

**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM  
ANÁLOGOS DE NUCLEOS(T)ÍDEOS E DE ESCAPE VACINAL DO VÍRUS DA  
HEPATITE B (VHB) EM PACIENTES COM HEPATITE CRÔNICA**

**SIDELCINA RUGIERI PACHECO**

**Salvador – Bahia**

**2016**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e**  
**Medicina Investigativa**

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM**  
**ANÁLOGOS DE NUCLEOS(T)ÍDEOS E DE ESCAPE VACINAL DO VÍRUS DA**  
**HEPATITE B (VHB) EM PACIENTES COM HEPATITE CRÔNICA**

**SIDELCINA RUGIERI PACHECO**

Orientador: Dr. Luciano Kalabric Silva

Tese apresentada ao Curso da Pós-Graduação  
em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa para a obtenção do grau de  
Doutor

**Salvador - Bahia**

**2016**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

P116a Pacheco, Sidelcina Rugieri.  
Avaliação de mutações de resistência ao tratamento com análogos de nucleos(t)ídeos e de escape vacinal do vírus da hepatite B (VHB) em pacientes com hepatite crônica. / Sidelcina Rugieri Pacheco. - 2016.  
150 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Kalabric Silva, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2016.

1. Vírus da Hepatite B. 2. Resistência. 3. Análogos de nucleosídeos.
4. Nucleotídeos. I. Título.

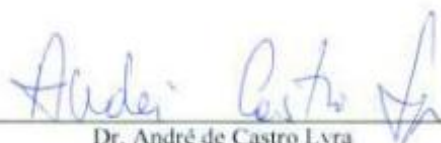
CDU 616.36-002

"AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO VÍRUS DA HEPATITE B (VHB) ÀS DROGAS ANTIVIRAIS  
UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE PACIENTES COM HEPATITE CRÔNICA."

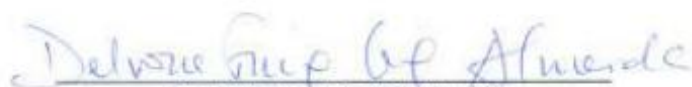
**SIDELCINA RUGIERI PACHECO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. André de Castro Lyra  
Professor Permanente  
UFBA



Dra. Delvone Freire Gil Almeida  
Professora  
FTC



Dr. Artur Trancoso Lopo de Queiroz  
Pesquisador  
CPqGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

**CAPES** bolsa de doutorado através do Projeto Brasil sem Miséria.

**CNPq** apoio financeiro através do Edital Universal 478322/2012-7.

Dedico este trabalho

...a **Deus** por ser na minha vida mais que abundante!

... aos **participantes da pesquisa** com Hepatite B crônica que aceitaram fazer parte desse trabalho.

...aos meus pais **Santina e Calixto**, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelas palavras, pelos conselhos e acima de tudo pela presença quando ausentes.

...a minha sogra **Maria Adélia Silva dos Santos** por todo o apoio e amor a minha família!

... A minha família que começou e cresceu durante a execução desse trabalho: Meu marido, amigo, companheiro, **Carlos Gustavo** e as minhas duas filhas **Agnes** e **Agatha**, vocês tornaram a caminhada mais leve e suave, repleta de amor!

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Dr. Luciano Kalabric Silva** pelo exemplo pessoal e profissional, que cercou com o seu apoio, confiança, amizade, compreensão e orientação mesmo com todos os caminhos sinuosos da pesquisa.

Ao Chefe do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) da Fiocruz/BA, **Dr. Mitermayer Galvão dos Reis** pela colaboração e apoio na execução do trabalho.

Ao **Dr. Raymundo Paraná** que foi um dos idealizadores e colaboradores desse trabalho, viabilizou a realização da análise de resistência do VHB, tanto em Salvador/Bahia e em Rio Branco/Acre.

A **Maria Isabel Magalhães Andrade dos Santos** pela colaboração. Dividimos em diversos momentos o trabalho, as dores, as lágrimas, as inquietações, mas também as alegrias.

Aos estudantes de Iniciação Científica: **Aline Reis, Raíssa Lanna, Juliana Myasaky, Rômulo Freire e Daniela Nascimento** pela colaboração na realização das entrevistas e revisão de prontuário dos pacientes no HUPES-UFBA.

Ao laboratório de biologia molecular LAPI-HUPES, **Andreas Stocker, Breno Dominguez, Mila Hughes, Luciana Aragão, Ianei Carneiro, Jeferson Corrêa**, que colaboraram no treinamento e no início da realização dos testes moleculares nas amostras provenientes do Acre.

A **Dra. Maria Isabel Schinoni** pela colaboração, apoio, amizade e incentivo, nos momentos mais difíceis, era a luz a guiar o caminho.

Ao **Serviço de Gastro-Hepatologia** pela colaboração e apoio na realização do presente trabalho.

Aos funcionários do FUNDHACRE/SAE- HC, principalmente a **Enf. Edna, Sílvia, Augusto**, pelo apoio e a acolhida no período que estive em Rio Branco/Acre.

Ao estudante de Iniciação Tecnológica da Plataforma de Bioinformática **Alisson Fonseca** pelo apoio nas análises das sequências de VHB.

A Plataforma de Sequenciamento Fiocruz-Bahia (PDTIS) em nome de M. Sc **Silvana Paz**, que antes de ser uma colaboradora científica é uma grande amiga.

Ao LACEN-BA, em especial a Dra. **Maria Alice S. Zarife, Eline Carvalho e Haydee Lordelo** pela colaboração na logística das amostras e nos resultados de HBV-DNA.

Ao NECBA/ Núcleo de Hepatologia **Dr. Argemiro D'Oliveira Júnior, Dra. Simone Muniz, Carolina B. Gusmão, Laiana Januse Cordeiro, Maria São Pedro** pelo apoio e amizade.

Á todos do **LPBM** pelo apoio e amizade, principalmente **Theomira do Carmo e Gilmar Ribeiro Júnior** pela colaboração na coleta das amostras dos pacientes e no compartilhamento do material do laboratório.

As amigas da PgBSMI que percorreram juntas mais essa etapa tão importante da concretização de um dos sonhos da minha vida, que possamos prosseguir juntos em outros sonhos: **Táise Lima e Kathleen Ribeiro**.

Aos **professores** do curso de pós-graduação que contribuíram para a minha formação.

A todos os funcionários da **Fiocruz-BA**.

Aos **colegas** da pós-graduação, pela excelente convivência e amizade firmada durante as disciplinas.

A **Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna** pela correção da tese e adequação as normas da ABNT.

A **todos** aqueles que direta ou indiretamente cooperaram para que fosse possível a realização desse trabalho.



*“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”*

Cora Coralina

PACHECO, Sidelcina Rugieri. Avaliação de mutações de resistência ao tratamento com análogos de nucleos(t)ídeos e de escape vacinal do vírus da hepatite B (VHB) em pacientes com hepatite crônica. 150 f.il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) -Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Salvador, 2016.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A hepatite B (VHB) é uma infecção dinâmica crônica, que apesar de existir programas de imunização e tratamento antiviral disponível, existe o risco de emergência de mutações de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos (AN) que devem ser rastreadas, devido as suas implicações clínicas. O Brasil disponibiliza pelo SUS cinco drogas para o tratamento antiviral: IFN, LAM, ADF, ETV e TDF e um guia de conduta clínica para orientar o tratamento no território nacional, o Protocolo de Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e co-infecções. **OBJETIVO:** O objetivo do presente estudo foi avaliar as mutações de resistência aos AN, mutações de escape vacinal e genótipos circulantes em pacientes com hepatite B crônica em dois centros de referencia em Hepatites, na Bahia (região Nordeste) e no Acre (região Norte) do Brasil. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foi utilizadas ferramentas de biologia molecular e bioinformática, através de nested PCR e sequenciamento direto das amostras, para rastrear as mutações de resistência, a região alvo foi a transcriptase reversa (RT) do gene P e as mutações de escape vacinal foi a região do gene S do VHB, como também os genótipos e subgenótipos do VHB. **RESULTADOS:** Foram incluídos 527 pacientes durante o período de 2011-2015, sendo 320 pacientes do HUPES/BA e 207 do FUNDHACRE/AC. Os pacientes que representam a região Nordeste foram 59,3 % do sexo masculino e uma média de idade de  $44,75 \pm 12,4$  DP, os pacientes da região Norte 42% foram do sexo masculino e a média de idade foi de  $40,36 \pm 13,9$  DP. Todos os pacientes incluídos apresentaram AgHBs persistente por mais de seis meses e 86,1% apresentaram AgHBe negativo. Foram sequenciadas 296 amostras dos pacientes com VHB crônica. Foram encontradas mutações de resistência aos AN na Região Norte 1,2% (2), Região Nordeste 7,4%(8) e no global 3,8%(20). Os padrões de mutações de resistência primária encontrados foram: rtA194T, (3) rtL180M+M204V, rtL180M+M204I, rtS202I, rtM204I, rtA181S, rtA181E e rtA184S. Em relação ao escape vacinal a frequência para a Região Norte foi de 7,1% (11), Região Nordeste 8,4% (9) e no global 7,6% (20). Nos pacientes virgens de tratamento (n=189), a frequência de mutações de resistência foi de 6%, somente nas amostras da região Nordeste. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo com ou sem mutação dos pacientes virgens de tratamento. Não foram encontradas mutações de resistência nas amostras da região Norte. Os genótipos circulantes nas duas regiões foram A, D e F, e a região Nordeste foi encontrada o genótipo C (C2). **CONCLUSÃO:** Os resultados demonstram a importância de rastrear e monitorar as mutações de resistência aos AN e de escape vacinal devido a importância epidemiológica e clínica na conduta terapêutica.

**Palavras-chave:** VHB, Vírus da Hepatite B, Mutações de Resistência, Escape Vacinal, Análogos de Nucleos(T)Ídeos

PACHECO, Sidelcina Rugieri. Evaluation of treatment resistance mutations with analogues nucleos(t)ide and vaccine escape the hepatitis B virus (HBV) in patients with chronic hepatitis. 150 f. il. Thesis (PhD em Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Fundação Oswaldo Cruz, Gonçalo Muniz Research Center, Salvador, 2016.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Hepatitis B virus (HBV) is a chronic dynamic infection, which although there immunization programs and antiviral therapy available, there is a risk of emergence of resistance mutations cores analogs (t) ide to be screened, because of their implications clinics. The Brazil offers the SUS five drugs for antiviral treatment: IFN, LAM, ADF, ETV and TDF and clinical guide of conduct to guide treatment in the country, the Therapeutic Guidelines Protocol for Hepatitis B and co-infections. **AIM:** The aim of this study was to evaluate the resistance mutations core analogues (t) ide, vaccine escape mutations and circulating genotypes in patients with chronic hepatitis B in two reference centers in Hepatitis, Bahia (Northeast) and Acre (Northern region) of Brazil. **MATERIAL AND METHODS:** Was used tools of molecular biology and bioinformatics by nested PCR and direct sequencing of samples to track resistance changes, the target region is the reverse transcriptase (RT) P gene and vaccine escape mutations was region of the gene S of HBV, as well as the HBV genotypes and subgenotipos. **RESULTS:** 527 patients were included during the period 2011-2015, with 320 patients HUPES / BA and 207 FUNDHACRE / AC. Patients representing the Northeast were 59.3% male and an average age of  $44.75 \pm 12.4$  PD patients in the northern region 42% were male and the average age was  $40, 36 \pm 13.9$  DP. All patients had persistent HBsAg for more than six months and 86.1% were HBeAg negative. We were sequenced 296 samples from patients with chronic HBV. the cores of similar resistance mutations were found (t) ide in the North 1.2% (2), Northeast 7.4% (8) and 3.8% overall (20). The patterns of primary resistance mutations were: rtA194T (3) rtL180M + M204V, M204I + rtL180M, rtS202I, rtM204I, rtA181S, and rtA181E rtA184S. Regarding vaccine escape the frequency for the Northern Region was 7.1% (11), Northeast 8.4% (9) and the global 7.6% (20). In treatment-naïve patients (n = 189), the frequency of resistance mutations was 6%, only the samples in the Northeast. There was no statistically significant difference between the groups with or without mutation of naive patients. There were no resistance mutations in samples from the North. Circulating genotypes in the two regions A, D and F, and the Northeast found the C genotype (C2). **CONCLUSION:** The results demonstrate the importance of tracking and monitoring the resistance mutations similar cores (t) ide and vaccine escape due to epidemiological and clinical importance in the therapeutic approach.

**Key words:** HBV, Hepatitis B Virus, Resistance Mutations, Vaccine Escape

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1	Estimativa da soroprevalência do VHB no mundo. ....	16
Figura 2	Estrutura do vírus do VHB. ....	19
Figura 3	Representação esquemática do genoma do VHB. ....	21
Figura 4	Representação esquemática da replicação do VHB. ....	22
Figura 5	Distribuição dos genótipos do VHB em diferentes regiões do mundo. ....	23
Quadro 1	Importância clínica das mutações do VHB. ....	26
Figura 6	Localização das mutações de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos nos domínios rt do gene P VHB. ....	30
Quadro 2	Manejo de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos. ....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADV	Adefovir Dipivoxil
AgHBc	Antígeno associado ao core do VHB
AgHBe	Antígeno que indica replicação viral e infectividade do VHB
AgHBs	Antígeno de superfície do VHB
ALT	Alanina aminotransferase
AN	Análogos de núcleos(t)ídeos
Anti-HBc	Anticorpos para HBcAg
Anti-HBe	Anticorpos para HBeAg
Anti-HBs	Anticorpos para HBsAg
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CHC	Carcinoma hepatocelular
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>desoxyribonucleic acid</i> )
Domínio C	Domínio catalítico
ETV	Entecavir
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNDHACRE	Fundação Hospital do Acre
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
INF	Interferon
LACEN	Laboratório de Saúde Pública
LAM	Lamivudina
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Fase de leitura aberta “open read frame”
P	Gene da polimerase
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> ).
PEG-INF	Peginterferon alfa
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i> )

RT	Transcriptase reversa (do inglês, <i>reverse transcriptase</i> )
S	Gene do antígeno de superfície (AgHBs)
SUS	Sistema Único de Saúde
TDF	Tenofovir
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UM	Unidades por milhão (UM).
VDLR	Marcador de infecção para sífilis (do inglês, <i>venereal disease research laboratory</i> )
VHB	Vírus da hepatite B
VHB-DNA	DNA do VHB
VHC	Vírus da Hepatite C
VHD	Vírus da Hepatite D ou Virus Delta
VR	Valor de referência
YIDD	(Y= tirosina; I= isoleucina; D= ácido aspártico)
YMDD	(Y=tirosina, M=metionina, D= ácido aspártico)
YVDD	(Y= tirosina; V= valina; D= ácido aspártico)

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO VHB .....	16
2.2	HISTÓRIA NATURAL E ASPECTOS CLÍNICOS DO VHB.....	18
2.3	O VÍRUS DA HEPATITE B (VHB) .....	20
2.4	MORFOLOGIA, ESTRUTURA GENÔMICA DO VHB .....	21
2.5	REPLICAÇÃO DO VHB.....	22
2.6	GENÓTIPOS DO VHB.....	23
2.7	TRATAMENTO ANTIVIRAL PARA VHB .....	25
2.8	MUTAÇÕES NO GENOMA DO VHB .....	27
2.9	PROTOSCOLOS DE TRATAMENTO PARA VHB.....	32
3	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	35
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
4	<b>RESULTADOS</b> .....	36
4.1	CAPÍTULO 1: Avaliação do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o tratamento para hepatite B crônica nas Regiões Nordeste e Norte do Brasil.....	36
4.2	CAPÍTULO 2: Genotyping of HBV and tracking of resistance mutations in treatment-naive patients with chronic hepatitis B in the Northeastern and North regions of Brazil .....	53
4.3	CAPÍTULO 3: Mutations Associated With Drug Resistance and Prevalence of Vaccine Escape Mutations In Patients With Chronic Hepatitis B Infection ...	70
4.4	CAPÍTULO 4: Epidemiologia molecular do vírus da Hepatite B no Estado do Acre, Brasil .....	87
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	108
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	116

**APÊNDICE I** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**APÊNDICE II** – Questionário clínico-epidemiológico e revisão do prontuário

**ANEXO I** – Cartas de apoio e financiamento

**ANEXO II** – Aprovação dos CEPs

# 1 INTRODUÇÃO

O Grupo de Pesquisa em Virologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-CPqGM-FIOCRUZ/BA possui equipe multidisciplinar que desenvolve pesquisas há mais de 15 anos com hepatites B e C, atuando na prestação de serviços para a população através de diagnóstico e genotipagem desses vírus. Durante esse período foi estabelecido parcerias com a UFBA, LACEN, HEMOBA, FUNDHACRE, com outros grupos de pesquisa regionais, nacionais e internacionais, produzindo trabalhos para a comunidade científica. Dentre essas parcerias, podemos destacar o Hospital Universitário Professor Edgar Santos HUPES-UFBA, que conta com o Ambulatório Professor Francisco de Magalhães-Neto, especializado nas hepatites virais, e uma equipe de pesquisadores e médicos reconhecidos no cenário nacional como centro de referência ao atendimento dos pacientes com hepatites B e C.

Esta tese de doutorado foi apresentada ao curso de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do CPqGM e visa atender a região Norte e Nordeste, através da avaliação da resistência ao tratamento aos AN, mutações de escape vacinal e genotipagem, realizando um trabalho científico pioneiro, que envolve aspectos clínico-laboratoriais e com um impacto relevante no desenvolvimento científico, formação e transferência de recursos humanos voltados para a análise de mutações virais e suas implicações a para o tratamento da hepatite B crônica, tendo como público alvo, os pacientes assistidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), sob tratamento e virgens de tratamento acompanhados no HUPES-UFBA (Salvador-BA) e FUNDHACRE (Rio Branco-AC).

Nos últimos vinte anos, o tratamento da hepatite B crônica vem sofrendo avanços significativos desde o emprego do interferon alfa (IFN-alfa), que possibilitou alterar a história natural da doença, até a gradual incorporação dos análogos de núcleos(t)ídeo (AN). O uso de IFN-alfa é limitado pelo alto custo, critérios de exclusão e pelos seus eventos adversos, que não ocorrem com o uso dos AN, Entretanto, a administração dos AN por tempo prolongado, como por exemplo, a Lamivudina (LAM), que foi utilizada em monoterapia por quase uma década, produz a emergência de cepas resistentes à droga (mutantes YMDD), que ocorre em até



32% dos pacientes AgHBe positivos, após um ano de tratamento, podendo atingir 70% dos pacientes após quatro ou cinco anos de tratamento.

O advento das mutações de resistência aos AN costuma agravar o quadro clínico de hepatite B crônica, trazendo de volta o risco das complicações hepáticas e, por vezes, produzindo períodos de reativação necro-inflamatória hepática (“*flares*”), rebote virológico com reaparecimento do VHB DNA (“*virological breakthrough*”), devido à resistência genotípica.

Diante deste contexto e com o intuito de beneficiar os pacientes com hepatite B crônica é de grande importância a genotipagem do VHB, o acompanhamento do tratamento antiviral e o levantamento das mutações que favorecem a resistência ao tratamento e o escape vacinal: para o paciente, que recebe um tratamento de difícil aderência pela necessidade por um tempo prolongado, para o médico e o Sistema de Saúde (SUS), que passam a ter um parâmetro técnico para avaliar os Protocolos e Diretrizes Terapêuticas, na decisão por um tratamento mais eficiente, com Resposta Viroológica Sustentada (RVS) e com menos ônus ao sistema de saúde e aos cofres públicos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

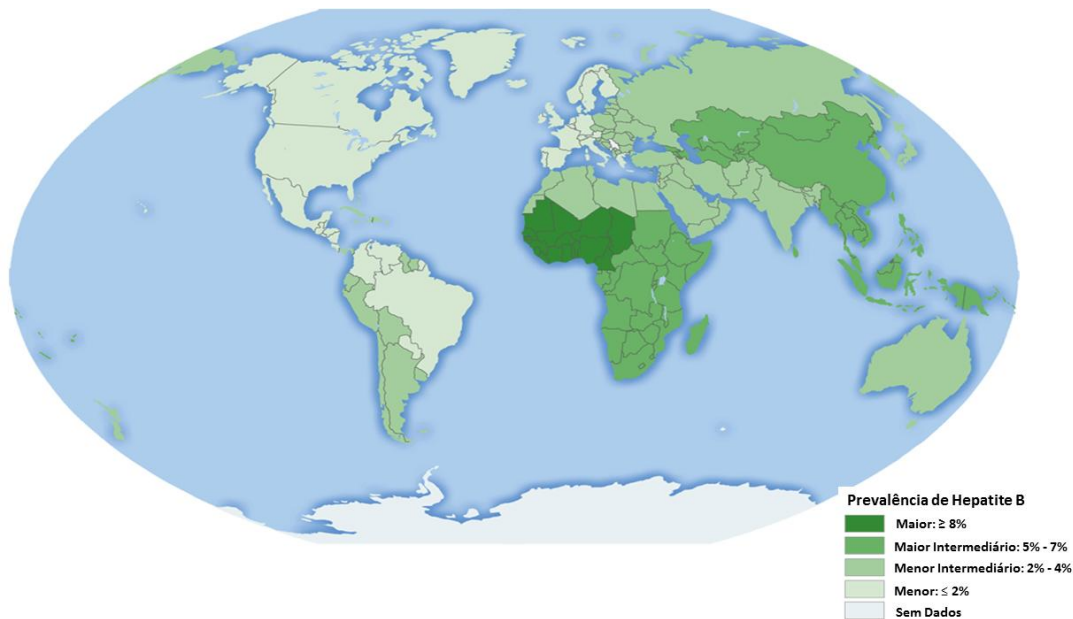
### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DO VHB

O vírus da hepatite B (VHB) é considerado um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo responsável por altos índices de morbimortalidade, podendo evoluir para formas graves como descompensação hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (Chen *et al.*, 2006). A Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou recentemente, a hepatite B crônica como pandemia, e elevou a infecção por VHB como uma das suas prioridades (Trepo *et al.*, 2014)

Apesar de existir vacina segura e eficaz para o VHB há mais de 30 anos, estima-se que 2 bilhões de pessoas já tenham evidência sorológica de infecção pelo VHB, aproximadamente 400 milhões de pessoas estão infectadas cronicamente e aproximadamente 800.000 morrem a cada ano em consequência da hepatite B aguda ou crônica (Kane, 1995; Who, 2008).

A transmissão do VHB pode se dar por diferentes vias, tais como: sexual, vertical, horizontal e parenteral. A via de transmissão está diretamente associada com o padrão de endemicidade da infecção (Ott *et al.*, 2012). O VHB apresenta uma taxa de infectividade de 50 a 100 vezes maior do que a do HIV I/II, e a susceptibilidade à infecção são globais, sendo que, a imunidade para o VHB pode ocorrer por meio de infecção passada ou vacinação (Who, 2010)

O VHB apresenta ampla distribuição geográfica com prevalência global com diferentes níveis de endemicidade nas várias regiões do mundo, sendo classificada em três regiões endêmicas distintas: baixa até 2%, intermediária 2% a 7% e alta, com mais de 7%. A classificação foi baseada nos resultados dos estudos epidemiológicos de prevalência sorológica do antígeno de superfície (AgHBs), que tanto é um marcador sorológico de contato como de infecção crônica, quando presente por mais de 6 meses; e/ou marcador de infecção pregressa resolvida (anti-HBc) em uma determinada população. As áreas consideradas endêmicas são o Sudeste Asiático, a África Central, a região do pacífico Sul e algumas populações indígenas do norte do Alasca e norte do Canadá (Fay, 1990; Silveira *et al.*, 1999; Merrill e Hunter, 2011).(Figura 1)



**Figura 1.** Estimativa da soroprevalência do VHB no mundo (CDC, 2012).

O Brasil foi considerado recentemente como uma área de baixa endemicidade, com prevalência do AgHBs menor que 1%. Estes dados foram resultados do Inquérito Nacional nas Capitais realizado pelo Ministério da Saúde para avaliar a prevalência das hepatites virais (Ministério Da Saúde, 2011). Devido ao Brasil ser um país continental, a infecção pelo VHB costuma ser dinâmica, uma vez que sua prevalência e incidência sofre influência dos hábitos de vida, relações culturais, condições socioeconômicas, distribuição geográfica, movimentos migratórios e grau de exposição ao risco, por todas essas questões listadas que dificultam estabelecer uma realidade da endemicidade, ainda existem poucos estudos sobre hepatite B no território brasileiro muitas vezes restringido a grupos populacionais específicos (Focaccia, 2007; Moreira *et al.*, 2010; Scaraveli *et al.*, 2011).

Estudos epidemiológicos realizados desde a década de 90 demonstraram altas taxas de prevalência para os marcadores sorológicos para VHB, como os estados do Acre, Amazonas e Rondônia Espírito Santo e oeste de Santa Catarina (Ferreira e Silveira, 1997; Silveira *et al.*, 1999; Clemens *et al.*, 2000; Ferreira, 2000; Toledo *et al.*, 2005). Ainda há evidências de uma maior prevalência de VHB em populações com menor complexidade urbana, na Amazônia e em outros bolsões regionais do interior do Brasil (Tavares-Neto *et al.*, 2004; Viana *et al.*, 2005).

No Brasil, a hepatite B é uma doença de notificação compulsória. As notificações por regiões geográficas, entre 1999 e 2011 demonstraram que o Sudeste concentra 36,6% dos casos, seguido do Sul, com 31,6%. Nesse período, tanto o país, quanto as regiões apresentaram crescimento das taxas de incidência (número de casos a cada 100 mil habitantes por ano). No Brasil, a taxa passou de 0,3%, em 1999, para 6,9%, em 2010. A região Sul registra os maiores índices desde 2002, seguida da região Norte. Em relação à provável fonte/mecanismo de infecção atribuída ao final de investigação epidemiológica, em 2011, ainda há um alto percentual de ignorados ou deixados em branco (56,1%). No mesmo ano, dos casos nos quais esse campo foi preenchido, a via sexual é a forma predominante de transmissão (52,7%) (fonte: <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>).

## 2.2 HISTÓRIA NATURAL E ASPECTOS CLÍNICOS DO VHB

A infecção pelo VHB é um processo dinâmico, envolve interações entre vírus-hospedeiro. A hepatite B pode se apresentar nas formas aguda crônica ou fulminante. Durante a infecção pelo VHB, a resposta imune do hospedeiro provoca tanto dano hepatocelular, quanto a eliminação viral. O curso da história natural da infecção crônica do VHB apresenta cinco fases distintas: tolerância imunológica, resposta imunológica AgHBe positiva, inativa, crônica AgHBe negativa, clareamento do AgHBe, incluindo a infecção oculta (Easl e 2012).

Na fase de tolerância imunológica, observa-se elevada replicação viral, representada pela positividade do AgHBe, pelos altos níveis de VHB-DNA, os níveis de ALT/AST (aminotransferases) normais ou baixos e sem evidências de atividade necroinflamatória. Esta fase ocorre predominantemente na transmissão perinatal, sobretudo recém-nascidos de mães AgHBe positivas e, ou nos primeiros anos de vida. Considerada a fase mais contagiosa (EASL, 2012).

A fase de resposta imunológica AgHBe positiva é caracterizada pelo início do reconhecimento do vírus pelo sistema imune do hospedeiro, apresentando aumento e flutuações das aminotransferases e atividade necroinflamatória hepática de moderada a grave. Embora menor do que na fase anterior, os níveis do VHB- DNA permanecem elevados, e ainda há evidências de lesões hepáticas na biópsia (Lok e

Mcmahon, 2009). Esta fase pode durar semanas ou vários anos de tolerância imune, sendo mais freqüente em indivíduos infectados na idade adulta. Esta fase encerra quando ocorre a soroconversão do anti-HBe (EASL, 2012).

O estado de portador inativo do VHB é caracterizado por baixos níveis de replicação viral (níveis baixos ou indetectáveis de VHB- DNA no soro, normalização das aminotransferases e soroconversão AgHBe/anti-HBe)(Hoofnagle et al., 2007; McMahan, 2010). O estado de portador inativo apresenta baixo risco de evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular (EASL, 2012). Para caracterizar um portador inativo, deve-se acompanhá-lo por um ano, a cada 3-4 meses, através dos níveis de aminotransferases, VHB-DNA. AgHBe negativa é encontrada em indivíduos que soroconvertem para o anti-HBe durante a fase imune reativa, ou após anos ou décadas do estado de portador inativo. Representa uma fase imune reativa tardia na história natural da infecção pelo VHB, sendo caracterizada por reativação periódica, flutuação nos níveis de VHB DNA e aminotransferases e hepatite ativa.

A fase AgHBe negativa, apresenta resposta imune tardia, após anos ou décadas como portador inativo. Apresentam mutações nas regiões Pré-Core e/ou promotora basal do core, com risco elevado de progressão para fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepático (EASL, 2012).

Na fase AgHBs negativa, observa-se baixo nível de replicação viral, com VHB- DNA detectável no fígado. Geralmente, o VHB DNA não é detectável no soro, mas o anti-HBc com ou sem anti-HBs são detectáveis. Se a perda do AgHBs for anterior ao surgimento da cirrose, o paciente terá um prognóstico favorável, risco reduzido de evolução para cirrose, descompensação e carcinoma hepatocelular. Ao contrário, se a cirrose já se desenvolveu antes da perda do AgHBs espontaneamente ou por tratamento, o risco de carcinoma hepatocelular se mantém, e o paciente deve ser avaliado no mínimo cada 6 meses (EASL, 2012).

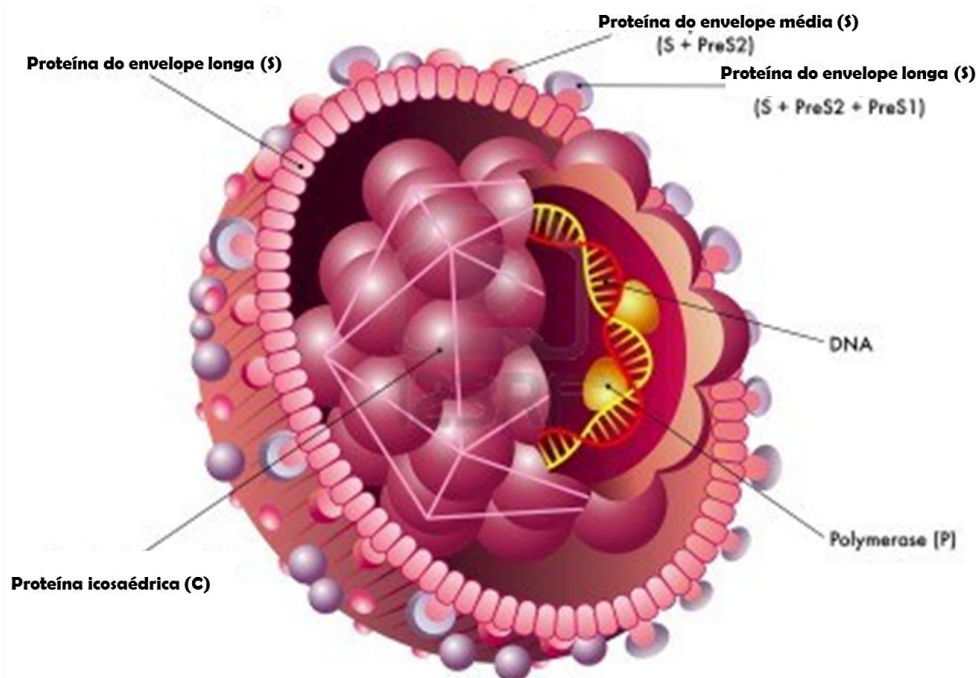
Embora, alguns fatores podem modificar o curso da história natural, contribuindo para a mudança do status clínico da doença e exacerbação da replicação viral. Dentre estes fatores que podem estar envolvidos dentro desse cenário são as coinfeções virais, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite C (VHC) e vírus da hepatite delta (VHD). Fatores isolados como o alcoolismo crônico, uso de drogas hepatotóxicas e imunossupressão são condições que podem alterar o curso clínico da doença e/ ou exacerbar a replicação do VHB (Ferreira, 2000). No entanto, evidências recentes sugerem que as fases não são tão

distintas como se acreditava anteriormente, o que desafia as diretrizes de tratamento.

### 2.3 O VÍRUS DA HEPATITE B (VHB)

O VHB, também conhecido como partícula de Dane, com aproximadamente 42 nanômetros (nm) de diâmetro, pertence ao gênero *Orthohepadnavirus* da família *Hepadnaviridae*. Os membros dessa família apresentam tropismo por hepatócitos e possuem uma estrutura morfológica semelhante entre si.

O VHB apresenta externamente o envelope viral, constituído principalmente pelo antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs), e internamente, o nucleocapsídeo ou core (Figura 2). Essa estrutura possui simetria icosaédrica, sendo formada pelo antígeno do core (AgHBc) e pelo genoma viral (DNA), que se encontra associado à enzima DNA polimerase/transcriptase reversa (Tiollais *et al.*, 1985; Befeler e Di Bisceglie, 2000).



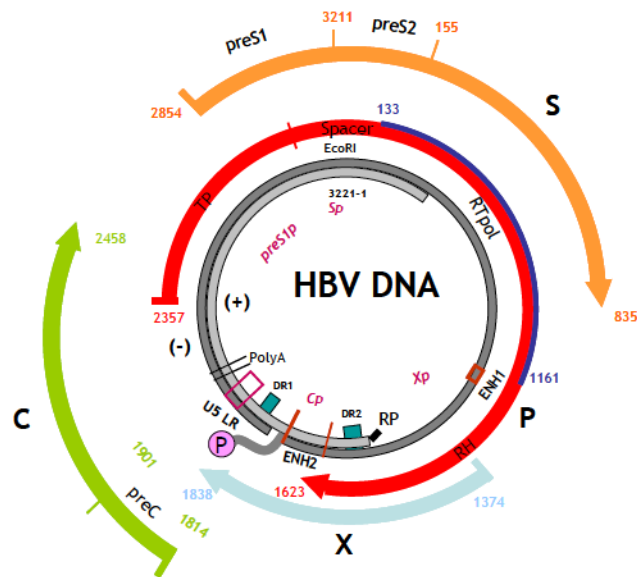
**Figura 2.** Estrutura do virion do VHB.

## 2.4 MORFOLOGIA, ESTRUTURA GENÔMICA DO VHB

O genoma do VHB é considerado um dos menores dentre os genomas de vírus que infectam o homem (Rapicetta *et al.*, 2002). Apresenta uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla. A fita incompleta é de polaridade positiva. Já a fita completa tem polaridade negativa, sendo complementar ao RNA mensageiro viral. O genoma do VHB possui um comprimento de aproximadamente 3200 pares de base (3,2 Kb) com quatro regiões de leitura aberta (ORF, do inglês “*Open Reading Frame*”) que se superpõem: Pré-S1/Pré-S2/S, Pré C/C, X e P. Estes genes são responsáveis pela codificação das três proteínas do envelope ou fita curta (S), média (M), longa (L), que constituem os antígenos de superfície do VHB (AgHBs), a proteína do core (AgHBc), proteína nuclear (AgHBe), proteína X e a polimerase viral (P). A fita longa (fita L, de polaridade negativa) é completa e possui uma redundância terminal de 8 a 9 nucleotídeos na sua extremidade 5’, na qual está ligada uma DNA polimerase pré-elaborada (Ganem, 2001; Kay e Zoulim, 2007). Por sua vez, a fita curta (fita S, de polaridade positiva) é incompleta e possui um oligoribonucleotídeo ligado à sua extremidade 5’ (Delius *et al.*, 1983; Ganem, 2001; Rehmann e Nascimbeni, 2005; Kay e Zoulim, 2007). Enquanto a sua extremidade 5’ é fixa, a sua extremidade 3’ é inconstante, de modo que confere à fita S um tamanho variável, possuindo no mínimo até 50% do comprimento da fita mais longa (Summers *et al.*, 1975; Delius *et al.*, 1983; Kay e Zoulim, 2007). Na extremidade 5’ de ambas as fitas estão presentes pequenos domínios repetitivos (cerca de 11 nucleotídeos) denominados DR1 e DR2 (Ganem, 2001).

O ORF do gene P ocupa 80% de todo o genoma e codifica a enzima DNA polimerase viral que possui A polimerase viral pode ser dividida em quatro regiões, representadas na Figura3: (i) domínio amino-terminal, que atua como proteína terminal ou primase, sendo importante para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa, (ii) região “espaçadora”, que parece não ter função específica, (iii) domínio de transcriptase reversa, que contém sete motivos denominados de A a G e (iv) domínio carboxi-terminal (ou C), que exibe atividade de RNase H (Seeger e Mason, 2000; Sablon e Shapiro, 2005). A polimerase viral possui o motivo YMDD (Tirosina-Metionina-Aspartato- Aspartato), que é parte do sítio ativo do domínio C,

presente também na transcriptase reversa (RT). O uso prolongado de AN pode favorecer o surgimento de mutações de resistência do VHB no gene P (Lai et al., 2003; Craxi et al., 2006).



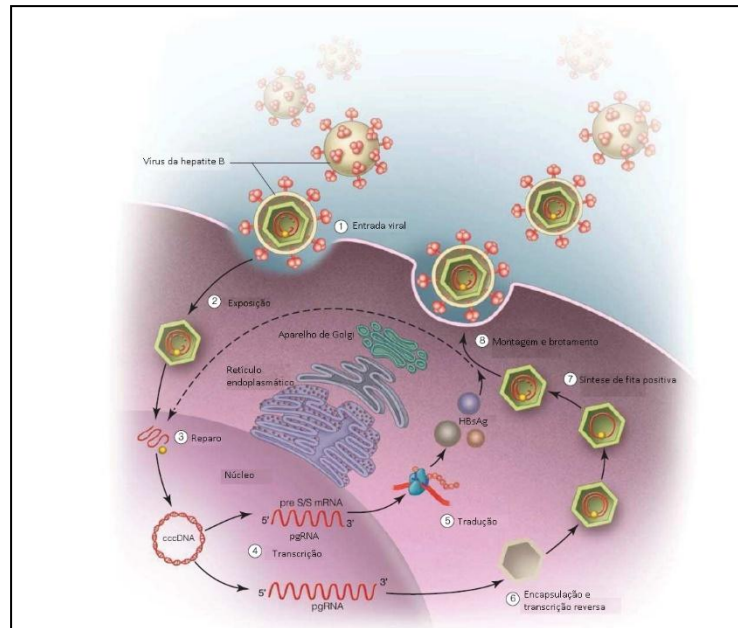
**Figura 3.** Representação esquemática do genoma do VHB.

## 2.5 REPLICAÇÃO DO VHB

A replicação do VHB ainda não está totalmente esclarecida, mas os estudos apontam que o vírus liga-se a um receptor ainda desconhecido na célula hepática do hospedeiro através das proteínas L, M e S. Ao penetrar na célula, o VHB perde o envelope e o core e o DNA do VHB (VHB-DNA) é transportado até o núcleo, onde é convertido em uma molécula de DNA intermediário circular fechado covalentemente (cccDNA, do inglês *covalently closed circular DNA*) pelo próprio sistema de reparo da célula do hospedeiro. O cccDNA servirá como molde para a transcrição do RNAm pré-genômico e RNAm para síntese das proteínas do core, superfície, polimerase e X. O RNA pré-genômico migra ao citoplasma e produz a fita negativa do DNA, pela ação da transcrição reversa viral, formando um complexo RNA/DNA. Então, a fita negativa do DNA servirá como molde para a síntese da fita positiva incompleta pela ação da polimerase viral. Por fim, o VHB-DNA é envelopado para produzir novas



partículas virais ou penetra novamente no núcleo, para manter o ciclo de replicação viral (Lok, 2001; Madigan, 2003).



**Figura 4.** Representação esquemática da replicação do VHB.

## 2.6 GENÓTIPOS DO VHB

A análise filogenética das sequências genômicas dos isolados em várias regiões geográficas permitiu a caracterização da diversidade do VHB definida em até o presente momento em 10 genótipos e 9 subtipos com base nas diferenças das sequências de nucleotídeos do gene pré S/S ou do genoma completo. Utiliza-se como padrão que diferentes genótipos devem apresentar uma divergência  $\geq 8\%$  e que a determinação dos sub-genótipos de um mesmo genótipo deve apresentar divergência  $> 4\%$  em sua sequência de nucleotídeos (Okamoto H, 1988; Norder H, 1994; Stuyver L, 2000; Arauz-Ruiz P, 2002).

O genótipo A é normalmente é identificado em indivíduos brancos e negros encontrados no noroeste da Europa, América do Norte e regiões da África; os genótipos B e C em indivíduos asiáticos do extremo leste, China e Japão; o D é cosmopolita, mas prevalece em países dos Bálcãs, Oriente Médio, podendo entender-se até a Índia; o genótipo E está restrito a áreas do oeste sub-Saara; o

genótipo F é predominante entre índios da América Central e do Sul; o genótipo G é encontrado nos EUA e França; e o genótipo H foi recentemente encontrado na América Central (Echevarri´A, 2006; Mitre, 2010). O genótipo I foi descrito no Vietnã, Laos e China e o genótipo J no Japão (Locarnini *et al.*, 2013).

Os genótipos circulantes descritos para o Brasil são respectivamente o A, D e F (Sitnik *et al.*, 2004; Mello *et al.*, 2007; De Oliveira *et al.*, 2008). O genótipo F é mais frequente na população indígena na região Norte do país (Viana *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010). O Brasil apresenta uma diferença em relação aos países da América Latina, onde a sua grande maioria, o genótipo F é o mais frequente e importante (Alvarado-Mora e Pinho, 2013).



**Figura 5.** Distribuição dos genótipos do VHB em diferentes regiões do mundo (a); Distribuição dos genótipos e sub-genótipos do VHB na América Latina (b) (Fonte: CDC, 2010; (Alvarado-Mora e Pinho, 2013)

## 2.7 TRATAMENTO ANTIVIRAL PARA VHB

Nas últimas duas décadas, muitos avanços têm sido alcançados em relação ao tratamento para VHB, com redução das taxas de morbimortalidade. O objetivo do tratamento com antivirais é alcançar a resposta virológica sustentada (RVS), com supressão da replicação do VHB-DNA e negatização da carga viral (VHB-DNA) após a suspensão do tratamento, apresentando uma resposta bioquímica, normalização dos níveis de ALT/AST, melhora histológica hepática e diminuição da progressão dos danos hepáticos. Entretanto, a eficácia do tratamento antiviral, está atrelada a outros fatores que podem comprometer a RVS, como eventos adversos, baixa aderência ao tratamento, tratamento prévio, mutações de resistência, indicação de tratamento inadequado de acordo com o quadro clínico e variação genética do indivíduo (Zoulim e Locarnini, 2009).

Entre as opções farmacológicas para o tratamento do VHB, duas estão disponíveis, os Interferons (IFN-  $\alpha$  ou IFN-peguilado) e os AN. Há quase 20 anos o Sistema Único de Saúde (SUS) tem oferecido tratamento para os pacientes com VHB crônica, inicialmente com o IFN- $\alpha$  e a LAM e na atualidade cinco drogas estão aprovadas pelo Ministério da Saúde: IFN-  $\alpha$ , Lamivudina (LAM), Adefovir (ADV), Tenofovir (TDF) e Entecavir (ETV). Os AN tem a capacidade de interferir na atividade da transcriptase reversa (RT) do gene da polimerase viral (P) (Tillmann, 2007; Brasil, 2011).

O IFN foi a primeira linha de tratamento utilizado no tratamento para VHB podendo levar a resposta sustentada (perda do DNA-VHB e do AgHbe) em até um terço dos casos tratados. O tratamento com IFN tem a vantagem de ser de curta duração, não desenvolve resistência antiviral e entre as desvantagens está relacionada a administração do Interferon  $\alpha$  (IFN-  $\alpha$ ; de 5 MU a 10 UM três vezes por semana, via subcutânea, por, pelo menos, três meses), e diversos eventos adversos observados durante o tratamento.

Alguns AN têm demonstrado uma maior aceitação, segurança, menos contraindicações e efeitos colaterais quando comparados ao IFNs (Lok, 2001; De Souza, 2002). Entretanto, RVS normalmente não é atingida após o período de um ano, levando a tratamentos mais longos ou mesmo com prazo indeterminado. Apesar da eficácia na atividade antiviral, o uso prolongado dos AN, principalmente a

LAM, tem demonstrado o potencial para o desenvolvimento de resistência do VHB (Da Silva 2000; Thompson, 2006; Bottecchia, 2008; Haddad, 2010).

Muitas vezes, a resistência pode ser evidenciada pela persistência do AgHBe ou pela elevação da carga viral durante o curso do tratamento, associadas a mutações do VHB-DNA, cabendo ao médico analisar os riscos e os benefícios do tratamento (De Souza, 2002). Entretanto, a pesquisa de mutações do VHB-DNA é preponderante para identificar mutantes resistentes. Quanto maior o tempo de tratamento maior a probabilidade de surgir mutantes resistentes, apresentando um coeficiente de incidência de 6%, 31% e 51% em 12, 24 e 48 meses respectivamente. Estima-se que a resistência pode aparecer a partir do 9º mês de tratamento (Thompson, 2006). Entretanto, aproximadamente 25% dos pacientes que continuaram o tratamento depois da detecção de mutantes resistentes podem obter negatificação do AgHBe (Liaw Yf, 2000).

A LAM foi o primeiro AN a ser aprovado para o uso na hepatite crônica pelo VHB, em 1998. É um potente inibidor da replicação viral, com supressão do VHB-DNA em 60-70% diminuindo a taxa de fibrose e a incidência de CHC. Todavia, apresenta entre os AN alta taxa de mutação de resistência.

O ADV tem eficácia comparável à LAM, entretanto apresenta como vantagem menor desenvolvimento de resistência. Foi aprovado no Brasil em 2004 para o tratamento do VHB no SUS (Saúde, 2006). No Protocolo de Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde, recomenda-se o uso como terapia de resgate principalmente, associado com LAM, ETV ou TDF.

O ETV e o TDF são a primeira linha de tratamento desde a aprovação e incorporação no Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas desde 2009, por demonstrar nos estudos clínicos, atividade em controlar a replicação do VHB, e estão associados com mínimo risco de desenvolvimento de mutações de resistência antiviral, devido à alta barreira genética, mesmo em tratamento longos, como no caso são os tratamentos por AN. Outras drogas, tais como emtricitabina e clevudine, poderão se tornar, em futuro próximo, novas armas no controle do VHB, entretanto, essas drogas ainda não estão aprovadas pela ANVISA.

O desenvolvimento de antivirais com alta potência e novas associações de medicamentos, conjuntamente com a melhor compreensão dos mecanismos de resistência do VHB são importantes conquistas para melhorar a eficácia do

tratamento e diminuir, a carga global de portadores do VHB (Ferreira e Borges, 2007).

## 2.8 MUTAÇÕES NO GENOMA DO VHB

Passados quase 30 anos do primeiro estudo que teve como objetivo estimar a taxa de mutação do VHB, através do advento da biologia molecular (Okamoto *et al.*, 1987), foi observado desde então que o VHB apresenta a taxa mais alta de mutação entre os vírus de DNA. O VHB tem elevada taxa de replicação, com  $10^{12}$  virions produzidos por dia e uma taxa de mutação de aproximadamente  $10^5$  substituição/base/ciclo. O equivalente a cerca de  $10^{10-11}$  mutações pontuais produzidos por dia em indivíduos com replicação ativa (Nowak *et al.*, 1996). As mutações cumulativas no genoma do indivíduo refletem a pressão seletiva do próprio vírus ou da resposta imune do hospedeiro.

As mutações no genoma do VHB tem ganhado destaque e sendo alvo de inúmeros estudos científicos pelo o impacto biológico e clínico, sendo as mais importantes às mutações do pré-core do gene C, escape vacinal no gene S e as mutações de resistência aos AN no gene P (Quadro 1).

**Quadro 1.** Importância clínica das mutações do VHB.

Mutação VHB	Localização no genoma VHB	Fator de risco	Significância clínica
Resistência Antiviral (RT)	P (polimerase)	Tratamento com análogos de nucleos(t)ídeos (AN)	Desenvolvimento de resistência aos AN
Pré-core	C (core)		Ausência de produção de AgHBe
Escape Vacinal	"a" determinante do gene S	Vacina e imunoglobulinas	Aumento do risco de CHC; Infecção oculta de VHB;

Adaptado de Elgouhari *et al.*, 2008.

A região do gene C, é importante para a expressão do marcador de replicação do VHB, o AgHBe. Uma das mutações mais importantes pela frequência que ocorrem, a troca da guanina (G) no nucleotídeo 1896, por uma adenina (A) que altera o códon 28 da proteína AgHBe, inicialmente UGG para UAG (códon de terminação) para a tradução proteica, não permitindo a expressão do AgHBe. Os pacientes que apresentam a mutação na região do pré-core no gene C, que não secretam o AgHBe, tem risco em evoluir para as formas mais graves da doença hepática, como cirrose e também para hepatite fulminante.

O genoma compacto do VHB apresenta uma característica interessante que está relacionada à organização das quatro fases de leitura que estão parcialmente sobrepostas, onde o gene S é completamente sobreposto pelo gene P. Sendo assim, uma mutação no gene S pode repercutir produzindo alterações também no gene P, por consequência desta sobreposição (Ganem, 2001; Liu et al., 2005). Igualmente, uma mutação no gene da P repercute no gene S, induzindo alterações no mesmo (Stuyver et al., 2001). Esta sobreposição entre os genes S e o da P dentro do genoma do VHB faz com que uma mutação no gene S induzida por imunoterapias, como vacinação ou imunoglobulina da hepatite B, pode induzir também a uma mutação no gene da polimerase viral, influenciando, portanto na replicação do VHB.

Várias mutações no gene S têm sido identificadas, sendo consideradas como mutações de escape vacinal, principalmente as localizadas no determinante "a" do AgHBs, localizadas entre os aminoácidos 124-147. A primeira mutação descrita e que causa interrupção da expressão de determinantes do AgHBs foi a G-145-A, substituição do aminoácido Gly na posição 145 pelo aminoácido Arg, sendo considerada a mais comum e a mais estudada (Carman et al., 1990; Oon et al., 1999), outras mutações também foram descritas como A-144-A, M-133-L, G-129-H, T-118-V, P-120-T, G-128-R, G-130-N, K-141-E, R-169-P e G-119-E, associadas com escape imune (Carman, 1997; Cooreman et al., 2001; Khan et al., 2004). Essas mutações geram preocupação, principalmente, porque os vírus com essas mutações no gene S, podem não ser neutralizados pelos anticorpos causando infecção pelo VHB em indivíduos vacinados. Entretanto, podem complicar as estratégias de vacinação, dentre as mutações a G-145-A pode se tornar comum nas próximas décadas (Wilson et al., 1999). As mutações do gene S (AgHBs) de escape vacinal

podem desempenhar futuramente, um papel importante na compreensão do modelo de evolução do VHB (Kay e Zoulim, 2007).

As mutações no gene S estão relacionadas ao escape vacinal, as mutações no gene P, as da região da *rt* estão relacionadas às mutações de resistências aos AN. O tratamento antiviral com os AN representa uma pressão seletiva exógena do qual determina a vantagem de sobrevivência das cepas mutantes do VHB (Sheldon e Soriano, 2008).

As mutações de resistência podem ser de dois tipos, associadas com a falha terapêutica, são as mutações de resistência primária, que são diretamente responsáveis pela resistência e as mutações de resistência secundárias ou compensatórias, que são responsáveis por promover ou aumentar a replicação viral (Lok et al., 2007). Mutações secundárias emergem devido a seleção de alterações associadas a resistência na polimerase viral, usualmente, com custo na eficiência da replicação viral, essas mutações secundárias são muito importantes no contexto das mutações de resistência.

As mutações de resistência primárias ou secundárias do VHB, são descritas através de um consenso que criou um sistema de nomenclatura baseado nas quatro regiões do gene P, sendo elas a amino terminal, espaçadora, *rt* e carboxi-terminal, que possui 344 aminoácidos. A notação da mutação, inicia-se com a região, no caso das mutações de resistências aos AN, a *rt*, seguida do aminoácido original, a posição e o aminoácido resultante da mutação, como por exemplo, a mutação mais frequente, associada a LAM, *rtM2014I* (Stuyver et al., 2001; Lok et al., 2007).

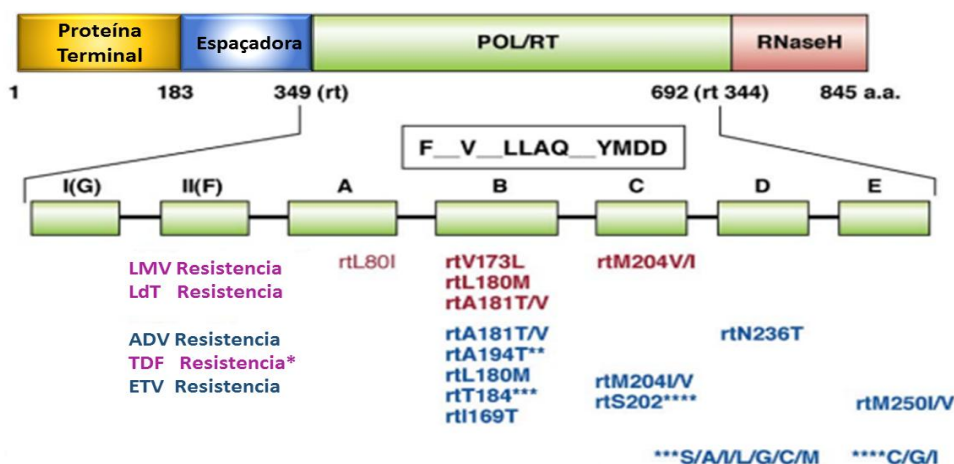
A mutação *rtM2014I* está localizada na sequência denominada YMDD (Y=tirosina, M=metionina, D= ácido aspártico) localizada no domínio C (domínio catalítico) do VHB. Uma delas se caracteriza pela substituição do aminoácido metionina na posição 204 pela valina (variante YVDD: Y= tirosina; V= valina; D= ácido aspártico; transcriptase reversa M204V, população ocidental) ou isoleucina (variante YIDD: Y= tirosina; I= isoleucina; D= ácido aspártico; *rtM204I*, população oriental). O aparecimento de mutações YMDD está associado à exarcebação aguda da hepatite B, acompanhada por um rápido aumento da carga viral e dos níveis sorológicos de ALT (Dettke et al., 2001; Bottecchia, Souto, et al., 2008). No domínio B, tem sido identificadas mutações secundárias, de resistência à LAM, *rtL180M*, *rtV173L* e *rtA181T/V* (Delaney et al., 2003). A LAM apresenta baixa barreira genética, com desenvolvimento de resistência em 14 a 32% dos pacientes, após 1

ano de tratamento, podendo chegar a 70% em 4 anos (Lai et al., 1998; Lok et al., 2003; Chang et al., 2004).

Mutações de resistência ao ADF são encontradas nos domínios B e D, sendo as N236T e A181TV, as principais descritas, apresenta em 5 anos de duração de tratamento uma taxa de mutação de 29% (Angus et al., 2003; Villeneuve et al., 2003; Hadziyannis, 2006). Mutações de resistência ao ETV foram mapeadas no domínio B, rtI169T, rtI180M e rtS184G, e no domínio C, rtS202I e rtM204V, no domínio E, a mutação rtM250V, essas mutações foram descritas em terapia de resgate com pacientes com tratamento prévio com LAM, que houve falha de tratamento, sendo as mutações mais frequentes. O ETV é considerado entre as opções terapêuticas de baixa resistência, ou seja, com alta barreira genética, em 6 anos de terapia com pacientes virgens de tratamento a taxa foi de 1,2% de mutações de resistência (Tenney et al., 2004; Chang et al., 2010) . Até o presente momento não foram encontradas mutações de resistência para o TDF em pacientes em monoterapia, apenas em pacientes co-infectados com HIV, ou pacientes tratados previamente com LAM, a mutação encontrada nesses casos foi a rtA194T, também é considerado junto com o ETV de alta barreira genética (Sheldon et al., 2005; Delaney et al., 2006). Dentre as mutações de resistência mapeadas, observou-se que oito códons do VHB do gene P da rt, estavam associados com mutações de resistência primária aos AN: 169,180,181,184,202,204,236,250 (Figura 6)

Durante a terapia antiviral, foi observado que o tratamento com AN podem induzir mutações de resistência tanto no gene P da rt, mas também no gene S (Bartholomeusz e Locarnini, 2006; Hollinger, 2008; Sheldon e Soriano, 2008). Na literatura, está bem descrito com os AN, LAM e o ADV onde foi observado mutações tanto no gene P quanto na região Pré-S1, Pré-S2 e S. A mutação rtA181T, gera stop códons na sobreposição do gene S no aminoácido 172 (sW172-stop), como também a mutação rtM204I, que gera a mutação sW196-stop. A mutação do ETV, rtT184M, gera a mutação a sL176-stop (Warner e Locarnini, 2008; Yeh, 2010).





**Figura 6.** Localização das mutações de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos nos domínios rt do gene do VHB.

No Brasil poucos estudos foram realizados com o objetivo de rastrear as mutações com terapia antiviral nos pacientes com hepatite B crônica tratados com AN ou virgens de tratamento. Apesar do grande número de estudos que abordam a nível mundial as diferentes estratégias terapêuticas e suas consequências clínicas e virológicas, apenas alguns poucos estudos relatam a situação do tratamento antiviral no Brasil para os pacientes com hepatite B crônica. As maiorias destes estudos se concentram na ocorrência de mutações de resistência a LAM (Da Silva *et al.*, 2001; Bottecchia, Ikuta, *et al.*, 2008; Haddad *et al.*, 2010), principalmente em pacientes co-infectados com HIV / VHB (Santos *et al.*, 2004; Sucupira *et al.*, 2006; Pessoa *et al.*, 2008; Mendes-Correa *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010). Recentemente, foi publicado um trabalho com pacientes virgens de tratamento, onde foi observada uma baixa frequência (1,6%) de mutações de resistência nos pacientes não tratados. Estes resultados podem sugerir que a propagação e seleção natural de cepas do VHB resistentes a droga é um evento raro ou a maior parte das cepas podem permanecer instável na ausência de pressão seletiva aos AN (Haddad *et al.*, 2010; Mello *et al.*, 2012; Gomes-Gouvea *et al.*, 2015).

## 2.9 PROTOCOLOS DE TRATAMENTO PARA VHB

Nos últimos anos com os avanços no tratamento para VHB e o acúmulo de conhecimento científico, incorporando o movimento internacional da Medicina Baseada em Evidências, e na opinião e experiência dos profissionais de saúde, as Associações do Estudo do Fígado como a Americana, Europeia e Asiática (AASLD, EASL e APASL), elaboraram normas de orientação clínica (guidelines) ou protocolos de tratamento, um guia racional de decisão de tratamento pautados no status clínico, níveis de VHB-DNA, níveis de ALT/AST, status de AgHBe e atividade necroinflamatória e fibrose hepática (Lok, 2015)EASL, 2012).

No Brasil até 2009, o Protocolo de Tratamento para VHB do Ministério da Saúde recomendava apenas o IFN e a LAM como opções terapêuticas. Paralelamente, os Estados adotavam tratamentos independentes da recomendação do protocolo clínico. Visando universalizar a nível nacional, padronizar e centralizar a compra de medicamentos no âmbito do SUS, em 2011 o Ministério da Saúde lançou um novo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções, que incorporou o ADF, ETV e TDF e categorizou os algoritmos de tratamentos, opções de terapia de resgate aos pacientes com resistência antiviral e co-infectados. Dentre as opções terapêuticas, quando se trata da prescrição de AN, o ETV e o TDF despontaram como primeira linha de tratamento, devido ao baixo risco de desenvolver a longo prazo resistência antiviral (Brasil, 2002; 2011).

Os algoritmos de tratamentos do Protocolo Clínico (2011) foram divididos em: 4.1 - indivíduos virgens de tratamento, AgHBe reagente e não cirróticos, 4.2 - indivíduos virgens de tratamento, com AgHBe não reagente e não cirróticos e 4.3 - indivíduos virgens de tratamento, cirróticos, com AgHBe reagente ou não reagente.

Os pacientes alocados para o algoritmo 4.1, os que apresentarem os níveis de ALT normal, devem ser monitorados a cada três meses, a biópsia hepática é facultativa, caso ela seja realizada é o resultado seja A2/F2 deve-se indicar como tratamento o IFN- $\alpha$ . Os pacientes que apresentarem os níveis de ALT alterada, acima do valor de referência devem ser indicados para o tratamento com IFN-  $\alpha$ , com o tempo de tratamento de 16 a 24 semanas. Para os que responderem o tratamento, os respondedores sorológicos (AgHBe negativo, anti-HBe positivo, deve-

se monitorar a ALT a cada 6 meses e o VHB-DNA anualmente. Os respondedores parciais (AgHBe negativo e anti-HBe negativo) e os não respondedores (AgHBe positivo e anti-HBe negativo) deve-se solicitar VHB-DNA, e quando a carga viral for acima de  $10^4$  cópias/mL ou  $>2.000\text{UI/mL}$  deve-se indicar o tratamento com TDF, se houver restrição ao uso, devido a sua nefrotoxicidade, indica-se o ETV.

Os pacientes alocados para o algoritmo 4.2, os que apresentarem os níveis de ALT normal indica-se monitorar os níveis de ALT e VHB-DNA a cada seis meses. Para os pacientes que apresentarem os níveis de ALT alterada, e os níveis de VHB-DNA for  $<10^3$  ( $<200\text{UI/mL}$ ), monitorar ALT e VHB-DNA a cada 6 meses, entretanto, os que apresentarem os níveis de carga viral acima de  $10^3$  ( $\geq 200\text{UI/mL}$ ) e  $<10^4$  ( $<2000\text{UI/mL}$ ), os resultados de biopsia hepática iram definir a indicação ao tratamento, se for  $<A2/F2$ , deve-se monitorar a cada seis meses os níveis e ALT e VHB-DNA, se o resultado for acima de A2/F2 deve-se indicar o tenofovir, até a conversão sorológica do AgHBs e a negativação do VHB-DNA, caso haja contra-indicação, indica-se o ETV.

Os pacientes alocados para o algoritmo 4.3, com cirrose Child B e C, ou serão indicados para a lista de transplante ou tratados com ETV ou TDF, caso o paciente soroconverta para AgHBe negativo, e os níveis de VHB-DNA estejam indetectáveis, deve-se monitorar os níveis de ALT/AST a cada três meses e o VHB-DNA a cada 6 meses, o tratamento deve ser encerrado após 6 meses da RVS. Os pacientes classificados como Child A, independente dos níveis de ALT/AST normal ou alterada e os níveis de carga viral, devem ser tratados com ETV ou TDF, os que converterem o AgHBs para negativo e VHB-DNA indetectável, devem continuar o tratamento até 6 meses após a negativação do VHB-DNA e a conversão sorológica.

O protocolo também aborda o manejo para os pacientes com resistência antiviral aos AN, simplificando através de um quadro didático as opções de resgate ao tratamento (Quadro 2). Apesar não estar disponível no SUS, através das ferramentas de biologia molecular o rastreamento de mutações de resistência aos AN, os pacientes que apresentam falha ou não resposta devem realizar a terapia de resgate.

O futuro do tratamento antiviral para VHB e do manejo dos pacientes com VHB crônica deve estar pautado na produção científica através das pesquisas e ensaios clínicos, principalmente nos mecanismos da patogênese, rastreamento das mutações de resistência e novas estratégias terapêuticas para o VHB que visa

aumentar a supressão viral e a prevenção da resistência antiviral e suas complicações, como também um diagnóstico rápido e preciso, que direcione a conduta terapêutica, tanto para o rastreamento das mutações, como também para a prevenção do CHC. A medicina personalizada vem ganhando atenção nos últimos anos, podendo se tornar uma tendência, analisando cada indivíduo com os seus fatores genéticos e suas características ambientais, sociais e como da própria doença, comorbidades, direcionando para o início do tratamento, com o máximo de benefício, minimizando os eventos adversos e no caso dos pacientes com VHB crônicos a RVS (Zoulim e Locarnini, 2009; Lok, 2015).

**Quadro 2.** Manejo de resistência aos análogos de núcleos(t)ídeos.

Terapêutica em uso	1ª opção de resgate	2ª opção de resgate
LAM	LAM + TDF ou TDF**	ETV
LAM+ADF	LAM + TDF ou TDF	ADF + ETV ou ETV
ADF	LAM* + TDF ou TDF**	ADF + ETV ou ETV
INF $\alpha$	TDF	ETV
ETV	ETV + TDF ou TDF	ADF + ETV
TDF	Até o momento, não há estudos com relato de resistência do VHB ao tenofovir	

Siglas - LAM: lamivudina; ADF: adefovir; TDF: tenofovir; ETV: entecavir; INF $\alpha$ : interferon-alfa; VHB: vírus da hepatite B

\* Se não há uso prévio de lamivudina ou resistência à mesma.

\*\* Intolerância ou contraindicação ao TDF: indicar resgate com LAM + ADF

(Fonte: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B)

O protocolo também engloba as coinfeções associadas ao VHB, como HIV, VHC e VHD, oferecendo recomendações para que os pacientes sejam tratados de acordo com o quadro clínico e dentre o leque de opções terapêuticas liberadas pelo o Ministério da Saúde. Sem dúvida, o novo Protocolo Clínico para manejo do VHB, foi um marco e um avanço para o tratamento e incorporação de novos medicamentos, e que devem ser revisados e atualizados periodicamente, acompanhando a evolução do conhecimento técnico e científico.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de tratamento antiviral e mutações de resistência ao tratamento com análogos de núcleos(t)ídeos e de escape vacinal em pacientes com hepatite B crônica.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar e traçar o perfil de tratamento comparando ao Protocolo de Diretrizes Terapêuticas para hepatite B crônica do Ministério da Saúde nos estados da Bahia e Acre;
- b) Determinar as mutações de resistência primária e secundária, mutações de escape vacinal e genótipos e subgenótipos circulantes dos pacientes virgens de tratamento com hepatite B crônica antes do início da terapia antiviral;
- c) Determinar as mutações de resistência primária e secundária, mutações de escape vacinal e genótipos e subgenótipos circulantes dos pacientes em tratamento com hepatite B crônica;

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 CAPÍTULO 1: Avaliação do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o tratamento para hepatite B crônica nas Regiões Nordeste e Norte do Brasil**

O artigo 1 refere-se aos objetivo específico a) desta tese. Este artigo encontra-se aceito para publicação pela Revista Brasileira de Clínica Médica em outubro de 2015. Publicação prevista para abril/2016

**Título:**

AVALIAÇÃO DO PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO PARA HEPATITE B CRÔNICA NAS REGIÕES NORDESTE E NORTE DO BRASIL

**Title:** ANALYSIS OF CLINICAL PROTOCOL AND GUIDELINES THERAPEUTIC FOR TREATMENT FOR CHRONIC HEPATITIS B IN NORTHEAST BRAZIL AND REGIONS NORTH

CEP-HUPES: Protocolo: 31177 /12: CAAE 01315812.0.0000.0049

CEP-FIOCRUZ: Protocolo: 238/2011 CAAE: 04074012.2.0000.5009

CEP-FUNDHACRE: Protocolo: 144.499/12 CAAE: 04074012.2.0000.5009

Declaro que não há conflitos de interesse por parte dos autores.

**Autores:**

Sidelcina Rugieri Pacheco (1)

Maria Isabel Magalhães Andrade dos Santos (1)

Maria Isabel Schinoni (2)

Raymundo Paraná (2)

Mitermayer Galvão dos Reis (1)

Luciano Kalabric Silva (1)

(1) Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz- Fundação Oswaldo Cruz

(2) Universidade Federal da Bahia

**Abstract:** In Brazil the treatment for Hepatitis B conical, has been provided by the National Health System for over 10 years. The aim was to evaluate the treatment of patients with chronic hepatitis B in two reference centers in Viral Hepatitis in the Northeast and North of Brazil, compared to the Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines Hepatitis B of the Ministry of Health. The study included 527 patients in outpatient care. In algorithm 4.1 it was observed that there is a difficulty in following the recommendation of the Ministry of Health in two reference centers, 78.9% and 72% northeast and north respectively. The 4.2 algorithm, the algorithm was presented in general more than 90% follow-up on the recommendation of the Clinical Protocol because patients are mostly negative HBeAg. The algorithm 4.3

approximately 85% of patients in the Northeast was in the recommendation of the Clinical Protocol for chronic hepatitis B, however, no patients in the Northern Region. The Clinical Protocol Therapeutic Guidelines for Hepatitis B was a big step and advance. An important tool within the reality of treatment for hepatitis B and it was possible to incorporate new drugs and treatment indicators grounded in Evidence-Based Medicine and the International Consensus by the Ministry of Health.

Key words: antiviral treatment, hepatitis B, guidelines

**Resumo:** No Brasil o tratamento para hepatite B crônica, tem sido disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde há mais de 10 anos. O objetivo foi analisar o tratamento dos pacientes com hepatite B crônica, em dois Centros de Referência em Hepatites Virais na Região Nordeste e Norte do Brasil, comparando com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hepatite B do Ministério da Saúde. Foram incluídos no estudo 527 pacientes em atendimento ambulatorial. No algoritmo 4.1 foi observado que existe uma dificuldade em seguir a recomendação do Ministério da Saúde, nos dois serviços de referência, 78,9% e 72% Região Nordeste e Norte respectivamente. O algoritmo 4.2, foi o algoritmo que apresentou no geral mais de 90% de seguimento na recomendação do Protocolo Clínico, devido que os pacientes são na sua grande maioria AgHBe negativo. O algoritmo 4.3 aproximadamente 85% dos pacientes da Região Nordeste estava dentro da recomendação do Protocolo Clínico para Hepatite B crônica, entretanto, nenhum paciente da Região Norte. O Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B foi um grande passo e avanço. Uma ferramenta importantíssima dentro da realidade do tratamento para hepatite B e foi possível incorporar novas drogas e indicadores de tratamento embasados na Medicina Baseada em Evidências e nos Consensos Internacionais pelo Ministério da Saúde.

Palavras-chaves: tratamento antiviral-hepatite B, protocolo clínico

## **INTRODUÇÃO:**

A hepatite B crônica (HBC) é um problema de saúde pública mundial, foi considerada recentemente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma pandemia, existindo aproximadamente 400 milhões de infectados no mundo, tendo



um grande impacto pessoal, social e econômico<sup>1</sup>. O tratamento da HBC tem como objetivo a supressão sustentada da replicação do vírus, a remissão do estado necroinflamatório hepático e a redução dos estágios avançados de fibrose, prevenindo assim, a insuficiência hepática, cirrose e a evolução para o carcinoma hepatocelular<sup>2,3</sup>.

No Brasil o tratamento para HBC, tem sido disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) há mais de 10 anos, com a indicação do interferon-alfa (IFN) como primeira linha de escolha. Diversos medicamentos foram aprovados para tratamento a partir de então, atualmente estão aprovados para o tratamento, os análogos de nucleos(t)ídeos (AN) Lamivudina (LAM), o Adefovir dipivoxil (ADV), Entecavir (ETV), e Tenofovir (TDF), respectivamente<sup>4,5,6</sup>. O AN são administrados via oral, inibem a transcrição reversa, que ocorre durante o ciclo de replicação viral no hepatócito. O tratamento para HBC é baseado na eficácia, segurança, incidência de resistência, via de administração, custo, presença ou ausência de cirrose. Entretanto, o tratamento com AN é a longo prazo, podem favorecer as mutações de resistência no genoma de HBV, tendo um forte impacto na resposta ao tratamento e no curso da doença<sup>4,7</sup>. Foram organizados consensos terapêuticos (guidelines), na Europa e nos Estados Unidos que servem como referência para outros países, pautados principalmente nos níveis séricos de aminotransferases (ALT/AST), carga viral (HBV-DNA), AgHBe positivo ou negativo, e cirrose<sup>8,9,10</sup>.

O Ministério da Saúde<sup>5</sup>, através do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Co-infecções (2011), amplia, regulamenta e universaliza a nível nacional os critérios e acesso ao tratamento para hepatite B, categoriza os algoritmos de tratamento, opções de terapia de resgate e as indicações para pacientes co-infectados, embasado nas recomendações da Organização Mundial de Saúde, nas Diretrizes Internacionais para o HBC e na Medicina Baseada em Evidências. A partir de então, a comunidade médica, tem um guia para orientação na conduta clínica.

O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Co-infecções apresenta basicamente três algoritmos de tratamento. O algoritmo 4.1 engloba os pacientes virgens de tratamento, AgHBe + (positivo) e não cirróticos, o 4.2 os pacientes virgens de tratamento, AgHBe - (negativo) e não cirróticos e o algoritmo 4.3 abrange os pacientes virgens de tratamento, cirróticos e AgHBe independente se for positivo ou negativo. No

protocolo há abordagens para terapia de resgate, para pacientes que foram tratados, as mutações para resistência, e situações especiais, como tratamento em crianças, co-infectados por HIV, VHC e VHD.

O objetivo deste estudo, foi analisar a condução do tratamento para os pacientes com hepatite B crônica, na Região Nordeste representado pelo Ambulatório de Referência de Hepatologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (HUPES-UFBA) em Salvador, Bahia e na região Norte pela Fundação Hospital do Estado do Acre (FUNDHACRE) do Hospital das Clínicas do Acre, em Rio Branco, comparando a conduta terapêutica, com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hepatite Viral Crônica B do Ministério da Saúde.

## **MÉTODOS:**

Trata-se de um estudo exploratório descritivo do tipo corte transversal, que abrange o período de 2011 a 2015. Foram incluídos 527 pacientes com HBC em acompanhamento nos Ambulatórios de Referências de Hepatologia do Complexo HUPES (Região Nordeste) e do FUNDHACRE (Região Norte). Este estudo foi submetido de acordo com a resolução vigente em 2011 (196/96) do Conselho Nacional de Saúde, tendo obtido parecer favorável do comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz -Fundação Osvaldo Cruz (CEP-CPqGM), CEP-HUPES e do CEP-FUNDHACRE.

Todos os participantes com HBC em atendimento ambulatorial foram convidados a participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foi realizada entrevista e revisões de prontuários dos participantes a fim de obtermos os resultados de exames sorológicos (AgHBs, AgHBe, anti-HBs, anti-HBe, anti-VHC, anti-HDV, VDRL, anti-HIV, anti-HTLV I/II), bioquímicos (ALT, AST), virológicos (Carga Viral- HBV DNA), e esquema terapêutico adotado.

Os questionários aplicados durante a entrevista apresentavam codificação, não permitindo a identificação do indivíduo. Os dados foram analisados através do pacote estatístico Software SPSS versão 21.0 para Windows. Os eventos de interesse foram descritos através de frequências e de medidas de tendência central (média, mediana) e dispersão (desvio-padrão).

Os pacientes foram categorizados nos algoritmos 4.1, 4.2 e 4.3, conforme suas características clínicas e resultados laboratoriais para o monitoramento ou

tratamento contidos no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções (2011).

## **RESULTADOS:**

Foram incluídos no estudo 320 pacientes com HBC em acompanhamento no Ambulatório de Referência do Complexo HUPES. A maioria dos pacientes foi do sexo masculino (59,3%), a faixa etária foi de 18 a 83 anos com uma média de idade e desvio padrão de  $44,75 \pm 12,4$ . O tempo médio de acompanhamento ambulatorial são de 8 anos, com uma faixa que se estende de 1 a 20 anos de acompanhamento (Tabela 01). No FUNDHACRE foram incluídos 207 pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Referência de Hepatites, a maioria foi do sexo feminino com 57,0%, a faixa etária foi de 18 a 72 anos com uma média de idade de  $40,36 \pm 13,9$ . Os pacientes foram todos diagnosticados com HBC, apresentaram AgHBs positivo (100%) por mais de 6 meses. A maior frequência foi dos pacientes AgHBe negativos com 86,1% (320), AgHBe positivo com 13,9% (63). Entretanto, 74 pacientes não tinham no momento da coleta dos dados informações para AgHBe.

Os níveis séricos das aminotransferases (ALT e AST) e carga viral detectável (VHB-DNA) foram avaliados no pré-tratamento. Os níveis de aminotransferases ALT/AST dos pacientes do Complexo HUPES 78% estavam com os níveis séricos normais, dentro dos valores de referência, e 22% estavam com os níveis elevados, acima do valor de referência. O VHB-DNA foi detectável em 59,3%. Os níveis de aminotransferases ALT/AST dos pacientes do FUNDHACRE 71,4% estavam com os níveis séricos normais, dentro dos valores de referência, e 28,6% estavam com os níveis elevados, acima do valor de referência. O VHB-DNA foi detectável em 99,5% (Tabela 02).

Os pacientes do Complexo HUPES que estão em tratamento para HBC correspondem a 41,1% e os não tratados (virgens de tratamento), que são os que nunca utilizaram droga para o tratamento da HBC, correspondem a 58,9%. As drogas mais utilizadas foram ETV 42,1%, TDF 23,6%, LAM 20%, IFN 14,3%, e ADF 3,6%. Os pacientes do FUNDHACRE que estão em tratamento para HBC correspondem a 27,1% e os não tratados, correspondem a 72,9%. As drogas mais utilizadas foram IFN 38,5%, ETV 32,7%, TDF 30,8% e LAM 3,8%. (Tabela 03).

Os pacientes do Complexo HUPES que foram avaliados para o seguimento do Protocolo de Diretrizes Terapêuticas para HBC foram 85% (272), sendo que dos

320 pacientes que foram considerados com HBC, devido a presença de AgHBs por mais de 6 meses, 15% (48) não tinham alguns dos critérios descritos nos prontuários para que fossem alocados dentro dos algoritmos (4.1, 4.2 e 4.3 ou co-infectados) e 8,4% (24) estão em tratamento, antes das Diretrizes do Ministério da Saúde entrar em vigor (2011). No algoritmo 4.1 que tem como critérios virgem de tratamento, AgHBe+, não cirrótico, 78,9 % seguiram o que está preconizado no Protocolo. No algoritmo 4.2 que tem como critérios virgem de tratamento, AgHBe -, não cirrótico, 91,5 % seguiram o que está preconizado no Protocolo. No algoritmo 4.3 que tem como critérios virgem de tratamento, AgHBe + ou -, cirrótico, 75 % seguiram o que está preconizado no Protocolo. Os co-infectados que são menos de 2% dos pacientes, não puderam ser avaliados, devido que estão ou foram tratados antes da diretriz entrar em vigor.

Os pacientes do FUNDHACRE que foram avaliados para o seguimento do Protocolo de Diretrizes Terapêuticas para HBC foram 88,8% (184), sendo que dos 207 pacientes que foram considerados com HBC, devido a presença de AgHBs por mais de 6 meses, 11,1% não tinham alguns dos critérios descritos nos prontuários para que fossem alocados dentro dos algoritmos (4.1, 4.2 e 4.3 ou co-infectados). No algoritmo 4.1 que 72 % seguiram o que está preconizado no Protocolo. No algoritmo 4.2, 85,6% seguiram o que está preconizado no Protocolo. No algoritmo 4.3 nenhum paciente tinha os critérios para ser alocados. Para co-infecções, 25 pacientes apresentaram reativos para o anti-VHD (hepatite delta), e 24% seguiram a recomendação de tratamento (Tabela 04).

## **DISCUSSÃO:**

Os Protocolos Clínicos ou Diretrizes Terapêuticas são ferramentas que se configuram como um tipo de tecnologia lógica que visam organizar, uniformizar a conduta dos profissionais da saúde diante das diversas situações que possam enfrentar na rotina dos serviços de saúde <sup>11</sup>. Eles se propõem a nortear as tomadas de decisões e manejo terapêutico desses profissionais através do delineamento de diretrizes clínicas embasadas no movimento internacional da Medicina Baseada em Evidências <sup>12</sup>.

Seguindo essa tendência mundial, o Brasil desde 2002, inicialmente por meio de portarias, estabelecem consensos para tratamento para hepatite B <sup>11, 13</sup>. Um marco foi alcançado com o lançamento em 2011 do Protocolo Clínico de Diretrizes

Terapêuticas para o manejo da Hepatite B, que tem como objetivo uniformizar a nível nacional, o uso racional do arsenal terapêutico, pautado em algoritmos de tratamento (4.1, 4.2 e 4.3 e co-infecções) principalmente na presença ou ausência do AgHBe, níveis de ALT e carga viral (DNA-VHB) <sup>5</sup>.

O ambulatório Magalhães Neto, do Complexo HUPES da Região Nordeste, e o Serviço de Assistência Especializada do FUNDHACRE da Região Norte são considerados como referência para os pacientes com hepatites virais, atuando há mais de 20 anos no acompanhamento, monitoramento e tratamento dos pacientes com hepatite B crônica. Os pacientes em atendimento ambulatorial do Complexo HUPES são na sua grande maioria do sexo masculino, em média 8 anos de acompanhamento ambulatorial e mais de 70% foram AgHBe-. Os pacientes do FUNDHACRE foram na sua grande maioria do sexo feminino, e mais de 80% foram AgHBe-. No geral, 86,1% foram AgHBe-. Os pacientes AgHBe- são os que tendem a evoluir clinicamente para as formas mais grave da doença hepática crônica. E muitos trabalhos vêm demonstrando, principalmente no Brasil, essa realidade da maior prevalência dos pacientes HBC com marcador sorológico AgHBe- <sup>14,15,16,17</sup>.

A avaliação do paciente pré-tratamento é fundamental e objetiva selecionar os indivíduos que serão tratados ou que continuarão a ser monitorados. A conduta clínica deve ser pautada, no status clínico, exame físico, histologia hepática, provas de função hepática, mas principalmente nos níveis séricos das aminotransferases (ALT, AST), e sorologias para o VHB (AgHbs, AgHbe/anti-Hbe, anti Hbc (total e IgM), anti-Hbs), HIV, VHC e VHD (co-infecções) e níveis de HBV DNA <sup>4,8</sup>.

Em relação aos pacientes que tiveram histórico de tratamento, desse universo, os pacientes virgens de tratamento foram 58,9% do Complexo HUPES e 72,9% do FUNDHACRE. Em relação aos pacientes em tratamento, 41,1% do Complexo HUPES e 27,1% do FUNDHACRE. Nos dois serviços as maiores frequências são de pacientes virgens de tratamento, que estão sendo monitorados para ALT/AST e HBV-DNA, como prevê o Protocolo de Diretrizes Terapêuticas do MS.

Para o primeiro esquema terapêutico, as maiores frequências de indicação ao tratamento foram AN, ETV e TNF, correspondendo a mais de 60% das prescrições. Dois pontos podem ser destacados em relação a maior frequência dessas drogas, primeiro que seguindo a recomendação do Ministério da Saúde, pelo o Protocolo de Diretrizes Terapêuticas, os pacientes AgHBe- devem ser tratados

como primeira droga de escolha por ETV e TNF, e segundo são drogas que tem maior barreira genética, diminuindo assim o risco de adquirir a longo prazo resistência antiviral.

O algoritmo 4.1 que abrange os pacientes virgens de tratamento AgHBe+ e não cirróticos, quando apresenta ALT normal, o paciente deve ser monitorado a cada 3 meses, entretanto, se o paciente apresentar ALT alterada, o tratamento deve ser iniciado com IFN, independente da carga viral DNA-VHB, isto é explicado porque os pacientes que apresentam AgHBe+, existe uma alta probabilidade da carga viral estar acima de 20.000UI/ml.

O IFN foi à primeira droga aprovada para o tratamento para os pacientes com HBC, o tratamento tem em média uma duração de 16 a 24 semanas. Entretanto foi observado que existe uma dificuldade em seguir a recomendação do Ministério da Saúde, nos dois serviços de referência, os que se enquadraram no algoritmo 4.1, apenas 78,9% no Complexo HUPES e 72% no FUNDHACRE, seguiram o que está preconizado no Protocolo Clínico.

Todavia, apesar de não estar devidamente documentado no prontuário do paciente, há contraindicações ao uso do IFN descrito no Protocolo Clínico, como descompensação hepática, gestação, neoplasias, infecções ativas, doenças auto-imunes, granulocitopenia ou plaquetopenia críticas, depressão psíquica acentuada, além de comorbidades mórbidas de maior gravidade pelos eventos adversos associados ao IFN <sup>18</sup>.

O IFN como qualquer outra droga apresenta vantagens e desvantagens, apesar da administração ser intramuscular, três vezes por semana, entretanto têm como vantagem o período determinado de tratamento, maior taxa de redução de AgHBe e AgHBs, a Resposta Viroológica Sustentada (RVS) nos pacientes e a ausência de resistência ao IFN. Contudo, são diversos os efeitos adversos e sua utilização é limitada em pacientes com doença hepática avançada ou descompensada <sup>19</sup>. Utilizando os parâmetros adotados no Brasil, no aspecto econômico demonstrou ser a alternativa com a melhor relação custo-efetividade. Ou seja, os efeitos alcançados justificam o valor gasto com a droga <sup>20</sup>.

Em relação ao algoritmo 4.2 que abrange os pacientes virgens, mas AgHBe-, quando a ALT alterada e carga viral acima de 2000 UI/ml, o paciente deve ser tratado com TDF, caso existe contraindicação em pacientes renais crônicos, indica-se o ETV. Os AN como são administrados via oral, os eventos adversos são

praticamente inexistentes, o risco é mínimo ou ausente de resistência, boa tolerabilidade e RVS obtida na grande maioria dos pacientes aderentes ao tratamento <sup>21</sup>. Os pacientes atendidos nos dois serviços, são na sua maioria AgHBe negativo, e são os estão dentro dessa recomendação do Ministério da Saúde, e foi o algoritmo que apresentou no geral mais de 90% de seguimento na recomendação do Protocolo Clínico.

O algoritmo 4.3 abrange os pacientes cirróticos, independente da positividade do AgHBe, da carga viral DNA-VHB e dos níveis de aminotransferases, o critério central nesse algoritmo é a classificação do Child-Pugh. Resumidamente, os pacientes que foram classificados como Child-Pugh A, AgHbe-, se os níveis de aminotransferases estiverem normais e a carga viral DNA-VHB estiverem <200UI/ml os pacientes devem ser monitorados, agora, se os níveis de aminotransferases estiverem alteradas e o DNA-VHB > 200UI/ml o tratamento é indicado, como primeira droga de escolha, o entecavir. Os pacientes classificados como Child- Pugh B e C, encaminhados para o ambulatório de transplante hepático. Nesse algoritmo, aproximadamente 85% dos pacientes do Complexo HUPES estavam dentro da recomendação do Protocolo Clínico para Hepatite B crônica, entretanto, nenhum paciente do FUNDHACRE tinha os critérios para ser alocados dentro desse algoritmo.

Uma particularidade dos pacientes do FUNDHACRE, como são pacientes que estão na área endêmica da região da Amazônia ocidental, existe uma alta prevalência de co-infecção com o vírus da hepatite D (delta), considerada como uma superinfecção podendo evoluir para hepatite fulminante <sup>22, 23,24</sup>. Dos pacientes do presente estudo, 12,1% (25) apresentaram co-infecção com VHB-VHD, e destes apenas 24% seguiram a recomendação do Protocolo Clínico para co-infecções, entretanto, como trata-se de um estudo de corte-transversal, isto é a realidade no momento da coleta de dados. Para os pacientes co-infectados com o vírus delta, quando diagnosticado o paciente deve ser tratado com IFN-peg ou se a o VHB-DNA for acima de 2000UI/mL o tratamento deve ser IFN-LAM ambos por 48 semanas. Como trata-se de uma doença grave e poucos são os estudos clínicos controlados efetivos e os AN, como LAM e ADF não apresentaram resultados satisfatórios, apenas o IFN, o Protocolo Clínico recomenda que todos os casos deverão ser seguidos e notificados ao Programa Nacional de Hepatites Virais para que se faça o monitoramento dos resultados.

Com base nos resultados discutidos, há alguns pontos que devem ser considerados e apontados para futuras discussões e adaptações do protocolo. Os pacientes virgens de tratamento, por exemplo, podem apresentar mutações de resistência, sendo assim, torna-se importante antes do início do tratamento, realizar o levantamento das mutações antes da decisão da melhor escolha terapêutica, o rastreamento das mutações permite a escolha da melhor droga que pode aumentar as chances de alcançar a RVS <sup>25,26,27</sup>.

Outro ponto que deve ser abordado é a quantificação do AgHBs que se destaca como indicador prognóstico e na avaliação de resposta ao tratamento. Foi observado que os pacientes em uso de AN apresentam um padrão de declínio do AgHBs variável, sendo pouco frequente a ocorrência de clareamento do AgHBs durante o tratamento com AN <sup>28,29</sup>. Entretanto, a perda do AgHBs e a soroconversão para anti-HBs podem ocorrer espontaneamente em 1 a 3% dos casos por ano, geralmente após vários anos com HBV-DNA persistentemente indetectável <sup>30</sup>. O rastreamento das mutações de resistência e a quantificação do AgHBs podem ser uma mais uma alternativa para auxiliar na tomada de decisão e no manejo clínico, que no Brasil não está disponibilizado na Rede Pública, apenas em poucos laboratórios particulares ou em protocolos de pesquisa.

O Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B, foi um grande passo e avanço. Uma ferramenta importantíssima dentro da realidade do tratamento para Hepatite B e foi possível incorporar novas drogas e indicadores de tratamento embasados na Medicina Baseada em Evidências e nos Consensos Internacionais pelo Ministério da Saúde. Entretanto, passados quase 5 anos da sua incorporação, torna-se necessário atualizar com as novas propostas apresentadas nas revisões dos Consensos Internacionais e na produção científica, avaliar as lacunas de classificação dos algoritmos para que todos os pacientes possam ser alocados corretamente e facilitando que os mesmos possam alcançar a RVS no tratamento para Hepatite B.

### **Agradecimentos:**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através do processo 478322/2012-7.



**REFERÊNCIA:**

1. Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2014; doi: 10.1016/S0140-6736(14)60220-8.
2. Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. REVEAL-HBV study group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65–73.
3. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004 Mar; 11;350(11):1118-29. Review. No abstract available. Erratum in: *N Engl J Med* 2004 Sept; 16(12):351.
4. Lok AS, McMahon BJ. AASLD Practice Guidelines. Chronic Hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 2009; 50:1-36.
5. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. In: Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de DST AeHV, editor.: Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais; 2011.
6. Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Secretária de Vigilância em Saúde. Hepatites Virais no Brasil. Situações, Ações. Agenda 2011.
7. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009; 137: 1593–608.
8. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57: 167–85.
9. Liaw YF, Kao JH, Piratvisuth T, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update. *Hepatol Int* 2012; 6: 531–61.
10. Lok AS. Personalized treatment of hepatitis B. *Clinical and Molecular Hepatology*. 2015;21(1):1-6. doi:10.3350/cmh.2015.21.1.1.
11. Silva LK. Avaliação tecnológica e avaliação de custo-efetividade em saúde: a incorporação de tecnologias e a produção de diretrizes clínicas para o SUS. *Ciênc Saúde Coletiva* 2003; 8:501-20
12. SCHNEID et al. Protocolos Clínicos embasados em evidências: a experiência do Grupo Hospitalar Conceição. *Revista AMRIGS*, Porto Alegre, v.47, n.2, p. 104-114, abr.-jun. 2003.

13. Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas hepatite viral crônica B. 2002.
14. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine* .2002; 347: 168-174,
15. Galizzi FJ, Teixeira R, Fonseca JC, Souto FJ. Clinical profile of hepatitis B virus chronic infection in patients of Brazilian liver reference units. *Hepatology Int*. 2010;4(2):511-5.
16. Chachá SG, Ferreira SC, Costa TV, Almeida Filho LC, Villanova MG, Souza FF, et al. Clinical, demographic and epidemiological characteristics of patients with hepatitis B followed at a university hospital in southeastern Brazil: predominance of HBeAg negative cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(1):13-7.
17. Assis, D R et al. Caracterização de uma coorte ambulatorial de pacientes com infecção por vírus da hepatite B crônica. *Einstein (São Paulo)* [online]. 2015, vol.13, n.2, pp. 189-195.
18. Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al. HBV 99–01 Study Group; Rotterdam Foundation for Liver Research. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 123–129.
19. Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, et al. Peginterferon alfa-2a HBeAg-positive chronic hepatitis B study group. Peginterferon alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352: 2682–2695.
20. Almeida, A et al. Custo-efetividade dos análogos de nucleosídeos/nucleotídeos para hepatite crônica B. *Rev. Saúde Pública* [online]. 2012, vol.46, n.6 [cited 2015-10-07], pp. 942-949 .
21. Buti, M. HBeAg-positive chronic hepatitis B: Why do I treat my patients with Nucleos(t)ide Analogs? *Liver Int* 2014;34 (Suppl 1):108-11.
22. Viana S. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the Western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73:808-14.
23. Braga WSM, Brasil L M, Souza RAB, Castilho MC, Fonseca JC. Ocorrência da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e delta(VHD) em sete grupos

- indígenas do Estado do Amazonas Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2001; 34(4): 349-355, jul-ago
24. Bensabath G, Leão RNQ. Epidemiologia na Amazônia brasileira. In: Focaccia R, organizador. Tratado de hepatites virais. São Paulo: Editora Atheneu; 2003. p. 1-26.
  25. Zhang Q, Liao Y, Cai B, Li Y, Li L, Zhang J, An Y, Wang L. Incidence of natural resistance mutations in naive chronic hepatitis B patients: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*.2015;30:1440-1746.
  26. Nguyen MH, Garcia RT, Trinh HN et al. Prevalence of hepatitis B virus DNA polymerase mutations in treatment-naive patients with chronic hepatitis B. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2009; 30: 1150–8.
  27. Xu J, Wu B, Wang J-H, et al. Pre-Existing Mutations in Reverse Transcriptase of Hepatitis B Virus in Treatment-Naive Chinese Patients with Chronic Hepatitis B. ParaskevisD, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0117429. doi:10.1371/journal.pone.0117429.
  28. Seto W, Liu K, Wong DK, Fung J, Huang F, Hung IF, Lai C, Yeun M. Pattern of hepatitis B surface antigen decline and HBV DNA suppression in Asian treatment-experienced chronic hepatitis B patients after three years of tenofovir treatment. *J Hepatol* 2013; 59: 709-716.
  29. Chevaliez S, Hézode C, Bahrami S, Grare M, Pawlostsky J.M. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside /nucleotide analogue therapy: finite treatment duration unlikely. *J Hepatol* 2013; 58:676683.
  30. Martinot-Peignoux M1, Boyer N, Colombat M, Akremi R, Pham BN, Ollivier S, Castelnau C, et al. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. *J Hepatol* 2002; 36:543-548.

**Tabelas e figuras:**

**Tabela 01. Características sócio-demográficas dos pacientes com HBC atendido no HUPES-UFBA e no FUNDHACRE, 2011-2015.**

Características demográficas	HUPES			FUNDHACRE		
	N*=320	%	Média ±DP	207	%	Média ±DP
<b>Sexo</b>						
Masculino	179	59,3		87	42	
<b>Idade</b>						
Min.	18		44,75±12,4	18		40,36 ± 13,9
Max.	83			72		

\*Resultado varia de acordo com a disponibilidade dos dados.

**Tabela 02 – Resultados dos marcadores bioquímicos ALT/AST e HBV-DNA na admissão e no pré-tratamento dos pacientes HBC em acompanhamento ambulatorial, atendidos no HUPES-UFBA e no FUNDHACRE, 2011-2015.**

Marcadores bioquímicos	HUPES		FUNDHACRE	
	n:295	%	n=196	%
<b>Pré-tratamento</b>				
<b>Aminotransferases (ALT\AST)</b>				
Normal	238	78	140	71,4
Elevada	67	22	56	28,6
<b>HBV-DNA</b>				
Detectável	175	59,3	195	99,5

\*Total varia conforme a disponibilidade do dado na revisão de prontuário

**Tabela 03. Características do tratamento antiviral dos pacientes com HBC atendido no HUPES-UFBA e no FUNDHACRE 2011-2015.**

Tratamento	HUPES		FUNDHACRE	
	n: 307	%	n:199	%
<b>Histórico de tratamento</b>				
Não tratados	181	58,9	145	72,9
Em curso	126	41,1	54	27,1
<b>Droga antiviral</b>				
IFN	20	14,3	20	38,5
LAM	28	20	2	3,8
ENT	59	42,1	17	32,7
ADF	5	3,6		
TDF	33	23,6	16	30,8

\*Total varia conforme a disponibilidade do dado na revisão de prontuário

**Tabela 04. Comparação do tratamento antiviral indicado para os pacientes com HBC com o Protocolo de Diretrizes Terapêuticas atendido no HUPES-UFBA e no FUNDHACRE, 2011-2015.**

Algoritmo de tratamento	HUPES			FUNDHACRE		
	Elegíveis n:272	Seguiram recomendação do MS	a do %	Elegíveis n:184	Seguiram recomendação do MS	a do %
4.1 Virgem de tratamento, AgHBe+, não cirrótico	38	30	78,9	25	18	72
4.2 Virgem de tratamento, AgHBe-, não cirrótico	194	178	91,5	134	119	85,6
4.3 Virgem de tratamento, AgHBe+ou-, cirrótico	16	12	75	-	-	-
Co-infectado HBV-VHD	-	-	-	25	6	24

\*Total varia conforme a disponibilidade do dado na revisão de prontuário

### 3.2 CAPÍTULO 2: Genotyping of HBV and tracking of resistance mutations in treatment-naive patients with chronic hepatitis B in the Northeastern and North regions of Brazil

Manuscrito do artigo 2 refere-se ao objetivo específico b) desta tese. Este artigo está sendo preparado para submissão para a Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

**Title:**

Genotyping of HBV and tracking of resistance mutations in treatment-naive patients with chronic hepatitis B in the Northeastern and North regions of Brazil

**Running title:** Resistance mutations in naive patients

**Authors:**

Sidelcina Rugieri Pacheco (1)

[srugieri@gmail.com](mailto:srugieri@gmail.com)

Maria Isabel Magalhaes Andrade dos Santos (1)

[mariaisabel\\_mas@yahoo.com.br](mailto:mariaisabel_mas@yahoo.com.br)

Andreas Stocker (2)

[astocker@ufba.br](mailto:astocker@ufba.br)

Maria Alice Zarife

[maszarife@gmail.com](mailto:maszarife@gmail.com) (3)

Maria Isabel Schinoni (2)

[mariaschinoni4@gmail.com](mailto:mariaschinoni4@gmail.com)

Raymundo Paraná (2)

[unif@svn.com.br](mailto:unif@svn.com.br)

Mitermayer Galvão dos Reis (1)

[miter@bahia.fiocruz.br](mailto:miter@bahia.fiocruz.br)

Luciano Kalabric Silva (1)

[kalabric@bahia.fiocruz.br](mailto:kalabric@bahia.fiocruz.br)

(1) Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz- Fundação Oswaldo Cruz- Laboratório de Patologia e Biologia Molecular

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Bahia-Brasil CEP: 40296-710

(2) Universidade Federal da Bahia

(3) Laboratório Central de Saúde Pública do Estado da Bahia- LACEN



## Summary

Resistance mutations analogues to nucleos(t)ides have been described in naïve patients treated for chronic hepatitis B, with clinical implications. The aim of this study is to investigate resistance mutations of primary and secondary and genotypes circulating in naive patients to Chronic Hepatitis B (CHB), in the Northern and Northeastern regions of Brazil. We conducted a study of resistance mutations and genotypic characterization of HBV in 189 naive patients chronically infected with HBV. Only 5 treatment-naive patients of the Northeastern region (n=84) had mutations RT gene P at positions that may be associated with viral resistance, with a rate of 6 %. The mutations were rtA194T, rtL180M+M204V, rtS202I, rtM204I and rtA181S. No patient had the resistance mutation in the Northern region. In the gene S region, the frequency of vaccine escape mutations were in the Northeast 2.4% region and the Northern region 8.6%. This information before the start of treatment may contribute to clinical decision making, reducing treatment failure and the risk of progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma for CHB.

Key words: treatment-naïve, Chronic Hepatitis B, analogues nucleos(t)ides, resistance mutation

**Funding source:** National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) process: 478322/2012-7 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Introduction

Although there is a safe and effective vaccine against the hepatitis B virus (HBV) since the early 80s, chronic hepatitis caused by this pathogen is far from being eradicated and continues to constitute a severe public health problem in many parts of the world, and was considered recently by the World Health Organization (WHO) as a pandemic. There are 400 million people infected worldwide and, in Brazil, two million are chronically infected. Brazil has an ethnic, economic and regional diversity that would be no different for the epidemiology of HBV infection, but also presents a very heterogeneous distribution (Trepo et al., 2014; Brasil, 2012; Pereira et al., 2009; Mello et al., 2007). These individuals are exposed to the risk of developing severe complications including cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Di Bisceglie, 2009; Lok, 2009).

In the last twenty years in Brazil, significant advances in the treatment for chronic hepatitis B (CHB) have occurred, initially with the use of IFN-alpha, allowing to alter the natural progression of the disease. Currently, through the Clinical Protocol of Therapeutic Guidelines for Hepatitis B (2011), which directs the therapeutic conduct for HBV, five drugs are available for treatment, IFN-alpha and the nucleos(t)ide analogues (NA) lamivudine (LAM) adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV) and tenofovir (TDF) (Lok & McMahon, 2009; Brasil, 2011). However, the use of NAs for a long time can determine the emergence of strains resistant to the drug.

The emergence of antiviral resistance has a close association with NA amino acid substitutions in the reverse transcriptase (RT region of the HBV genome), which are classified as primary and secondary self compensatory resistance mutations (Lok & Zoulim, 2007; Zoulim & Locarnini, 2009). The NA therapy can induce certain resistance mutations, it is noticed that natural HBV reverse transcriptase mutations exist even in treatment naïve patients (Jardi et al., 2007; Nguyen et al., 2009).

In addition, the HBV genome is complicated, and has been classified into eight genotypes (A-H) based on differences of  $\geq 8\%$  in its whole genome sequence. The HBV genotypes have distinct geographic distribution: genotype A has a universal distribution, being the predominant genotype in Europe, North and Central America, sub-Saharan Africa, and India. Genotypes B and C are predominant in Southeast Asia, China, Japan and Australia. Genotype D is mainly found in the Middle East and the Mediterranean. Genotype E seems to be predominant in West Africa, whereas genotype G is distributed throughout the United States, Mexico, and France. Genotype F is mainly found in Central and South America and Alaska. Finally, genotype H is unique to Central America and the United States ( Norder et al., 2004; Deterding et al., 2008; McMahon, 2009). Genotypes A, D and F circulate among Brazilian HBV carriers (Mello et al., 2007).

The aim of this study is to investigate primary and secondary resistance mutations in the genotypes circulating in patients naive to CHB in the Northern and Northeastern regions, represented by the state of Acre and Bahia, and its implications in the clinical treatment of chronic hepatitis B.

## Methods

### Patients

A study of resistance mutations and genotypic characterization of HBV was conducted in 189 naive patients chronically infected with HBV, 84 (Region Northeast) 105 (Region North), during 2011-2015. All patients tested positive for the HBsAg antigen within at least six months, and tested negative for the human immunodeficiency virus (HIV), and were naïve for treatment of HBV, in two Centers of Reference for Viral Hepatitis, at the Northeastern region, in the Hospital Universitário Professor Edgard Santos - HUPES and at the Northern region, in the Fundação Hospital do Acre - FUNDHACRE, Brazil.

### HBV quantification

HBV DNA was detected and quantified by real-time PCR assay. The test procedures followed the manufacturer's recommendations and were performed automatically at the laboratory facilities of the Public Health Central Laboratory (Laboratório Central de Saúde Pública) of the State of Acre and Bahia (LACEN).

### Polymerase chain reaction

HBV DNA was extracted from the sera of patients using was extracted from 200 µL of each serum sample using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit Kit (Roche, USA) according to the manufacturer's instructions. The RT region of the HBV gene (1032 pb) was amplified by a nested polymerase chain reaction (PCR). Primers were described by Krekulova et al. (2003) and modified to increase sensitivity to PCR. In the first reaction, the primers used were HB-1 5' TAT TTC CCT GCT GGT GGC TCC 3' (position 50-71), and HB-4 5' ACT TTC CAA TCA ATA GG 3' (position 969-986). In the second reaction, the primers used were HB-5 5' GAA CAG TAA ACC CTG CTC CG 3' ( position 78-98) and HB-8 5' TGT ACA ATA TGA TCC TGT GG 3' ( position 909-929) (Life Technologies, EUA).

For the amplification of DNA, 5.0µL of the sample was used for the first reaction, and put into a mixture containing: 2.5 µL 10x PCR buffer, 0.5 µL of dNTP mix (10mM), 1.25 µL MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0.5 µL of each primer, and 0.2 µL of platinum Taq DNA polymerase (5U/µL) (Invitrogen, San Diego, CA, USA), resulting in a final volume of 25 µL. The cycle conditions used initially were 94°C for 2 min for denaturing, followed by 45 cycles of 94°C for 30 s, 56.0°C for 30 s, 72°C for 2 min,

and a final extension of 72°C for 7 min in a Mastercycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany).

The second reaction used 1.0µL of the PCR product, into a mixture containing: 5 µL 10x PCR buffer, 1.0 µL of dNTP mix (10mM), 2.5 µL MgCl<sub>2</sub> (50mM), 5 µL of each primer, and 0.2µL of platinum Taq DNA polymerase (5U/µL) (Invitrogen, San Diego, CA, USA), resulting in a final volume of 50 µL. The cycle conditions used initially were 94°C for 2 min for denaturing, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 60.0°C for 30 s, 72°C for 2 min, and a final extension of 72°C for 7 min in a Mastercycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany).

### **Sequencing of the HBV RT region**

The samples were purified with a QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, EUA), sequenced with forward and reverse primers using a BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The reactions were performed in an automatic ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer Sequencer (Applied Biosystems). The sequencing project coverage was only 2- and 6-fold corresponding to the sequence obtained from each primer product (HB-2, HB-3, HB-5, HB-6, HB-7 and HB-8, data not shown).

### **Sequence analysis**

To confirm the specificity of each amplicon, the sequences obtained were analyzed using the GenBank BLAST tool. Subsequently, sequences from the same patient were assembled to a reference sequence and conflicting sites were corrected by visual inspection (CLC Main Workbench v. 5). Consensus sequence of each HBV isolate was submitted to a web based software for subtyping and prediction of phenotypic resistance to genotype-specific mutations in the polymerase gene (rt mutation) and escape mutation (HBs mutation) (Max-Planck-Institut für Informatik, Germany at <http://hbv.geno2pheno.org/index.php>). One hundred eighty nine sequences of these analyses were submitted to the GenBank (accession number: KU847525-KU847634; KU847635-KU847735)

### **Statistical analyses**

Those were performed using the software SPSS 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Comparison between groups was performed using a one-way ANOVA t-test or a chi-square test, as appropriate. HBV DNA concentrations were expressed on a logarithmic scale. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

### **Ethical considerations**

This study was reviewed and approved by the Ethics Committee of FUNDHACRE, Rio Branco, Acre and the Ethics Committee of HUPES, Salvador, Bahia - Brazil.

### **Results**

Samples from 189 treatment-naïve CHB patients were enrolled in this retrospective study. Their clinical features were summarized in Table 1. 84 treatment-naïve patients at HUPES/Salvador-Bahia (Northeastern Region), consisting of 50.6% males and 49.4% females, with a median age of 44 years (the range was 18-72). A high ALT serum level (reference value is >41 UI/mL) was found in 38.7% of the patients, with a median of 45.65 UI/mL. The HBV DNA level in the serum had a median of 3.3 log (the range was 1.51-8.34) while 86.1% of them were HBeAg sero-negative. The HBV genotypes distribution found was: A (89.3%), D (2.4%), F (7.1%) and C (1.2%). Co-infection with hepatitis C was found to be 1.2%. For the patients of FUNDHACRE/Rio Branco-Acre (Northern Region), there were 105 treatment-naïve patients, consisting of 37.1% males and 62.9 % females with a median age of 40 years (the range was 18-72). a high ALT serum level (reference value is >41 UI/mL) was found in 28.3 % of the patients, with a median of 42.63 UI/mL. The HBV DNA level in the serum had a median of 3.12 log (the range was 1.75-8.04) while 92,9 % of them were HBeAg sero-negative. The HBV genotypes distribution found was: A (59%), D (21%), F (20%). Co-infection with hepatitis C (HBV HCV) was found to be 1.9 %, and with hepatitis D (HBV HDV) was found to be 3.8%.

Only 5 treatment-naïve patients of the Northeastern region (n=84) had mutations at positions that may be associated with viral resistance, as described in Table 2. No patient had the resistance mutation at FUNDHACRE (n=105). The mutations were

rtA194T, rtL180M+rtM204V, rtS202I, rtM204I and rtA181S. In the pre S/S region, there was sI195M and sQ129H.

No significant correlation between the group the region Northeast with mutation and group without mutation was found in our sample described in Table 3.

## **Discussion**

Resistance mutations to NA have been described in naive patients treated for chronic hepatitis B, with clinical implications. It is important to track changes in primary and secondary resistance in patients that have not yet been processed (Nguyen et al., 2009) in order to monitor, optimize and advocate the best treatment, achieving SVR, and consequently reducing the progression of cirrhosis and the evolution to hepatocellular carcinoma (Chen et al., 2006).

In this study, the patients evaluated were from two Reference Centers for Viral Hepatitis in Brazil, one at the Northern Region, which has the highest prevalence rates for CHB and one at the Northeastern Region, which is considered to have a low prevalence of CHB. In both Reference Centers, the naive patients had an average age around 40 years, mostly females, and have the serological marker HBeAg- mostly, demonstrating a global and Brazilian trend, of the prevalence of CHB patients with HBeAg- (Hadziyannis & Vassilopoulos, 2001; Galizzi et al, 2010; Chachá et al., 2011.). However, the patients in the Northeastern Region, when compared to the ones from Northern Region, showed values above the reference value for ALT (38.7% vs. 28.3%).

The circulating genotypes already described for Brazil are respectively the A, D and F (Sitnik et al., 2004; Oliveira et al., 2008; Mello et al., 2007). Being that the predominant is genotype A, as observed in the Northeastern Region with almost 90%, followed by the genotypes F, D and C. In the Northern Region, genotype A was also predominant, with almost 60%, followed by the genotypes D and F. And the proportion of genotype F is more common in the indigenous population in the Amazon region, compared with other Brazilian regions (Viana et al., 2005, Santos et al., 2010). Besides that genotype F is more frequent in the Amazon region, co-infection with HBV HDV (delta) is also very common, with a found prevalence of 3,8%, followed by HBV HCV, with 1,8% in the patients studied. Regarding the frequency of subgenotypes found in the northeast A1 (71%), A2 (4%), C2, D2, D3 respectively 1%, and F2 (6%). The frequency of subgenotypes the northern region were A1 (59%), D1 (1%), D2 (2.9%), D3(10.5%), D4 (6.7%), F1 (7.6%) and F2

(12.4%). The subgenotype A1 have been mostly identified in African population and their descendants. Subgenotype A2 is primarily found among Europeans. (Hannoun et al., 2005; Kramvis & Kew, 2007). Genotype C is the most prevalent in Asia. In Brazil, states the region southeast, there was a great migration of descendants of Asia, therefore, subgenotypes C2 (Alvarado-Mora, 2011). Genotype D was divided in four subgenotypes (D1, D2, D3 e D4) found in different continents. The genotype F are considered indigenous to the American continents, and four subgenotypes have been described, F1, F2, F3 and F4. In Latin American, genotype F is the most prevalent, with exception of Brazil, where genotype A (Alvarado-Mora & Pinho, 2013).

The presence of resistance mutations in treatment-naïve patients has shown clinical significance due to the pre-existing mutations, which need to be investigated and traced. In this present study, we used direct sequencing of the HBV's DNA from the reverse transcriptase (RT) from the polymerase region to track resistance mutations to NA. In the Northern Region, there were no primary or secondary resistance mutations found on the NA. In some studies, in treatment-naive patients, they were not found too (Xu et al, 2015; Liu et al, 2010.). However, in patients in the Northeastern Region, mutations resistant to NA were found (05/84) corresponding to a prevalence of 6% of the samples. In several studies in the literature, most of them being held in the Asian population, resistance mutations rates in naive patients revolve around 1 to 20% (Pollicino et al, 2008; Liu et al, 2010; Tauseef et al, 2012, Tan et al, 2012; Nguyen et al, 2009; Selabe et al, 2007). In Brazil, in a recently published study (Gouveia et al., 2015), with samples from various regions of Brazil, the resistance rate of mutations associated with NA was found to be 1.6% in naive patients. Expanding the prevalence for the Northern and Northeastern regions, the prevalence of resistance mutations to NA was found to be 2.6%.

One of the resistance mutations found in the Northeast was rtA194T, which can be associated with resistance to TDF, which has shown in vitro reduced susceptibility to TDF when combined with the resistance mutations to LAM M204V and L180M. The clinical implication of the rtA194T mutation must be determined through long-term follow-up clinical studies (Funk et al, 2002; Tenney et al., 2009). HBeAg- patients may have an increased risk of selecting the rtA194T mutation, and therefore, antiviral resistance, so another alternative would be an indication of ETV as a first drug of choice (Amini-Bavil-Olyaei et al., 2009).

The other two mutations are associated with resistance to LAM rtL180M + rtM204V and rtS202I. The rtM204V mutation is considered a primary resistance mutation due to the susceptibility of HBV to LAM, and the rtL180M and rtV173L mutations are considered compensatory or secondary mutations (Hoofnagle et al., 2007), that can increase the viral replication fitness (Zoulim & Locarnini, 2009). The rtM204V mutation was the most common in studies of naive patients (Feeney et al, 2007; Fung et al, 2008), which is the resistance mutation associated to LAM. However, by the Clinical Protocol of Therapeutic Guidelines for Chronic Hepatitis B (MS, 2011), LAM is not indicated as a first-line choice because of its low genetic barrier and antiviral resistance rate that can reach approximately 80% in 05 years of treatment (Shaw et al, 2006; Lok et al., 2009). The first lines of choices of antiviral treatment for treatment-naïve patients without cirrhosis are the ETV and TDF, recommended by the Ministry of Health.

The resistance mutations rtL180M + rtM204V and rtS202I may be associated to the presence of mutations in the coding region of the HBsAg envelope region (S of the HBV), as found in the patterns I195M, W196L and G145R, indicating vaccine escape. Mutations in the polymerase region associated with LAM resistance can produce changes in the envelope region (S), and as they are superimposed, it results in a reduction of antigenicity of the HBsAg protein. Another interesting point, these patterns of mutations found in patients with resistance mutations to NA in the S region are more described for genotype A, compared to genotype D. In the literature there are no mutations in the S region associated with the rtA194T resistance mutation, confirming the results found (Torresi, 2002; Sheldon & Soriano, 2008). The emergence of adefovir resistant mutant in patients with lamivudine resistance is more common than in treatment-naive patients. Two major mutations of adefovir resistance are rtN236T and rtA181V/T, and in the current study we found the mutation rtN236T. Compared to patients with the resistance mutation to NA and without the mutation, no clinical evidence was found. Although Zhang et al., conducted a systematic review of the literature where the work showed that the variables such as genotype, sex, the HBeAg status, compared to the genotype C, male and HBeAg-, present a clinically significant association with higher rates compared to the genotypes B and D, female and HBeAg -. The ALT serum levels showed no influences to the emergence of antiviral resistance mutations (Zhang et al., 2015). In Brazil, there are few studies that were conducted that survey resistance mutations to NA on naive patients



seeking clinical association. However, other studies should be conducted to track and trace the changes in the mutations profile, crossing with the epidemiological characteristics of the population, with a larger number of treatment-naive patients with CHB.

In conclusion, it is important to track the resistance mutations to NA in naive patients due to pre-existing mutations in the RT region associated with antiviral treatment, which has a direct impact on public health. This information, before the start of treatment, may contribute to clinical decision making, reducing therapeutic failure, and the risk of progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma for CHB.

### **Acknowledgments**

To the sequencing platform Fiocruz / BA (PDTIS) Silvana Paz; To LACEN-BA and LACEN-AC; SAE - Specialized Care Service of Hospital das Clinics of Acre (FUNDHACRE); the fellows of the Scientific Initiation Fellowship PIBIC- Fiocruz and CNPq.

### **References**

- Alvarado-Mora MV, Santana RA, Sitnik R, et al. Full-length genomic sequence of hepatitis B virus genotype C2 isolated from a native Brazilian patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106:495–498.
- Amini-Bavil-Olyae S, Herbers U, Sheldon J, Luedde T, Trautwein C, et al. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. *Hepatology*. 2009; 49: 1158–1165.
- Chachá SG, Ferreira SC, Costa TV, Almeida Filho LC, Villanova MG, Souza FF, et al. Clinical, demographic and epidemiological characteristics of patients with hepatitis B followed at a university hospital in southeastern Brazil: predominance of HBeAg negative cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(1):13-7.
- Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65-73.

- Deterding K, Constantinescu I, Nedelcu FD, Gervain J, Nemecek V, Srtunecy O, et al. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *J Med Virol*. 2008;80(10):1707-11.
- Di Bisceglie AM. Hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: S56–60.
- Fung J, Lai CL, Fong DY, Yuen JC, Wong DK, et al. Correlation of liver biochemistry with liver stiffness in chronic hepatitis B and development of a predictive model for liver fibrosis. *Liver Int*.2008; 28: 1408–1416.
- Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepatol* 2002;52-61
- Galizzi FJ, Teixeira R, Fonseca JC, Souto FJ. Clinical profile of hepatitis B virus chronic infection in patients of Brazilian liver reference units. *Hepatol Int*. 2010;4(2):511-5.
- Gomes-Gouvêa, M S, Ferreira, A. C, Teixeira R, et al., HBV carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naive patients,” *Antiviral Therapy*, 2015; vol. 20, pp. 387–395.
- Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *HEPATOLOGY* 2001;34(4 Pt 1):617-624.
- Hannoun C, Soderstrom A, Norkrans G, Lindh M. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *J Gen Virol* 2005; 86:2163–2167.
- Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, Fleischer R, Lok AS. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology* 2007; 45: 1056–1075.
- Jardi R, Rodriguez-Frias F, Schaper M et al. Hepatitis B virus polymerase variants associated with entecavir drug resistance in treatment-naive patients. *J. Viral Hepat*. 2007; 14: 835–40.
- Kramvis A, Kew MC. Molecular characterization of subgenotype A1 (subgroup Aa) of hepatitis B virus. *Hepatol Res* 2007; 37:S27–S32
- Krekulova L, Rehak V, Da Silva Filho HP, Zavoral M, Riley LW. Genotypic distribution of hepatitis B virus in the Czech Republic: a possible association with modes of transmission and clinical outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 1183-1188.

- Liu BM, Li T, Xu J et al. Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naive Chinese patients. *Antiviral Res.* 2010; 85: 512–9.
- Liu BM, Li T, Xu J, Li XG, Dong JP, et al. Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naïve Chinese patients. *Antiviral Res.* 2010; 85(3): 512–519.
- Lok AS, McMahon BJ. AASLD Practice Guidelines. Chronic Hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 2009; 50:1-36.
- Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV: Standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007; 46:254–265.
- McMahon BJ, Dentinger CM, Bruden D, et al. Antibody levels and protection after hepatitis B vaccine: results of a 22-year follow-up study and response to a booster dose. *J Infect Dis* 2009; 200: 1390–96.
- Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, Saraiva JC, Virgolino HA, Motta-Castro AR, Melo MM, Martins RMB, Gomes SA 2007. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 7: 103.
- Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 2007; 7:103.
- Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Secretaria de Vigilância em Saúde. Hepatites Virais no Brasil. Situações, Ações. Agenda 2011.
- Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. In: Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de DST AeHV, editor.: Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais; 2011.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico-Hepatites Virais, ano 3, n. 1, 2012. Disponível em: <[http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/51820/boletim\\_epidemiol\\_gico\\_hepatites\\_virais\\_2012\\_ve\\_12026.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/51820/boletim_epidemiol_gico_hepatites_virais_2012_ve_12026.pdf)>. Acesso em: 10 august 2015. 3 Id. Ibid.

- Nguyen MH, Garcia RT, Trinh HN et al. Prevalence of hepatitis B virus DNA polymerase mutations in treatment-naive patients with chronic hepatitis B. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2009; 30: 1150–8.
- Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarri JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic Diversity of Hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47: 289-309.
- Oliveira CM, Farias IP, Ferraz da Fonseca JC, Brasil LM, de Souza R, Astolfi-Filho S, 2008. Phylogeny and molecular genetic parameters of different stages of hepatitis B virus infection in patients from the Brazilian Amazon. *Arch Virol* 153: 823–830.
- Pereira LM, Martelli CM, Merchán-Hamann E, Montarroyos UR, Braga MC, Lima ML, et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81:240-247.
- Pollicino T, Isgro G, Di Stefano R, Ferraro D, Maimone S, et al. Variability of reverse transcriptase and overlapping S gene in hepatitis B virus isolates from untreated and lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients. *Antivir Ther.* 2009; 14:649–654.
- Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. *Virology* 2010; 7: 315
- Selabe SG, Lukhwareni A, Song E, Leeuw YG, Burnett RJ, et al. Mutations associated with lamivudine-resistance in therapy-naive hepatitis B virus (HBV) infected patients with and without HIV co-infection: implications for antiretroviral therapy in HBV and HIV co-infected South African patients. *J Med Virol.* 2007;79: 1650–1654.
- Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J. Hepatol.* 2006; 44: 593–606.
- Sheldon J, Soriano V. Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61: 766–768.
- Sitnik R, Pinho JR, Bertolini DA, Bernardini AP, da Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *Journal Clinical of Microbiology.* 2004; 42: 2455-60.
- Tan YW, Ge GH, Zhao W et al. YMDD motif mutations in chronic hepatitis B antiviral treatment naive patients: a multi-center study. *Braz. J. Infect. Dis.* 2012; 16: 250–5.

- Tauseef I, Iqbal F, Rehman W, Ali M, Qureshi JA, Aslam MA. A PCR-RFLP based protocol for the detection of hepatitis B virus variants in some lamivudine-untreated chronic hepatitis B virus carriers in Pakistan. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2012; 25: 349–52.
- Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, et al. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* 2009; 49: 1503–14.
- Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol.*2002; 25: 97–106.
- Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2014; doi: 10.1016/S0140-6736(14)60220-8.
- Viana S, Parana R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V 2005. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 73: 808-814
- Weber B. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. *J Med Virol* 2006; 78:59-65.
- Xu J, Wu B, Wang J-H, et al. Pre-Existing Mutations in Reverse Transcriptase of Hepatitis B Virus in Treatment-Naive Chinese Patients with Chronic Hepatitis B. ParaskevisD, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0117429. doi:10.1371/journal.pone.0117429.
- Zhang Q, Liao Y, Cai B, Li Y, Li L, Zhang J, An Y, Wang L. Incidence of natural resistance mutations in naive chronic hepatitis B patients: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.*2015;30:1440-1746.
- Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009; 137: 1593–608

## Tables and figures

Table 1: Clinical features of treatment-naïve patients for CHB attending two Reference Centers for Viral Hepatitis between 2011 and 2015.

	Northeast		North	
	(n=84)	%	(n= 105)	%
Age† (min-max)	18-72	44,3±12,3	18-72	40,5±12,3
Gender (male/female)	40/39	50,6/49,4	39/66	37,1/62,9
ALT† (IU/L)	7-231	45,65±38,9	12-414	42,63±52,3
VR>41 IU/L	29	38,7	28	28,3
HBeAg (+/-)	10/62	13,9/86,1	07/91	7,1/92,9
HBV DNA log10 >4	12	15,6	14	13,3
HBV DNA level†	1,51-8,34	3,3±1,47	1,75-8,04	3,12±1,4
HBV genotype				
A	75	89,3	62	59
D	2	2,4	22	21
F	6	7,1	21	20
C	1	1,2	0	0
Co-infection				
HBV HCV	1	1,2	2	1,9
HBV HDV			4	3,8
Mutation				
Escape vacinal (sHBV)	2	2,4	9	8,6
Mutation resistance				
NA	5	6	0	0

†median and Standard Deviation (SD)

Table 2. Virological and resistance mutation profile of CHB naïve patients to analogue nucleos(t)ides.

Patient	Age	Gender	Viral load (log UI/mL)	Genotype	Mutation		AgHBe Status	Resistance profile			
					rtHBV	sHBV		LAM	ADV	ETV	TDF
H: 351	56	M	3,72	A1	S202I		no reagent	S	S	R	S
H:105	62	M	8,6	A1	A194T		no reagent	S	S	S	R
H:117	48	M	2,21	A1	M204I	Q129H	reagent	R	S	R	S
H:123	27	M	6,11	F2	A181S		reagent	R	R	S	S
H:226	30	M	8,3	A2	L180M+M204V	I195M	reagent	R	S	R	S

Table 3. Comparing the epidemiological characteristics of patients with resistance mutations and no resistance mutations in the HBV RT region.

	Group with mutation (n=5)	Group without mutation (n=79)
Genotype type A	4	71
type non A	1	8
Gender male	4	36
female	1	38
HBeAg positive	3	7
negative	2	60
Age ≥ 40 years old	3	44
≤ 40 years old	2	21
HBV DNA ≥ log 4	2	10
≤ log 4	3	62
ALT ≤ VR=41 UI/dL	2	44
≥ VR=41 UI/dL	3	26

\*There was no significant association at a  $p < 0.05$

### 3.3 CAPÍTULO 3: Mutations Associated With Drug Resistance and Prevalence of Vaccine Escape Mutations In Patients With Chronic Hepatitis B Infection

Manuscrito do artigo 3 refere-se ao objetivo específico c) desta tese. Este artigo está sendo preparado para submissão para a Revista Hepatology.



**Title**

Mutations Associated With Drug Resistance and Prevalence of Vaccine Escape Mutations In Patients With Chronic Hepatitis B Infection

**Running title**

Mutations Associated With Drug Resistance

**Author list - e-mail addresses**

Maria Isabel Magalhães A. dos Santos<sup>a</sup> – [mariaisabel\\_mas@yahoo.com.br](mailto:mariaisabel_mas@yahoo.com.br)

**Sidelcina Rugieri Pacheco**<sup>a</sup> – [srugieri@gmail.com](mailto:srugieri@gmail.com)

Andreas Stocker<sup>b</sup> – [inbox@andreas-stoecker.de](mailto:inbox@andreas-stoecker.de)

Maria Isabel Schinoni<sup>c</sup> - [mariaschinoni4@gmail.com](mailto:mariaschinoni4@gmail.com)

Raymundo Paraná<sup>c</sup> - [unif@svn.com.br](mailto:unif@svn.com.br)

Mitermayer G. Reis<sup>a</sup> - [miter@bahia.fiocruz.br](mailto:miter@bahia.fiocruz.br)

Luciano K. Silva<sup>a</sup> - [kalabric@bahia.fiocruz.br](mailto:kalabric@bahia.fiocruz.br) /Phone number – (55) 71 3176-2301

**Author's affiliations**

<sup>a</sup> Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador-BA, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório do Serviço de Gastro-Hepatologia / de Pesquisa em Infectologia (SGH/LAPI), HUPES-UFBA, Salvador-BA, Brazil.

<sup>c</sup> Universidade Federal da Bahia, Ambulatório Magalhães Neto, HUPES-UFBA, Salvador-BA., Brazil.

## Abstract

**Background:** The Brazilian public health system (SUS) has provided antiviral drugs for chronic hepatitis B treatment for over 10 years, but a system for monitoring for drug-related resistance mutations is not available. **Aim:** Determine the presence of HBV mutations associated with resistance to nucleos(t)ide analogs among 81 naïve patients with chronic HBV infection and treated at Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador – BA - Brazil. **Methods:** HBV-DNA was PCR amplified with primers deduced from the flanking of the rt domain at the HBV P gene, and sequenced using ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, USA), the sequence extended 1032 bp and encompassed the entire rt domain (from amino acid 1 to 344). Those sequences were submitted to the HBV drug resistance database (HBVrt DB, Stanford University, USA) to retrieve each mutation according to the genotype and treatment. **Results:** HBV genotype A1 (85.2%) was the most prevalent, followed by genotype A2 (4.9%), F (6.2%), and C1, D2 and D4 (1.2% each). Six patients (7%) exhibited resistance mutations to LAM, ETV and TDF: two with patterns L180M + M204V and four with other different patterns: L80I + L180M + M204I; L80V + L180M + M204V; M204I; A194T. All of these mutations were present in patients with genotype A (four A1 and two A2). In addition, four mutations in gene S (three cases with the sI195M mutation and one with the W196L mutation), associated with mutations in the rt domain of the P gene were detected, corresponding to a rate of 6% of vaccine escape mutations. **Conclusion:** In this study, a strong association was found between the occurrence of HBV resistance mutations and HBeAg positivity, co-infection with HIV and a history of treatment for HBV and / or HIV.

Keywords: HBV, hepatitis B virus, resistance, nucleos(t)ides analogs.

## Introduction

Although the safety and efficacy of vaccines, infections with hepatitis B virus (HBV) is a public health problem, mainly, being one of the leading causes of death from infectious disease worldwide. The World Health Organization (WHO) estimates that one third of the world population has serologic evidence of HBV infection, 350 million people are chronically infected, and 600,000 die each year as a result of acute or chronic hepatitis B (Kane 1995; WHO 2008). Infected have a high risk of

developing severe forms of the disease such as cirrhosis, liver failure, hepatocellular carcinoma, and death (Maddrey 2001) .

The HBV belongs to the Orthohepadnavirus genre of Hepadnaviridae family. It has partially double-stranded DNA genome of approximately 3,200 nucleotides (nts.). Although HBV is a DNA virus, it requires the reverse transcriptase activity during the viral replication cycle. Errors promoted by reverse transcriptase during replication generate are at a rate of approximately  $1.4$  and  $3.2 \times 10^{-5}$  substitutions of nucleotides (nt.) per year (Locarnini 1990). This rate is considered the highest among DNA virus genomes (Duffy 2008). This phenomenon is responsible to form heterogeneous groups of sequences of the viral genome in the same host, known as viral quasispecies.

Under the action of antiviral drugs, the quasispecies population can evolve through the selection of resistant HBV mutant forms due to the drugs. In order to prevent the emergence of resistance and to guide treatment decisions, the continuous monitoring of patients during the antiviral treatment is necessary. Therefore, viral mutations have virological, laboratory and clinical effects that can ultimately determine the therapeutic failure (MARTELL 1992; CHEN 2002).

In the last twenty years, significant advances in the treatment of chronic hepatitis B have occurred, initially by the use of interferon-alpha ( INF-alpha ) , which allowed changing the natural progression of the disease, and more recently, by the use of pegylated-interferon (peg-INF) , which helps the patient through its administration in a single dose (1 dose / week) . However, INFs have restricted its use due to high cost and mainly because of its side effects. This limitation does not occur with the use of nucleos(t)ide analogues. However, as mentioned above, the extended use of nucleos(t)ide analogues can determine the emergence of drug-resistant (eg, YMDD mutant) strains. This can occur in up to 32 % of patients with the "e" antigen reagent in the HBV serum (HBeAg or nuclear protein) after one year of treatment, reaching 70% of patients after four or five years of treatment with lamivudine (LAM). The advent of mutations that confer resistance to nucleos(t)ide analogues usually aggravate the condition of chronic hepatitis B, bringing back the risk of complications and resulting in an increased activity of a necroinflammatory liver ("flares") (Thompson 2006) .

Moreover, resistance to one drug may predispose to cross-resistance to other drugs, thus generating many patients infected with multi-resistant viruses. It is also

known that mutations in the reverse transcriptase (target of nucleos(t)ide analogues) predispose mutations in the HBV S gene, favoring a possible vaccine escape (Lacombe 2013).

The international scientific literature has supported research on screening for genotypic resistance of HBV variants that do not correspond to those found in Brazil. Therefore, this study may contribute to the association of resistance for the genotypes A1 and F.

Given this context, and in order to benefit patients with chronic hepatitis B, the monitoring of antiviral treatment is very important: the patient who receives treatment finds adherence difficult due to the need of its long-term use; and the medical and health system, will have a technical parameter to evaluate treatment protocols, to decide upon a more efficient treatment that is less burdensome to the health system.

The purpose of study was to determine the presence of HBV mutations associated with resistance to nucleos(t)ide analogues among 81 naïve patients with chronic HBV infection and treated at the Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador – BA - Brazil.

## **Materials and Methods**

### **Study sites and samples**

The study was conducted at the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA), Salvador-BA, in collaboration with the Hepatology Service of Ambulatório Magalhães Neto, Hospital Universitário Prof. Edgar Santos of the Universidade Federal da Bahia (HUPES-UFBA), Salvador - BA, the Research Laboratory of Infectious Diseases (LAPI-BA), Salvador - BA and the Central Public Health Laboratory (LACEN-BA), Salvador - BA.

We recruited all HBV DNA detectable (viral load above 160 copies / mL) patients being accompanied at the Hospital Professor Edgar Santos who made blood draw to evaluate the viral load in the period from July 2012 to May 2015, for the presence of AgBHs for more than six months, and with a confirmatory molecular test represented by a HBV-DNA qualitative. These patients were naïve or treated with nucleos(t)ide analogues (LAM, ETV, ADV and TDF), and agreed to participate by signing the TCLE that was approved by the Ethics Committee for Research Involving Human Subjects of FIOCRUZ-BA and HUPES-UFBA.

### Collection and storage of data and samples

Data from interviews and reviews of medical records were registered in a database protected by password, available at FIOCRUZ, and accessible only by members of the research team (REDCap, Vanderbilt University, USA). A blood sample was collected from each participant to carry out the HBV viral load with COBAS® TaqMan kit (Roche, USA) and the analysis of resistance mutations. The samples were processed within 2 h from the collection by serum separation, then aliquoted and frozen in a freezer at -80°C until use, to prevent degradation of viral DNA.

### HBV- DNA isolation and sequencing of amplicon.

Total DNA was extracted from 200 µl of each serum sample using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, USA) according to the manufacturer's instructions. Two overlapping regions comprising the whole area of rt were amplified using primers, CF and S-R2A, and RT-F4 and RT-3a.A, the amplification using the primers CF and S-R2A was performed with a volume of 60 µL containing 5 µL of the extracted DNA, 1x PCR buffer without MgCl<sub>2</sub>, 0.20 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM of each primer and 0.02 U / µL Taq Polymerase Platinum. The reagent mixture was heated at 94°C for 2 min; followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 20 seconds, annealing at 57°C for 30 seconds and extension at 72°C for 60 seconds; and finally one more step at 72°C for 5 minutes to finish the extension of the tapes that were already amplified. RT-PCR amplification with these primers F4 and RT-3a was carried out with 60 µL, with the same reaction conditions, but with the proposed annealing temperature of 59°C.

The amplified products were subjected to electrophoresis on agarose 1% gel, prestained with SYBR Safe (Invitrogen, USA) and visualized with the transilluminator under blue light.

Purification of PCR products was performed using the PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. The material was sent for sequencing of the polymerase gene through the BigDye Terminator method (ABI 3730).

### Assembling sequence and determination of HBV genotypes

The sequences of at least four (max. 6) of each isolate were assembled along with a reference sequence of the genotype A1 or F (Genbank accession number AB116092 and AY090459, respectively). Analyses were performed using software CLC Main Workbench v.6.9 by visual inspection of electropherograms and correction of conflicting sites. For this analysis, we used the function "assemble sequences to reference" and the program's default parameters. The contigs had a size of 1032 bp (corresponding to amino acids 1-344 of the RT HBV) (Stuyver, L. 2000). The consensus sequence of each isolate was compared to a reference HBV sequence available in the DB HBVrt database (Rhee Margeridon-Thermet et al. 2010) for genotyping. The sequences were also analyzed in the MEGA program V.5.05 through the Neighbor-Joining algorithm (NJ) and 100 bootstrap replicates using analysis (Tamura K 2011).

#### Analysis of resistance mutation of RTHBV gene

The antiviral resistance mutations for chronic hepatitis B located in rtHBV L80V / I, V84M, I169T, V173L, L180M, A181V / T, T184G, A194T, S202G / I, M204I / V / S, I233V, N236T and M250V were reviewed using an online tool available in the rtHBV DB database (Stanford University, USA) (Rhee, Margeridon-Thermet et al. 2010). This software also allows searching for mutations that impact on vaccine escape mutations associated with the rt, located in the S gene rtM204I (sW196\* / S / G), rtM204V (sI195M) + rtM204V rtL180M / I (no mutations rtL180M) or rtV173L + rtL180M + rtM204V / I (sE164D, sI195M).

#### Data analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 21 program (IBM, USA). The events of interest were reported with mean and standard deviation. To compare proportions, the Chi-square test (corrected by Yates) or Fisher's exact test were used when recommended. The odds ratio (OR) was calculated using the method of cross-products. In all statistical tests, a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) was used.

#### Results

A total of 81 patients had a viral load above 160 copies / ml, which allowed the search for HBV resistance mutations by the standardized method as described above. In addition, 90% (73/81) had records in HUPES, which allowed for a review of

clinical and laboratory data. The sample showed a higher frequency (56%) of males with a mean age (years) of  $44.2 \pm 14.3$  (SD = standard deviation). It was observed that most patients are mono-infected with HBV and with fibrosis F1 - F3.

Only 25% (18/73) of patients with chronic hepatitis B had a history of previous antiviral treatment or in progress. The treatment was administered in male predominantly patients (78%) that were HBeAg positive (73%), ALT altered (72%), with fibrosis F1 - F3 (100%), according to the data obtained upon admission (Table 1).

A chart review was not possible in one patient. The HBeAg seropositivity and ALT levels were maintained practically unchanged between admission and pretreatment. One patient did not test for HBeAg before treatment, but this was positive upon admission. The average viral load of HBV was of  $7.3 \pm 7.6$  log / mL, much greater than 2,000 copies / mL or 3 log / mL, a value that is recommended by the Ministry of Health protocols as a standard for indication of treatment (Table 2). The average duration of treatment was 3 years, the minimum was less than one year and maximum 11 years. Most patients were treated with a single treatment regimen (82%) and monotherapy (78%). In our series, ETV was the most frequently administered drugs (44%), followed by TDF (39%), INF (16%) and LAM (16%) (Table 2).

The timeline of sixteen patients with their treatment history is represented in Figure 7. The oldest treated patient was admitted in 1998 (T-5), but only started treatment in 2012, waiting for fourteen years. The time of monitoring and the start of treatment were influenced by individual clinical features and the availability of antiviral drugs. INF and / or LAM analogues were administered to patients who began treatment earlier. Insofar as other antiviral drugs with greater genetic barrier and less side effects were available, they were gradually being preferably used (Figure 1).

Amplification and sequencing of HBV DNA for research of resistance mutations was performed on all samples tested. Altogether, 81 contigs were analyzed with, the size of 1032 bp, which corresponds to the total area of the rt P gene domain. Among the isolates tested, the A1 genotype was the most prevalent (85.2%) followed by the A2 genotype (4.9%) F (6.2%) and C2, D2 and D4 (1.2% each).

Six isolates (7%) have mutations associated with the development of resistance to nucleos(t)ide analogues in the rt P gene domain (genotypic resistance):

two patients showed the pattern L180M + M204V and four had other standards (L80I + L180M + M204I, M204V + L80V + L180M, M204I, A194T).

All mutations were identified in isolates with genotype A. In addition, four strains with mutations in the S gene mutations associated with the P<sub>rt</sub> gene domain were detected. This corresponds to a rate of 6% of vaccine escape mutations. Three cases presented the sI195M mutation and the sW196L mutation. Although these codons overlap only in the region of the rtM204V / I mutation, changes in the S gene were found only between the cases with the compensatory mutations rtL80I / V and rtL180M (Table 3).

Taking as the outcome, the occurrence of mutations was significantly associated to this event: positive for HBeAg, co-infection with HIV and history of treatment for HBV and / or HIV (Table 4). Due to lack of data from some patients and the sample size, the impact of the pretreatment viral loads on the occurrence of resistance mutations was not possible to be evaluated.

## Discussion

We found that the genotypic profile of the studied populations was very similar and presented the three genotypes (A, D, F) circulating in Brazil (Araujo, Mello et al 2004; Bottecchia 2008, Gouvêa 2015). Interestingly, a patient with genotype C was found, although this genotype is characteristic in the East Asian region, it has been described in Brazil, as of recently (Bertolini OF 2012). Still, it observed a higher frequency of HBV infection in men and with an average age of 40 years. Data that corroborate the literature, which indicates a higher hepatitis B infection rate in groups of men (Bottecchia 2008).

The main resistance mutations are found between the amino acid positions 80 to 250 (M Ghany 2007). And mutations in the YMDD motif at position 204 are the most frequent and relevant to resistance to lamivudine (DA SILVA 2000; Haddad 2010).

In the study population, we observed the presence of mutation of the following standards: L180M + M204V and four different patterns: L80I + L180M + M204I; L80V + L180M + M204V; M204I; A194T.

Among the factors which predispose HBV resistance to analogues, there are: the persistence of HBsAg for more than 6 months in serum situation, which characterizes chronic hepatitis B, and elevated viral load and transaminases before



the treatment and on the duration (time) of the treatment (Thompson 2006) and the presence of HBeAg pre-treatment and co-infection with HIV.

In this study we observed a strong association of factors: history of treatment, pretreatment of HBeAg positive status, and co-infection with HIV to the development of the resistance mutation ( $p = 0.01$ ,  $p = 0.01$  and  $p < 0.01$  respectively).

As mentioned before, resistance mutations related to lamivudine are mainly in the YMDD motif. Because of this reason, M204V and M204I are the most frequent resistance mutations to lamivudine (Zöllner 2004; Thompson 2006; Haddad 2010). It is also reported that the M204V mutation reduces viral fitness when compared to M204I. By virtue of this characteristic, the M204V mutation is combined with the compensatory mutation L180M to enhance this replication capacity, while the M204I can be more easily found individually (Zöllner 2004; Thompson 2006; Haddad 2010).

Tenofovir is analogous with higher genetic barrier, so it has little or no associated resistance mutation. Recently, the A194T mutation has been described with a resistance mutation, *in vitro*, associated with the TDF. This mutation has been described in the literature in a HIV monoinfected case treated with TDF for 6 months (Lacombe, Boyd et al. 2013). In our study, the patient who had the virus with this mutation was treatment-naïve and had a viral load of  $< 2,000$  IU / ml or  $3 \log$  / mL.

Although there are still few studies, it is believed that the genotype may also have influence on the development of resistance to antiviral drugs, and genotype D is the most frequent for M204I mutation in comparison to the genotype A. (Zöllner 2004; Bottecchia 2008; Haddad 2010).

In this work, all the mutations found were present in patients with genotype A. However the association analysis did not show statistically significant results.

The work also includes analysis of changes in the S gene, with impact on vaccine escape, associated with mutations in the RT. A rate of 6% of sequences was found to have vaccine escape mutations, lower than the rate reported in studies with patients coinfecting with HIV (Lacombe, Boyd et al. 2013). Those change for the group of patients coinfecting with HIV and have the genotype D, and are in a prolonged treatment with lamivudine as risk factors for the development of these mutations. However, in this work, such mutations in the HBV consensus sequences of three patients coinfecting with HIV and monoinfected was observed, all genotypes A.

## **Conclusion**

In the population studied, we found a higher frequency of men that were HBeAg negative patients, 25%, however, among patients treated for HBeAg positive, the percentage was higher, with 71%. With respect to HBV genotyping, an increased prevalence of the genotype A1 (85.2%) followed by the genotype A2 (4.9%), F (6.2%) and C2, D2 and D4 (1.2% each) was observed. There was a rate of 7% of mutant strains resistant to nucleos(t)ide analogues, and a strong association between the occurrence of resistance mutations for HBV in patients with co-infection for HIV in the treatment history, and negative anti-HBe was found. In the future, a study with an analysis of the level of viral quasispecies will be necessary.

Finally, given the results presented before therapy is initiated, it is extremely important to monitor the viral load and identify the resistance mutations to support clinical decisions about management of patients and prevent the emergence of resistant multi-viruses.

## **Acknowledgments**

This study is funded by FIOCRUZ – BA and Universal-MCTI / CNPq No. 14/2012. In addition, we are thankful to the partner institutions LACEN-BA, for the exams, and infrastructure provided by the Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES).

## **Disclosure Statement**

There are no existing competing financial interests or conflicts of interest.

**Funding source:** National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) process: 478322/2012-7

## References

- ALAN KAY, F. Z. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. **Virus Res.**, v. 127, p. 164–176, 2007.
- ARAUJO, N. M. et al. High proportion of subgroup A? (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. **Arch. Virol.**, v. 149, n. 7, 2004.
- BERTOLINI, D.A. et al. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. **Infect Genet Evol.** v.6,n.12,p. 1295-1304, 2012.
- BOTTECCHIA, M. S. et al. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. **BMC Microbiol.**, v. 8, n. 11, p. 1-10, 2008.
- BRASIL, M. S. Doenças Infecciosas e Parasitárias-Brasília/DF, 2008.
- CHEN, S. W., Y. M. Genetic evolution of structural region of hepatitis C virus in primary infection. **Worl J gastroenterol.** v.8, p.686-693, 2002.
- DA SILVA , L. C. D. F. et al. Predictive factors for response to lamivudine in chronic Hepatitis B. **Rev. Inst. Med. trop.** v. 42, p.189-196,2000.
- DUFFY, S. et al. Rates of evolutionary change in virus: patterns and determinants. . **Nature Publishing Group.**v. 9, p. 267-276, 2008.
- HADDAD, R. M., et al. Hepatitis B virus genotyping among chronic hepatitis B patients with resistance to treatment with lamivudine in the city of Ribeirão Preto, State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.43,p. 224-228, 2010.
- KANE, M. Global programme for control of hepatitis B infection. **Vaccine.** v.13, p. 47–49, 1995.
- LACOMBE, K. B. et al. High Incidence of Treatment-Induced and Vaccine-Escape Hepatitis B Virus Mutants Among Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis B–Infected Patients. **Hepatology** .v.58, n.3, p. 913-922, 2013.
- LOCARNINI, S. B., C. Antiviral chemotherapy for chronic hepatitis B infection: lessons learned from treating HIV-infected patients. **Journal of Hepatology** . v.30, p. 36-550, 1990.

- MADDREY, W. C. Hepatitis B--an important public health issue. **Clin Lab.** v.47,n.1-7,p. 51-55, 2001.
- MARTELL, M. E., et al. Hepatitis C Virus (HCV) Circulates as a Population of Different but Closely Related Genomes: Quasispecies Nature of HCV Genome Distribution. **Journal of virology.** v. 66, n.5, p.3225-3229, 1992.
- THOMPSON, A. J. V. A., et. al. Lamivudine resistance in patients with chronic hepatitis B: Role of clinical and virological factors. **Journal of Gastroenterology and Hepatology.** v.22, p.1078–1085, 2006.
- WHO. Hepatitis B. Acessado em: 24/01, 2011, disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>, 2008.
- WHO , Hepatitis B, countries or areas at risk , 2012.
- ZOLLNER, B. P., et al. Viral Features of Lamivudine Resistant Hepatitis B Genotypes A and D. **Hepatology.** v. 39, p. 42-50, 2004.

## Tables and figures

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics at admission of patients with chronic hepatitis B treated at HUPES, 2012-2015.

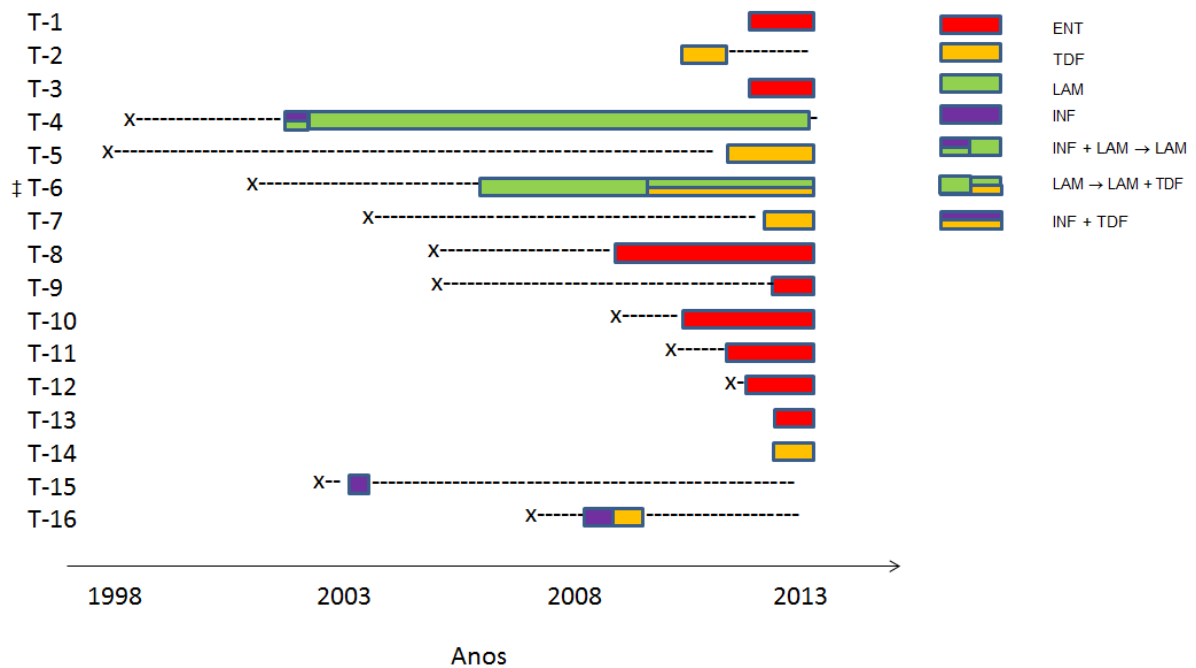
Characteristics on admission	Treatment history				Total	
	Naive N=55 <sup>†</sup> (%)	Average ± DP	Treated N = 18 <sup>†</sup> (%)	Average ± DP	N = 73 <sup>†</sup> (%)	Average ± DP
<b>Sex</b>						
Male.:Fem.	27:28 (49:51)		14:4 (78:22)		41:32 (56:44)	
Age (years)		43,9 ± 14,2		46,9 ± 14,7		44,2 ± 14,3
Min. – Max.		17 – 71		18 - 76		17 - 76
<b>Serology pos.</b>						
AgHBe	5/45 (11)		11/15 (73)		16/60 (27)	
anti-HCV	1/39 (3)		0/16 (0)		1/55 (2)	
anti-HIV	0/28 (0)		3/13 (23)		3/41 (7)	
anti-HTLV I/II	1/18 (6)		1/7 (14)		2/25 (8)	
ALT		88,8 ± 332,1		73,4 ± 48,5		84,7 ± 284,9
> VR = 41	18/48 (38)		13/18 (72)		31/66 (47)	
<b>UI/dL</b>						
<b>Biopsy</b>						
<b>/Elastography</b>						
F0	3/8 (37)		0/7 (0)		3/15 (20)	
F1-F3	5/8 (63)		7/7 (100)		12/15 (80)	
F4	0/8 (0)		0/7 (0)		0/15 (0)	
Steatosis	13/25 (52)		3/7 (43)		16/32 (50)	

<sup>†</sup> Total vary depending on availability of data. DP = standard deviation.

**Table 2.** Clinical and laboratory data pretreatment of patients treated with antiviral drugs in HUPES, 2012-2015.

Characteristics	N=18 <sup>†</sup> %	Average ± DP
<b>Pretreatment</b>		
AgHBe pos.		10/14 (71)
ALT		72,3 ± 67,2
> VR = 41 UI/dL		12/16 (75)
HBV-DNA (log/mL)		7,3 ± 7,6
<b>Treatment history</b>		
Previous		3/17 (18)
In course		14/17 (82)
<b>Duration of treatment</b>		
(year)		3,0 ± 4,1
Min. – Max.		<1 - 11
<b>Number schemes</b>		
1		14/17 (82)
2		3/17 (18)
<b>Type of regimen</b>		
Monotherapy		14/18 (78)
Conjugada		4/18 (22)
<b>Antiviral drug</b>		
INF		3/18 (16)
LAM		3/18 (16)
ETV		8/18 (44)
TDF		7/18 (39)

<sup>†</sup> Total vary depending on availability of data. DP = standard deviation.



**Figure 1.** Patients in the timeline with chronic hepatitis B treated in HUPES-UFBA Complex, between 2012 and 2015.

Note: The "x" represents the admittance, the dotted line monitoring period and the rectangle patient treatment period. ‡ Patients seropositive for HIV.

The T17 and T18 cases are patients treated at Couto Maia and CEDAP respectively and for this reason are not represented on the timeline.

**Table 3.** Genotypic profile of patients with mutations of resistance to analogues nucleos(t)ídes.

Case	Origin	Genotype	Mutations	
			Gene P	Gene S
T-6	BRA/BA/SSA	A1	L80V+L180M+M204V	I195M
T-11	BRA/BA/SSA	A1	M204I	-
T-17	BRA/BA/SSA	A2	L180M+M204V	I195M
T-18	BRA/BA/SSA	A2	L180M+M204V	I195M
N-1	BRA/BA/SSA	A1	A194T	-
N-2	BRA/BA/SSA	A1	L80I+L180M+M204I	W196L

N = naïve patient; T = treated patient.

**Table 4.** Clinical and laboratory characteristics of patients with chronic hepatitis B with / without mutation seen at HUPES between 2012-2015.

Characteristics	With Mutation		Without Mutation		P
	N = 6 <sup>†</sup>	Average ±DP	N = 75 <sup>†</sup>	Average ±DP	
AgHBe					0,01
Pos.	3		12		
Neg.	0		44		
HIV					
Serum positive	2		0		< 0,01
Serum, negative	1		37		
ALT, UI/dL	83,5 ± 19,0		72,8± 74,3		
Level ALT					
> VR=41 UI/dL	3		28		ns
≤ VR=41 UI/dL	1		33		
Viral load, log/mL	1	6,28	9	5,54 ± 1,65	nd
Genotype					ns
A	6		65		
No-A	0		8		
Hist. treatment					0,01
Treated	4		14		
Naive	1		53		
Antiviral drug					ns
LAM	1		1		
Others *	2		13		
Duration of treat., months	2	76 ± 76	14	30 ± 35	ns

<sup>†</sup> Total vary depending on availability of data. DP = standard deviation. ns = not significant. nd = not determined. \* Some patients were treated for HIV with other analogues nucleos(t)ídes.



### 3.4 CAPÍTULO 4: Epidemiologia molecular do vírus da Hepatite B no Estado do Acre, Brasil

Manuscrito do artigo 4 refere-se ao objetivo específico c) desta tese. Este artigo está sendo preparado para submissão para Journal Virology

**Título**

Epidemiologia molecular do vírus da hepatite B no Estado do Acre, Brasil

**Autores**

Sidelcina Rugieri Pacheco (1)

[srugieri@gmail.com](mailto:srugieri@gmail.com)

Maria Isabel Magalhaes Andrade dos Santos (1)

[mariaisabel\\_mas@yahoo.com.br](mailto:mariaisabel_mas@yahoo.com.br)

Andreas Stocker (2)

[astocker@ufba.br](mailto:astocker@ufba.br)

Maria Isabel Schinoni (2)

[mariaschinoni4@gmail.com](mailto:mariaschinoni4@gmail.com)

Raymundo Paraná (2)

[unif@svn.com.br](mailto:unif@svn.com.br)

Mitermayer Galvão dos Reis (1)

[miter@bahia.fiocruz.br](mailto:miter@bahia.fiocruz.br)

Luciano Kalabric Silva (1)

[kalabric@bahia.fiocruz.br](mailto:kalabric@bahia.fiocruz.br)

(1) Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz- Fundação Oswaldo Cruz- Laboratório de  
Patologia e Biologia Molecular

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Bahia-Brasil CEP: 40296-710

(2) Universidade Federal da Bahia

**Palavra-chave:** Hepatite B, mutações de escape vacinal, mutações de resistência,  
genótipos

## Resumo

A hepatite B (VHB) é uma infecção crônica, em contrapartida apresenta programas de imunização e tratamento antiviral disponível, entretanto mutações do genoma do VHB, principalmente no gene S e no gene P da região da Transcriptase Reversa (RT), resultam em mutações de escape vacinal e mutações de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos que devem ser rastreadas, devido as suas implicações clínicas. O presente estudo demonstrou em uma amostra de 156 pacientes com VHB crônica proveniente do estado do Acre, na região Norte do Brasil, uma taxa de mutação de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos de 1,2%, as mutações primárias encontradas foram rtA181E, e rt rtT184S/T. As mutações de escape vacinal que estão relacionadas com a redução da antigenicidade do AgHBs, apresentaram uma taxa de 7,1%. Mutações compensatórias também foram encontradas, sendo que as mais frequentes foram rtN246S, rtH248N e rtl233V. Os genótipos circulantes foram A, F e D respectivamente e os subgenótipos foram A1, D1, D2, D3, D4, F1 e F2. Devido à emergência das mutações de escape vacinal e mutações de resistência ao tratamento antiviral, e a gravidade da doença hepática provocada pelo VHB, o rastreamento das mutações são importantes devido ao impacto na conduta terapêutica.

## Introdução

O vírus da hepatite B (VHB) é considerado como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Aproximadamente, 400 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com VHB, sendo responsável por mais de 600.000 registros de óbitos por ano (El-Serag e Rudolph, 2007; Trepo *et al.*, 2014). A infecção pelo VHB apresenta um grande impacto pessoal, social e econômico, está associado com uma significativa morbimortalidade, podendo evoluir para cirrose hepática, descompensação hepática e carcinoma hepatocelular (Chen *et al.*, 2006; Di Bisceglie, 2009; Lok e McMahon, 2009).

Apesar de existir vacina segura e eficaz e tratamento antiviral para o VHB, mutações no genoma do VHB têm sido descrita na literatura científica com implicações biológicas e clínicas. Dentre essas mutações, as mutações no gene S estão relacionadas ao escape vacinal e mutações no gene P, precisamente, as da região da transcriptase reversa (RT) estão relacionadas às mutações de resistências

ao tratamento antiviral, os análogos de nucleos(t)ídeos. As mutações de resistência podem ser de dois tipos, as mutações de resistência primária, que são diretamente responsáveis pela resistência e as mutações de resistência secundárias ou compensatórias, que são responsáveis por promover ou aumentar a replicação viral (Lok *et al.*, 2007).

A análise filogenética das sequências genômicas dos isolados em várias regiões geográficas permitiu a caracterização da diversidade do VHB definida em até o presente momento em 10 genótipos e 9 subtipos com base nas diferenças das sequências de nucleotídeos do gene pré S/S ou do genoma completo. Utiliza-se como padrão que diferentes genótipos devem apresentar uma divergência  $\geq 8\%$  e que a determinação dos sub-genótipos de um mesmo genótipo deve apresentar divergência  $> 4\%$  em sua sequência de nucleotídeos (Okamoto *et al.*, 1988; Norder *et al.*, 1994; Stuyver *et al.*, 2000; Arauz-Ruiz *et al.*, 2002) (Okamoto H, 1988; Norder H, 1994; Stuyver L, 2000; Arauz-Ruiz P, 2002).

A distribuição geográfica dos genótipos do VHB apresenta padrões característicos. O genótipo A é mais prevalente no noroeste da Europa, América do Norte e regiões da África; os genótipos B e C em indivíduos de origem asiática do extremo leste, China e Japão; o genótipo D é cosmopolita, mas a prevalência é maior em países dos Bálcãs, Oriente Médio, podendo entender-se até a Índia; o genótipo E está restrito a áreas do oeste sub-Saara; o genótipo F é predominante entre índios da América Central e do Sul; o genótipo G é encontrado nos EUA e França; e o genótipo H foi recentemente encontrado na América Central (Stuyver *et al.*, 2000; Franca *et al.*, 2004; Norder *et al.*, 2004). O genótipo I foi descrito no Vietnã, Laos e China e o genótipo J no Japão (Locarnini *et al.*, 2013). Os genótipos circulantes descritos para o Brasil são respectivamente o A, D e F (Sitnik *et al.*, 2004; Mello *et al.*, 2007; De Oliveira *et al.*, 2008). O genótipo F é mais frequente na população indígena na região Norte do país (Viana *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010).

No Brasil, a endemicidade do VHB é heterogênea, sendo a infecção mais prevalente na região norte do país, e o Estado do Acre é o que apresenta a maior taxa de detecção de VHB entre todos os estados brasileiros, com aproximadamente 60% de casos por 100.000 habitantes (Ministério Da Saúde, 2011). São poucos os estudos científicos brasileiros, que aplicam a epidemiologia molecular para a hepatite B. O presente trabalho teve como objetivo rastrear as mutações de escape vacinal e de resistência antiviral, e os genótipos e subgenótipos circulantes do VHB,

através da aplicação da epidemiologia molecular nos pacientes com hepatite B crônica no Acre, região Norte do Brasil.

## **Metodologia**

### **Participantes da Pesquisa**

Estudo de corte transversal, analítico, envolvendo 156 pacientes com hepatite B crônica, amostras coletadas durante o período de 2011-2012. Todos os pacientes apresentaram AgHBs positivo por mais de seis meses, e não apresentaram co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os participantes da pesquisa foram provenientes do Serviço Especializado do Ambulatório de Hepatites do Hospital Fundação do Acre – FUNDHACRE (Hospital das Clínicas) em Rio Branco, Acre, região norte do Brasil.

### **Carga viral do VHB**

O VHB-DNA foi detectado e quantificado por ensaio de PCR em tempo real. Os procedimentos adotados seguiram as recomendações do fabricante e foram realizadas automaticamente nas instalações do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Acre (LACEN).

### **Reação de Cadeia da Polimerase – PCR**

O VHB-DNA foi extraído a partir das amostras dos pacientes a partir de 200 µL de cada amostra de soro utilizando o Kit High Pure Kit de Ácido Nucleico viral (Roche, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A região do gene da RT do VHB (1032 pb) foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os iniciadores (primers) foram descritos por (Krekulova *et al.*, 2003) e modificado para aumentar a sensibilidade da PCR. Na primeira reação, os iniciadores utilizados foram HB-1 5' TAT TTC CCT GCT GGT GGC TCC 3' (posição 50-71), e HB-4 5' ACT TTC CAA ATA TCA GG 3' (posição 969-986). Na segunda reação, os iniciadores utilizados foram HB -5 5' TAA GAA CAG ACC CTG CTC CG 3' (posição 78-98) e HB-8 5' ACA ATA TGT TGA TGT TCC GG 3' (posição 909-929) (Life Technologies, EUA).

Para a amplificação do DNA, 5,0 µL da amostra foi utilizado para a primeira reação com os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão 10 x de PCR, 0,5 µL de mistura de dNTP (10 mM), 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µL de cada iniciador, e 0,2

ul de DNA-polimerase Taq Platinum (5 U / mL) (Invitrogen, San Diego, CA, EUA), resultando num volume final de 25 uL. As condições de ciclos usados inicialmente foram de 94 ° C durante 2 min de desnaturação, seguida de 45 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 56,0 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 2 min, e uma extensão final de 72 ° C durante 7 min no termociclador Mastercycler Gradient Termociclador (Eppendorf, em Hamburgo, Alemanha).

Para a segunda reação foi utilizado 1.0µL do produto de PCR, com os seguintes reagentes: 5 ul de tampão de PCR 10 x, 1,0 uL de mistura de dNTP (10 mM), 2,5 mL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 5 uL de cada iniciador, e 0.2µL de platina ADN-polimerase Taq (5 U / mL) (Invitrogen, San Diego, CA, EUA), resultando num volume final de 50 uL. As condições de ciclos usados foram de 94 ° C durante 2 min de desnaturação, seguida de 35 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 60,0 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 2 min, e uma extensão final de 72 ° C durante 7 min no termociclador Mastercycler Gradient Termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

### **Sequenciamento da região VHB RT**

As amostras foram purificadas com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, EUA), e sequenciados com os iniciadores (primers), utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas no sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **A análise da sequência**

Para confirmar o tipo de vírus, as sequências obtidas foram analisadas usando a ferramenta BLAST GenBank. A análise genotípica do VHB foi realizada por comparação das sequências referências com as sequencias obtidas a partir de VHB-DNA isolado a partir dos pacientes com sequências de consenso do VHB. Posteriormente, sequências de nucleotídeos foram analisados utilizando os softwares DNA Star 5.0 e 4.0 MEGA. Mutações de resistência (RT), genótipos, subgenótipos e mutações no gene S foram determinadas por análise filogenética utilizando sequências publicadas e foi realizado fenotipagem virtual por dois algoritmos, disponível no site da Universidade de Stanford (<http://hibdb.stanford.edu/HBV/HBVseq/development/HBVseq.html>) e no site do Max-Planck-Institut für Informatik, Alemanha (<http://hbv.geno2pheno.org/index.php>). As 156

sequências destas análises foram submetidas ao GenBank (número de acesso: KU847472-KU847634)

### **Analises estatística**

As variáveis foram analisadas através do pacote estatístico SPSS 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA). Os eventos de interesse foram descritos através de frequências e de medidas de tendência central (média e mediana) e dispersão (desvio padrão). Concentrações de DNA do VHB foram expressos em uma escala logarítmica.

### **Considerações éticas**

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética da FUNDHACRE, Rio Branco, Acre.

### **Resultados**

Os pacientes apresentaram uma idade média com desvio padrão de  $40,9 \pm 12,4$ , e a faixa etária entre 18 a 72 anos de idade. Os pacientes acima de 40 anos, correspondem a 49,4%, sendo que a maior frequência foi do sexo feminino com 59%. Os pacientes que residem na capital e no interior do Acre foram praticamente 50% cada.

Os níveis de alanina aminotransferases (ALT) em média com desvio padrão, foi de  $42,63 \pm 52,3$ , sendo que foram observados valores de 12 a 414 IU/L e os que apresentaram ALT acima do valor de referência (41 UI/mL) foram 30,3%. A maioria dos pacientes com VHB crônica, 86,4% apresentaram AgHBe negativo.

Em relação a carga-viral do VHB-DNA os valores foram dados em log<sub>10</sub>, a média com desvio padrão foram de  $3,47 \pm 1,5$ , com o valor mínimo de 1,74 e o máximo de 8,4 log<sub>10</sub> cópias por mL. Os resultados acima de 4 log cópias por mL correspondem a 23,7%. Os pacientes que não foram tratados, os pacientes virgens de tratamento, correspondem a 59,5%, e os pacientes em tratamentos foram 40,5%. Destes, 7,1% foram diagnosticados com cirrose hepática.

Os genótipos circulantes foram o A com 57%, D com 19,9% e o F com 23,1%. Os subgenótipos foram A1(57%), D1(1,3%), D2(2,6%), D3(9,0%), D4(7,1%), F1(7,1%) e F2(16%). Os pacientes que apresentam co-infecção com VHC, foi 1,9% e com o VHD foi de 11,5%.

As mutações de resistência foram encontradas em dois pacientes em tratamento que corresponde a uma taxa de 1,2% e os que apresentaram mutações de escape vacinal foi de 7,1% (Tabela 1).

Tabela 1. Características epidemiológicas, tratamento e perfil de mutações dos pacientes com VHB crônico, atendidos no Hospital das Clínicas do Acre, no período de 2011-2012.

Características	(n=156)	%
Idade† (min-max)	18-72	40,9±12,4
> 40 anos	77	49,4
Sexo (masculino\feminino)	64/92	41/59
Residência		
Rio Branco (Capital)	64	49,2
Interior	66	50,8
Níveis de ALT		
ALT† (IU/L)	12-414	42,63±52,3
VR>41 IU/L	36	30,3
Status AgHBe	29	38,7
AgHBe (+/-)	20/127	13,6/86,4
VHB-DNA		
DNA -VHB log10 >4	37	23,7
DNA-VHB nível †	1,74-8,4	3,47±1,5
Perfil de tratamento		
não tratados (virgens)	91	59,5
em tratamento	62	40,5
Cirrose	11	7,1
Genótipos do VHB		
A	89	57
D	31	19,9
F	36	23,1
Co-infecção		
VHC	3	1,9
VHD	18	11,5
Mutações		
Escape vacinal (sHBV)	11	7,1
Mutação de resistência NA	2	1,2

† valores : média e DP(desvio padrão) \* valores variam de acordo com a disponibilidade dos dados

As mutações de resistência primária associada aos análogos de nucleos(t)ídeos encontradas foram rtA181E e rtT184S/T. As mutações na região S, estão descritas



na Tabela 2, as mutações em negrito estão relacionadas as mutações de escape vacinal:

Tabela 2. Detecção de genótipos e subgenótipos, mutações de resistência na rt da polimerase e mutações no gene S, em pacientes com VHB crônicos.

Amostra	Genótipo Subgenótipo	Mutação RT	Mutação no AgHBs
1016	A1		<b>119R</b> , 127R, 133T
1022	A1		133T, <b>145A</b>
1048	A1		119R, <b>121S</b> , <b>121Y</b> , <b>123N</b> , 126I, 128V, 130N, 133T
1062	F2		140S
1104	A1		117T, <b>121S</b> , 133L
1111	F2		144E
1116	D2		101H, 120A, 120P, 120S, 120T, 133T
1151	A1		122K, 126N, 134V
1152	F1	181E	
1183	D3		120P, 120T
1189	A1	184S	

Foram estimadas frequências dos padrões de mutações de resistência nos sítios dos domínios da rt da polimerase, dos quais foram relacionados com o genótipo. As mutações mais frequentes foram: rtN246S (23,7%), rtH248N (5,1%), rtI233V e rtN238H/S/T (3,8%), rtI187L/N, rtI187L/N e rtS219A/S (3,2%), rtL217R/M, rtL220L/V, rtN248H, rtQ215H/Q, rtV214E/A (2,5%), rtL229M/L/V (1,9%), rtK212N e rtL207M (1,3%), rtA194S, rtL235S, rtN226H e rtT237P/T (0,6%).

Tabela 3. Frequência dos padrões de mutações, substituição de nucleotídeos na RT da polimerase em pacientes VHB crônicos.

Mutações na região da RT	Genótipos	No	%
rtN246S	F	37	23,7
rtH248N	D/F	8	5,1
rtI233V	A/D	6	3,8
rtN238H/S/T	A/D	6	3,8
rtI187L/N	A	5	3,2
rtS219A/S	A/F	5	3,2
rtL217R/M	A/F	4	2,5
rtL220L/V	F	4	2,5
rtN248H	A/D/F	4	2,5
rtQ215H/Q	A/D/F	4	2,5
rtV214E/A	A/D	4	2,5
rtL229M/L/V	A	3	1,9
rtK212N	A	2	1,3
rtL207M	F	2	1,3
rtA194S	A	1	0,6
rtL235S	A	1	0,6
rtN226H	A	1	0,6
rtT237P/T	F	1	0,6
rtY245H	D	1	0,6

## Discussão

No Brasil poucos estudos foram realizados utilizando a epidemiologia molecular aplicada para hepatite B crônica, com o objetivo de rastrear as mutações de resistência com terapia antiviral em pacientes tratados com AN ou virgens de tratamento, ou as mutações de escape vacinal, correlacionando com os genótipos e subgenótipos na região Norte. Apesar do grande volume de estudos que abordam a nível mundial as mutações no genoma do VHB suas implicações clínicas e biológicas, apenas alguns poucos estudos relatam a situação do tratamento antiviral no Brasil para os pacientes com hepatite B crônica. A maioria destes estudos se concentra na ocorrência de mutações de resistência a LAM (Da Silva *et al.*, 2001;

Bottecchia *et al.*, 2008; Haddad *et al.*, 2010), principalmente em pacientes co-infectados com (Santos *et al.*, 2004; Sucupira *et al.*, 2006; Mendes-Correa *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010).

O presente estudo realizado no estado do Acre, na região da Amazônia Ocidental, considerada uma área de alta endemicidade de VHB e co-infecção com o vírus Delta (VHD), demonstrou uma média de idade, também encontrada em outras regiões do país, em torno de 40 anos, sendo que aproximadamente 50% apresentam mais de 40 anos, entretanto, a maior frequência foi do sexo feminino, podendo sugerir que no estado do Acre, a transmissão que apresenta a maior frequência de infecção do VHB seja a transmissão vertical ou perinatal (Victoria Fda *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2012). O perfil clínico dos pacientes, aproximadamente 90% apresentaram AgHBe negativo e não cirróticos. Os pacientes que apresentaram valores de referência de ALT acima valor de referência foram 30% e níveis de VHB-DNA demonstrando que a maioria dos pacientes mantem os níveis normais de ALT e de VHB-DNA dentro dos valores preconizados pelo o Ministério da Saúde para serem monitorados a cada 6 meses, refletindo no número de pacientes virgens de tratamento que foram de quase 60%(Brasil, 2011). A maior frequência de co-infecção foi com o VHD, o que já é esperado nessa região demonstrado em vários estudos (Fonseca *et al.*, 1988; Braga Wsm, 2001; De Paula *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2005)

Os genótipos circulantes entre os pacientes foram o A, D e F. Estudos realizados anteriormente, que tentaram caracterizar a distribuição genotípica na região Norte, encontraram também o mesmo padrão de distribuição o genótipo A seguido do genótipo F (De Oliveira *et al.*, 2008; Castilho Mda *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2012; Godoy *et al.*, 2013). Os subgenótipos encontrados foram A1, D1, D2, D3, D4, F1 e F2. O Subgenotipo A1 tem sido identificado em populações afrodescendentes (Skelton *et al.*, 2012), no estado do Acre, segundo dados do censo de 2010, aproximadamente 72% são afrodescendentes (IBGE, 2010). Os subgenótipos D (1-4) têm ampla distribuição geográfica não seletiva e os subgenótipos F são descritos frequentemente em populações indígenas da América Latina, sendo que no Brasil, F1 e F2 são os mais encontrados (Mello *et al.*, 2007; Alvarado-Mora e Pinho, 2013; Mello *et al.*, 2013). A implicação clínica dos genótipos na evolução do VHB e na resposta terapêutica ainda é controversa, não está bem definido, como no caso da infecção pela hepatite C (VHC). No caso do genótipo A e D que são o mais

prevalente no Brasil, o genótipo A pode evoluir para a forma mais crônica, comparado com o genótipo D, entretanto, outros estudos demonstraram que o genótipo A é mais favorável a eliminação viral, o “clearance”, em comparação com outros genótipos (Mayerat *et al.*, 1999; Sanchez-Tapias *et al.*, 2002). O genótipo A também pode apresentar uma melhor resposta terapêutica com análogos de núcleos(t)ídeos do que o genótipo D, com uma menor taxa de mutações de resistência associada ao tratamento com Lamivudina na região do YMDD, na RT da polimerase do HBV (Zollner *et al.*, 2004). O genótipo F é frequentemente associado à hepatite fulminante, devido a co-infecção ou superinfecção com o VHD (Quintero *et al.*, 2001), em relação ao tratamento, estudos devem ser realizados para preencher essa lacuna.

As mutações de resistência aos análogos de núcleos(t)ídeos, mutações primárias foram encontradas em dois pacientes em tratamento (2/156) apresentando uma taxa de mutação de 1,2% , as mutações encontradas foram a mutação rtA181E que está associada a resistência a Lamivudina (LAM) e Adefovir (ADF), e a mutação rtT184S está associada ao Entecavir (ETV). Entretanto, estes dois casos, um não estava sendo tratado com análogos de núcleos(t)ídeos, e sim Interferon (IFN) e o outro estava sendo tratado com Tenofovir (TDF). Sendo assim, a mutação de resistência não compromete o tratamento e a conduta terapêutica adotada.

A taxa de mutação de escape vacinal, do gene S (AgHBs), descritos para os pacientes do presente estudo foi superior comparado aos que apresentaram mutações de resistência antiviral, uma taxa de 7,1%, demonstrando a importância desses resultados devido ao impacto clínico. Essas mutações de escape vacinal geram preocupação, devido que podem complicar as estratégias de vacinação, dentre as mutações de escape vacinal, a G-145-A, é a mais prevalente e estudada, que pode se tornar comum nas próximas décadas (Carman *et al.*, 1990; Carman, 1997; Oon *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999). As mutações de escape vacinal podem desempenhar futuramente, um papel importante na compreensão do modelo de evolução do VHB (Kay e Zoulim, 2007).

Outros padrões de mutações na região da RT do gene P da polimerase do VHB, com substituição de aminoácidos também foram observados, e a frequência dessas mutações podem acompanhar mutações no gene S, devido a sobreposição com o gene P, produzindo aminoácidos mutantes ou proteínas do AgHBs truncadas (Torresi, 2002; Cento *et al.*, 2013). Esses padrões de mutações em posições na RT

descritos e relacionados com mutações de resistências podem ser mutações secundárias ou compensatórias, onde alguns estudos sugerem que podem estar envolvidos com resistência aos análogos de núcleos(t)ídeos. Dentre as mutações encontradas no presente estudo, as mutações compensatórias foram as rtL207M, rtQ215H/Q, rtL229M/L/V, e as demais mutações encontradas nas posições da RT, podem sugerir uma potencial resistência aos análogos de núcleos(t)ídeos ADF ou ETV, devido as posições que estão localizadas dentro da região da RT. Algumas mutações foram encontradas nos três genótipos, como a rtQ215H/Q e a rtN248H, sendo que a mutação rtQ215H/Q, rtI233V, rtV214E/A e rtN238H/S/T são mais frequentes no genótipo D, entretanto a mutação rtN246S, foi encontrada apenas nos pacientes com genótipo F (23,7%) (De Maddalena *et al.*, 2007; Amini-Bavil-Olyaei *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2014).

Toda essa diversidade de mutações descritas no presente trabalho, demonstra a variabilidade genética do VHB, sendo um dos vírus que apresentam a mais alta taxa de mutação entre os vírus de DNA, esse potencial encontra seis importantes fatores que favorecem essa diversidade, uma carga viral elevada produzida durante a replicação ativa, baixa fidelidade da atividade corretora da DNA polimerase, pressão seletiva e barreira genética do tratamento antiviral, fitness viral do VHB, replicação viral dentro do hepatócito, todos esses fatores favorecem numa elevada taxa mutacional. Uma grande piscina de quasispécies do VHB é gerado em que o vírus mais apto, ou seja, o vírus que tem maior capacidade de replicação, torna-se o vírus dominante. Pressões seletivas, resposta imune resultam em mutantes de escape vacinal / imunoglobulina e mutações de resistência antiviral (Locarnini e Yuen, 2010). Os vírus que codificam as alterações associadas à resistência antiviral muitas vezes têm reduzido a replicação *in vitro*, mas o acúmulo de mutações adicionais ajuda a restaurar o fitness viral. As mutações compensatórias podem ocorrer não apenas no gene P, mas também em outros genes tais como o gene S, devido a sobreposição do gene S e do gene P (Sheldon *et al.*, 2006; Sheldon e Soriano, 2008).

Apesar do VHB ser uma infecção crônica com programas de imunização e tratamento antiviral disponível, e a conduta terapêutica ser baseada em protocolos e diretrizes clínicas de tratamento, provenientes de resultados científicos internacionais e na opinião dos especialistas, as mutações do genoma do VHB demonstram que devem também ser monitoradas, e o rastreamento também deve ser

disponível como uma alternativa de diagnóstico, para nortear a conduta clínica, mesmo antes do paciente iniciar o tratamento, permitindo oferecer um tratamento que possa alcançar a Resposta Viroológica Sustentada (RVS) dos pacientes crônicos. Existe uma possibilidade de emergência dessas mutações de resistência e de escape vacinal, os pacientes tratados e resistentes, visto que o tratamento com análogos de núcleos(t)ídeos é a longo prazo, existe um risco da recidiva da carga viral do VHB-DNA, uma recidiva dos marcadores hepáticos, como a ALT, progressão da doença hepática, como cirrose, incluindo manifestações clínicas como descompensação, elevação da atividade de replicação viral e a possibilidade do aumento dos casos de carcinoma hepatocelular (Lai *et al.*, 2009).

Os resultados apresentados no presente trabalho, demonstram mesmo com uma taxa de 1,2% de mutações de resistência e 7,1% de escape vacinal em uma amostra proveniente de uma demanda de um serviço de saúde, que se trata de um problema de saúde pública, a alteração da antigenicidade do AgHBs, que resulta nas mutações de escape vacinal e propagação das mutações de resistência ao tratamento com análogos de núcleos(t)ídeos são uma realidade e uma urgência a ser enfrentada nos próximos anos.

### **Agradecimentos**

A plataforma de sequenciamento de DNA, M.Sc Silvana Paz, e a plataforma de bioinformática, Dr.Luciano Kalabric, da Fiocruz-Bahia. Ao Hospital das Clínicas de Rio Branco-Acre (FUNDHACRE). Ao CNPQ pelo suporte financeiro através do edital Universal, processo: 478322/2012-7 e a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado pelo programa Brasil sem Miséria do Governo Federal.

## Referências

- ALVARADO-MORA, M. V.; PINHO, J. R. Distribution of HBV genotypes in Latin America. **Antivir Ther**, v. 18, n. 3 Pt B, p. 459-65, 2013. ISSN 2040-2058 (Electronic) 1359-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792558> >.
- AMINI-BAVIL-OLYAEI, S. et al. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 1158-65, Apr 2009. ISSN 1527-3350 (Electronic) 0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19263474> >.
- ARAUZ-RUIZ P, N. H., ROBERTSON BH, MAGNIUS LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **J Gen Virol**, v. 83, n. 8, p. 2059-73, 2002.
- ARAUZ-RUIZ, P. et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **J Gen Virol**, v. 83, n. Pt 8, p. 2059-73, Aug 2002. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12124470> >.
- BOTTECCHIA, M. et al. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 11, 2008. ISSN 1471-2180 (Electronic) 1471-2180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18211717> >.
- BRAGA WSM, B. L., SOUZA RAB, CASTILHO MC, FONSECA JCF. Ocorrência da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e delta (VHD) em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas. **Rev Soc Bras Med Trop** v. 34(4), p. 349-55, 2001.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E. H. V. Brasília: Ministério da Saúde 2011.
- CARMAN, W. F. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. **J Viral Hepat**, v. 4 Suppl 1, p. 11-20, 1997. ISSN 1352-0504 (Print) 1352-0504 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9097273> >.
- CARMAN, W. F. et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. **Lancet**, v. 336, n. 8711, p. 325-9, Aug 11 1990. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1697396> >.
- CASTILHO MDA, C. et al. Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus infection in isolated villages in the Western Brazilian Amazon. **Am J Trop Med Hyg**, v.

- 87, n. 4, p. 768-74, Oct 2012. ISSN 1476-1645 (Electronic) 0002-9637 (Linking).  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22908032> >.
- CENTO, V. et al. Anti-HBV treatment induces novel reverse transcriptase mutations with reflective effect on HBV S antigen. **J Infect**, v. 67, n. 4, p. 303-12, Oct 2013. ISSN 1532-2742 (Electronic) 0163-4453 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796863> >.
- CHEN, C. J. et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. **JAMA**, v. 295, n. 1, p. 65-73, Jan 4 2006. ISSN 1538-3598 (Electronic) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16391218> >.
- DA SILVA, L. C. et al. Efficacy and tolerability of long-term therapy using high lamivudine doses for the treatment of chronic hepatitis B. **J Gastroenterol**, v. 36, n. 7, p. 476-85, Jul 2001. ISSN 0944-1174 (Print) 0944-1174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11480792> >.
- DE MADDALENA, C. et al. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. **Virology**, v. 365, n. 1, p. 113-24, Aug 15 2007. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451771> >.
- DE OLIVEIRA, C. M. et al. Phylogeny and molecular genetic parameters of different stages of hepatitis B virus infection in patients from the Brazilian Amazon. **Arch Virol**, v. 153, n. 5, p. 823-30, 2008. ISSN 0304-8608 (Print) 0304-8608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288443> >.
- DE PAULA, V. S. et al. Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the Western Region of the Brazilian Amazon Basin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1123-8, Nov 2001. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784933> >.
- DI BISCEGLIE, A. M. Hepatitis B and hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 49, n. 5 Suppl, p. S56-60, May 2009. ISSN 1527-3350 (Electronic) 0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19399807> >.
- DIAS, A. L. et al. Molecular characterization of the hepatitis B virus in autochthonous and endogenous populations in the Western Brazilian Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 1, p. 9-12, Feb 2012. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22370821> >.



- EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2557-76, Jun 2007. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570226> >.
- FAN, J. et al. Impact of the rtI187V polymerase substitution of hepatitis B virus on viral replication and antiviral drug susceptibility. **J Gen Virol**, v. 95, n. Pt 11, p. 2523-30, Nov 2014. ISSN 1465-2099 (Electronic) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25028473> >.
- FONSECA, J. C. et al. Prevalence of infection with hepatitis delta virus (HDV) among carriers of hepatitis B surface antigen in Amazonas State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, n. 3, p. 469-71, 1988. ISSN 0035-9203 (Print) 0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3232188> >.
- FRANCA, P. H. et al. Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected argentinean blood donors. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5015-21, Nov 2004. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528689> >.
- GODOY, B. A. et al. Origin of HBV and its arrival in the Americas--the importance of natural selection on time estimates. **Antivir Ther**, v. 18, n. 3 Pt B, p. 505-12, 2013. ISSN 2040-2058 (Electronic) 1359-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792622> >.
- HADDAD, R. et al. Hepatitis B virus genotyping among chronic hepatitis B patients with resistance to treatment with lamivudine in the City of Ribeirao Preto, State of Sao Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 3, p. 224-8, May-Jun 2010. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20563485> >.
- JL, D. et al. The rtL229 substitutions in the reverse transcriptase region of hepatitis B virus (HBV) polymerase are potentially associated with lamivudine resistance as a compensatory mutation. **J Clin Virol**, v. 54, n. 1, p. 66-72, May 2012. ISSN 1873-5967 (Electronic) 1386-6532 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22398037> >.
- KAY, A.; ZOULIM, F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. **Virus Res**, v. 127, n. 2, p. 164-76, Aug 2007. ISSN 0168-1702 (Print) 0168-1702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17383765> >.
- KREKULOVA, L. et al. Genotypic distribution of hepatitis B virus in the Czech Republic: a possible association with modes of transmission and clinical outcome. **Eur J**

- Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 11, p. 1183-8, Nov 2003. ISSN 0954-691X (Print) 0954-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14560151> >.
- LAI, M. W. et al. Identification of nonsense mutations in hepatitis B virus S gene in patients with hepatocellular carcinoma developed after lamivudine therapy. **Antivir Ther**, v. 14, n. 2, p. 249-61, 2009. ISSN 1359-6535 (Print) 1359-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430100> >.
- LOCARNINI, S. et al. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). **Semin Cancer Biol**, v. 23, n. 6 Pt B, p. 561-75, Dec 2013. ISSN 1096-3650 (Electronic) 1044-579X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24013024> >.
- LOCARNINI, S. A.; YUEN, L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. **Antivir Ther**, v. 15, n. 3 Pt B, p. 451-61, 2010. ISSN 2040-2058 (Electronic) 1359-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516565> >.
- LOK, A. S.; MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B: update 2009. **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 661-2, Sep 2009. ISSN 1527-3350 (Electronic) 0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19714720> >.
- LOK, A. S. et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 254-65, Jul 2007. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17596850> >.
- MAYERAT, C.; MANTEGANI, A.; FREI, P. C. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? **J Viral Hepat**, v. 6, n. 4, p. 299-304, Jul 1999. ISSN 1352-0504 (Print) 1352-0504 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10607244> >.
- MELLO, F. C. et al. Phylogeography and evolutionary history of hepatitis B virus genotype F in Brazil. **Virol J**, v. 10, p. 236, 2013. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23855930> >.
- MELLO, F. C. et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiol**, v. 7, p. 103, 2007. ISSN 1471-2180 (Electronic) 1471-2180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18036224> >.
- MENDES-CORREA, M. C. et al. High frequency of lamivudine resistance mutations in Brazilian patients co-infected with HIV and hepatitis B. **J Med Virol**, v. 82, n. 9, p. 1481-8, Sep 2010. ISSN 1096-9071 (Electronic) 0146-6615 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20648600> >.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE, D. D. D., AIDS E HEPATITES VIRAIS SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Hepatites Virais no Brasil: Situações, Ações**. Agenda 2011 2011.
- NORDER H, C. A., MAGNIUS LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology**, v. 198, n. 2, p. 489-503, 1994.
- NORDER, H. et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. **Intervirology**, v. 47, n. 6, p. 289-309, 2004. ISSN 0300-5526 (Print) 0300-5526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564741> >.
- NORDER, H.; COUROUCE, A. M.; MAGNIUS, L. O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology**, v. 198, n. 2, p. 489-503, Feb 1994. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8291231> >.
- OKAMOTO H, T. 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.**, v. 69, n. 10, p. 2575-83., 1988.
- OKAMOTO, H. et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **J Gen Virol**, v. 69 ( Pt 10), p. 2575-83, Oct 1988. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3171552> >.
- OON, C. J. et al. Detection of hepatitis B surface antigen mutants and their integration in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett**, v. 136, n. 1, p. 95-9, Feb 8 1999. ISSN 0304-3835 (Print) 0304-3835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10211946> >.
- QUINTERO, A. et al. Hepatitis delta virus genotypes I and III circulate associated with hepatitis B virus genotype F In Venezuela. **J Med Virol**, v. 64, n. 3, p. 356-9, Jul 2001. ISSN 0146-6615 (Print) 0146-6615 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11424126> >.
- SANCHEZ-TAPIAS, J. M. et al. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. **Gastroenterology**, v. 123, n. 6, p. 1848-56, Dec 2002. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454842> >.

- SANTOS, A. O. et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. **Virol J**, v. 7, p. 315, 2010. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073730> >.
- SANTOS, E. A. et al. Hepatitis B virus variants in an HIV-HBV co-infected patient at different periods of antiretroviral treatment with and without lamivudine. **BMC Infect Dis**, v. 4, p. 29, Aug 31 2004. ISSN 1471-2334 (Electronic) 1471-2334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339340> >.
- SHELDON, J. et al. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. **J Viral Hepat**, v. 13, n. 7, p. 427-34, Jul 2006. ISSN 1352-0504 (Print) 1352-0504 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16792535> >.
- SHELDON, J.; SORIANO, V. Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 4, p. 766-8, Apr 2008. ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218641> >.
- SILVA, A. C. et al. Hepatitis B genotype G and high frequency of lamivudine-resistance mutations among human immunodeficiency virus/hepatitis B virus co-infected patients in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 770-8, Sep 2010. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944991> >.
- SITNIK, R. et al. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2455-60, Jun 2004. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15184419> >.
- SKELTON, M.; KEW, M. C.; KRAMVIS, A. Distinct mutant hepatitis B virus genomes, with alterations in all four open reading frames, in a single South African hepatocellular carcinoma patient. **Virus Res**, v. 163, n. 1, p. 59-65, Jan 2012. ISSN 1872-7492 (Electronic) 0168-1702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889961> >.
- STUYVER, L. et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 1, p. 67-74, Jan 2000. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640543> >.
- STUYVER L, D. G. S., VAN GEYT C, ZOULIM F, FRIED M, SCHINAZI RF, ROSSAU R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **J Gen Virol.**, v. 81, p. 67-74, 2000.

- SUCUPIRA, M. V. et al. Patterns of hepatitis B virus infection in Brazilian human immunodeficiency virus infected patients: high prevalence of occult infection and low frequency of lamivudine resistant mutations. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 655-60, Sep 2006. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072479> >.
- TORRESI, J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. **J Clin Virol**, v. 25, n. 2, p. 97-106, Aug 2002. ISSN 1386-6532 (Print) 1386-6532 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12367644> >.
- TREPO, C.; CHAN, H. L.; LOK, A. Hepatitis B virus infection. **Lancet**, v. 384, n. 9959, p. 2053-63, Dec 6 2014. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954675> >.
- VIANA, S. et al. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 4, p. 808-14, Oct 2005. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222030> >.
- VICTORIA FDA, S. et al. Characterization of HBeAg-negative chronic hepatitis B in western Brazilian Amazonia. **Braz J Infect Dis**, v. 12, n. 1, p. 27-37, Feb 2008. ISSN 1678-4391 (Electronic) 1413-8670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18553011> >.
- WANG, F. et al. Evolution of hepatitis B virus polymerase mutations in a patient with HBeAg-positive chronic hepatitis B virus treated with sequential monotherapy and add-on nucleoside/nucleotide analogues. **Clin Ther**, v. 31, n. 2, p. 360-6, Feb 2009. ISSN 0149-2918 (Print) 0149-2918 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302908> >.
- WILSON, J. N.; NOKES, D. J.; CARMAN, W. F. The predicted pattern of emergence of vaccine-resistant hepatitis B: a cause for concern? **Vaccine**, v. 17, n. 7-8, p. 973-8, Feb 26 1999. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10067705> >.
- ZOLLNER, B. et al. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 42-50, Jan 2004. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14752821> >.

## 4 DISCUSSÃO

Apesar de existir medidas profiláticas através da vacina segura e eficaz contra o vírus da hepatite B (VHB) desde o início da década de 80, e tratamento antiviral para a hepatite B crônica, a infecção causada por esse agente está longe de ser erradicada e segue constituindo grave problema de saúde pública em várias regiões do globo, sendo considerada recentemente pela OMS como uma pandemia. O Brasil apresenta uma diversidade étnica, econômica e regional, o que não seria diferente em relação à epidemiologia da infecção pelo VHB que também apresenta uma distribuição muito heterogênea dos pacientes crônicos.

O presente estudo traçou um retrato do tratamento em duas regiões brasileiras, a Nordeste e Norte, através dos estados da Bahia e do Acre, abordando as implicações clínicas que podem interferir na resposta e no desfecho ao tratamento, traçando um perfil da situação do tratamento antiviral através dos medicamentos disponibilizados pelo o Ministério da Saúde, desde 2009, com a incorporação de dois AN que são inibidores potentes com baixa taxa de resistência o ETV e TDF, vindo a substituir a LAM, que após 5 anos de tratamento alcança uma taxa de resistência de 70% (Lai *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2004; Lok *et al.*, 2003; EASL, 2012). O Brasil também deu um grande passo através da elaboração do Protocolo de Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B, padronizando a conduta terapêutica em todo o território nacional através dos algoritmos de tratamento, terapia de resgate e co-infecções (Capítulo 1), pautado na medicina baseada em evidências, ensaios clínicos e trabalhos científicos de grande relevância.

O Capítulo 1 demonstrou que nas duas regiões há uma prevalência de pacientes AgHBe negativo com aproximadamente 90%, que são os pacientes que se enquadram no algoritmo 4.2 do Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde, que são os que tem indicação quando virgens de tratamento e não cirróticos ao tratamento com os análogos de núcleos(t)ídeos, sendo que a primeira linha de escolha são os NA, ETV e TDF, que no estudo, os que se encontram em tratamento correspondem a 60% dos que fazem uso desses AN, sendo o algoritmo que teve o maior seguimento da recomendação do Protocolo Clínico, todavia, o algoritmo 4.1 que são os pacientes virgens, AgHBe positivo e não cirróticos foram os que apresentaram uma dificuldade em seguir essa

recomendação, devido que a mediação a ser prescrita é o IFN, e provavelmente, devido a administração subcutânea e os diversos eventos adversos associados, acaba dificultando a indicação terapêutica e a adesão. Na região Norte, a co-infecção com o VHD ficou em torno de 12,1%, demonstrando a alta taxa de co-infecção nessa região. Na região Nordeste a prevalência é maior do sexo masculino e na região Norte do sexo feminino com hepatite B crônica.

Passado, cinco anos da publicação do Protocolo de Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B (Brasil, 2011), não foi realizado nenhuma avaliação sobre o protocolo, e nem as dificuldades encontradas na aplicação dos algoritmos na conduta terapêutica em Serviços de Referência para hepatites, e a medida que o conhecimento avança, abre-se outras perspectivas de tratamento e também de diagnóstico como o rastreamento de mutações e de escape vacinal. O tratamento para VHB é a longo prazo, permite a supressão da replicação do VHB, mas não a erradicação do vírus, devido a persistência do DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) no núcleo do hepatócito infectado, o que pode explicar a reativação do vírus (Brecht *et al.*, 2001). O VHB é um dos vírus DNA, com maior taxa de mutação no genoma, criando possibilidades de emergência de mutações de resistência antiviral. Além disso, o genoma do VHB integra no genoma do hospedeiro, podendo favorecer o desenvolvimento de CHC (Pollicino *et al.*, 2011).

No Capítulo 2, foi realizado o rastreamento de resistência antiviral de mutações primárias e secundárias, mutações de escape vacinal e genotipagem dos pacientes virgens de tratamento, visando traçar o perfil de mutações pré-existentes nesse grupo, e comparar os dois grupos, o grupo com mutação e o grupo sem mutação. Foram encontradas mutações de resistência apenas nos pacientes da região Nordeste com uma taxa de 6%, e mutações de escape vacinal, a frequência para a região Nordeste foi de 2,4% e para a região Norte foi de 8,6%. Os genótipos circulantes foram A, D e F, e na região Nordeste foi encontrado o genótipo C (subgenótipo C2), proveniente de origem asiática, muito comum nos descendentes de imigrantes asiáticos que vieram ao Brasil (Alvarado-Mora *et al.*, 2011). Em relação aos subgenótipos também foi encontrado na região Nordeste o A2, de origem europeia, e não foi encontrado esse genótipo na região Norte. Entretanto, na região Norte foram encontrados os subtipos D1, D4 e F1, que não foram encontrados nos pacientes do Nordeste. Não houve associação significativa na comparação dos grupos em relação a marcadores de prognóstico como idade,

genótipos, HBV-DNA, status AgHBe e ALT. Dentre as mutações de resistência os padrões encontrados nos pacientes virgens de tratamento foram rtA194T, que sugere resistência ao TDF, e rtL180M+rtM204V, rtM204I, rtS202I, rtA181S, respectivamente resistências a LAM+ ETV e ADF+TDF.

O primeiro estudo publicado que rastreou mutações de resistência em pacientes virgens de tratamento antiviral no Brasil foi publicado em 2015 onde foi encontrado mutações de resistência em pacientes virgens de tratamento com uma taxa de 1,6% (Gomes-Gouveia *et al.*, 2015). Estes resultados podem sugerir que a propagação e seleção natural de cepas do VHB resistentes a droga é um evento raro ou a maior parte das cepas podem permanecer instável na ausência de pressão seletiva aos AN (Haddad *et al.*, 2010; Mello *et al.*, 2012; Gomes-Gouveia *et al.*, 2015).

No presente estudo, a taxa de mutação de resistência em pacientes virgens de tratamento foi mais alta, em comparação com o outro estudo publicado, em torno de 6%, isto pode ser explicado, devido que a amostra da Bahia foi maior em comparação ao outro estudo. Apesar das amostras terem sido proveniente de várias regiões brasileiras, mas a amostra da Bahia foi apenas de 2% (n=19), pode ser que pelo tamanho amostral, não foi possível encontrar mutações de resistência aos AN. Embora, para a região Norte, não foi incluído nenhuma amostra da Amazônia Ocidental considerada uma área de alta endemicidade de VHB. Nos dois estudos foram encontradas mutações rtA194T que em estudo *in vitro* sugerem mutações de resistência ao TDF, que é a primeira droga de escolha no tratamento para VHB. Todavia, são estudos importantes que vem preencher a lacuna de mutações de resistência em pacientes virgens, demonstrando a importância do mapeamento dessas mutações e também para a conduta terapêutica, como uma opção de diagnóstico antes do início do tratamento antiviral, visto que as mutações estão circulando nesse grupo de pacientes.

No capítulo 3, também foi realizado o rastreamento de mutações de resistência em uma amostra de 81 pacientes da Bahia, agora em todos os pacientes virgens e em tratamento. O genótipo A1 foi o mais prevalente (85,2%) seguido pelo genótipo A2 (4,9%) F2 (6,2%) e C2, D2 e D4 (1,2% cada). Seis pacientes (7%) apresentaram mutações de resistência para LAM, ETV, TDF: dois com o padrão rtL180M + rtM204V e quatro com padrões diversos (rtL80I + rtL180M + rtM204I; rtL80V + rtL180M + rtM204V; rtM204I; rtA194T). Todas estas mutações foram



associadas ao genótipo A (quatro A1 e dois A2). Além disso, foi encontrado um paciente com VHB genótipo C típico do leste da Ásia. Destes pacientes, dois foram virgens de tratamento e quatro tinham histórico de tratamento para HIV ou VHB. Foram detectadas quatro mutações no gene S (três casos com a mutação sI195M e um a mutação sW196L) associadas às mutações do domínio rt do gene P, correspondendo à uma taxa de 6% de mutações de escape vacinal. A prevalência das mutações de resistência às drogas antivirais variou de acordo com a duração do tratamento e com o nível da barreira genética da droga utilizada. Neste estudo, foi encontrada uma forte associação entre a ocorrência de mutações de resistência do VHB e positividade para o AgHBe, co-infecção com o HIV e histórico de tratamento para VHB e/ou HIV.

No Capítulo 4, o manuscrito envolve a utilização da epidemiologia molecular, através da caracterização das mutações do VHB, sejam elas de resistência primárias, secundárias ou compensatórias e as que podem sugerir mutações de resistência aos AN, as mutações de escape vacinal e genotipagem dos pacientes do estado do Acre, da região Norte brasileira.

As mutações de resistência aos AN, mutações primárias foram encontradas em dois pacientes em tratamento (2/156) apresentando uma taxa de mutação de 1,2%, as mutações encontradas foram a mutação rtA181E que está associada a resistência a Lamivudina (LAM) e Adefovir (ADF), e a mutação rtT184S está associada ao Entecavir (ETV). Entretanto, estes dois casos, um não estava sendo tratado com AN, e sim Interferon (IFN) e o outro estava sendo tratado com Tenofovir (TDF). Sendo assim, a mutação de resistência não compromete o tratamento e a conduta terapêutica adotada.

A taxa de mutação de escape vacinal, do gene S (AgHBs), descritos para os pacientes do presente estudo foi superior comparado aos que apresentaram mutações de resistência antiviral, uma taxa de 7,1%, demonstrando a importância desses resultados devido ao impacto clínico. Essas mutações de escape vacinal geram preocupação, devido que podem complicar as estratégias de vacinação, dentre as mutações de escape vacinal, a G-145-A, é a mais prevalente e estudada, que pode se tornar comum nas próximas décadas (Carman *et al.*, 1990; Oon *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999). As mutações de escape vacinal podem ter uma implicação epidemiológica e podem desempenhar futuramente, um papel importante na compreensão do modelo de evolução do VHB (Kay e Zoulim, 2007). Outros

padrões de mutações também foram encontrados e relacionados com os genótipos, já descritos na literatura. Entretanto, foi encontrado um padrão de mutação apenas para o genótipo F, a mutação rtN246S, ainda não foi descrito na literatura, sendo importante monitorar as novas mutações que possam surgir, visto que o genótipo F é prevalente na região Norte do país.

No Brasil poucos estudos foram realizados com o objetivo de rastrear as mutações com terapia antiviral nos pacientes com hepatite B crônica tratados com AN ou virgens de tratamento. Apesar do grande número de estudos que abordam a nível mundial as diferentes estratégias terapêuticas e suas consequências clínicas e virológicas, apenas alguns poucos estudos relatam a situação do tratamento antiviral no Brasil para os pacientes com hepatite B crônica. A maioria destes estudos se concentram na ocorrência de mutações de resistência a LAM (Da Silva *et al.*, 2001, Bottecchia *et al.*, 2008; Haddad *et al.*, 2010), principalmente em pacientes co-infectados com HIV / VHB (Santos *et al.*, 2004, Sucupira *et al.*, 2006, Pessoa *et al.*, 2008, Mendes-Corrêa *et al.*, 2010, Silva *et al.*, 2010). Estes estudos foram realizados na sua grande maioria, quando o IFN e a LAM eram as duas únicas drogas disponíveis como opção terapêutica. Após a introdução do ETV e TDF, torna-se necessário monitorar as mutações de resistência desses AN, como também o surgimento de outras mutações que podem comprometer a RVS. As mutações de resistência que ocorrem no gene P, também podem ocorrer no gene S, devido a organização do genoma do VHB, onde uma mesma sequência de nucleotídeos é responsável pela codificação de duas ou mais proteínas, devido a essa sobreposição do genoma, as proteínas que codificam as proteínas do envelope (S), também codificam a da polimerase (P), sendo assim torna-se também importante monitorar as mutações no gene S, principalmente as que reduzem a antigenicidade do AgHBs, as de escape vacinal.

Existem evidências que pacientes tratados com análogos de núcleos(t)ídeos com baixa barreira genética tem resultado na seleção de mutações de resistência antiviral e potencialmente em mutações de escape vacinal (Lapinski *et al.*, 2012). Um dos fatores que pode contribuir para o aumento da emergência dessas mutações, em vários países, foi o uso por quase uma década da LAM, em monoterapia, isto já está sendo observado em alguns países da Ásia, inclusive em transmissão vertical (Clements *et al.*, 2010), ou seja, a monoterapia pode promover a seleção de vírus multi-resistentes (Villet *et al.*, 2006). O Brasil também está dentro

dessa realidade, como a LAM foi o único análogo disponível e aprovado pelo Ministério da Saúde de 2002 a 2009 para o tratamento de primeira linha de escolha para os pacientes com VHB crônica, foi amplamente indicado em monoterapia, sendo que os efeitos do uso da LAM por anos podem repercutir na seleção dos vírus, tornando um problema de saúde pública a ser enfrentado.

A emergência de mutações de resistência é uma realidade, já descrita nos pacientes virgens de tratamento e nos pacientes em tratamento. O Protocolo de Diretrizes Terapêuticas preconiza como primeira linha de tratamento os AN que apresentam alta barreira genética, e baixa taxa de resistência, sendo hoje o tratamento mais indicado o ETV e TDF, entretanto, o rastreamento das mutações podem uma ferramenta para monitorar o surgimento de mutações já descritas, como novas mutações, visto que o vírus do VHB apresenta uma alta taxa de mutação do genoma. As mutações de escape vacinal também são muito importantes dentro desse cenário, devido ao impacto epidemiológico nas estratégias e nos programas de vacinação para o VHB. A hepatite B crônica é uma infecção dinâmica que está longe de ser erradicada, devido à capacidade do VHB de se adaptar as pressões seletivas, que permite a sobrevivência e a propagação dos vírus resistentes.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

**Capítulo 1:** Avaliação do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o tratamento para Hepatite B crônica nas Regiões Nordeste e Norte do Brasil

1. No algoritmo 4.1 foi observado que existe uma dificuldade em seguir a recomendação do Ministério da Saúde, nos dois serviços de referência, 78,9% e 72% Região Nordeste e Norte respectivamente, isto se deve que o IFN é a droga de escolha nesse algoritmo, apresenta restrições de uso, administração subcutânea e diversos eventos adversos.
2. O algoritmo 4.2, foi o algoritmo que apresentou no geral mais de 90% de seguimento na recomendação do Protocolo Clínico, devido que os pacientes são na sua grande maioria AgHBe negativo, e a droga de escolha nesse algoritmo são os AN, administração oral, praticamente sem eventos adversos.
3. O algoritmo 4.3 aproximadamente 85% dos pacientes da Região Nordeste estava dentro da recomendação do Protocolo Clínico para Hepatite B crônica, entretanto, nenhum paciente da Região Norte.

**Capítulo 2:** Genotyping of HBV and tracking of resistance mutations in treatment-naive patients with chronic hepatitis B in the Northeastern and North regions of Brazil

4. A taxa de mutação de resistência nas amostras dos pacientes virgens de tratamento da região Nordeste foram de 6%(5/84). Não foi identificada nenhuma mutação de resistência nas amostras da região Norte.
5. As mutações de resistência primária foram: rtA194T rtL180M+M204V, rtS202I, rtM204I e rtA181S, que apresentam resistência a LAM, ADF, ETV e TDF.
6. Mutações de escape vacinal foram de 2,4% para a região Nordeste e 8,6% para a região Norte.
7. Os genótipos circulantes nas duas regiões foram o A, D e F, sendo que para a região Nordeste foi encontrado o genótipo C (C2).

**Capítulo 3:** Mutations Associated With Drug Resistance and Prevalence of Vaccine Escape Mutations In Patients With Chronic Hepatitis B Infection

8. Seis pacientes (7%) apresentaram mutações de resistência para LAM, ETV, TDF: dois com o padrão rtL180M + rtM204V e quatro com padrões diversos (rtL80I + rtL180M + rtM204I, rtL80V +rtL180M + rtM204V; rtM204I; rtA194T)
9. o genótipo A1 foi o mais prevalente (85,2%) seguido pelo genótipo A2 (4,9%) F2 (6,2%) e C2, D2 e D4 (1,2% cada)
10. Foi encontrada uma forte associação entre a ocorrência de mutações de resistência do VHB e positividade para o AgHBe, co-infecção com o HIV e histórico de tratamento para VHB e/ou HIV.

**Capítulo 4:** Epidemiologia molecular do vírus da Hepatite B no Estado do Acre, Brasil

11. Taxa de mutação de resistência aos AN de 1,2%, as mutações foram rtA181E, e rt rtT184S/T.
12. Os genótipos circulantes foram A, F e D respectivamente e os subgenótipos foram A1, D1, D2, D3, D4, F1 e F2.
13. A mutação rt N246S foi encontrada apenas nas amostras com genótipo F.

## REFERÊNCIAS

ALVARADO-MORA, M. V.; PINHO, J. R. Distribution of HBV genotypes in Latin America. **Antivir. Ther.**, v. 18, n. 3 Pt B, p. 459-465, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792558> >.

ALVARADO-MORA, M. V. et al. Full-length genomic sequence of hepatitis B virus genotype C2 isolated from a native Brazilian patient. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 495-498, jun. 2011.  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739039> >.

ANGUS, P. et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. **Gastroenterology**, v. 125, n. 2, p. 292-297, aug. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12891527> >.

ARAUZ-RUIZ P, N. H.; ROBERTSON, B.H.; MAGNIUS, L.O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **J. Gen. Virol.**, v. 83, n. 8, p. 2059-2073, 2002.

BARTHOLOMEUSZ, A.; LOCARNINI, S. Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. **J. Med. Virol.**, v. 78, Suppl 1, p. S52-5, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622878> >.

BEFELER, A. S.; DI BISCEGLIE, A. M. Hepatitis B. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 14, n. 3, p. 617-632, Sep 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987113> >.

BOTTECCHIA, M. et al. Lamivudine resistance and other mutations in the polymerase and surface antigen genes of hepatitis B virus associated with a fatal hepatic failure case. **J Gastroenterol. Hepatol.**, v. 23, n. 1, p. 67-72, jan. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171343> >.

BOTTECCHIA, M. et al. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. **BMC Microbiol.**, v. 8, p. 11, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18211717> >.

BOTTECCHIA, M. S., F. J. D; Ó, K. M. R; AMENDOLA, M.; BRANDÃO, C. E.; NIEL, C. ; GOMES, S. A. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. **BMC Microbiol.**, v. 8, n. 11, p. 1-10, 2008.

BRASIL. Portaria nº 860 de 12 de novembro de 2002 da Secretaria de Atenção à Saúde. Ministério da Saúde. **Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da hepatite viral crônica B.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2002.

\_\_\_\_\_. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções.** Ministério da Saúde. Departamento de Dst, A. e. H. V. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRECHOT, C. et al. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? **Hepatology**, v. 34, n. 1, p. 194-203, jul. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431751> >.

CARMAN, W. F. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. **J. Viral Hepat.**, v. 4 Suppl 1, p. 11-20, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9097273> >.

CARMAN, W. F. et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. **Lancet**, v. 336, n. 8711, p. 325-329, aug. 1990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1697396> >.

CHANG, T. T. et al. Four years of lamivudine treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 19, n. 11, p. 1276-1282, nov. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15482535> >.

CHANG, T. T. et al. Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 422-430, feb. 2010.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20049753> >.

CHEN, C. J. et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. **JAMA**, v. 295, n. 1, p. 65-73, jan. 2006. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16391218> >.

CLEMENS, S. A. et al. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in 4 centers in Brazil.

**Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 1, p. 1-10, jan-feb. 2000.. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10881112> >.

COOREMAN, M. P.; LEROUX-ROELS, G.; PAULIJ, W. P. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. **J. Biomed.**

**Sci.**, v. 8, n. 3, p. 237-247, may-jun. 2001. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11385295> >.

CRAXI, A.; ANTONUCCI, G.; CAMMA, C. Treatment options in HBV. **J. Hepatol.**, v. 44, n. 1 Suppl, p. S77-83, 2006. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356581> >.

DA SILVA, L. C. et al. Efficacy and tolerability of long-term therapy using high lamivudine doses for the treatment of chronic hepatitis B. **J. Gastroenterol.**, v. 36, n. 7, p. 476-485, jul.

2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11480792> >.

DA SILVA, L. C. D. F. et al. Predictive factors for response to lamivudine in chronic hepatitis B. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 42, p. 189-196, 2000.

DE OLIVEIRA, C. M. et al. Phylogeny and molecular genetic parameters of different stages of hepatitis B virus infection in patients from the Brazilian Amazon. **Arch. Virol**, v. 153, n. 5, p. 823-830, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288443> >.



DE SOUZA, R. R. Secretária de Assistência à Saúde. Portaria nº 860, Anexo: protocolo clínico e diretrizes terapêuticas - hepatite viral crônica B - Lamivudina, Interferon-alfa. 2002. Disponível em: < [www.ministeriodasaude.org.com.br](http://www.ministeriodasaude.org.com.br) >

DELANEY, W. E. T. et al. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 7, p. 2471-2477, jul. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16801428> >.

DELANEY, W. E. T. et al. The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. **J. Virol.**, v. 77, n. 21, p. 11833-11841, nov. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557667> >.

DELIUS, H. et al. Structure of the hepatitis B virus genome. **J. Virol.**, v. 47, n. 2, p. 337-243, aug. 1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6620456> >.

DETTKE, M. et al. Detection of HBV DNA-positive HBsAg-negative platelet concentrate by routine PCR screening. **Transfusion**, v. 41, n. 8, p. 1074-1075, aug. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11493744> >.

EASL. Clinical Practice Guidelines. Management of chronic hepatitis B virus infection European Association for the Study of the Liver. vol. 57 j 167–185 **J. Hepatol.**, 2012.

ECHEVARRÍA, J. M. AVELLON. N., A. Hepatitis B Virus Genetic Diversity. **J. Med. Virol.**, v. 78, p. 36–42, 2006.

ELGOUHARI, H. M.; ABU-RAJAB TAMIMI, T. I.; CAREY, W. D. Hepatitis B virus infection: understanding its epidemiology, course, and diagnosis. **Cleve Clin. J. Med.**, v. 75, n. 12, p. 881-889, dec. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088007> >.

FAY, O. H. Hepatitis B in Latin America: epidemiological patterns and eradication strategy. The Latin American Regional Study Group. **Vaccine**, v. 8 Suppl, p. S100-6; discussion S134-9, mar. 1990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2139277> >.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Viral hepatitis: update. **J. Pediatr.** v. 73, n. 6, p. 367-376, nov.-dec. 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685369> >.

FERREIRA, M. S. Diagnosis and treatment of hepatitis B. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 4, p. 389-400, jul.-aug. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10936954> >.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Advances in the treatment of hepatitis B. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 4, p. 451-462, jul.-aug. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17876470> >.

FOCACCIA, R. **Hepatites virais**, São Paulo: Editora Atheneu , 2007.

GANEM, D. Virology. The X files--one step closer to closure. **Science**, v. 294, n. 5550, p. 2299-2300, dec. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743185> >.

GOMES-GOUVEA, M. S. et al. HBV carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naive patients. **Antivir. Ther.**, v. 20, n. 4, p. 387-395, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25624410> >.

HADDAD, R. et al. Hepatitis B virus genotyping among chronic hepatitis B patients with resistance to treatment with lamivudine in the City of Ribeirao Preto, State of Sao Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 3, p. 224-228, may-jun. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20563485> >.

HADDAD, R. M.; A. DE L. C.; UYEMURA, S. A.; YOKOSAWA, J. Hepatitis B virus genotyping among chronic hepatitis B patients with resistance to treatment with lamivudine in the city of Ribeirão Preto, State of São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, p. 224-228, 2010.

HADZIYANNIS, S. J. New developments in the treatment of chronic hepatitis B. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 6, n. 9, p. 913-21, sep. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16918258> >.

HOLLINGER, F. B. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. **Transfusion**, v. 48, n. 5, p. 1001-1026, may. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454738> >.

HOOFNAGLE, J. H. et al. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. **Hepatology**, v. 45, n. 4, p. 1056-1075, apr. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17393513> >.

KANE, M. Global programme for control of hepatitis B infection. **Vaccine**, v. 13, p. 47-49, 1995.

KAY, A.; ZOULIM, F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. **Virus Res.**, v. 127, n. 2, p. 164-176, aug. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17383765> >.

KHAN, N. et al. Modulation of hepatitis B virus secretion by naturally occurring mutations in the S gene. **J. Virol.**, v. 78, n. 7, p. 3262-3270, apr. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016847> >.

LAI, C. L. et al. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, n. 2, p. 61-68, jul. 9 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9654535> >.

LAI, C. L. et al. Viral hepatitis B. **Lancet**, v. 362, n. 9401, p. 2089-2094, dec. 20. 2003. I Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697813> >.

LAPINSKI, T. W.; POGORZELSKA, J.; FLISIAK, R. HBV mutations and their clinical significance. **Adv. Med. Sci.**, v. 57, n. 1, p. 18-22, jun. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430043> >.

LIAW, Y.F. et al. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. **Gastroenterology**, v. 119, n. 1, p. 172-180, 2000.

LIU, K. Z. et al. Clinical features of chronic hepatitis B patients with YMDD mutation after lamivudine therapy. **J. Zhejiang Univ. Sci. B**, v. 6, n. 12, p. 1182-1187, dec. 2005.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16358376> >.

LOCARNINI, S. et al. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). **Semin. Cancer Biol.**, v. 23, n. 6 Pt B, p. 561-575, dec. 2013. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24013024> >.

LOK, A. S. Personalized treatment of hepatitis B. **Clin. Mol. Hepatol.**, v. 21, n. 1, p. 1-6, mar. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834795> >.

LOK, A. S. et al. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterology**, v. 125, n. 6, p. 1714-1722, dec. 2003. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14724824> >.

LOK, A. S.; MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B: update 2009. **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 661-662, sep. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19714720> >.

LOK, A. S. et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 254-265, jul. 2007.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17596850> >.

LOK, A. S. F. M., B. J. AASLD practice guidelines: chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 34, p. 1225-1241, 2001.

MADIGAN, M. T. M.; ARKER, J. **Brock Biología de los Microorganismos**. 10<sup>a</sup>. Pearson Prentice Hall, 2003.

MCMAHON, B. J. Natural history of chronic hepatitis B. **Clin. Liver Dis.**, v. 14, n. 3, p. 381-396, aug. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20638020> >.

MELLO, F. C.; FERNANDES, C. A.; GOMES SDE, A. Antiviral therapy against chronic hepatitis B in Brazil: high rates of lamivudine resistance mutations and correlation with HBV genotypes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 317-325, may. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22510826> >.

MELLO, F. C. et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiol.**, v. 7, p. 103, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18036224> >.

MENDES-CORREA, M. C. et al. High frequency of lamivudine resistance mutations in Brazilian patients co-infected with HIV and hepatitis B. **J. Med. Virol.**, v. 82, n. 9, p. 1481-1488, sep. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20648600> >.

MERRILL, R. M.; HUNTER, B. D. Seroprevalence of markers for hepatitis B viral infection. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 2, p. e78-121, feb. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21130675> >.

BRASIL. SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Aids e Hepatites Virais. Hepatites Virais no Brasil: Situações, Ações.** Agenda 2011.

MITRE, H. P. **Hepatite B: etiologia, epidemiologia e prevenção.** Fórum sobre Hepatite B: do básico ao atual. 2010. p. 5-12.

MOREIRA, R. C. et al. HBV markers in haemodialysis Brazilian patients: a prospective 12-month follow-up. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 107-108, feb. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209339> >.

NORDER H, C. A., MAGNIUS LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology**, v. 198, n. 2, p. 489-503, 1994.

NOWAK, M. A. et al. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 9, p. 4398-4402, apr. 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8633078> >.

OKAMOTO, H. et al. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. **J. Virol.**, v. 61, n. 10, p. 3030-3034, oct. 1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3041023> >.

OKAMOTO H, T. 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.**, v. 69, n. 10, p. 2575-2583, 1988.

OON, C. J. et al. Detection of hepatitis B surface antigen mutants and their integration in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Letter**, v. 136, n. 1, p. 95-99, feb. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10211946> >.

OTT, J. J. et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. **Vaccine**, v. 30, n. 12, p. 2212-2219, mar. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273662> >.

PESSOA, M. G. et al. Efficacy and safety of entecavir for chronic HBV in HIV/HBV coinfecting patients receiving lamivudine as part of antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 22, n. 14, p. 1779-1787, sep. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18753861> >.

POLLICINO, T.; SAITTA, C.; RAIMONDO, G. Hepatocellular carcinoma: the point of view of the hepatitis B virus. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 8, p. 1122-1132, aug. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21665892> >.

RAPICETTA, M.; FERRARI, C.; LEVRERO, M. Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection. **J. Med. Virol.**, v. 67, n. 3, p. 454-457, jul. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12116045> >.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 3, p. 215-229, mar. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738952> >.

SABLON, E.; SHAPIRO, F. Advances in Molecular Diagnosis of HBV Infection and Drug Resistance. **Int. J. Med. Sci.**, v. 2, n. 1, p. 8-16, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968334> >.

SANTOS, A. O. et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. **Viol. J.**, v. 7, p. 315, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073730> >.

SANTOS, E. A. et al. Hepatitis B virus variants in an HIV-HBV co-infected patient at different periods of antiretroviral treatment with and without lamivudine. **BMC Infect. Dis.**, v. 4, p. 29, aug. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339340> >.

BRASIL. Entecavir para o tratamento da Hepatite B crônica. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. n. 1, p. 1-6, Junho 2006.

SCARAVELI, N. G. et al. Seroprevalence of hepatitis B and hepatitis C markers in adolescents in Southern Brazil. **Cad. Saude Publ.** v. 27, n. 4, p. 753-758, apr. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603758> >.

SEEGER, C.; MASON, W. S. Hepatitis B virus biology. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.**, v. 64, n. 1, p. 51-68, mar. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704474> >.

SHELDON, J. et al. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. **Antivir. Ther.**, v. 10, n. 6, p. 727-734, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16218172> >.

SHELDON, J.; SORIANO, V. Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 61, n. 4, p. 766-768, apr. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218641> >.

SILVA, A. C. et al. Hepatitis B genotype G and high frequency of lamivudine-resistance mutations among human immunodeficiency virus/hepatitis B virus co-infected patients in

Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 770-778, sep. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944991> >.

SILVEIRA, T. R. et al. Hepatitis B seroprevalence in Latin America. **Rev. Panam. Salud Publ.**, v. 6, n. 6, p. 378-383, dec. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10659668> >.

SITNIK, R. et al. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 6, p. 2455-2460, jun. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15184419> >.

STUYVER L, D. G. S. et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 67-74, 2000.

STUYVER, L. J. et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. **Hepatology**, v. 33, n. 3, p. 751-757, mar. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230757> >.

SUCUPIRA, M. V. et al. Patterns of hepatitis B virus infection in Brazilian human immunodeficiency virus infected patients: high prevalence of occult infection and low frequency of lamivudine resistant mutations. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 655-660, sep. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072479> >.

SUMMERS, J.; O'CONNELL, A.; MILLMAN, I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, n. 11, p. 4597-4601, nov. 1975. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060140> >.

TAVARES-NETO, J. et al. Seroprevalence of hepatitis B and C in the Western Brazilian Amazon region (Rio Branco, Acre): a pilot study carried out during a hepatitis B vaccination program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, n. 2, p. 133-139, apr. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361991> >.



TENNEY, D. J. et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 9, p. 3498-507, sep. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328117> >.

THOMPSON, A. J. V. A. et al. Lamivudine resistance in patients with chronic hepatitis B: Role of clinical and virological factors. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 22, p. 1078–1085, 2006.

TILLMANN, H. L. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 1, p. 125-140, jan. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17206760> >.

TIOLLAIS, P.; POURCEL, C.; DEJEAN, A. The hepatitis B virus. **Nature**, v. 317, n. 6037, p. 489-495, oct. 1985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2995835> >.

TOLEDO, A. C. JR. et al. Seroprevalence of hepatitis B and C in Brazilian army conscripts in 2002: a cross-sectional study. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 5, p. 374-383, oct. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410888> >.

TREPO, C.; CHAN, H. L.; LOK, A. Hepatitis B virus infection. **Lancet**, v. 384, n. 9959, p. 2053-2063, dec. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954675> >.

VIANA, S. et al. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 4, p. 808-814, oct. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222030> >.

VILLENEUVE, J. P. et al. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. **J. Hepatol.**, v. 39, n. 6, p. 1085-1089, dec. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14642631> >.

VILLET, S. et al. Selection of a multiple drug-resistant hepatitis B virus strain in a liver-transplanted patient. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1253-1261, oct. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030194> >.

WARNER, N.; LOCARNINI, S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172\* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. **Hepatology**, v. 48, n. 1, p. 88-98, jul. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537180> >.

WHO. **Hepatitis B**. 2008. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> >. Acesso em: 24/01.

WHO, W. H. O. **Hepatitis B**. 2010. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> >. Acesso em: 10/01.

WILSON, J. N.; NOKES, D. J.; CARMAN, W. F. The predicted pattern of emergence of vaccine-resistant hepatitis B: a cause for concern? **Vaccine**, v. 17, n. 7-8, p. 973-978, feb. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10067705> >.

YEH, C. T. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy. **Antivir. Ther.**, v. 15, n. 3 Pt B, p. 471-475, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516567> >.

ZOULIM, F.; LOCARNINI, S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1593-1608 e1-2, nov. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737565> >.

## **APÊNDICE I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado, “Avaliação da resistência do vírus da hepatite B (VHB) às drogas antivirais utilizadas no tratamento de pacientes com hepatite crônica”. O objetivo deste estudo é avaliar marcadores de resposta e de resistência às drogas antivirais utilizadas no tratamento da hepatite B crônica.

Para participar você deve assinar duas vias deste termo de consentimento (uma via ficará com você e a outra com o pesquisador); autorizar a revisão do seu prontuário para obtermos informações sobre o tipo de tratamento para a hepatite B, duração do tratamento, histórico clínico e os resultados dos seus exames sorológicos sobre a infecção pelo HIV, Hepatite C, Hepatite D, Sífilis, Doença de Chagas e HTLVI/II e bioquímicos, através dos níveis de ALT e carga viral; responder a um questionário com perguntas sócio - demográficas e fatores de exposição; e permitir a cada seis meses a coleta de uma amostra de 10 mL de sangue para a realização da carga viral e o sequenciamento do material genoma do vírus da hepatite B para a pesquisa de mutações de resistência ao tratamento antiviral. Os resultados dos exames serão anexados aos prontuários para avaliação do médico.

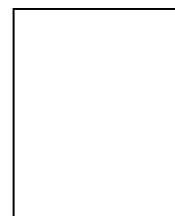
Não existem riscos aparentes diretamente relacionados ao estudo. Entretanto, a coleta de sangue pode ocasionar pequena hemorragia local ou complicações inespecíficas. A fim de proteger os participantes do estudo, as coletas serão realizadas por profissionais bem treinados. Por outro lado, participar deste estudo pode trazer alguns benefícios diretos e indiretos: (1) reconhecer marcadores de bom prognóstico para o tratamento da hepatite B crônica; (2) saber se o vírus da hepatite B apresenta mutações no genoma que causam resistência ao tratamento indicado;(3) permitir maximizar recursos e esforços no tratamento desta doença; (4) contribuir para orientar a escolha da melhor droga no tratamento dos pacientes crônicos para o VHB.

É importante destacar que seu nome e identificação serão mantidos em sigilo. Além disso, você é livre para recusar em participar do estudo ou dele retirar seu consentimento a qualquer momento sem qualquer transtorno ou interrupção de seu atendimento médico pela unidade de saúde onde está sendo atendido.

Eu, \_\_\_\_\_ (nome do voluntário), li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento médico. Sei que meu nome não será divulgado e que não terei despesas. Eu recebi uma cópia do termo de esclarecimento. Eu concordo em participar do estudo.

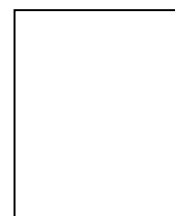
\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do voluntário, se maior que 18 anos ou dos pais ou responsáveis legais dos menores de 18 anos



Impressão digital do voluntário, pais ou

Assinatura do voluntário, se menor de 18 anos



Assinatura do pesquisador responsável

*Luciano Kalabric Silva*

Luciano Kalabric Silva  
Tecnologista em Saúde Pública  
CPqGM/FIOCRUZ  
SIAPE 121430-8

Impressão digital do voluntário menor (caso

Assinatura de testemunhas \_\_\_\_\_

Contatos:

<p><b><u>Pesquisador Responsável:</u></b> Dr. Luciano Kalabric Silva Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas Tel.: 71-3176-2265 / 71-3176-2301 / E-mail: <a href="mailto:kalabric@bahia.fiocruz.br">kalabric@bahia.fiocruz.br</a> Fax: 71-3176-2289</p>	<p><b>Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):</b> Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA Tel.: 71-3176-2285 / E-mail: <a href="mailto:cep@bahia.fiocruz.br">cep@bahia.fiocruz.br</a> HUPES, UFBA-BA Tel.: (71) 3283-8043 FUNDHACRE Tel.: 68-3226-4809</p>
--	---

## **APÊNDICE II - Questionário clínico-epidemiológico e revisão do prontuário**



## **ANEXO I – Cartas de apoio e financiamento**

## **ANEXO II - Aprovações dos CEPs**