de probabilidade posterior são mostrados nos ramos principais. As sequências isoladas de familiares estão destacadas, onde F1, F3, F4, F6 e F9 se referem às sequências HBV/D3 isoladas de membros das famílias 1, 3, 4, 6 e 9 respectivamente



**Figura 7 -** Árvore filogenética de sequências de HBV subgenótipos D2 e D4 identificados entre portadores de hepatite B crônica procedentes do Estado do Espírito Santo (em azul). Sequências do *GenBank* são apresentadas por seu genótipo/subgenótipo correspondente, seguido pelo

número de acesso e pela origem geográfica, e sequências isoladas de outros casos no Brasil estão destacadas em verde. Os valores de probabilidade posterior são mostrados nos ramos principais. As sequências isoladas de familiares estão destacadas, onde F2 se refere às sequências HBV/D4 isoladas de membros da família 2

### **4.3 Avaliação de correlação entre os genótipos/subgenótipos do HBV e características demográficas, epidemiológicas, laboratoriais e clínicas dos indivíduos com hepatite B crônica avaliados**

Na Tabela 2, são apresentados os resultados da distribuição dos subgenótipos do HBV de acordo com características demográficas, epidemiológicas, laboratoriais e clínicas dos 202 indivíduos, nos quais foi possível identificar o genótipo/subgenótipo do HBV. Nessa população, a média de idade era de 48,8 e mediana de 48 anos, sendo 55% (111/202) do sexo masculino e 45% (91/202) do sexo feminino. Quanto à macrorregião de nascimento no Estado do Espírito Santo, a maioria (47,5%; n=96) era natural da região metropolitana, seguida pela região central (12,9%; n=26), sul (9,4%; n=19) e Norte (6,4%; n=13). Quarenta e oito indivíduos (23,8%) não eram nativos do Espírito Santo.

A provável via de infecção pelo HBV foi identificada em 143 dos 202 (70,8%) indivíduos, predominando as vias vertical ou intrafamiliar em 61,3% (124/202) dos casos.

Em relação à presença do antígeno HBeAg, a maioria (93,1%; 188/202) apresentava HBeAg negativo e 14 (6,9%) indivíduos apresentavam HBeAg positivo. A coinfeção com HIV ou com HCV foi pouco frequente, 3 casos e 1 caso respectivamente. A progressão da hepatite B crônica foi avaliada entre 200 dos 202 indivíduos com genótipo do HBV caracterizado, e, entre estes, foram predominantes as fases clínicas com HBeAg negativo.

**Tabela 2** - Características demográficas, epidemiológicas, laboratoriais e clínicas dos 202 indivíduos portadores do HBV, acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017, cujo genótipo/subgenótipo viral foi caracterizado

Variável n(%)	Total N= 202 n (%)	Subgenótipo do HBV					
		A1 N= 129 n (%)	A2 N= 3 n (%)	D2 N= 2 n (%)	D3 N= 56 n (%)	D4 N= 8 n (%)	F2a N= 4 n (%)
<b>Idade (anos)</b>							
Média	48,8	48,8	52	35	53,5	47,5	36,7
Mediana	48	46,5	52	35	55	47,5	41,5
<b>Sexo n (%)</b>							
Masculino	111(55)	68 (52,7)	2 (66,7)	2 (100)	33 (59)	3 (37,5)	3 (75)
Feminino	91 (45)	61 (47,3)	1 (33,3)	0	23 (41)	5 (62,5)	1 (25)
<b>Provável via de transmissão</b>							
Vertical	71(35,1)	33 (25,6)	0 (0)	1 (50,0)	31 (55,3)	4 (50)	2 (50)
Intrafamiliar	53 (26,2)	36 (27,9)	2 (75,0)	0 (0)	11 (19,6)	3 (37,5)	1 (25)
Sexual	5 (2,5)	9 (7,0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,8)	0 (0)	0 (0)
Sanguínea	14 (6,9)	3 (3,1)	0 (0)	0 (0)	5 (8,9)	0 (0)	0 (0)
Desconhecida	59 (29,2)	47 (36,4)	1(25)	1(50)	8 (14,3)	1 (12,5)	1 (25)
<b>Macrorregião do ES</b>							
Metropolitana	96 (47,5)	53 (41,1)	2 (66,7)	2 (100)	33 (58,9)	4 (50)	2 (50)
Norte	13 (6,4)	11 (8,5)	0 (0)	0 (0)	1 (1,8)	1(12,5)	0 (0)
Central	27 (12,9)	19 (14,7)	0 (0)	0 (0)	7 (12,5)	0 (0)	1 (25)
Sul	19 (9,4)	11 (8,5)	0 (0)	0 (0)	8 (14,3)	0 (0)	0 (0)
Outras	47 (23,3)	35 (27,1)	1 (33,3)	0 (0)	7 (12,5)	3 (37,5)	1 (25)
<b>Status HBeAg</b>							
HBeAg -	188 (93,1)	121 (93,8)	3 (100)	1 (50,0)	52 (92,9)	7 (87,5)	4 (100)
HBeAg +	14 (6,9)	8 (6,2)	0 (0)	1 (50,0)	4 (7,1)	1 (12,5)	0 (0)
<b>Fase Clínica</b>							
Imunotolerante	8 (4)	7 (5,4)	0 (0)	0 (0)	1 (1,8)	0 (0)	0 (0)
Hepatite Ativa HBeAg+	8 (4)	3 (2,3)	0 (0)	1 (50)	3 (5,4)	1 (12,5)	0 (0)
Portador inativo	125 (61,9)	80 (62)	3 (100)	1 (50)	35 (62,5)	3 (37,5)	3 (75)
Hepatite ativa HBeAg-	59 (29,2)	37 (28,7)	0 (0)	0 (0)	17 (30,4)	4 (50)	1 (25)
Não classificado	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Coinfecção</b>							
HBV/HIV	3 (1,5)	2 (1,5)	0 (0)	0 (0)	1 (1,8)	0 (0)	0 (0)
HBV/HCV	1 (0,5%)	1 (0,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
HBV/HIV/HCV	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Tratamento antiviral</b>							
Não	129 (63,9)	86 (66,7)	3 (100)	1 (50)	32 (57,1)	4 (50)	3 (75)
Sim	73 (36,1)	43 (33,3)	0 (0)	1 (50)	24 (42,9)	4 (50)	1 (25)
<b>HBV DNA</b>							
Mediana UI/mL		1.023	1604	14.490	273	328	76
IIQ1-IIQ3		285-8.000	113-2.762	-	13-11474	133-2814	72-235

Análises estatísticas para a avaliação da correlação entre subgenótipo do HBV e as variáveis demográficas, epidemiológicas, clínicas e laboratoriais relacionadas na Tabela 2 foram conduzidas incluindo apenas aqueles infectados pelos subgenótipos mais frequentes, A1 e D3, os quais representaram 91,6% (185/202) da casuística de estudo. Na Tabela 3, são apresentados os resultados dessa análise, que demonstrou associação significativa entre o subgenótipo viral e as variáveis demográficas e epidemiológicas: provável via de transmissão e naturalidade dos indivíduos. A via de transmissão vertical apresentou associação com o subgenótipo A1 e a transmissão intrafamiliar com subgenótipo D3 ( $p=0.001$ ). A infecção pelo subgenótipo A1 foi mais frequente do que a infecção pelo subgenótipo D3 entre indivíduos nascidos fora do Estado do Espírito Santo ( $p=0,029$ ).

Não se observou correlação entre infecção pelo subgenótipo A1 ou D3 com idade, sexo, macrorregião de nascimento, coinfeção com HIV ou HCV, carga viral, início ou não de tratamento antiviral durante o estudo, perfil sorológico do HBeAg e fase clínica da hepatite B crônica (Tabela 3).

**Tabela 3** - Características demográficas, epidemiológicas, laboratoriais e clínicas dos 185 indivíduos portadores crônicos do HBV subgenótipo A1 ou D3 acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017

Variável	Total de genótipos N= 185 n (%)	Genótipo A1 N= 129 n (%)	Genótipo D3 N= 56 n (%)	valor-p
<b>Idade</b>				
Média (DP)	48,8 (±14,1)	48,9 (±14,2)	53,5 (±12,0)	
Mediana (IIQ)	48,0 (38-60)	46,5 (37-60)	55,0 (44,7-61,5)	
<b>Sexo</b>				
Masculino	101 (54,6)	68 (52,7)	33 (58,9)	0,43
Feminino	84 (45,4%)	61 (47,3)	23 (41,1)	
<b>Provável transmissão</b>				
Vertical	64 (34,6)	33 (25,6)	31 (55,4)	0,001
Intrafamiliar	47 (25,4)	36 (27,9)	11(19,6)	
Sexual	14 (7,6)	9 (7)	5 (8,9)	
Sanguínea	06 (3,2)	5 (3,9)	1(1,8)	
Desconhecida	54 (29,2)	46 (35,7)	8 (14,3)	
<b>Natural do ES</b>				
Não	42 (22,7)	35 (27,1)	7 (12,5)	0,029
Sim	143 (77,3)	94 (72,9)	49 (87,5)	
<b>Macrorregião</b>				
<b>Nascimento no ES</b>				
Metropolitana	87 (47,0)	54 (41,9)	33 (58,9)	0,087
Norte	15 (8,1)	14 (10,9)	01 (1,8)	
Central	23 (12,4)	16 (12,4)	07 (12,5)	
Sul	18 (9,7)	10 (7,8)	8 (14,3)	
Outros	42 (22,7)	35 (27,1)	7 (12,5)	
<b>Coinfecção HIV</b>				
Não	182 (98,4)	127 (98,4)	55 (98,2)	
Sim	3 (1,6)	2 (1,6)	1 (1,8)	
<b>Coinfecção HCV</b>				
Não	184 (99,5)	128 (99,2)	56 (100)	
Sim	1 (0,5)	1 (0,8)	0	
<b>Uso antiviral</b>				
Não	118 (63,8)	86 (66,7)	32 (57,1)	0,21
Sim	67 (36,2)	43 (33,3)	24 (42,9)	
<b>Status HBeAg</b>				
HBeAg-	173 (93,5)	121 (93,8)	52 (92,8)	0,81
HBeAg+	12 (6,5)	8 (6,2)	4 (7,1)	
<b>Forma clínica</b>				
Imunotolerante	6 (3,3)	5 (3,9)	1 (1,8)	0,45
Hepatite ativa HBeAg+	5 (2,7)	2 (1,6)	3 (5,4)	
Portador inativo	99 (54,1)	69 (54,3)	30 (53,6)	
Hepatite ativa HBeAg-	73 (39,4)	51 (40,2)	22 (39,3)	

#### 4.4 Frequência dos diferentes subgenótipos do HBV no Espírito Santo e em outros locais de nascimento

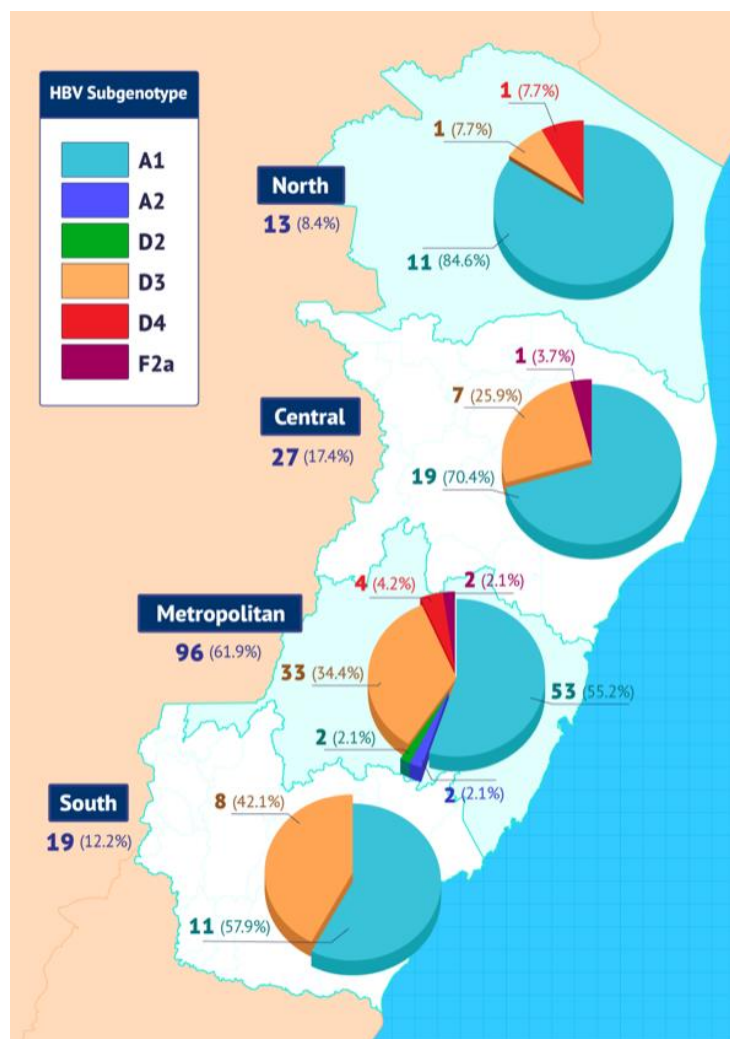
Para melhor entendimento em relação à introdução dos diferentes subgenótipos do HBV no Estado do ES, foi avaliada a frequência dos subgenótipos de acordo com o local de nascimento dos indivíduos do estudo, assim como o perfil de agrupamento das sequências na árvore filogenética.

As frequências dos subgenótipos do HBV foram similares tanto nos indivíduos nascidos no ES como em outras localidades (Tabela 2). Entretanto, apesar dos subgenótipos A1 e D3 predominarem nos dois grupos, a frequência do subgenótipo D3 foi maior (31,6%; 49/155) entre os indivíduos nascidos no ES; entre aqueles nascidos fora do Estado, a frequência de D3 foi de 14,6% (7/48), diferença que foi estatisticamente significativa, conforme apresentado no tópico anterior (Tabela 3).

Considerando os indivíduos naturais do Espírito Santo (n=155), 62% (96/155) eram da macrorregião metropolitana, 8,4% (13/155) naturais da macrorregião Norte, 17,4% (27/155) da macrorregião central e 12,2% (19/155) da macrorregião Sul do Estado. As frequências dos subgenótipos do HBV em cada uma dessas macrorregiões foram similares àquelas da população geral do estudo, com predomínio de A1 e D3, tendo, contudo, algumas particularidades: aumento progressivo das frequências no sentido Norte-Sul do Estado (7,7%; 25,9%; 34,4%; 42,1%) do subgenótipo D3 e, no sentido Sul-Norte do Estado, para o subgenótipo A1 (57,9%; 55,2%; 70,4%; 84,6%). Na região metropolitana, foram encontrados todos os subgenótipos (A1, A2, D2, D3, D4 e F2a) (Figura 8).

Nos resultados da análise filogenética, também não se observou, dentro dos diferentes agrupamentos de subgenótipos, a formação de *clusters* específicos apenas com cepas do HBV isoladas de indivíduos naturais da mesma macrorregião no ES (Figuras 4 a 7).





**Figura 8 -** Distribuição dos subgenótipos do HBV caracterizados no presente estudo por macrorregiões do Estado do ES

#### 4.5 Avaliação da transmissão intrafamiliar do HBV no Espírito Santo por análise filogenética das sequências

Entre os indivíduos inclusos no estudo, foram identificados 38 com algum grau de parentesco. Em 21 desses indivíduos, os quais eram pertencentes a 9 famílias, foi possível realizar a análise filogenética das sequências S/Pol do HBV para a avaliação de transmissão intrafamiliar. O Quadro 2 mostra a relação familiar entre esses indivíduos.

Isolados com estreitas relações filogenéticas foram encontrados em três famílias (F2, F3 e F5). Nesses casos, se observou alta similaridade entre as sequências, que formaram um grupo monofilético bem-suportado (valor de probabilidade posterior  $>0.8$ ). O subgenótipo D4 foi identificado entre os membros (mãe e filhos) da família 2, o HBV/D3 entre os membros (irmãos) da família 3 e o HBV/A1 entre membros (irmãos) da família 5 (Figuras 4, 6 e 7).

As sequências dos isolados dos membros da família 8 (mãe e filha) apresentaram um padrão de agrupamento monofilético, porém com pouco suporte (valor de probabilidade posterior a 0.64). Resultado similar foi observado na análise das sequências de HBV dos membros das famílias 1 (pai e filhos), 7 (pai e filha) e 9 (cônjuges). Todos os casos de cada respectiva família estavam infectados com o mesmo subgenótipo (HBV/A1: F7 e HBV/D3: F1 e F9), porém as sequências agruparam em diferentes *clusters* (Quadro 2).

Na família 4, cada cônjuge apresentava história familiar de hepatite B crônica, e foram, provavelmente, infectados antes do matrimônio por subgenótipos diferentes (HBV/A1 e HBV/D3), conforme Figuras 4 e 6.

Na família 6, apesar de irmãos, esses indivíduos apresentavam genótipos diferentes (HBV/A1 e HBV/D3), o que evidencia infecção por diferentes fontes (Figuras 4 e 6). Nesse caso, em especial, o irmão apresentava coinfecção por HBV/HIV, levantando a possibilidade de a infecção pelo HBV ter ocorrido pela via sexual.

**Quadro 2** - Casos com histórico de transmissão intrafamiliar cujo subgenótipo do HBV foi caracterizado: relação familiar e resultado da análise filogenética das sequências do HBV caracterizadas

Família	Membros	Grau parentesco	Provável via de transmissão na classificação clínica	Subgenótipo	Evidência de transmissão intrafamiliar com base na filogenia
F1	ES_156	Filho	Intrafamiliar	D3	Fraca As sequências agruparam separadas dentro do clado de D3
	ES_24	Pai	Vertical		
	ES_210	Filho	Vertical		
F2	ES_26	Mãe	Vertical	D4	Forte As sequências agruparam juntas e com valor de pp alto
	ES_284	Filha	Vertical		
	ES_88	Filho	Vertical		
F3	ES_45	Irmão	Vertical	D3	Forte As sequências agruparam juntas e com valor de pp alto
	ES_227	Irmã	Vertical		
F4	ES_28	Esposa	Sexual	A1	Ausente Genótipos diferentes
	ES_46	Marido	Desconhecida	D3	
F5	ES_277	Irmão	Vertical	A1	Forte As sequências agruparam juntas e com valor de pp alto
	ES_233	Irmã	Vertical		
F6	ES_13	Irmã	Vertical	D3	Ausente Genótipos diferentes
	ES_84	Irmão	Vertical	A1	
F7	ES_11	Pai	Desconhecida	A1	Fraca As sequências agruparam separadas dentro do clado de D3
	ES_294	Filha	Intrafamiliar		
F8	ES_263	Mãe	Intrafamiliar	A1	Média As sequências agruparam juntas, mas com valor de pp mais baixo
	ES_273	Filha	Desconhecida		
F9	ES_14	Esposa	Intrafamiliar	D3	Fraca As sequências agruparam separadas dentro do clado de D3
	ES_268	Marido	Sexual		

#### **4.6 Análise de mutações nas regiões genômicas do promotor basal do core (BCP) e pré-core (PC)**

De 202 amostras nas quais se caracterizou o genótipo/subgenótipo do HBV, em 116, foi possível amplificar e sequenciar as regiões pré-core (PC) e do promotor basal do core (BCP) para a pesquisa de mutações.

Na análise da variabilidade nas posições 1762 e 1764 (região BCP), foi observado que 69% das amostras apresentavam cepas do HBV com mutações nessas posições. A mutação G1764A foi observada com maior frequência (68%) do que a mutação A1762T (54%), e 52,7% das amostras apresentavam a associação A1762T + G1764A.

Não se observou associação entre a presença de mutações no BCP com o perfil sorológico do HBeAg; a frequência das mutações A1762T e G1764A isoladamente ou associadas foi similar nas amostras com HBeAg negativo e positivo. Da mesma forma, não se observou associação entre a presença dessas mutações com idade, formas de transmissão, formas clínicas da hepatite B crônica e níveis de HBV DNA. Por outro lado, se observou que essas mutações foram mais frequentes (73,5%) nas cepas genótipo A do que nas genótipo D (55,6%), mas sem significância estatística ( $p=0,08$ ). Quando essa avaliação foi feita considerando-se cada uma das mutações A1762T ou G1764A isoladamente ou associadas (A1762T + G1764A), observou-se que a frequência sempre foi maior no genótipo A, porém apenas a maior frequência da G1764A no genótipo A em relação ao D (73,5% vs 51,8%) apresentou significância estatística ( $p=0,03$ ). Resultados semelhantes foram observados quando se avaliou a frequência das mutações no BCP entre os subgenótipos A1, D3 e outros (A2, D2 e D4).

**Tabela 4 -** Frequência de mutações na região BCP e características clínicas, laboratoriais e virológicas dos indivíduos portadores do HBV acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017

Variável	Total	A1762T n=60	P value A1762T	G1764A n=75	P value G1764A	A1762T + G1764A n=58	P value A1762T + G1764A	A1762T e/ou G1764A n=76	P value A1762T e/ou G1764A	WT BCP n=34	P value WT BCP
<b>Idade (anos)</b>											
20 - 40	41 (36,9%)	22 (53,7%)	0,949	27 (67,5%)	0,908	21 (52,5%)	0,971	27 (67,5%)	0,785	13 (32,5%)	0,785
>40	70 (63,1%)	38 (54,3%)		48 (68,6%)		37 (52,8%)		49 (70%)		21 (30%)	
<b>HBsAg status</b>											
Negativo	97 (87,4%)	51 (52,3%)	0,407	66 (68%)	0,931	50 (51,5%)	0,496	67 (69%)	0,991	30 (30,9%)	0,991
Positivo	14 (12,6%)	9 (64,3%)		9 (69,2%)		8 (61,5%)		9 (69,2%)		4 (30,7%)	
<b>Genótipo</b>											
A	84 (75,7%)	48 (57%)	0,250	61 (73,5)	0,040	47 (56,6%)	0,151	61 (73,5%)	0,086	22 (26,5%)	0,086
D	27 (24,3%)	12 (44,4%)		14 (51,8%)		11 (40,7)		15 (55,6%)		12 (44,4%)	
<b>Subgenótipo</b>											
A1	82 (73,9%)	47 (57,3%)	0,497	60 (74%)	<b>0,034</b>	46 (56,8%)	0,360	60 (74%)	0,080	21 (25,9%)	0,080
D3	24 (21,6%)	11 (45,8%)		11 (45,8)		10 (41,7%)		12 (50%)		12 (50%)	
Outros	5 (4,5%)	2 (40%)		4 (80%)		2 (40%)		4 (80%)		1 (20%)	
<b>HBV DNA (IU/mL)</b>											
até 2000 UI	50 (43,9%)	25 (53,2%)	0,981	32 (68,1%)	0,398	24 (51%)	0,933	33 (70,2%)	0,395	14 (29,8%)	0,395
de 2001 a 10000 UI	27 (23,7%)	15 (55,6%)		21 (77,8%)		15 (55,6%)		21 (77,8%)		6 (22,2%)	
maior que 10000 UI	37 (32,4%)	19 (54,3%)		21 (61,8%)		18 (52,9%)		21 (61,8%)		13 (38,2%)	
<b>Classificação Clínica</b>											
Imunotolerante	7 (6,3%)	4 (57,1%)	0,708	4 (57,1%)	0,671	4 (57,1%)	0,850	4 (57,1%)	0,617	3 (42,9%)	0,609
Hepatite ativa HBsAg+	7 (6,3%)	5 (71,4%)		5 (83,3%)		4 (66,7%)		5 (83,3%)		1 (16,7%)	
Hepatite ativa HBsAg-	39 (35%)	19 (48,7%)		25 (64%)		19 (48,7%)		25 (64,1%)		14 (35,9%)	
Portador inativo	58 (52,3%)	32 (55,2%)		41 (70,7%)		31 (53,4%)		42 (72,4%)		16 (27,6%)	
<b>Formas de transmissão</b>											
Intrafamiliar	68 (61,3%)	36 (52,9%)	0,767	45 (67,2%)	0,775	34 (50,7%)	0,603	46 (68,7%)	0,902	21 (31,3%)	0,902
Outras	43 (38,7%)	24 (55,8%)		30 (69,7%)		24 (55,8%)		30 (69,8%)		13 (30,2%)	

Na análise da variabilidade nas posições 1896 e 1899 da região PC, foi observado que 24% das amostras apresentavam cepas do HBV com mutações nessas posições. A mutação G1899A foi observada com maior frequência (17,2%) do que a mutação G1896A (16,4%), e 9,5% das amostras apresentavam a associação G1896A + G1899A (Tabela 5).

Não se observou associação entre a presença de cepas com mutações na região PC com o perfil sorológico do HBeAg. A frequência de cepas com as mutações G1896A e G1899A isoladamente ou associadas foi similar nos casos com HBeAg negativo e positivo. Da mesma forma, não se observou a associação entre a presença de cepas com essas mutações e as vias de transmissão ou as formas clínicas da hepatite B crônica.

Mutações na região PC foram mais frequentes (75,8%) nas cepas genótipo D do que nas genótipo A (6,9%). Essa diferença apresentou significância estatística ( $p < 0,001$ ), resultado que se manteve mesmo quando essa avaliação foi feita considerando-se cada uma das mutações G1896A ou G1899A isoladamente ou associadas (G1896A + G1899A). Resultados semelhantes foram observados quando se avaliou a frequência das mutações na região PC entre os subgenótipos A1, D3 e outros (A2, D2 e D4), com valor de  $p < 0,001$  (Tabela 5).

Na análise da base presente na posição 1858, que faz pareamento com a base 1896 no genoma do HBV, observou-se que 95,3% ( $n=81/85$ ) das cepas genótipo A apresentavam um C e, em todos esses casos, a mutação G1896A estava ausente. Quatro amostras (4,7%) HBV/A1 apresentaram um T na posição 1858, e, em uma delas, a mutação G1896A estava presente. Todas as amostras genótipo D ( $n=29$ ; D3=24, D2=2 e D4=3) apresentavam um T na posição 1858. Entre essas, a mutação G1896A foi observada em 62% ( $n=18/29$ ) dos casos; 58,3% ( $n=14/24$ ) nos HBV/D3, em todos os HBV/D2 ( $n=2/2$ ) e em 66,7% ( $n=2/3$ ) dos HBV/D4 (Tabela 5).

Valores intermediários de HBV DNA (2.000 UI/mL e 10.000 UI/mL) apresentaram associação estatisticamente significativa com a presença da

mutação G1896A ( $p=0,04$ ) isolada ou em associação com a mutação G1899A ( $p=0,01$ ). A presença da mutação G1899 isoladamente não apresentou associação com nenhum valor de carga viral ( $p=0,06$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5 -** Frequência de mutações na região PC e características clínicas, laboratoriais e virológicas dos indivíduos portadores do HBV acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017

Variável	Total	G1896A		G1899A		G1896A + G1899A		G1896A + G1899A		WT PC	P value WT PC
		n=19	P value G1896A	n=20	P value G1899A	n=11	P value G1896A + G1899A	n=28	P value G1896A e/ou G1899A		
<b>Idade (anos)</b>	<b>n=116</b>	<b>16,40%</b>		<b>17,20%</b>		<b>9,50%</b>		<b>24%</b>		<b>75,90%</b>	
20 - 40	n=116	19		20		11		28		88	
		43 (37%)	0,279	6 (13,9%)	0,466	3 (7%)	0,471	8 (18,6%)	0,279	35 (81,4%)	0,279
>40		73 (63%)		14 (19,2%)		8 (11%)		20 (27,4%)		53 (72,6%)	
<b>HBsAg status</b>	<b>n=116</b>										
Negativo	101 (87,1%)	17 (16,8%)	1,000	19 (18,8%)	0,462	10 (9,9%)	1,000	26 (25,7%)	0,517	75 (74,3%)	0,517
Positivo	15 (12,9%)	2 (13,3%)		1 (6,7%)		1 (6,7%)		2 (13,3%)		13 (86,7%)	
<b>Genótipo</b>	<b>n=116</b>										
A	87 (75%)	1 (1,1%)	< 0,001	5 (5,7%)	< 0,001	0	< 0,001	6 (6,9%)	< 0,001	81 (93,1%)	< 0,001
D	29 (25%)	18 (62%)		15 (51,6%)		11 (37,9%)		22 (75,8%)		7 (24,1%)	
<b>Subgenótipo</b>	<b>n=116</b>										
A1	85 (73,3%)	1 (1,2%)	< 0,001	5 (5,9%)	< 0,001	0	não determinado	6 (7%)	< 0,001	79 (92,9%)	< 0,001
D3	24 (20,7%)	14 (58,3%)		15 (58,3%)		10 (41,7%)		18 (75%)		6 (25%)	
Outros	7 (6%)	4 (57,1%)		1 (14,3%)		1 (14,3%)		4 (57,1%)		3 (42,9%)	
<b>HBV DNA (IU/mL)</b>	<b>n=114</b>										
até 2000 UI	50 (43,9%)	4 (8%)	0,046	6 (12%)	0,063	1 (2%)	0,014	9 (18%)	0,089	41 (82%)	0,089
de 2001 a 10000 UI	27 (23,7%)	8 (29,6%)		9 (33,3%)		6 (22,2%)		11 (40,7%)		16 (59,3%)	
maior que 10000 UI	37 (32,4%)	7 (18,9%)		5 (13,5%)		4 (10,8%)		8 (21,6%)		29 (78,4%)	
<b>Classificação Clínica</b>	<b>n=116</b>										
Imunotolerante	7 (6%)	0	0,243	0	0,377	0	não determinado	0	0,256	7 (100%)	0,256
Hepatite ativa HBsAg+	8 (6,9%)	2 (25%)		1 (12,5%)		1 (12,5%)		2 (25%)		6 (75%)	
Hepatite ativa HBsAg-	41 (35,3%)	9 (21,9%)		7 (17%)		5 (12,2%)		11 (26,8%)		30 (73,2%)	
Portador inativo	60 (51,7%)	8 (13,3%)		12 (20%)		5 (8,3%)		15 (25%)		45 (75%)	
<b>Formas de transmissão</b>	<b>n=116</b>										
Intrafamiliar	70 (60,3%)	14 (20%)	0,184	13 (18,6%)	0,638	8 (11,4%)	0,367	19 (27%)	0,346	51 (72,9%)	0,346
Outras	46 (39,7%)	5 (10,9%)		7 (15,2%)		3 (6,5%)		9 (19,6%)		37 (80,4%)	



A associação de mutações nas regiões BCP (posições 1762 e 1764) e PC (posições 1896 e 1899) também foi analisada, a qual foi observada em 16,4% das amostras com mutações nessas posições. Cepas com mutações somente na região BCP (A1762T e/ou G1764A) foram observadas com maior frequência (52,7%) do que aquelas que apresentavam mutações somente na região PC (G1896A e/ou G1899A), presentes em apenas 8% das amostras analisadas (Tabela 6).

Não se observou associação entre a presença de mutações nas regiões BCP + PC (A1762T e/ou G1764A + G1896 e/ou G1899A) com o perfil sorológico do HBeAg. A frequência dessas mutações isoladamente ou associadas foi similar nas amostras com HBeAg negativo e positivo. Da mesma forma, não se observou associação com demais variáveis analisadas.

Mutações nas regiões BCP + PC foram mais frequentes (48,1%) nas cepas genótipo D do que nas genótipo A (6,0%), com significância estatística ( $p < 0,001$ ). Quando essa avaliação foi feita considerando-se os casos que apresentavam somente as mutações A1762T e/ou G1764A (BCP), observou-se que a frequência foi maior no genótipo A (67,5%) em relação ao genótipo D (7,4%), com significância estatística ( $p < 0,001$ ), e, quando essa avaliação foi feita considerando-se as amostras com mutações apenas nas posições G1896A e G1899A (PC), observou-se que a frequência foi maior no genótipo D (29,6%) do que no genótipo A (1,2%), com significância estatística ( $p < 0,001$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6 -** Frequência de mutações na região BCP + PC e características clínicas, laboratoriais e virológicas dos indivíduos portadores do HBV acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017

Variável	Total	WT BCP+ WT PC n=25		P value WT BCP+ WT PC		Mutação BCP (A1762T e/ou G1764A) + PC (G1896A e/ou G1899A) n=18		P value Mutação BCP (A1762T e/ou G1764A) + PC (G1896A e/ou G1899A)		Somente mutação no BCP n=58		P value Somente mutação no BCP		Somente no PC n=9		P value Somente mutação no PC	
		n=110	22,70%	18	16,40%	58	52,70%	9	8%								
<b>Idade (anos)</b>																	
20 - 40	40 (36,4%)	10 (25%)	0,669	5 (12,5%)	0,400	22 (55%)	0,718	3 (7,5%)	0,843								
>40	70 (63,6%)	15 (21,4%)		13 (18,6%)		36 (51,4%)		9 (8,2%)									
<b>HBsAg status</b>																	
Negativo	97 (88,2%)	21 (21,6%)	0,487	16 (16,5%)	1,000	51 (52,6%)	0,931	9 (9,3%)	0,595								
Positivo	13 (11,8%)	4 (30,8%)		2 (15,4%)		7 (53,8%)		0,000									
<b>Genótipo</b>																	
A	83 (75,5%)	21 (25,3%)	0,242	5 (6%)	< 0,001	56 (67,5%)	< 0,001	1 (1,2%)	< 0,001								
D	27 (24,5%)	4 (14,8%)		13 (48,1%)		2 (7,4%)		8 (29,6%)									
<b>Subgenótipo</b>																	
A1	81 (73,6%)	20 (24,7%)	0,692	5 (6,2%)	não determinado	55 (67,9%)	< 0,001	1 (1,2%)	não determinado								
D3	24 (21,8%)	4 (16,7%)		10 (41,7%)		2 (8,3%)		8 (33,3%)									
Outros	5 (4,5%)	1 (20%)		3 (60%)		1 (20%)		0									
<b>HBV DNA (IU/mL)</b>																	
até 2000 UI	47 (43,5%)	13 (27,6%)	<b>0,010</b>	7 (14,9%)	0,683	26 (55,3%)	0,722	1 (2,2%)	<b>0,047</b>								
de 2001 a 10000 UI	27 (25%)	1 (3,7%)		6 (22,2%)		15 (55,6%)		5 (18,5%)									
maior que 10000 UI	34 (31,5%)	10 (29,4%)		5 (14,7%)		16 (47)		3 (8,8%)									
<b>Classificação Clínica</b>																	
Imunotolerante	7 (6,4%)	3 (42,9%)	0,533	0	não determinado	4 (57,1%)	0,927	0	não determinado								
Hepatite ativa HBsAg+	6 (5,5%)	1 (16,7%)		0		3 (50%)		2 (33,3%)									
Hepatite ativa HBsAg-	39 (35,5%)	10 (25,6%)		4 (10,3%)		19 (48,7%)		6 (15,4%)									
Portador inativo	58 (52,7%)	11 (19%)		5 (8,6%)		32 (55,2%)		10 (17,2%)									
<b>Formas de transmissão</b>																	
Intrafamiliar	67 (60,9%)	14 (20,9%)	0,569	11 (16,4%)	0,985	35 (52,2%)	0,898	7 (10,4%)	0,262								
Outras	43 (39,1%)	11 (25,6%)		7 (16,3%)		23 (53,5%)		2 (2,6%)									

A presença de mutações com relevância clínica em outras posições da região PC (1814-1816: códon de indicação para síntese do HBeAg, 1862 e 1888) foi avaliada. A frequência de amostras com mutações nas posições 1814-1816 foi de 19% (n=22/116), já a mutação G1862T foi observada em 71,5% (n=83/116) das amostras, e a mutação G1888A, C ou T em 43,1% (Tabela 7). Esta última foi associada com idade entre 20-40 anos (p=0,03).

As mutações G1862T e G1888A, C ou T foram mais frequentes nas cepas genótipo A (94,2% e 57,3%) do que nas genótipo D (3,4% vs 0%), resultado que apresentou significância estatística (p<0,001). Resultados semelhantes foram observados quando se avaliou a frequência dessas mutações entre os subgenótipos A1, D3 e outros (A2, D2 e D4).

Em relação à associação das mutações nas posições 1814-1816, 1862 e 1888 da região PC com as formas clínicas da hepatite B, se observou que a presença de cepas com mutação nas posições 1814-1816 foram frequentes nos casos com formas clínicas HBeAg negativo (p=0,03), sendo mais frequentes entre os portadores inativos (26,7%) seguidos pelos casos com hepatite ativa HBeAg negativo (14,6%) (Tabela 7).

**Tabela 7 - Análise da presença e características clínicas das amostras com outras mutações dos indivíduos portadores HBV acompanhados no HUCAM, entre janeiro de 2005 a julho de 2017**

Variável	Total	1814-1816		P value 1814-1816	G1862T n=83	P value G1862T	G1888A, C ou T n=50	P value G1888A, C ou T
		Qualquer alteração no start codon n=22	19,0%					
<b>Idade (anos)</b>								
20 - 40	43 (37%)	9 (20,9%)	0,680	34 (79%)	0,162	24 (55,8%)	<b>0,034</b>	
>40	73 (63%)	13 (17,8%)		49 (67%)		26 (35,6%)		
<b>HBsAg status</b>								
Negativo	101 (87,1%)	22 (21,8%)	0,070	74 (73,3%)	0,358	43 (42,6%)	0,766	
Positivo	15 (12,9%)	0		9 (60%)		7 (46,7%)		
<b>Genótipo</b>								
A	87 (75%)	19 (21,4%)	0,150	82 (94,2%)	< 0,001	50 (57,3%)	< 0,001	
D	29 (25%)	3 (10,3%)		1 (3,4%)		0		
<b>Subgenótipo</b>								
A1	85 (73,3%)	19 (22,3%)	0,118	82 (96,5%)	< 0,001	50 (58,8%)	< 0,001	
D3	24 (20,7%)	3 (12,5%)		1 (4,2%)		0		
Outros	7 (6%)	0		0		0		
<b>HBV DNA (IU/mL)</b>								
até 2000 UI	50 (43,9%)	13 (26%)	0,078	39 (78%)	0,342	26 (52%)	0,165	
de 2001 a 10000 UI	27 (23,7%)	6 (22,2%)		18 (66,7%)		9 (33,3%)		
maior que 10000 UI	37 (32,4%)	3 (8,1%)	0,078	24 (64,9%)		13 (35,1%)		
<b>Classificação Clínica</b>								
Imunotolerante	7 (6%)	0	0,030	6 (85,7%)	0,117	4 (57,1%)	0,639	
Hepatite ativa HBsAg+	8 (6,9%)	0		3 (37,5%)		3 (37,5%)		
Hepatite ativa HBsAg-	41 (35,3%)	6 (14,6%)		30 (73,2%)		15 (36,6%)		
Portador inativo	60 (51,7%)	16 (26,7%)		44 (73,3%)		28 (46,7%)		
<b>Formas de transmissão</b>								
Intrafamiliar	70 (60,3%)	14 (20%)	0,725	46 (65,7%)	0,081	27 (38,6%)	0,224	
Outras	46 (39,7%)	8 (17,4%)		37 (80,4%)		23 (50%)		

---

---

## 5 DISCUSSÃO

---

---

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo descreveu características clínicas, epidemiológicas e virológicas da hepatite B crônica numa população de 587 indivíduos acompanhados por longo período no ambulatório de hepatites virais do Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Espírito Santo. A maior parte dos indivíduos apresentava formas clínicas HBeAg negativo ativas e inativas da hepatite B crônica, e os genótipos do HBV identificados nessa população foram A, D e F, sendo o HBV/A o mais frequente, seguido pelo HBV/D.

Até o momento, este é o maior e mais longo estudo de coorte observacional no Brasil. A mediana de idade foi de 48 anos, com leve predomínio de sexo masculino e nascidos na região metropolitana de Vitória, capital do Estado do ES. Estes resultados refletem a urbanização da população brasileira pelo IBGE, com 84% morando fora das zonas rurais [Censo 2010, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)].

No Brasil, com sua diversidade étnica, econômica e regional, a infecção pelo HBV também tem distribuição muito heterogênea com tendência de elevação no sentido Sul-Norte, com baixa prevalência nos Estados do Sul e uma das maiores do mundo na região amazônica. Entretanto, esse padrão também não é generalizado. Revisão recente sobre a situação epidemiológica da infecção pelo vírus da hepatite B demonstra que o Brasil apresenta prevalência geral baixa de 0,5%, com algumas áreas de média e alta prevalência de HBsAg, como região amazônica, ES e Oeste do Paraná (Souto, 2016). O Brasil, reconhecendo estas diferenças regionais, implementou precocemente a vacina contra a hepatite B nestas regiões. Inicialmente no Acre e Amazonas em 1989, e Espírito Santo e Paraná em 1993 (Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Programa Nacional de Imunização: PNI 25 anos: Brasília, MS, 1998).

Foi possível identificar a provável via de transmissão em 66,8% dos indivíduos do estudo. Na maioria dos estudos populacionais, o desconhecimento da provável via de transmissão predomina, e, quando identificada, a via sexual tem sido a mais frequente no Brasil (Souto, 2016). Ao contrário, nosso estudo não só apresentou taxa bem menor de desconhecimento da provável via de transmissão, como entre os pacientes nos quais foi possível identificar a provável via de transmissão, a mais frequente foi a via vertical e intrafamiliar, e não a via sexual. Fatores que possibilitaram maior identificação da provável via de transmissão no nosso estudo estão relacionados à investigação epidemiológica detalhada nas consultas médicas do caso-índice, incluindo aspectos clínicos, sociais, familiares e investigação epidemiológica laboratorial de membros da família como parte da rotina no nosso serviço. Desta forma, nosso estudo sugere forte papel da transmissão familiar da hepatite B no Estado do Espírito Santo como mecanismo mantenedor da prevalência média/alta descrita anteriormente. Esse fator familiar pode estar associado à forte imigração de europeus, incluindo a Itália no final do século XIX e início do século XX, que historicamente era considerada região de prevalência média/alta pelo forte componente familiar de transmissão do HBV (Trivello, 1982; Stroffolini, 2005). Da mesma forma, estudos em países árabes, como Irã e Egito (Ragheb, 2012; Sali, 2019), reforçam o papel da transmissão intrafamiliar do genótipo D, tanto pela presença da mãe como do pai infectado pelo HBV. No Brasil, estudos prévios em algumas regiões e cidades da região Sudeste e Sul encontraram associação entre hepatite B crônica e transmissão intrafamiliar em algumas populações (descendentes italianos) de indivíduos (Bertolini, 2012; Gusatti, 2015; Chachá, 2017; Pereira, 2017; Paoli, 2018). O Estado do ES apresenta forte densidade de imigrantes europeus, notadamente italianos, nos quais predomina o genótipo D, assentados no vale do Canaã na segunda metade do século XIX (Saletto, 2000). Nossos resultados parecem demonstrar a longevidade da infecção e a sustentabilidade da transmissão do HBV principalmente nos indivíduos

nascidos antes de 1993, quando foi instituída a vacinação contra a infecção pelo HBV no ES ao nascimento (Fonseca, 2010).

A frequência da coinfeção com o HIV varia de acordo com a área geográfica e os fatores de risco da população estudada. Frequência menor que no nosso estudo (3,9% vs 2,5%) foi descrita em área geográfica de baixa prevalência (Freitas et al., 2014). Por outro lado, frequências maiores (5,7% e 8,5%) foram descritas em populações especiais de usuários de drogas endovenosas (Mendes-Corrêa, 2000) e população carcerária (Souza, 2004), reforçando a influência dessas características na epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite B.

No Brasil, estudos avaliando as fases clínicas da hepatite B crônica são escassos. Nosso estudo, até o momento, é a maior coorte de seguimento por longo tempo (>10 anos) de indivíduos portadores de hepatite B crônica em um único centro. Nossos achados encontraram 92,5% de indivíduos com formas HBeAg negativo, sendo 54,9% de portadores inativos e 37,6% de hepatite ativa HBeAg negativo.

Dois estudos de coorte brasileiros encontraram predomínio de hepatite B crônica nas fases HBeAg negativo, tanto com fenótipo de portador inativo (46,9% e 40,9%) como com o de hepatite crônica ativa HBeAg negativo (23,3% e 33,2%) (Galizzi et al., 2010; Cunha-Silva et al., 2017). A diferença entre nossos resultados e estes estudos pode estar associada às características sociais e epidemiológicas dos indivíduos (idade e fator de risco para transmissão), do HBV (genótipo) e tamanho da amostra. O primeiro estudo avaliou coortes (média de 722 indivíduos/região geográfica analisada) em centros de referência em hepatite B nas cinco grandes regiões do país. O segundo estudo, apesar de longo e de um único centro de pesquisa como o nosso, tinha uma amostra 60% menor (247 indivíduos).

Os genótipos do HBV podem ser responsáveis por diferenças na história natural da hepatite B crônica. Estudo avaliando desfechos clínicos associados aos diferentes genótipos do HBV demonstrou taxas



diferenciadas de soroconversão do HBeAg para anti-HBe descritas como sendo mais precoce em indivíduos portadores de HBV genótipos A, B, D ou F do que em indivíduos com genótipo C (Kramvis, 2014).

Coorte de oito anos de seguimento de indivíduos nativos do Alasca portadores inativos da hepatite B evidenciou evolução para hepatite ativa HBeAg negativo em 26% dos indivíduos, e este desfecho foi menos frequente nos indivíduos portadores dos genótipos D2 ou D3 comparados com os outros genótipos A2, B6, C2 ou F1. Os autores sugerem que possa haver menor taxa de progressão da doença associada ao HBV genótipo D (McMahon et al., 2014). Nosso estudo, entretanto, não evidenciou diferença significativa entre os dois subgenótipos mais frequentes (HBV/A1 e HBV/D3) e as fases clínicas da hepatite B crônica.

Estudo chinês com 8.439 indivíduos com HBV evidenciou que, entre as formas ativas da doença, 18,2% dos indivíduos apresentavam hepatite crônica ativa HBeAg+ (Chen et al., 2013). No nosso estudo, essa frequência foi bem menor (3,4%). Apesar do forte componente familiar para a transmissão da infecção pelo HBV nesse estudo e no nosso, essa diferença pode estar associada à menor soroconversão HBeAg+/- dos genótipos B e C no estudo asiático, contrapondo-se ao nosso, em que predominaram os genótipos A e D.

O HBV tem infectado humanos há milênios, entretanto, há pouco conhecimento detalhado de como a doença se espalhou nas populações e regiões geográficas no passado (Kostaki et al., 2018).

A avaliação dos genótipos do HBV circulantes no ES foi anteriormente descrita como parte de amostras de indivíduos com hepatite B crônica de vários Estados brasileiros. Mesmo representada por um pequeno número de 21 amostras no estudo, evidenciou predomínio do genótipo A, porém, não incluiu avaliação dos subgenótipos, podendo, desta forma, ter sido pouco representativa (Lampe et al., 2017).

A análise filogenética das 202 amostras de indivíduos com hepatite B crônica evidenciou predomínio do genótipo A, principalmente subgenótipo

A1, seguido pelo D (maior prevalência de D3) e pequeno número de indivíduos com genótipo F (F2a). A esse respeito, este é o maior estudo de prevalência e distribuição dos genótipos do vírus da hepatite B conduzido em um único centro no Brasil.

Apesar dos genótipos A e D apresentarem distribuição global, o subgenótipo A1, endêmico na África Ocidental, parece ter sido introduzido no Brasil pelo tráfico de escravos africanos; o subgenótipo HBV/D3, frequente no mediterrâneo e Oriente Médio, parece ter sido introduzido no Brasil pela imigração europeia, e o subgenótipo HBV/F2a parece estar relacionado à população nativa indígena (Barros, 2014; Lago, 2014).

No Brasil, vários estudos em diferentes regiões e populações demonstraram predomínio do subgenótipo HBV/A1 (Tonetto et al., 2009; Bertolini et al., 2012; Moura et al., 2012; Nabuco et al., 2012; Barros et al., 2014; Crispim et al., 2014). Além disso, estudo avaliando genótipos em 1.000 amostras de portadores de hepatite B crônica de 24 Estados brasileiros também confirmou a circulação preponderante dos genótipos A, D e F (Lampe et al., 2017).

No nosso estudo, predominou o HBV/A1, seguido pelo subgenótipo D3 e, em pequena proporção, o subgenótipo F2a, reforçando o histórico da colonização no Estado do ES. Embora no ES ainda existam áreas indígenas, a baixa proporção do genótipo F encontrada no estudo pode estar relacionada à dizimação de populações indígenas (Godoy et al., 2016) ou à intensa migração interna de índios nativos para Bahia e Pernambuco na segunda metade do século XVI (Saletto, 2000).

A análise comparativa entre os dois subgenótipos mais prevalentes nos indivíduos do estudo demonstrou predomínio de HBV/A1 (129/ 69,7%) e HBV/D3 (56/ 30,3%), com mediana de idade e proporção de sexo semelhante à distribuição da população geral do estudo. Diferentemente dos nossos resultados, estudo realizado em indivíduos do Norte de Portugal evidenciou maior frequência de HBeAg negativo nos indivíduos genótipo A

comparado com o genótipo D em indivíduos do sexo feminino, diferença esta não encontrada no sexo masculino (Mota et al., 2009).

Estudos sobre a origem das cepas do HBV/A1 predominantes no Brasil propuseram que tenham chegado através de escravos oriundos do Leste da África na metade do século XIX (Lago et al., 2014), e a perpetuação do predomínio do HBV/A1 parece estar relacionada à grande miscigenação interna (no ES, provenientes do Estado da Bahia) e à renda familiar (Paoli et al., 2018).

Da mesma forma, a relação entre o HBV/D e a origem ancestral em indivíduos infectados é muito evidente nos estudos de epidemiologia molecular do HBV nos Estados da região Sul do Brasil. Da mesma forma, o ES foi destino de um forte contingente de imigrantes europeus, vindos especialmente da Itália e Alemanha no final do século XIX e na primeira metade do século XX. Essa ancestralidade também parece ser responsável pela alta prevalência do HBV/D em algumas cidades do Estado de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Bertolini et al., 2012; Gusatti et al., 2015; Chachá et al., 2017; Lampe et al., 2017).

Em relação ao subgenótipo HBV/D3, apesar da imigração italiana no ES, a frequência encontrada no nosso estudo (27,7%) foi inferior àquelas descritas na região Sul do Brasil (Paoli et al., 2018), algumas localidades no interior do Estado de SP (Tonetto et al., 2009; Chachá et al., 2017) e MS (Freitas et al., 2014), onde a etnia migratória europeia foi mais marcante.

Na análise de correlação entre os dois subgenótipos mais frequentes, a transmissão intrafamiliar foi mais frequente que o esperado entre os indivíduos infectados pelo subgenótipo D3 ( $p= 0.001$ ), e a transmissão vertical foi mais frequente que o esperado entre aqueles com subgenótipo A1 ( $p= 0.001$ ). Estudo avaliando transmissão da hepatite B numa comunidade rural africana demonstrou que, além da transmissão perinatal, a transmissão horizontal durante a infância parece ser um mecanismo comum de transmissão do HBV (Pinho-Nascimento, 2018).

A importância do componente familiar na transmissão do HBV está bem estabelecida para os genótipos B e C predominantes na Ásia, onde a transmissão vertical exerce forte papel na retroalimentação da alta prevalência da hepatite B. Essa característica também foi demonstrada em estudos de epidemiologia molecular que avaliaram a distribuição mundial do genótipo D, com alta prevalência na Europa, no Oriente Médio e em países do Mediterrâneo (Kostaki et al., 2018).

Nossos resultados reforçam a importância da transmissão intrafamiliar da hepatite B também nos genótipos A e D, descrita em outros estudos, principalmente nas cidades da região Sul do Brasil, notadamente cidades do Oeste do Paraná, Chapecó em SC, Caxias do Sul e Bento Gonçalves no RS, (Bertolini et al., 2012; Gusatti et al., 2015; Pereira et al., 2017; Paoli et al., 2018;) e Ribeirão Preto no Estado de SP (Chachá et al., 2017), com forte imigração italiana. Por outro lado, nossos resultados diferem do proposto por Ximenes e col., que descrevem o uso de drogas como principal via de transmissão nos Estados do Sudeste (Ximenes et al., 2015).

As análises das relações filogenéticas entre as sequências caracterizadas neste estudo demonstraram que as sequências de HBV subgenótipos A1 e D3 agruparam em diferentes *clusters* dentro do clado dos subgenótipos HBV/A1 e HBV/D3, o que reflete a introdução de diferentes cepas destes dois subgenótipos no Estado do ES. Da mesma forma, o padrão de agrupamento das sequências HBV/A1 e HBV/D3 identificadas no Espírito Santo foi observado com sequências de outras regiões do Brasil. Também não foi observada a formação de *clusters* específicos com sequências HBV/A1 e HBV/D3 de acordo com a região de nascimento no Espírito Santo, sugerindo que, nas diferentes regiões do ES, também ocorreu a introdução de diferentes cepas destes dois subgenótipos. O resultado da análise filogenética dos subgenótipos A2 e F2a segue o mesmo padrão descrito para o subgenótipo A1.

O papel dos genótipos nos desfechos clínicos na hepatite B crônica está bem estabelecido para os genótipos B e C. Em relação aos genótipos A

e D, essas evidências são menos claras. Revisão avaliando diferenças nos desfechos clínicos entre os genótipos A e D demonstrou haver resultados controversos. Alguns estudos em indivíduos com hepatite B ativa HBeAg- demonstraram agravamento da lesão hepática e pior prognóstico mais frequente naqueles indivíduos com genótipo D do que naqueles com A (genótipo D>A), enquanto em outros, o HBV/D estava associado com menor lesão hepática e depuração viral do que em indivíduos HBV/A (genótipo A>D) (Shi, 2012).

No Brasil, o estudo avaliou a influência dos genótipos A, D e F do HBV nos desfechos clínicos através de avaliação histológica e encontrou lesão histológica significativamente menor no genótipo D (Nabuco et al., 2012). No nosso estudo, não houve diferença estatisticamente significativa nas formas ativas da doença em relação aos desfechos clínicos entre os dois grupos, tanto na população HBeAg+ quanto na população HBeAg-.

A carga viral baixa no momento da classificação da fase clínica também foi semelhante em ambos os subgenótipos, confirmando evidência descrita anteriormente (Paoli et al., 2018). Da mesma forma, *status* HBeAg negativo, tanto na forma inativa (portador inativo) como na forma ativa da doença pelo HBV, foi semelhante nos dois grupos.

Coorte espanhola publicada recentemente, avaliando desfechos clínicos nos diferentes genótipos, evidenciou desfechos semelhantes entre os diferentes genótipos nas fases inativas da hepatite B crônica. Diferentemente, naqueles indivíduos com hepatite crônica ativa HBeAg+, a frequência do genótipo D foi menor que a esperada. Os autores atribuíram esse achado às mutações nas regiões pré-core e do promotor basal do core e menor expressão do antígeno HBeAg, frequentes no genótipo D (Aguilera et al., 2020).

Durante evolução da infecção crônica pelo HBV, mutações são comumente observadas no genoma do HBV. Dentre essas mutações, aquelas nas regiões do promotor basal do core (BCP) e/ou pré-core (PC) estão comumente associadas com menor expressão do antígeno HBeAg.

Apesar de o HBeAg ser uma proteína acessória e não ser necessária para a replicação viral, ela pode moderar a atividade imune, facilitando a cronicidade e favorecendo a persistência da infecção no indivíduo (Chen, 2004).

Cepas com mutações na região do promotor basal do core (mutações A1762T/G1764) e no gene pré-core (mutação G1896A e/ou G1899A) são comumente responsáveis pela replicação contínua do DNA do HBV mesmo após a soroconversão do antígeno HBeAg e a consequente persistência da inflamação hepática crônica (Lin, 2008; Mansourian, 2013). Esses achados sugerem que as características genéticas do HBV podem desempenhar papel importante na patogênese da hepatite B (Leng, 2015).

Nosso estudo avaliou as frequências e os padrões clínicos das variantes genéticas do HBV nas regiões BCP (A1762 e G1764A) e PC (G1896A) nos genótipos A e D em 116 amostras de HBV no Espírito Santo.

Mutações na região BCP isoladas ou associadas (69% e 52,7% respectivamente) foram frequentes e com distribuição similar entre os genótipos. Entretanto, diferentemente de outros, nosso estudo encontrou maior frequência da mutação G1764A associada com o genótipo A ( $p=0,04$ ) e confirmada quando avaliamos essa associação entre os subgenótipos A1 e D3 ( $p=0,03$ ). Não encontramos na literatura achados semelhantes. É possível que possam existir diferentes proteínas ligadoras nos portadores do HBV que possam influenciar o estabelecimento dessa mutação.

A maior parte dos estudos sobre variantes na região do BCP no genoma do HBV, as mutações A1762T e G1764A, tem sido descrita principalmente em HBV genótipos B e C.

Bui e col. avaliaram várias mutações na região da BCP e evidenciaram que as mutações A1762T e G1764A isoladas eram significativamente mais frequentes nos indivíduos HBV/C do que naqueles HBV/B. Além disso, meta-análise recente demonstrou que portadores de hepatite B crônica genótipo C e mutações na região BCP são preditores independentes para CHC (Yang et al., 2015).

Entre os genótipos A e D, os estudos descrevem frequentemente, a variabilidade da dupla mutação (A1762T/G1764A) na região do BCP com grande variabilidade entre os diferentes genótipos. Estudo avaliando somente infectados pelo genótipo D encontrou a dupla mutação nas posições 1762/1764 em 27,5% dos indivíduos (GHOSH, 2012). Similarmente, outro estudo em população de várias etnias infectadas por vários genótipos do HBV encontrou a dupla mutação na região da BCP em 24,2% dos indivíduos (Lau, 2021). Por outro lado, estudo canadense encontrou frequência bem maior (62,5%) do que relatada anteriormente e considerou o incremento da imigração asiática na última década como possível explicação (O'Brien, 2015).

No Brasil, os estudos que avaliaram a dupla mutação na região BCP são escassos e apresentam variabilidade entre os genótipos. Frequências menores (33,3%) no genótipo B e maiores nos genótipos A e F (62% e 90% respectivamente) (Sitnik et al., 2004). Resultados semelhantes (52,4%) foram descritos em estudo na região Nordeste em amostras de infectados quase que exclusivamente pelo genótipo A (Eloy, 2013). Estudo na região Sul do Brasil (Mello, 2014), onde predomina o genótipo D, evidenciou frequências semelhantes das variantes A1762T/G1764A entre os genótipos A (66,7%), C (64,3%) e D (30,5%). Da mesma forma, estudo na região Sudeste demonstrou que não houve diferença significativa na frequência da dupla mutação no BCP entre os genótipos A (44,2%), D (40,6%) e F (50%) (Chachá, 2017).

No nosso estudo, a dupla mutação A1762T/G1764A foi frequente (52,7%) e não apresentou diferença significativa entre os genótipos A e D. Adicionalmente, foi realizada análise de associação entre os subgenótipos mais frequentes, A1 e D3, e com as fases clínicas da hepatite B crônica, e não encontrou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,67$ ). Até o momento, este é o primeiro estudo que avalia mais detalhadamente a frequência das mutações na região da BCP nos genótipos e subgenótipos no Brasil.

Diferentes desfechos clínicos, como cirrose e CHC, têm sido associados à presença de variantes BCP no genoma do HBV, principalmente em estudos envolvendo indivíduos infectados com genótipos B e C e em menor frequência naqueles portadores dos genótipos A e D. Estudo em indivíduos com genótipo D HBeAg- encontrou associação entre variantes da região BCP com fases mais avançadas da hepatite B crônica (Gosh et al., 2012). Da mesma forma, Chachá e col. encontraram associação entre a dupla mutação A1762/G1764T e a presença de fibrose moderada/grave, cirrose e CHC. Nosso estudo, entretanto, não encontrou associação entre a presença de mutações na região da BCP com fases clínicas da hepatite B ( $p=0,70$ ). Semelhantemente, estudo no Canadá avaliando genótipos A-E também não encontrou associação entre a presença dessas mutações com diferentes fases clínicas da hepatite B crônica (O'Brien, 2015).

A frequência da infecção com cepas do HBV com mutações na região PC varia globalmente e é determinada predominantemente pelo genótipo do HBV. Nos países do Mediterrâneo, onde prevalece o genótipo D, praticamente todos os indivíduos com hepatite B crônica HBeAg negativo portam variantes pré-core (Alexopoulou et al., 2014).

Lau e col, avaliando a presença de cepas com essas mutações em indivíduos <18 e >18 anos, evidenciaram que essas variantes já estavam presentes (14,4%) nos indivíduos abaixo de 18 anos de idade, que evoluíram mais rapidamente para a fase HBeAg negativo da infecção pelo HBV do que aqueles infectados com cepas selvagens. Os autores concluem que a presença de cepas do HBV com essas mutações em idade precoce sugere que essas mutações podem ser selecionadas mesmo antes da soroconversão do antígeno HBeAg e podem ter implicações clínicas e terapêuticas no manejo dos indivíduos com hepatite B crônica.

Poucos estudos têm avaliado o comportamento das variantes genéticas na região PC circulantes no Brasil e sua influência na doença hepática nos portadores de hepatite B crônica.



Estudo avaliando população de indivíduos infectados com HBV identificou que a presença da variante G1896A se associou com lesão hepática mais grave (Rezende et al., 2005). Outro estudo identificou maior frequência da mutação pré-core G1896A em portadores de HBV genótipo D (77,7) e diferença significativa entre a presença da mutação G1896A com *status* HBeAg, demonstrando associação dessa mutação com soroconversão do antígeno HBeAg nos indivíduos infectados pelo genótipo D do HBV (Mello et al., 2014).

Mais recentemente, estudo identificou alta frequência de mutações na região PC (80,6%) associada ao genótipo D. Entretanto, a presença dessa mutação não se associou com doença hepática mais grave e CHC (Chachá et al., 2017).

No nosso estudo, a frequência da mutação G1896A isolada foi de 16,4% e associada com G1899A foi encontrada em 9,5% dos indivíduos e associada com o genótipo D. Essa diferença se manteve na análise dos subgenótipos A1 e D3 ( $p < 0,01$ ). Dos 4 (4,7%) indivíduos genótipo A com T na posição 1858, a mutação G1896A foi encontrada em um único indivíduo. Essa variante com T na posição 1858, apesar de infrequente, estudo recente a evidenciou em indivíduos portadores de HBV/A HBeAg- (16,4%) e HBeAg+ (2,3%) (Lau et al., 2021). Por outro lado, nosso estudo não encontrou diferença significativa entre a presença da mutação G1896A com características epidemiológicas (idade e via de transmissão), *status* HBeAg ou fase clínica da infecção pelo HBV. Da mesma forma, não se observou associação entre a presença de mutações na BCP + PC (A1762T e/ou G1764A + G1896A e/ou G1899A) com o perfil sorológico do HBeAg, a via de transmissão ou a fase clínica da infecção pelo HBV. Estes dados reforçam a hipótese de um mix de cepas com e sem essas mutações no *pool* de vírus circulante durante a história natural da hepatite B crônica (Alexopoulou et al., 2014).

Avaliação de outras mutações menos descritas na região PC, como G1888A e G1862A, foi realizada. A presença da primeira variante, G1888A,

apresentou associação com idade menor que 40 anos ( $p=0,03$ ). Uma hipótese para esse fato pode ser a emergência dessa mutação em idade precoce, com menor expressão do HBeAg e escape do sistema imune do hospedeiro e não clareamento viral completo pelo hospedeiro, perpetuando a infecção crônica pelo HBV. A presença da segunda variante, G1862A, apresentou associação significativa com genótipo A, confirmada no subgenótipo A1. Essa associação já foi descrita anteriormente (Kramvis, 1998) e confirmada em estudo recente no Brasil (Chachá, 2017). Entretanto, o seu valor na história natural da hepatite B crônica ainda é desconhecido. A presença dessa mutação parece afetar a expressão do antígeno HBeAg em indivíduos infectados com subgenótipo A1 (Kramvis, 2017).

---

---

## **6 CONCLUSÕES**

---

---

## 6 CONCLUSÕES

Entre a população de portadores crônicos do HBV procedentes do Estado do Espírito Santo e atendidos no Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFES no período entre julho de 2005 e julho de 2017:

- Neste estudo, foi verificado que se trata de uma população relativamente jovem, com média de idade de 49,1 anos, com leve predomínio de indivíduos do sexo masculino (52,6%) e predominantemente (78%) naturais do Estado do Espírito Santo, sendo a maior parte destes (47,7%) natural da região metropolitana do Estado;
- O componente familiar foi o fator predominante envolvido na provável via de transmissão do HBV, com 36,6% das infecções associadas à provável transmissão vertical e 19,6% à transmissão intrafamiliar;
- Se observou o predomínio de indivíduos na fase de portador inativo (54,9%) e na fase hepatite ativa HBeAg negativo (37,6%);
- Se observou baixa prevalência de coinfeção com HIV e/ou HCV;
- Os genótipos do HBV encontrados foram o A (subgenótipo A1) D (subgenótipos D2, D3 e D4) e F (subgenótipo F2a), sendo os subgenótipos A1 e D3 os mais frequentes;
- Na distribuição dos subgenótipos no Estado do ES de acordo com as diferentes macrorregiões, se observou aumento progressivo das frequências do subgenótipo D3 no sentido Norte-Sul do Estado

(7,7%; 25,9%; 34,4%; 42,1%) e do subgenótipo A1 no sentido Sul-Norte do Estado (57,9%; 55,2%; 70,4%; 84,6%);

- Na macrorregião metropolitana, foi observada a maior diversidade de subgenótipos em relação aos demais: os subgenótipos A1, A2, D2, D3, D4 e F2a foram encontrados nessa área;
- A infecção pelo subgenótipo A1 foi mais frequente do que a infecção pelo subgenótipo D3 entre indivíduos nascidos fora do Estado do Espírito Santo;
- O subgenótipo A1 apresentou associação com transmissão vertical e o subgenótipo D3, com transmissão intrafamiliar;
- Não se observou associação entre genótipos/subgenótipos com *status* HBeAg, HBV DNA ou fases clínicas da hepatite B crônica;
- Cepas do HBV com mutações na região do BCP (A1762T + G1764A) foram frequentes, sendo identificadas em 52,7% dos casos avaliados. A presença dessas mutações foi mais frequente no genótipo A em relação ao D, porém apenas a maior frequência da G1764A entre os HBV/A foi estatisticamente significativa.
- A presença de cepas com mutações na região do BCP não apresentou associação com idade, perfil sorológico do HBeAg, formas de transmissão, formas clínicas da hepatite B crônica e níveis de HBV DNA;
- Cepas com as mutações G1896A e/ou G1899A na região PC foram identificadas em 24% dos casos analisados e não apresentaram associação com idade, *status* do antígeno HBeAg ou fases clínicas da hepatite B crônica. A presença dessas mutações foi associada com o subgenótipo D3 e baixos níveis de HBV DNA;
- Cepas com alterações no códon de iniciação para síntese do HBeAg (posições 1814-1816 da região PC) foram observadas em 19% dos

casos e foram associadas às formas clínicas HBeAg negativo, sendo mais frequentes entre os portadores inativos (26,7%) seguidos pelos casos com hepatite ativa HBeAg negativo (14,6%);

- Cepas com a mutação G1862T foram observadas em 71,5% dos casos, e a presença dessa mutação associada com o subgenótipo A1;
- A mutação G1888A, C ou T também foi associada com o subgenótipo A1. Cepas com esse perfil foram identificadas em 43,1% dos casos, e sua presença associada com idade entre 20-40 anos.

---

---

**7 REFERÊNCIAS**

---

---

## 7 REFERÊNCIAS

Aguilera A, Trastoy R, Rodríguez-Frias F, Muñoz-Bellido JL, Melón S, Suárez A, Orduña A, Viciano I, Bernal S, García-Bujalance S, Montiel N, Molina JM, Basaras M, Fernández-Cuenca F, García-Arata I, Reina G, Ocete MD, Fuentes A, Navarro-de-La-Cruz D, Nieto L, Blazquez de Castro A, Buti M, Álvarez M, García F. GEHEP 010 study: Prevalence and distribution of hepatitis B virus genotypes in Spain (2000-2016). *J Infect.* 2020;81(4):600-6.

Akcay IM, Katrinli S, Ozdil K, Doganay GD, Doganay L. Host genetic factors affecting hepatitis B infection outcomes: Insights from genome-wide associations studies. *World J Gastroenterol.* 2018;24(30):3347-3360.

Alexopoulou A, Karayiannis P. HBeAg negative variants and their role in the natural history of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 28;20(24):7644-52.

Araujo NM, Mello FC, Yoshida CF, Niel C, Gomes SA. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. *Arch Virol.* 2004;149(7):1383-95.

Barros LM, Gomes-Gouvêa MS, Kramvis A, Mendes-Corrêa MC, dos Santos A, Souza LA, Santos MD, Carrilho FJ, de Jesus Domicini A, Pinho JR, de Souza Paiva Ferreira A. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. *Infect Genet Evol.* 2014;24:68-75.

Bertolini DA, Gomes-Gouvêa MS, Guedes de Carvalho-Mello IM, Saraceni CP, Sitnik R, Grazziotin FG, Laurino JP, Fagundes NJ, Carrilho FJ, Pinho JR. 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.



Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. JAMA. 1965;191:541-6.

Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. Ann Intern Med. 1967;66(5):924-31.

Bottecchia M, Souto FJ, O KM, Amendola M, Brandão CE, Niel C, Gomes SA. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. BMC Microbiol. 2008;8:11.

Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde / MS. Hepatites virais. Brasília: Ministério da Saúde; 2007. p.409-432.

Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico - Hepatites virais. Brasília: Ministério da Saúde; 2020.

Brasil. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia. Programa Nacional de Imunização: PNI 25 anos: Brasília, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde; 1998.

Chachá SGF, Gomes-Gouvêa MS, Malta FM, Ferreira SDC, Villanova MG, Souza FF, Teixeira AC, Passos ADDC, Pinho JRR, Martinelli ALC. Distribution of HBV subgenotypes in Ribeirão Preto, Southeastern Brazil: a region with history of intense Italian immigration. Braz J Infect Dis. 2017 Jul-Aug;21(4):424-432.

Chandra PK, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Panigrahi R, Chakrabarti S, De BK, Chakravarty R. Subgenotypes of hepatitis B virus genotype D (D1, D2, D3 and D5) in India: differential pattern of mutations, liver injury and occult HBV infection. J Viral Hepat. 2009 Oct;16(10):749-56

Chang KM, Liu M. Chronic hepatitis B: immune pathogenesis and emerging immunotherapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;30:93-105.

Chen P, Yu C, Wu W, Wang J, Ruan B, Ren J, Yang S, Xu K, Yu L, Li L. Serological profile among HBsAg-positive infections in Southeast China: A community-based study. *Hepat Mon*. 2013;13(1):e7604.

Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Laperche S, Pawlotsky JM. Performance of the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification. *J Clin Microbiol*. 2008;46(5):1716-23.

Chotiyaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;6(8):453-62.

Clemente CM, Carrilho FJ, Pinho JR, Ono-Nita SK, Da Silva LC, Moreira RC, Lemos MF, de Carvalho Mello IM. A phylogenetic study of hepatitis B virus in chronically infected Brazilian patients of Western and Asian descent. *J Gastroenterol*. 2009;44(6):568-76.

Conde SR, Mória Lde J, Barbosa MS, Amaral Ido S, Miranda EC, Soares Mdo C, Brito EM, Souza Odo S, de Araújo MT, Demachki S, Rebello JR, Mesquita MG, Denis AB, Ishak R. Prevalência de genótipos e de mutantes pré-core A-1896 do vírus da hepatite B e suas implicações na hepatite crônica, em uma população da Amazônia oriental. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37 Suppl 2:33-9.

Couroucé-Pauty AM, Plançon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang*. 1983;44(4):197-211.

Crispim MA, Fraiji NA, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MM, Kiesslich D. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infect Dis*. 2014;14:94.

Cruz-Santos MD, Gomes-Gouvêa MS, Costa-Nunes JD, Malta-Romano C, Teles-Sousa M, Fonseca-Barros LM, Carrilho FJ, Paiva-Ferreira AS, Rebello-Pinho JR. High prevalence of hepatitis B subgenotype D4 in Northeast Brazil: an ancient relic from African Continent? *Ann Hepatol.* 2018;17(1):54-63.

Cunha-Silva M, Marinho FRT, Oliveira PF, Lopes TM, Sevá-Pereira T, Lorena SLS, Almeida JRS. Retrospective analysis of hepatitis B virus chronic infection in 247 patients: clinical stages, response to treatment and poor prognostic factors. *Braz J Infect Dis.* 2017;21(4):441-447.

Dal Molin G, Poli A, Crocè LS, D'Agaro P, Biagi C, Comar M, Tiribelli C, Campello C. Hepatitis B virus genotypes, core promoter variants, and precore stop codon variants in patients infected chronically in North-Eastern Italy. *J Med Virol.* 2006 Jun;78(6):734-40.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1970 Apr 4;1(7649):695-8

European Association for the Study of the Liver. Electronic address: [easloffice@easloffice.eu](mailto:easloffice@easloffice.eu); European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;67(2):370-398.

Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol.* 2008;48(2):335-52.

Ferraz ML, Strauss E, Perez RM, Schiavon L, Kioko Ono S, Pessoa Guimarães M, Ferreira AP, Nabuco L, Carvalho-Filho R, Tovo C, Souto F, Abrão P, Reuter T, Dantas T, Viganí A, Porta G, Ferreira MS, Paraná R, Cimerman S, Bittencourt PL. Brazilian Society of Hepatology and Brazilian Society of Infectious Diseases Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Hepatitis B. *Braz J Infect Dis.* 2020;24(5):434-51.

Freitas SZ, Soares CC, Tanaka TS, Lindenberg AS, Teles SA, Torres MS, Mello FC, Mendes-Corrêa MC, Savassi-Ribas F, Motta-Castro AR. Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis B infection among HIV-infected patients in the State of MS, Central Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2014 Sep-Oct;18(5):473-80.

Fonseca JC. Histórico das hepatites virais [History of viral hepatitis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 May-Jun;43(3):322-30.

Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature.* 1979;281(5733):646-50.

Galizzi F J, Teixeira R, Fonseca JC, Souto FJ. Clinical profile of hepatitis B virus chronic infection in patients of Brazilian liver reference units. *Hepatol Int.* 2010 Jun 11;4(2):511-5.

Godoy BA, Gomes-Gouvêa MS, Zagonel-Oliveira M, Alvarado-Mora MV, Salzano FM, Pinho JR, Fagundes NJ. High prevalence of HBV/A1 subgenotype in native south Americans may be explained by recent economic developments in the Amazon. *Infect Genet Evol.* 2016 Sep;43:354-63.

Godoy BA, Pinho JRR, Fagundes NJR. Hepatitis B Virus: Alternative phylogenetic hypotheses and its impact on molecular evolution inferences. *Virus Res.* 2020 Jan 15;276:197776.

Gusatti CS, Costi C, Halon ML, Grandi T, Medeiros AF, Silva CM, Gomes SA, Silva MS, Niel C, Rossetti ML. Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapecó, Southern Brazil, Originate from Italy. *PLoS One*. 2015 Aug 14;10(8):e0135816.

Hadziyannis SJ. Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African countries. *J Hepatol*. 2011 Jul;55(1):183-91.

Horward CR; Zuckerman AJ. Core antigen and circulating anti-core antibody in hepatitis B infection. *J Immunol Methods*. 1977;14(3-4):291-301.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico: resultados preliminares - São Paulo. Rio de Janeiro; IBGE; 1982. (8º Recenseamento Geral do Brasil; v. 1, t. 4).

Kostaki EG, Karamitros T, Stefanou G, Mamais I, Angelis K, Hatzakis A, Kramvis A, Paraskevis D. Unravelling the history of hepatitis B virus genotypes A and D infection using a full-genome phylogenetic and phylogeographic approach. *Elife*. 2018 Aug 7;7:e36709.

Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005 Mar 31;23(19):2409-23.

Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology, South Africa*. 2014;57(3-4):141-50.

Krugman S, Ward R, Giles JP. The natural history of infectious hepatitis. *Am J Med*. 1962;32:717-28.

Kumar A, Kumar SI, Pandey R, Naik S, Aggarwal R. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D. *Indian J Gastroenterol*. 2005;24(1):19-22.

Lago BV, Mello FC, Kramvis A, Niel C, Gomes SA. Hepatitis B virus subgenotype A1: evolutionary relationships between Brazilian, African and Asian isolates. *PLoS One*. 2014 Aug 14;9(8):e105317.

Lampe E, Mello FCA, do Espírito-Santo MP, Oliveira CMC, Bertolini DA, Gonçalves NSL, Moreira RC, Fernandes CAS, Nascimento HCL, Grotto RMT, Pardini MIMC, On Behalf Of The Brazilian Hepatitis B Research Group. Nationwide overview of the distribution of hepatitis B virus genotypes in Brazil: a 1000-sample multicentre study. *J Gen Virol*. 2017 Jun;98(6):1389-1398.

Lin CL, Kao JH. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(5): a021436.

Lin CL, Kao JH. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017 Jun;31(3):249-255.

Lobato C, Tavares-Neto J, Rios-Leite M, Trepo C, Vitvitski L, Parvaz P, Zoulim F, D'Oliveira A Jr, Paraná R. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(5):863-8.

Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Biol*. 2013 Dec;23(6 Pt B):561-75.

Locarnini S, Hatzakis A, Chen DS, Lok A. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J Hepatol*. 2015 Apr;62(1 Suppl):S76-86.

McMahon BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol Int*. 2009 Jun;3(2):334-42.

McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2009a;49(5 Suppl):S45-55.

McMahon BJ, Bulkow L, Simons B, Zhang Y, Negus S, Homan C, Spradling P, Teshale E, Lau D, Snowball M, Livingston SE. Relationship between level of hepatitis B virus DNA and liver disease: a population-based study of hepatitis B e antigen-negative persons with hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014 Apr;12(4):701-6.e1-3.

McNaughton AL, D'Arienzo V, Ansari MA, Lumley SF, Littlejohn M, Reville P, McKeating JA, Matthews PC. Insights from deep sequencing of the HBV genome-unique, tiny, and misunderstood. *Gastroenterology*. 2019;156(2):384-99.

Magnius LO, Espmark A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*. 1972;80(2):335-7.

Mello FM, Kuniyoshi AS, Lopes AF, Gomes-Gouvêa MS, Bertolini DA. Hepatitis B virus genotypes and mutations in the basal core promoter and pre-core/core in chronically infected patients in southern Brazil: a cross-sectional study of HBV genotypes and mutations in chronic carriers. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(6):701-8.

Mendes-Corrêa MC, Barone AA, Cavalheiro Nd, Tengan FM, Guastini C. Prevalence of hepatitis B and C in the sera of patients with HIV infection in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000 Mar-Apr;42(2):81-5.

Miranda AE, Figueiredo NC, Schmidt R, Page-Shafer K. A population-based survey of the prevalence of HIV, syphilis, hepatitis B and hepatitis C infections, and associated risk factors among young women in Vitória, Brazil. *AIDS Behav*. 2008 Jul;12(4 Suppl):S25-31.

Moraes MT, Gomes SA, Niel C. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brazil. *Arch Virol.* 1996;141(9):1767-73.

Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. Epidemiological study of genotypes of hepatitis B virus in northern Portugal. *J Med Virol.* 2009 Jul;81(7):1170-6.

Moura IF, Lopes EP, Alvarado-Mora MV, Pinho JR, Carrilho FJ. Phylogenetic analysis and subgenotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. *Infect Genet Evol.* 2013 Mar;14:195-9.

Nabuco LC, Mello FC, Gomes Sde A, Perez RM, Soares JA, Coelho HS, Nogueira CA. Hepatitis B virus genotypes in Southeast Brazil and its relationship with histological features. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Sep;107(6):785-9. Erratum in: *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Nov;107(7):964.

O'Brien M, Casselman A, Smart G, Gretchen A, Kaita K, Kadkhoda K. Retrospective study of the prevalence and clinical significance of hepatitis B virus precore and basal core promoter variants. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2015 Nov-Dec;29(8): e1-6.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1988 Oct;69 (Pt 10):2575-83.

Pagano M, Gauvreau K. Métodos não-paramétricos. In: *Princípios de Bioestatística.* 2ª. Ed. São Paulo: Thompson, 2004a. cap. 13.

Pagano M, Gauvreau K. Tabelas de Contingência. In: *Princípios de Bioestatística.* 2ª. Ed. São Paulo: Thompson, 2004b. cap. 15.



Paoli J, Wortmann AC, Klein MG, Pereira VRZB, Cirolini AM, Godoy BA, Fagundes NJR, Wolf JM, Lunge VR, Simon D. HBV epidemiology and genetic diversity in an area of high prevalence of hepatitis B in southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2018 Jul-Aug;22(4):294-304.

Pereira VRZB, Wolf JM, Luz CADS, Stumm GZ, Boeira TDR, Galvan J, Simon D, Lunge VR. Risk factors for hepatitis B transmission in South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017 Aug;112(8):544-550.

Pinho-Nascimento CA, Bratschi MW, Höfer R, Soares CC, Warryn L, Pečerska J, Minyem JC, Paixão ICNP, Baroni de Moraes MT, Um Boock A, Niel C, Pluschke G, Röltgen K. Transmission of Hepatitis B and D Viruses in an African Rural Community. *mSystems*. 2018 Sep 18;3(5):e00120-18.

Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol*. 2012 Apr;84(4):587-95.

Ranki M, Schätzl HM, Zachoval R, Uusi-Oukari M, Lehtovaara P. Quantification of hepatitis B virus DNA over a wide range from serum for studying viral replicative activity in response to treatment and in recurrent infection. *Hepatology*. 1995 Jun;21(6):1492-9.

Rezende RE, Fonseca BA, Ramalho LN, Zucoloto S, Pinho JR, Bertolini DA, Martinelli AL. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol*. 2005 Jan;32(1):53-9.

Ribeiro NR, Campos GS, Angelo AL, Braga EL, Santana N, Gomes MM, Pinho JR, De Carvalho WA, Lyra LG, Lyra AC. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. *Liver Int*. 2006 Aug;26(6):636-42.

Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol*. 1974 Aug;14(2):384-91.

Sali S, Azarmmanesh S, Ghalikhani H, Vaezjalali M. Phylogenetic analysis of *Hepatitis B* virus among household members with HBV chronic infection. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2019 Jul-Sep;11(3):221-228.

Saletto N. Sobre a composição étnica da população capixaba. *Dimensões. Revista de História da UFES*. 2000;11:99-109.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.

Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology*. 2002 Dec;123(6):1848-56.

Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 7;13(1):14-21.

Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*. 2015 May;479-480:672-86.

Shi YH. Correlation between hepatitis B virus genotypes and clinical outcomes. *Jpn J Infect Dis*. 2012;65(6):476-82.

Silveira TR, da Fonseca JC, Rivera L, Fay OH, Tapia R, Santos JI, Urdeneta E, Clemens SA. Hepatitis B seroprevalence in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 1999 Dec;6(6):378-83.

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 Jun;42(6):2455-60.

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.* 2016 Feb;49(1):11-23.

Souza MG, Passos AD, Machado AA, Figueiredo JF, Esmeraldino LE. Co-infecção HIV e vírus da hepatite B: prevalência e fatores de risco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004 Sep-Oct;37(5):391-5.

Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.* 2009 Oct;83(20):10538-47.

Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis.* 2010 Feb;14(1):1-21, vii.

Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Brown RS Jr, Bzowej NH, Wong JB. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology.* 2018 Apr;67(4):1560-1599.

Tonetto PA, Gonçalves NS, Fais VC, Vigani AG, Gonçalves ES, Feltrin A, Gonçalves FL Jr. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. *BMC Infect Dis.* 2009 Sep 8;9:149. doi: 10.1186/1471-2334-9-149.

United Nations. Conference on Sustainable Development. Rio de Janeiro, 20-22 junho 2012. Available from:  
<https://www.un.org/en/conferences/environment/rio2012>

Vivaldini SM, Pinto FKA, Kohiyama IM, Almeida EC, Mendes-Correa MC, Santos AF, Ribeiro RA, Pereira GFM, Araújo WN. Exploratory spatial analysis of HBV cases in Brazil between 2005 and 2017. *Rev Bras Epidemiol.* 2019 Sep 26;22Suppl 1(Suppl 1):e190007.

Ximenes RAA, Figueiredo GM, Cardoso MRA, Stein AT, Moreira RC, Coral G, Crespo D, Dos Santos AA, Montarroyos UR, Braga MC, Pereira LMMB. Population-Based Multicentric Survey of Hepatitis B Infection and risk factors in the North, South, and Southeast Regions of Brazil, 10-20 years after the beginning of vaccination. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Dec;93(6):1341-1348.

WHO World Health Organization. OMS lança recomendações sobre hepatite B, que mata 650 mil por ano. *ONU News.* 12 de março de 2015. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2015/03/1504691-oms-lanca-recomendacoes-sobre-hepatite-b-que-mata-650-mil-por-ano>

WHO World Health Organization. *Global Hepatitis Report, 2017.* Geneva: World Health Organization; 2017.

Yang Y, Sun JW, Zhao LG, Bray F, Xiang YB. Quantitative evaluation of hepatitis B virus mutations and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis of prospective studies. *Chin J Cancer Res.* 2015 Oct;27(5):497-508.