

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

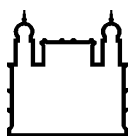
**Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares do vírus
da hepatite B em suínos *Sus scrofa*.**

Yasmine Rangel Vieira

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

Setembro/2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Yasmine Rangel Vieira

**Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares do vírus
da hepatite B em suínos *Sus scrofa*.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos necessários para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientação: Prof. Dr.^a Vanessa Salette de Paula

Rio de Janeiro

Setembro/2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

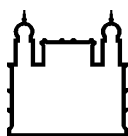
Y29 Vieira, Yasmine Rangel

Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares do vírus da hepatite B em suínos *Sus scrofa* / Yasmine Rangel Vieira. – Rio de Janeiro, 2012.
xv, 94 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2012.
Bibliografia: f. 60-76

1. Diagnóstico. 2. Vírus da hepatite B. 3. Suínos. 4. Javalis. I. Título.

CDD 616.3623



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Yasmine Rangel Vieira

**Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares do vírus da
hepatite B em suínos *Sus scrofa*.**

Orientação: Prof. Dr.^a Vanessa Salete de Paula

Aprovada em: 21/09/2012

EXAMINADORES

Prof.^a Dr.^a Natália Motta de Araújo (FIOCRUZ/IOC) - **Presidente e Revisora**

Prof. Dr. Fernando do Couto Motta (FIOCRUZ/IOC)

Prof.^a Dr.^a Débora Regina Lopes dos Santos (UFRRJ)

Prof.^a Dr.^a Livia Melo Villar (FIOCRUZ/IOC)

Prof. Dr. Marcelo Alves Soares (INCa/UFRRJ)

Rio de Janeiro, 21 de setembro de 2012.

Dedicatória

Aos meus avós maternos,
Maria Iracema Rangel de Souza e Walter Rangel de Souza.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dr.^a Vanessa Salete de Paula, inicialmente, pelo voto de confiança, apostando, acreditando e confiando no meu trabalho, mesmo sem nenhuma referência. Em seguida, por todo o carinho e amizade desenvolvidos, bem como pela paciência durante toda a jornada.

Ao Chefe do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV), Dr. Marcelo Alves Pinto, pela oportunidade de ingressar no grupo de pesquisa, bem como me presentear com o projeto que originou esse estudo.

A todos os amigos e/ou colegas que já fizeram ou fazem parte do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV), por toda a preocupação, ajuda, conselho e orientação durante o desenvolvimento desse trabalho. São eles: Débora Lopes, Luciane Almeida, Anna Carolina Mendes, Tamara Fogel, Amanda Perse, Renata Tourinho, Juliana Lopes, Tatiana Prado, Juliana Melgaço, Gentil Vasconcelos, Lilian Carvalho, Alexandre Santos, Natália Lanzarini, Lyana Lima, Guilherme Oliveira, Leilane Morais, Amanda Lopes, Vanessa Cristine, Camilla Almeida, Paula Borba e Aline Zanatta.

A Marcelle Figueira e Marcos Mendonça, pela preciosa e fundamental ajuda com o desenho molecular desse estudo. Sem dúvida, o diferencial para a materialização desse trabalho.

Aos fundamentais colaboradores desse estudo, Embrapa Suínos e Aves de Santa Catarina, representada pela Dr.^a Janice Ciacci-Zanella; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, representada pelo Dr. Antônio Vieira; e, *Tropical Sustainability Institute*, representada pelo Sr. Gonzalo Barquero, com quem estabelecemos os convênios necessários para conseguirmos a população de estudo.

À Dr.^a Márcia Arissawa de Biomanguinhos/FIOCRUZ, pela parceria para aquisição dos anticorpos monoclonais.

Ao laboratório de Virologia Molecular, em especial a Dr.^a Selma Gomes, Dr.^a Márcia Terezinha Souza e Bárbara Vieira, por compartilharem o *know-how* em hepatite B.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo fomento durante os últimos dois anos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, pela oportunidade de fazer parte do corpo discente, e pelo incentivo à formação do aluno.

À minha querida mãe, Márcia, pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis da minha vida.

Às minhas irmãs queridas, Tamara e Yárina, minhas cúmplices, parceiras e melhores amigas.

À minha avó Maria Iracema, pelo exemplo de vida, de mulher, de garra, luta e fé.

Ao meu avô Walter, *in memoriam*, minha principal referência de amor e generosidade.

Aos amigos e/ou colegas do Laboratório de Virologia Comparada, por tornarem esses dois anos de estudo e trabalho mais leves, em especial a Juliana Andrade, Yasmin Farias, Carmen Baur e Adriana Correa.

Aos amigos e/ou colegas do Laboratório de Enterovírus, em especial a Stéphanie Treiber, Larissa Medeiros, Gina Peres, e Fernando Tavares, pelas inúmeras e não menos importantes conversas de corredor.

Ao Chefe do Laboratório de Enterovírus, Dr. Edson Elias da Silva, por gentilmente disponibilizar o uso de equipamentos do seu laboratório.

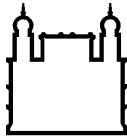
Aos amigos de outras jornadas científicas, Anna Carolina Coimbra, Monique Pacheco, Stephany Corrêa e André Mencialha, com quem muito aprendi e continuo aprendendo até hoje. Apaixonados pela profissão como eu, com quem já tive o prazer de dividir a bancada, e com quem tenho certeza que posso contar sempre que necessário.

Ao querido Dr. Júlio Paixão, meu amigo e eterno orientador, quem me despertou o interesse e o prazer pela pesquisa. Quem me ensinou a não desistir à primeira dificuldade, e a confiar mais em mim, e no meu potencial.

À amiga do curso de mestrado, Camila Lopes. Mesmo relutando em ingressar no mundo da Virologia.

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder
o que, com frequência, poderíamos ganhar, pelo
simples medo de arriscar.”

William Shakespeare



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PESQUISA DE MARCADORES SOROLÓGICOS E MOLECULARES DO VÍRUS DA HEPATITE B EM SUÍNOS *Sus scrofa*.

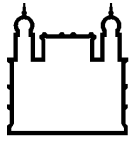
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Yasmine Rangel Vieira

O vírus da hepatite B (HBV) possui genoma DNA circular parcialmente fita-dupla, de cerca de 3,2 Kb e dupla polaridade. Este vírus pertence à família *Hepadnaviridae*, que pode ser encontrada tanto em mamíferos (Gênero *Orthohepadnavirus*) quanto em aves (Gênero *Avihepadnavirus*). Os representantes do gênero *Orthohepadnavirus* infectam humanos (HBV), primatas não humanos como chimpanzé, orangotango, gibão (HBV) e macaco-barrigudo (WMHBV), e roedores como marmotas (WHV) e esquilos (GSHV/ASHV). O gênero *Avihepadnavirus* já foi descrito circulando em patos (DHBV), gansos (GHBV), garças (HHBV), e cegonhas (STHBV). Estudos atuais propõem que galinhas também sejam hospedeiras do HBV. O HBV apresenta uma estreita faixa de hospedeiros, sendo restrito às espécies naturalmente infectadas ou àquelas intimamente relacionadas. Embora seja hospedeiro-específico, muitos estudos demonstram sua capacidade de cruzar barreiras entre espécies. Recentemente, investigações em um rebanho suíno na China utilizando kits de diagnóstico para HBV humano, incluindo ensaio imunoenzimático comercial (ELISA), coloração por imunohistoquímica e microscopia de transmissão eletrônica identificaram uma prova da existência de um novo membro da família *Hepadnaviridae* endêmico em suínos. O objetivo deste estudo foi investigar marcadores sorológicos e moleculares da circulação do HBV em criações comerciais brasileiras de suínos e javalis. Para esse fim, 376 suínos de rebanhos do estado de Santa Catarina, Rio de Janeiro e São Paulo foram testados para os marcadores sorológicos para HBV. Análises foram realizadas em amostras de soro usando kits ELISA para anti-HBc, HBsAg e anti-HBs. As amostras sorologicamente reativas e indeterminadas foram selecionadas para amplificação do HBV-DNA (1.100 pb e 429 pb), quantificação da carga viral e sequenciamento. Das 376 amostras de suínos analisadas, 28 (7,45%) foram reativas para anti-HBc, 3 (0,80%) para HBsAg e 6 (1,60%) para anti-HBs. Além desse total, mais 17 (4,52%) foram classificadas como indeterminadas na zona cinza do teste para anti-HBc e 2 (0,53%) para HBsAg. A carga viral de HBV foi determinada em duas amostras, com valor médio de $4,49 \times 10^3$ cópias/mL. O sequenciamento parcial do genoma revelou similaridade de 90,8-96,3% com HBV humano. Os dados sorológicos e moleculares demonstram evidências de infecção por um hepadnavírus em suínos e javalis brasileiros.

Palavras Chave: Diagnóstico, Vírus da Hepatite B, suínos, javalis.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PESQUISA DE MARCADORES SOROLÓGICOS E MOLECULARES DO VÍRUS DA HEPATITE B EM SUÍNOS *Sus scrofa*.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Yasmine Rangel Vieira

Hepatitis B virus (HBV) has a partially double-stranded circular DNA genome, of about 3,2 Kb and dual polarity. This virus belongs to the *Hepadnaviridae* family, which can be found in both mammals (*Orthohepadnavirus* genus) and birds (*Avihepadnavirus* genus). The *Orthohepadnavirus* genus representatives infect humans (HBV), non-human primates such as chimpanzees, orangutans, gibbons (HBV) and woolly monkeys (WMHBV), and rodents such as woodchucks (WHV) and squirrels (GSHV/ASHV). *Avihepadnavirus* genus has been reported to infect ducks (DHBV), geese (GHBV), herons (HHBV), and storks (STHBV). Recent studies suggest that chickens are also hosts of HBV. HBV displays a narrow host range, being restricted to limited or closely related naturally infected species. Although host-specific, many studies demonstrated the ability of HBV to cross species barriers. Recently, investigations in a swine herd in China using human HBV diagnostic kits including commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunohistochemical staining and transmission electron microscopy identified an evidence of the existence of a novel member of the hepadnavirus family endemic in swine. The aim of this study was to investigate the serological and molecular markers of HBV circulation in Brazilian domestic swine and wild boars herds. For this purpose, 376 swine from herds in Santa Catarina State, Rio de Janeiro State and São Paulo State were screened for HBV serological markers. Analyses were performed in serum samples using ELISA kits for anti-HBc, HBsAg and anti-HBs. Reactive and indeterminate swine serum samples were selected to perform HBV-DNA amplification (1,100 bp and 429 bp), viral load quantification and sequencing. From 376 swine samples analyzed, 28 (7.45%) were reactive to anti-HBc, 3 (0.80%) to HBsAg and 6 (1.60%) to anti-HBs. Besides, more 17 (4.52%) swine samples analyzed were classified in gray zone of EIA test to anti-HBc and 2 (0.53%) to HBsAg. HBV viral load was determined in two samples with mean value of 4.49×10^3 copies/mL. Partial genome sequencing showed similarity with human HBV with 90.8-96.3% of identity. Serological and molecular data demonstrate evidences of hepadnavirus infection in Brazilian swine.

Key Words: Diagnostic, Hepatitis B Virus, swine, boars.

Sumário

Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
1.1. Histórico	1
1.2. Epidemiologia	2
1.3. Classificação	6
1.4. Morfologia, estrutura e genoma	7
1.5. Replicação	11
1.6. Genótipos e distribuição	13
1.7. Patogenia	15
1.8. Manifestações clínicas	16
1.8.1. Infecção aguda	17
1.8.2. Infecção crônica	18
1.9. Diagnóstico	19
1.10. Profilaxia	22
1.11. Tratamento	23
1.12. HBV em animais	24
2. Justificativa	26
3. Objetivos	27
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. Materiais e Métodos	28
4.1. Comitê de Ética	28
4.2. Grupo de Estudo	28
4.3. Coleta das Amostras	28
4.4. Avaliação dos Marcadores Sorológicos	28

4.5.	Testes Moleculares	29
4.5.1.	Alinhamento das sequências de <i>Orthohepadnavirus</i>	29
4.5.2.	Otimização do ensaio de PCR	29
4.5.3.	Diagnóstico por PCR qualitativo	31
4.5.4.	Reações de sequenciamento	31
4.5.5.	PCR quantitativo	32
4.5.6.	Análise Filogenética	32
5.	Fluxograma	34
6.	Resultados	35
6.1.	Sorologia para HBsAg, anti-HBc e anti-HBs	35
6.2.	Diagnóstico Molecular	39
6.3.	Análise Filogenética	43
6.4.	Quantificação da carga viral	51
7.	Discussão	53
8.	Conclusões	58
9.	Perspectivas	59
10.	Referências Bibliográficas	60
Anexo		77
	Licença do Comitê de Ética no Uso Animal	
	Termo de Consentimento do Uso Animal	

Lista de Tabelas e Quadro

Tabela 1.1: Casos confirmados de hepatite B (número e taxa de detecção por 100.000 habitantes) segundo Unidade da Federação (UF) e região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999-2010	5
Tabela 4.1: Oligonucleotídeos para a região de superfície do HBV, usados para amplificação parcial do genoma ^(A) , quantificação da carga viral ^(B) e sequenciamento parcial do genoma ^(C)	33
Tabela 6.1: Prevalência dos marcadores sorológicos de HBV em suínos do Brasil	36
Tabela 6.2: Matriz de Identidade de Nucleotídeos com <i>Orthohepadnavirus</i>	46
Tabela 6.3: Matriz de Identidade de Nucleotídeos com <i>Avihepadnavirus</i>	47
Tabela 6.4: Resumo dos testes sorológicos e moleculares obtidos para as principais amostras do estudo	52
Quadro 1.1: Interpretação dos testes sorológicos para Hepatite B	20

Lista de Figuras

Figura 1.1: Prevalência mundial da infecção pelo HBV.....	3
Figura 1.2: Distribuição do HBV no Brasil	3
Figura 1.3: A família <i>Hepadnaviridae</i> e seus hospedeiros	6
Figura 1.4: Partículas associadas ao HBV.....	8
Figura 1.5: Estrutura do vírion	8
Figura 1.6: Organização genética do HBV	9
Figura 1.7: Revisão esquemática do ciclo replicativo de HBV	12
Figura 1.8: Distribuição dos principais genótipos de HBV circulantes por região do mundo	14
Figura 1.9 (A e B): Perfil sorológico da hepatite B aguda (A) e crônica (B)	21
Figura 6.1 (A, B e C): Nível de reatividade das amostras suínas para os marcadores de HBV analisados	38
Figura 6.2 (A e B): Análise da amplificação de amostras controle-positivo forte (A) e fraco (B), com carga viral estimada em 10^{10} cópias/mL e 10^4 cópias/mL, respectivamente, com oligonucleotídeos interespecíficos (MF-MR)	39
Figura 6.3 (A e B): Análise da amplificação dos plasmídeos contendo insertos referentes aos clones dos genótipos HBV A, D, E, F e G com oligonucleotídeos interespecíficos (MF-MR) (A) e, com PS1-S2 (B)	40
Figura 6.4 (A e B): Análise do limite de detecção para a <i>semi-nested</i> PCR - PCR1 com oligonucleotídeos PS1-S2 e, PCR2 com oligonucleotídeos PS1-SR, com as amostras controle-positivo forte (A) e fraco (B)	40
Figura 6.5 (A e B): Análise do limite de detecção dos oligonucleotídeos interespecíficos (MF-MR) para a amostra controle-positivo forte (A); a 2ª reação de PCR com os oligonucleotídeos interespecíficos (MF-MR) para a amostra controle-positivo fraco, a partir de PCR1 realizado tanto com os oligonucleotídeos PS1-S2 quanto com os oligonucleotídeos MF-MR (B)	41
Figura 6.6 (A e B): Análise da amplificação das amostras de suínos reagentes para, pelo menos, um marcador sorológico com PS1-S2, seguida de PS1-SR (A) e, após reamplificação com MF-MR (B)	42
Figura 6.7: Sequenciamento parcial do genoma das amostras positivas no PCR qualitativo, usando quatro oligonucleotídeos	44
Figura 6.8: Análise filogenética de <i>Orthohepadnavirus</i> baseada em sequências parciais do genoma	49
Figura 6.9: Análise filogenética dos genótipos humanos de HBV baseada em sequências parciais do genoma	50

Lista de Siglas e Abreviaturas

a.C. – antes de Cristo

AgAu - Antígeno Austrália

ALT – Alanina transaminase

Anti-HBc - Anticorpo para HBcAg

Anti-HBe – Anticorpo para HBeAg

Anti-HBs - Anticorpo para HBsAg

AST – Aspartato transaminase

cccDNA – *covalently closed circular* DNA (DNA na forma circular covalentemente fechada)

CEUA – Comitê de Ética no Uso Animal

Ct - o ciclo *threshold* (limiar da fase exponencial)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO – Absorbância ou densidade óptica

EIA – Imunoensaio enzimático

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)

HBcAg - Antígeno do core do vírus da hepatite B

HBeAg – Antígeno e secretado do vírus da hepatite B

HBIG – Globulina hiperimune da Hepatite B

HBsAg - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBxAg – Antígeno HBx do vírus da hepatite B

HBV - Vírus da hepatite B

HEV - Vírus da hepatite E

IgG – Imunoglobulina da isoforma G

IgM – Imunoglobulina da isoforma M

INF- α – Interferon-alfa

IU/L – Unidades internacionais por litro

JV - Javali

Kb - Kilobase

L – Proteína *large* do HBsAg

M – Proteína *middle* do HBsAg

mL – mililitro

mUI/mL – Miliunidades internacionais por mililitro

nm - nanômetro

NRTI – *Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors* (Nucleosídeos/nucleotídeos inibidores da transcriptase reversa)

ORF – *Open reading frame* (Fase aberta de leitura)

pb – Pares de bases

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PEI – Unidade de medida *Paul Erlich Institute*

pgRNA – RNA pré-genômico

rcDNA – *relaxed circular DNA* (DNA na forma circular relaxada)

RNA – Ácido ribonucleico

RNaseH – Ribonuclease H

S – Proteína *small* do HBsAg

sgRNA – RNA sub-genômico

SVP – partículas subvirais envelopadas vazias

SW – Suíno doméstico

UF – Unidade da Federação

μL - microlitro

UV – Luz ultravioleta

1. Introdução

1.1. Histórico

A literatura registra inúmeros episódios de epidemias ictericas ao redor do mundo desde o período antes de Cristo (a.C.). Dados de Hipócrates de 300-400 a.C. sugerem que o quadro icterico seria fruto de um acometimento hepático de natureza infecciosa (Sherlock, 1987). No século XVIII, tal quadro icterico foi classificado por Bianchi JB como ‘hepatite’ (Bianchi, 1725).

A hipótese de transmissão parenteral de hepatite foi suscitada em 1885, após a imunização de um grupo de trabalhadores alemães do porto de Bremen contra varíola. A vacina preparada a partir de linfa humana teria desencadeado um quadro icterico em cerca de 14,82% dos trabalhadores 2 a 8 meses após a inoculação (Lürman, 1885). Entretanto, essa hipótese só ganha robustez em 1937, após novo episódio de vacinação em massa, dessa vez contra febre amarela. Pacientes inoculados com a vacina preparada a partir de soro humano desenvolveram um quadro de icterícia 2 a 7 meses após a imunização (Findlay e Maccallum, 1938).

No Brasil, os relatos sobre as hepatites ganham destaque somente a partir do século XIX, quando se verificam relatos de surto icterico no Espírito Santo, após campanha de vacinação em massa contra a febre amarela em 1940 (Franco, 1969). Uma década depois, o mesmo ocorre na região Amazônica, com o uso de vacinas derivadas de plasma humano, administradas através de seringas e agulhas não descartáveis, além do uso recorrente de lancetas não descartáveis para diagnóstico da malária (Fonseca, 2010).

Apesar do histórico de relatos de icterícia, o vírus da hepatite B (HBV) foi descoberto somente em 1963, acidentalmente, por Blumberg BS (Blumberg et al., 1965). Analisando amostras de soro de um aborígine australiano, Blumberg notou a presença de um antígeno que reagia com amostras de soro de pacientes hemofílicos politransfundidos. Inicialmente esse antígeno foi classificado como antígeno Austrália (AgAu); e sua divulgação somente ocorreu dois anos mais tarde, com a publicação do trabalho ‘*A New antigen in Leukemia sera*’ (Blumberg et al., 1965).

Em 1967, o grupo de Blumberg passou a suspeitar que a alta frequência do AgAu em pacientes com hepatite aguda poderia ser derivada de uma infecção de etiologia viral. No ano seguinte, através de microscopia eletrônica, foi possível evidenciar a presença de inúmeras partículas esféricas e tubulares no soro de portadores crônicos do AgAu, as quais reagem

com o soro de pacientes convalescentes de hepatite (Blumberg et al., 1968). Em 1970, um terceiro tipo de partícula foi evidenciado, dessa vez contendo um ácido nucléico. Essa seria a partícula Dane, representando o vírion completo de HBV (Dane et al., 1970).

No Brasil, em 1970, estudos realizados na região Sul revelaram pela primeira vez a presença do AgAu, posteriormente designado como antígeno de superfície do HBV (HBsAg), entre pacientes nativos portadores de leucemia (Salzano e Blumberg, 1970).

Com o aprimoramento científico, novos antígenos do HBV foram identificados, bem como seus respectivos anticorpos, os quais passaram a ser utilizados como marcadores de replicação viral e infecciosidade, indicando a complexidade desse agente (Magnius e Espmark, 1972; Hadziyannis et al., 1983). A partir da década de 80, a utilização de ferramentas moleculares permitiu a identificação de diferentes genótipos atribuídos a esse vírus, ampliando o conhecimento sobre sua diversidade (Fonseca, 2010).

1.2. Epidemiologia

A infecção pelo HBV constitui um relevante problema de saúde pública a nível mundial (Grimm et al., 2011). Estima-se que mais de dois bilhões de pessoas foram infectadas; e destes, mais de 350 milhões de pessoas permaneçam infectadas por esse patógeno difundido globalmente (WHO, 2008).

O HBV é endêmico na Ásia, ilhas do Pacífico, África, Sul da Europa e América Latina (Kao e Chen, 2002) (Figura 1.1). Embora o Brasil esteja representado no cenário epidemiológico mundial com regiões de prevalência alta e intermediária de infecção, estudos nacionais minuciosos revelam regiões de prevalência alta e baixa de infecção (Souto, 1999). A Amazônia corresponde a uma área cuja prevalência varia entre 8-15% e, o restante do Brasil, abaixo de 2% (Figura 1.2).

Taxas variáveis de ocorrência da infecção pelo HBV em diferentes regiões do país são observadas, inclusive em nível de sub-regiões, uma vez que localidades vizinhas podem apresentar graus distintos de endemicidade (Souto, 1999). Na região Norte, principal área de alta prevalência do HBV no Brasil, que tem recebido maior atenção dos estudiosos e das autoridades sanitárias, verifica-se uma sub-região (em Barcellos) no Norte do Estado do Amazonas, cuja prevalência para o HBsAg é baixa (Arboleda et al., 1995). Na região Sul, ao contrário, que sempre apresentou os menores índices de hepatite B do país, foram caracterizadas sub-regiões, mais precisamente em Francisco Beltrão (PR), Cascavel (PR) e Chapecó (SC), com prevalência moderada a elevada do HBsAg. A mesma situação é

observada na região Sudeste, onde a prevalência é baixa, porém há a presença de sub-áreas com altos índices de infecção pelo HBV, localizadas nos estados do Espírito Santo e Minas Gerais (Souto, 1999) (Figura 1.2).

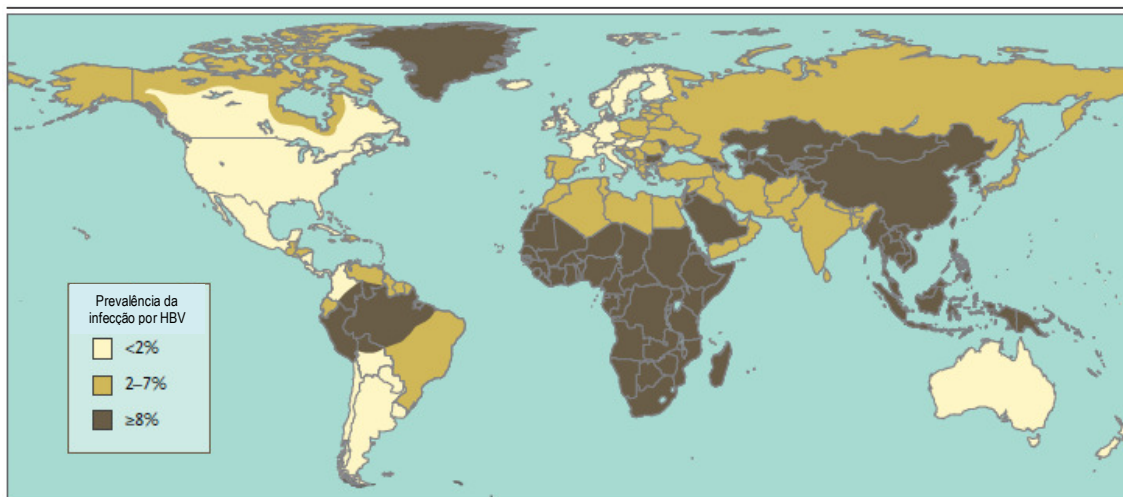


Figura 1.1: Prevalência mundial da infecção pelo HBV- Adaptado de Dienstag, 2008.

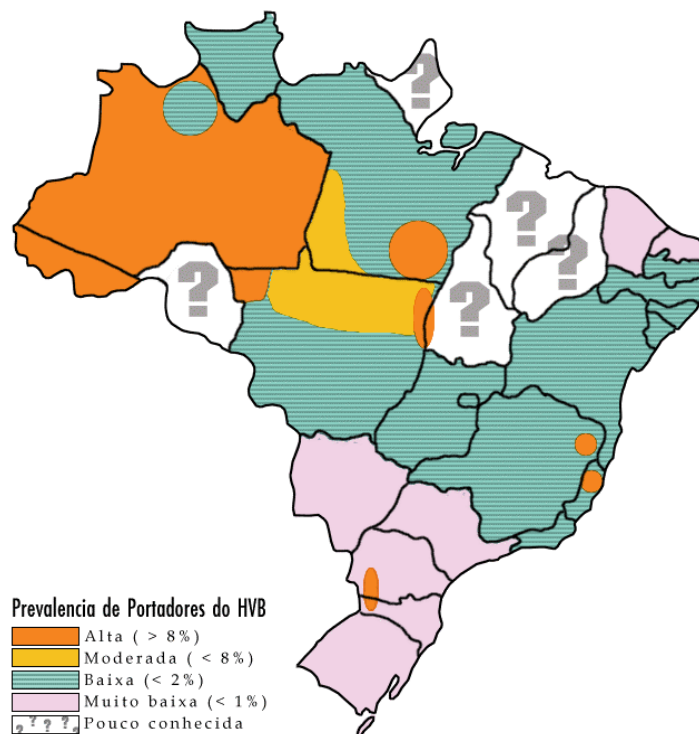


Figura 1.2: Distribuição do HBV no Brasil - Adaptado de Souto, 1999.

Segundo o Ministério da Saúde, o último '*Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais no Brasil*' publicado em julho de 2011 registra 104.454 novos casos confirmados de hepatite B no período de 1999 a 2010. Embora não caracterizadas como áreas endêmicas, as regiões Sul e Sudeste concentram 68,2% das notificações nesse período (Pereira et al., 2011) (Tabela 1.1).

As principais vias de infecção pelo HBV são a sexual, a perinatal e a percutânea (Dienstag, 2008). Nos países asiáticos, a maioria das infecções são adquiridas através de transmissão perinatal; ou, de transmissão vertical, no início da infância, da mãe para o filho. Na África e em países ocidentais, a transmissão horizontal entre crianças constitui a forma predominante de transmissão (Andre, 2000; Seeger e Mason, 2000; Kao e Chen, 2002). Em áreas de baixa prevalência, o uso de drogas injetáveis e o comportamento sexual de risco correspondem à principal via de infecção (Thimme e Blum, 2006; Dienstag, 2008; Mahtab et al., 2008).

Na maioria dos adultos as infecções pelo HBV são espontaneamente resolvidas, e uma resposta imune protetora é mantida ao longo da vida. No entanto, a maioria dos neonatos e crianças se tornam cronicamente infectados, com um risco elevado de desenvolverem complicações fatais como injúrias hepáticas crônicas, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular (Shi e Shi, 2009).

No Brasil, a infecção pelo HBV é de notificação compulsória, e os medicamentos são fornecidos aos pacientes pelo governo. Em outros países, entretanto, nos quais essa medida não ocorre, o custo dos antivirais torna o tratamento não amplamente disponível para os portadores de HBV (Leemans et al., 2007; McCaffrey, 2009; Patient et al., 2009). Além disso, os efeitos colaterais relevantes e a necessidade de administração prolongada de agentes antivirais afetam a adesão ao tratamento (Vial e Descotes, 1994; Fattovich et al., 1996; Lok et al., 2007; Zoulim, 2007; Lee e Keeffe, 2011). Apesar da disponibilidade de uma vacina eficaz, responsável pela proteção a longo prazo contra a infecção em mais de 90% das pessoas saudáveis, e com uma alta eficiência no bloqueio da transmissão vertical, cerca de um milhão de pessoas morrem anualmente devido à infecção pelo HBV (Perz et al., 2006; Xie et al., 2010).

Tabela 7 - Casos confirmados de hepatite B⁽¹⁾ (número e taxa de detecção por 100.000 habitantes) segundo UF e região de residência por ano de notificação, Brasil, 1999-2010⁽²⁾.

UF de residência	1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010 ^a		Total
	n ^o	taxa	n ^o	taxa	n ^o	taxa	n ^o	taxa	n ^o	taxa	n ^o	taxa	n ^o	taxa	n ^o	taxa	n ^o	taxa	n ^o	taxa	n ^o	taxa	n ^o	taxa	
Brasil	466	0,3	1168	0,7	2350	1,4	6019	3,4	8692	4,9	10246	5,7	12015	6,5	12134	6,5	12049	6,4	13147	6,9	14468	7,6	14650	6,1	104454
Monte	142	1,2	646	5,0	593	4,5	1028	7,6	964	7,0	1044	7,4	1074	7,3	1390	9,3	1426	9,3	1674	11,1	1938	12,6	1450	9,1	13369
Roraima	134	10,3	88	6,4	90	6,4	155	10,8	191	13,1	306	20,7	393	25,6	512	32,8	503	31,6	451	30,2	357	23,7	263	16,8	3443
Acre	6	1,1	255	45,7	260	45,3	280	47,7	215	35,8	226	36,8	225	33,6	394	57,4	342	48,6	478	70,3	665	96,2	382	52,1	3728
Amazons	0	0,0	178	6,3	121	4,2	345	11,6	270	8,9	212	6,8	147	4,5	116	3,5	156	4,6	310	9,3	492	14,5	401	11,5	2748
Roraima	0	0,0	4	1,2	40	11,9	66	19,0	39	10,9	61	16,6	49	12,5	79	19,6	94	22,6	58	14,1	113	26,8	81	18,0	684
Piauí	0	0,0	1	0,0	33	0,5	95	1,5	122	1,9	140	2,1	137	2,0	143	2,0	179	2,5	211	2,9	172	2,3	211	2,8	1444
Amapá	0	0,0	0	0,0	20	4,0	24	4,6	45	8,4	35	6,3	44	7,4	35	5,7	49	7,7	45	7,3	21	3,4	15	2,2	333
Toxantis	2	0,2	120	10,4	29	2,4	63	5,2	82	6,7	64	5,1	79	6,1	111	8,3	103	7,6	121	9,4	118	9,1	97	7,0	989
Maranhão	4	0,0	21	0,0	85	0,2	295	0,6	677	1,4	969	1,9	1258	2,5	1143	2,2	1098	2,1	1240	2,3	1491	2,8	1100	2,1	9381
Maranhão	0	0,0	2	0,0	19	0,3	69	1,2	116	2,0	119	2,0	124	2,0	133	2,2	111	1,8	210	3,3	189	3,0	164	2,5	1256
Piauí	0	0,0	1	0,0	0	0,0	0	0,0	8	0,3	19	0,6	30	1,0	25	0,8	27	0,9	23	0,7	40	1,3	30	1,0	203
Ceará	0	0,0	0	0,0	1	0,0	17	0,2	125	1,6	148	1,9	252	3,1	220	2,7	149	1,8	189	2,2	214	2,5	94	1,1	1409
Rio Grande do Norte	0	0,0	0	0,0	16	0,6	2	0,1	5	0,2	13	0,4	29	1,0	37	1,2	50	1,6	49	1,6	35	1,1	34	1,1	270
Pernambuco	0	0,0	0	0,0	6	0,2	3	0,1	31	0,9	87	2,5	136	3,8	78	2,2	50	1,4	61	1,6	97	2,6	114	3,0	663
Pernambuco	0	0,0	1	0,0	6	0,1	47	0,6	134	1,6	188	2,3	238	2,8	146	1,7	156	1,8	133	1,5	116	1,3	136	1,5	1301
Alagoas	4	0,1	4	0,1	22	0,8	101	3,5	81	2,8	141	4,8	82	2,7	92	3,0	107	3,5	107	3,4	250	7,9	97	3,1	1088
Sergipe	0	0,0	0	0,0	3	0,2	18	1,0	28	1,5	49	2,6	93	4,7	132	6,6	173	8,5	134	6,7	131	6,5	87	4,2	848
Bahia	0	0,0	13	0,1	12	0,1	38	0,3	149	1,1	205	1,5	274	2,0	280	2,0	275	2,0	334	2,3	419	2,9	344	2,5	2343
Suldeste	192	0,3	184	0,3	488	0,7	1758	2,4	2878	3,8	3882	5,1	4262	5,4	4447	5,6	4539	5,6	5194	6,5	5812	7,2	4548	5,7	38184
Minas Gerais	7	0,0	4	0,0	36	0,2	258	1,4	418	2,3	456	2,4	616	3,2	776	4,0	707	3,6	701	3,5	870	4,3	612	3,1	5461
Espírito Santo	0	0,0	7	0,2	50	1,6	237	7,4	364	11,2	530	16,1	552	16,2	484	14,0	473	13,4	412	11,9	407	11,7	314	8,9	3630
Rio de Janeiro	0	0,0	8	0,1	52	0,4	247	1,7	588	4,0	621	4,1	505	3,3	521	3,3	486	3,1	637	4,0	828	5,2	577	3,6	5070
São Paulo	185	0,5	165	0,4	350	0,9	1016	2,7	1508	3,9	2275	5,8	2589	6,4	2666	6,5	2873	6,9	3444	8,4	3707	9,0	3045	7,4	23823
Sul	123	0,5	230	0,9	973	3,8	2139	8,3	3334	12,8	3464	13,2	4118	15,3	3876	14,2	3740	13,5	3794	13,8	3695	13,3	3497	12,8	32983
Pernambuco	23	0,2	42	0,4	391	4,0	467	4,8	1408	14,2	1333	13,3	1607	15,7	1457	14,0	1312	12,5	1365	12,9	1309	12,2	1360	13,0	12074
Santa Catarina	80	1,6	157	2,9	315	5,8	957	17,3	1078	19,2	1117	19,6	1342	22,9	1339	22,5	1360	22,5	1255	20,7	1227	20,1	1089	17,4	11316
Rio Grande do Sul	20	0,2	31	0,3	267	2,6	715	6,9	848	8,1	1014	9,6	1169	10,8	1080	9,9	1068	9,6	1174	10,8	1159	10,6	1048	9,8	9593
Centro-Oeste	5	0,0	87	0,7	211	1,8	799	6,6	839	6,8	887	7,1	1303	10,0	1278	9,6	1246	9,2	1245	9,1	1532	11,0	1105	7,9	10537
Mato Grosso do Sul	5	0,2	3	0,1	25	1,2	177	8,3	207	9,5	264	12,0	318	14,0	265	11,5	207	8,9	214	9,2	271	11,5	141	5,8	2097
Mato Grosso	0	0,0	3	0,1	50	2,0	181	6,9	188	7,1	165	6,1	243	8,7	368	12,9	348	12,0	444	15,0	624	20,8	492	16,2	3106
Goiás	0	0,0	14	0,3	78	1,5	379	7,3	353	6,7	365	6,8	584	10,4	516	9,0	563	9,6	449	7,7	455	7,7	332	5,5	4088
Distrito Federal	0	0,0	67	3,3	58	2,8	62	2,9	91	4,2	93	4,2	158	6,8	129	5,4	128	5,3	138	5,4	182	7,0	140	5,4	1246

FONTES: Casos de hepatite B: SIM/SIS/MS; população: estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) segundo os Censos (1980, 1991 e 2000); contagem de população (1996) e regiões interestaduais: (1991 e 2009).
 ICD-10: (1) Foram considerados casos confirmados aqueles que apresentaram pelo menos um dos seguintes marcadores sorológicos reagentes: HBeAg ou antiHBe IgM ou HBeAg; (2) casos notificados no Sim até 31 de dezembro de 2010; (3) dados preliminares para 2010.
 EDC/DAJ; Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

Tabela 1.1: Fonte Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais (Pereira et al., 2011).

1.3. Classificação

O vírus da hepatite B pertence à família *Hepadnaviridae*, que pode ser encontrada em dois gêneros, *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus*, atribuídos a mamíferos e aves respectivamente (Blumberg et al., 1965; Dane et al., 1970; Magnius e Norder, 1995; Yang et al., 2007; Patient et al., 2009; Wei et al., 2010; Grimm et al., 2011).

O grupo dos *Orthohepadnavirus* inclui representantes que infectam humanos (*Homo sapiens sapiens*) (HBV), primatas não humanos como chimpanzé (*Pan troglodytes*), gibão (*Hylobates lar*), gorila (*Gorilla gorilla*), orangotango (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) (HBV) e macaco-barrigudo (*Lagothrix lagotricha*) (WMHBV), e roedores como marmotas (*Marmota monax*) (WHV) e esquilos (*Spermophilus beecheyi*) (GSHV), (*Spermophilus parryi kennicotti*) (ASHV) (Summers et al., 1978; Marion et al., 1980; Mandart et al., 1984; Trueba et al., 1985; Lanford et al., 1998; Warren et al., 1999; Grethe et al., 2000; Hu et al., 2000; Lanford et al., 2000; MacDonald et al., 2000). O gênero *Avihepadnavirus* foi relatado infectando patos (*Anas domesticus*) (DHBV), gansos (*Anser Rossi*, *Anser caerulescens*) (GHBV), garças (*Adrea cinerea*) (HHBV), cegonhas (*Ciconia ciconia*) (STHBV) (Mason et al., 1982; Mandart et al., 1984; Jilbert et al., 1987; Sprengel et al., 1988; Chang et al., 1999; Pult et al., 2001; Triyatni et al., 2001; Guo et al., 2005). Estudos recentes também incluem as galinhas (*Gallus gallus*) como hospedeiras de hepadnavírus, embora não esteja claro se o vírus encontrado é o mesmo ou uma variante do HBV, responsável pela hepatite B humana. (Tian et al., 2012) (Figura 1.3).

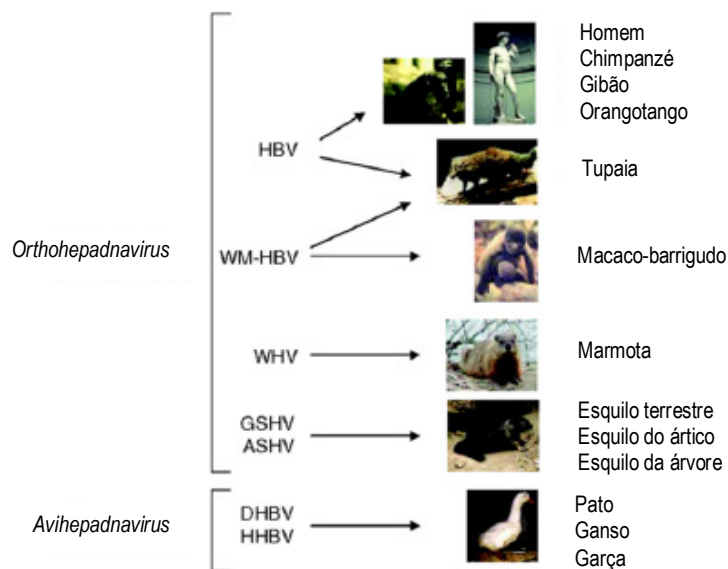


Figura 1.3: A família *Hepadnaviridae* e seus hospedeiros - Adaptado de Dandri et al., 2005.

Embora pertençam à mesma família, os diferentes membros de hepadnavírus apresentam distinções importantes (Dandri et al., 2005). Em geral, os vírus encontrados em aves são os mais divergentes do HBV, apresentando um genoma menor do que o encontrado em mamíferos e, compartilhando com eles uma similaridade na sequência de nucleotídeos de cerca de 40% (Mandart et al., 1984).

Apesar dessas diferenças, os hepadnavírus apresentam características semelhantes, verificadas em ambos os gêneros: produção de vírions envelopados, cujo material genético corresponde ao DNA, o qual se encontra na forma circular e parcialmente dupla fita, de 3-3,3 Kilobase (Kb); uma polimerase associada ao vírion com atividade de transcriptase reversa; produção de partículas subvirais em excesso, compostas somente de um envelope de proteínas e lipídeos; uma faixa restrita de hospedeiros susceptíveis e, indução de uma infecção persistente exibindo um hepatotropismo predominante (Ganem, 1996).

Devido a duas dessas características, a família *Hepadnaviridae* encontra-se atribuída à classe VII de Baltimore. De acordo com essa classificação, que visa agrupar os vírus de acordo com o seu material genético e estratégia de replicação, os hepadnavírus encontram-se como membros isolados da classe VII, composta por vírus de DNA dupla fita, os quais realizam uma transcrição reversa no seu processo replicativo, envolvendo, portanto, um intermediário de RNA (Baltimore, 1971).

1.4. Morfologia, estrutura e genoma

A análise por microscopia eletrônica revela três tipos de partículas virais distintas presentes no soro de um paciente infectado por HBV. Duas dessas partículas são estruturas menores, que podem ser encontradas nas formas esférica, com um diâmetro de 20 nm, e filamentosa, com comprimento variável e largura de 22 nm. Essas partículas são compostas pelo antígeno de superfície do HBV (HBsAg) e por lipídeos derivados do hospedeiro. Por não apresentarem ácido nucléico não são infecciosas (Gavilanes et al., 1982).

A terceira e última partícula corresponde à partícula infecciosa Dane, representando o vírion. Trata-se de uma partícula esférica de 42 nm de diâmetro, envolvida por uma bicamada lipídica na qual se encontram ancoradas proteínas transmembrana que compõem o HBsAg - proteínas *small (S)*, *middle (M)* e *large (L)*- associadas à morfogênese e infectividade (Gerlich e Robinson, 1980; Bruss, 2007) (Figura 1.4).

Internamente ao vírion encontra-se o nucleocapsídeo icosaédrico de aproximadamente 30 nm, composto do antígeno do core de HBV (HBcAg) complexado com uma polimerase

viral e o genoma de DNA de aproximadamente 3,2 Kb (Gerlich e Robinson, 1980; Bruss, 2007) (Figura 1.5). Em função do tamanho de seu genoma, o HBV é considerado um dos menores vírus infecciosos humano (Robinson et al., 1974; Lau e Wright, 1993). Apesar de o seu material genético corresponder ao DNA, esse vírus apresenta características particulares, semelhante aos retrovírus (Ganem and Schneider, 2001; Hollinger and Liang, 2001).

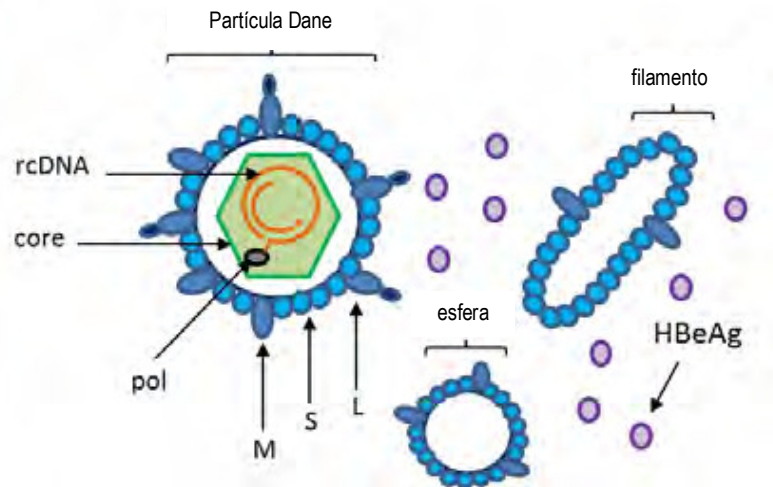


Figura 1.4: Partículas associadas ao HBV - Adaptado de Lucifora and Protzer, 2012.
 Legenda: rcDNA – *relaxed circular DNA*; core – proteína do capsídeo; pol – polimerase; S, M e L – proteínas *small, middle e large* do antígeno de superfície (HBsAg); HBeAg – antígeno ‘e’ secretado.

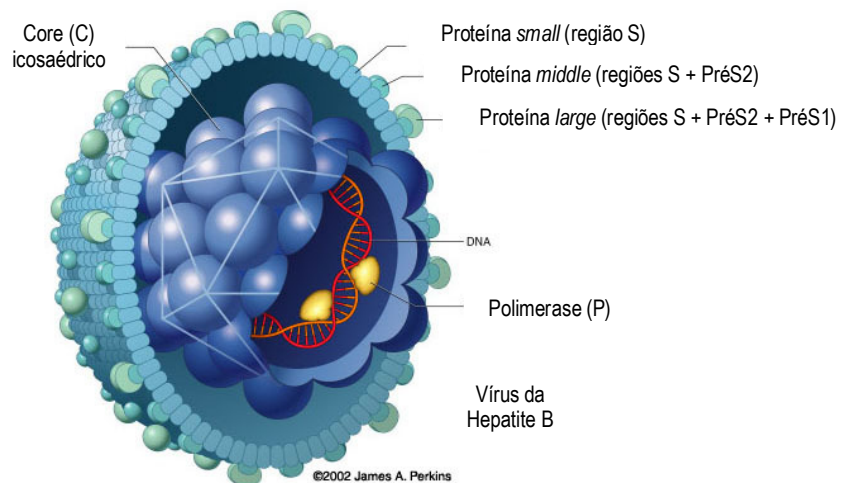


Figura 1.5: Estrutura do vírion. Adaptado de <http://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>. Acessado em 16/07/2012.

O genoma transportado pelo vírion encontra-se na forma circular relaxada (rcDNA), parcialmente dupla fita (dsDNA), covalentemente ligado a uma transcriptase reversa viral

(Gerlich e Robinson, 1980; Bruss, 2007; Wei et al., 2010). As fitas de DNA que o compõem apresentam diferentes comprimentos e dupla polaridade. A fita mais externa é a fita codificante, de polaridade negativa, representando o genoma total do HBV. Já a fita complementar interna apresenta comprimento variável, de cerca de 50-100% da fita codificante e, polaridade positiva. Extremidades coesivas geradas através de complementariedades entre as regiões 5' de ambas as fitas garantem sua configuração circular (Wei et al., 2010). E, à região 5' da fita completa que a transcriptase encontra-se ancorada (Gerlich e Robinson, 1980; Bruss, 2007; Wei et al., 2010).

O material genético de HBV apresenta uma organização altamente compacta, abrigando quatro fases abertas de leitura (ORFs) sobrepostas, as quais cobrem o genoma inteiro (Wei et al., 2010). Essas regiões são codificantes para proteínas estruturais específicas e não estruturais, e são identificadas por S (superfície), C (core), P (polimerase) e X (proteína X) (Lau and Wright, 1993) (Figura 1.6).

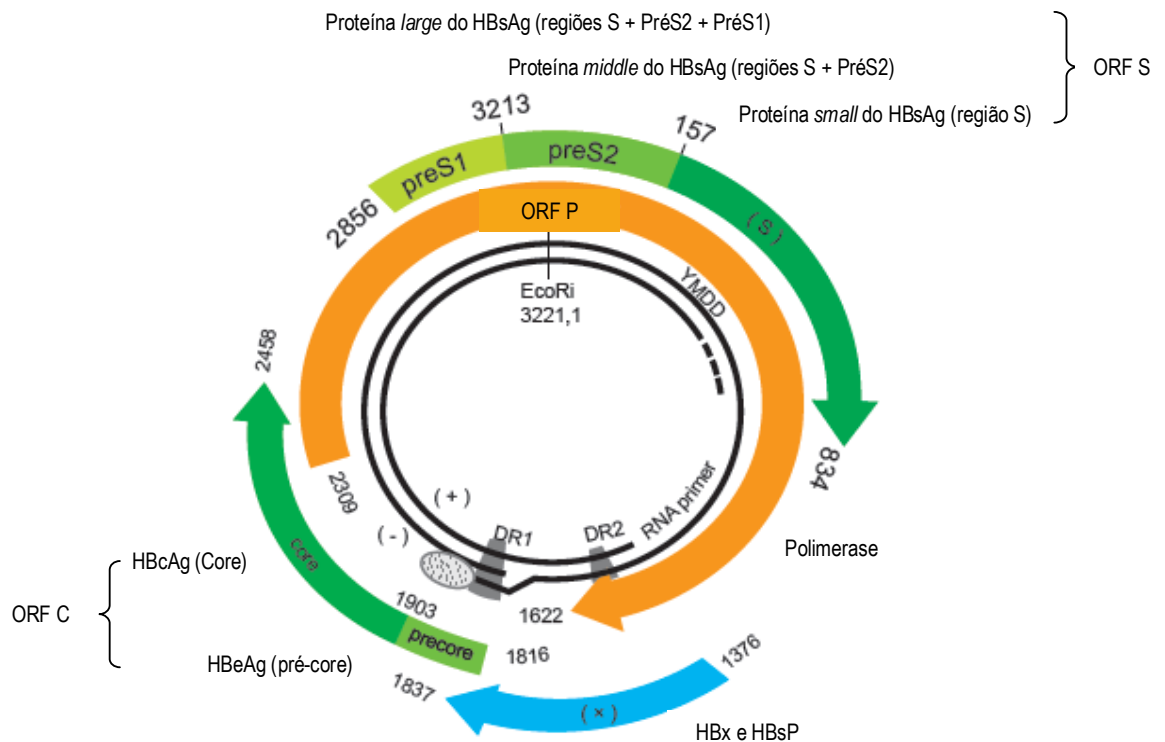


Figura 1.6: Organização genética do HBV - Adaptado de Kao, 2011.

Legenda: DR1, DR2 – repetições diretas do genoma, formando as extremidades coesivas que garantem a conformação circular; ORF S (regiões pré-S1, pré-S2 e S) - codificante para o HBsAg; ORF C (core e pré-core) - codificante para o HBcAg e o HBeAg; ORF P - codificante para a polimerase; ORF X - codificante para HBx e HBsP.

A ORF S é responsável pela codificação das proteínas que compõem o antígeno de superfície viral e circundam o nucleocapsídeo. Ela pode ser dividida nas regiões pré-S1, pré-

S2 e região S. A região S codifica a proteína S do HBsAg, as regiões pré-S2 e S codificam a proteína M do HBsAg e, a região completa pré-S/S codifica a proteína L do HBsAg (Wei e Tiollais, 1999; Gish e Gadano, 2006; Liang, 2009; Wei et al., 2010).

As proteínas S, M e L estão presentes em diferentes proporções nos três tipos de partículas virais associadas à infecção por HBV. A proteína S representa o componente predominante do envelope viral. A proteína M parece estar distribuída de forma semelhante em todos os tipos de partículas. A proteína L é somente encontrada no vírion e partícula filamentosas de HBV (Heermann et al., 1984).

A ORF C é responsável pela codificação do antígeno do nucleocapsídeo (HBcAg) e do antígeno 'e' secretado (HBeAg). Ela pode ser dividida nas regiões pré-core e core (Wei e Tiollais, 1999; Gish e Gadano, 2006; Liang, 2009; Wei et al., 2010). A região do core codifica o HBcAg enquanto o pré-core codifica o HBeAg, associado à infecção persistente (Milich e Liang, 2003) e envolvido com funções imunoregulatórias (Chen et al., 2004b; Chen et al., 2005; Bertoletti e Gehring, 2006; Visvanathan et al., 2007).

A ORF P é responsável pela codificação de uma proteína multifuncional, que pode ser dividida em proteína terminal e polimerase viral. O domínio da proteína terminal está envolvido na encapsidação e atua como primer para o início da síntese da fita negativa. A polimerase viral agrega funções não só de DNA polimerase, mas também de transcriptase reversa, que catalisa a síntese do genoma e, de ribonuclease H (RNaseH), a qual degrada o RNA pré-genômico e facilita a replicação (Soussan et al., 2000; Liang, 2009). Essa região codificante é a única que se encontra sobreposta a todas as demais ORFs (Soussan et al., 2000).

A ORF X é responsável pela codificação da proteína HBx, essencial à replicação viral. Trata-se de uma proteína com múltiplas funções, incluindo transdução de sinal, atividade transcricional, reparo de DNA, e inibição da degradação proteica (Wei and Tiollais, 1999; Gish e Gadano, 2006; Liang, 2009; Wei et al., 2010). A essa proteína está atribuído o potencial oncogênico de HBV (Liang, 2009).

Finalmente, uma proteína viral conhecida como HBsP codificada por um transcrito viral *spliced* (Soussan et al., 2000) também atribuído a ORF X parece estar envolvida com diferentes efeitos apoptóticos (Milich et al., 1997).

1.5. Replicação

O ciclo de replicação do HBV inicia com a ligação do vírion à membrana do hepatócito através de um receptor pré-S1 específico (Gerlich e Robinson, 1980; Klingmuller e Schaller, 1993). Apesar de o mecanismo de entrada na célula não estar elucidado, algumas vias têm sido propostas, como a entrada através de endocitose e de fusão direta do envelope viral com a membrana plasmática (Grimm et al., 2011).

Após a entrada do vírus na célula, o nucleocapsídeo é liberado no citosol e transportado até o núcleo do hepatócito (Nassal, 2008; Hongthanakorn e Lok, 2010). Os mecanismos de desencapsidação viral e transporte intracelular do seu genoma até o núcleo também não estão esclarecidos. Provavelmente, tais mecanismos envolvem modificação da proteína do nucleocapsídeo (Kang et al., 2006).

No núcleo, o genoma viral que se encontra na forma circular relaxada (rcDNA) é reparado e convertido a uma molécula circular covalentemente fechada (cccDNA) pela maquinaria enzimática celular (Weiser et al., 1983; Beck e Nassal, 2007; Sohn et al., 2009) e viral (Nassal, 2008).

Em um primeiro momento do processo de reparo, a região de fita simples do rcDNA é completada com nucleotídeos pela polimerase celular e, em outra etapa, a polimerase viral e os iniciadores de RNA usados para a síntese dessa fita serão removidos pelas enzimas celulares (Nassal, 2008). Após esse processo, o DNA será, então, circularizado e estabilizado através de proteínas histonas e não histonas (Kock e Schlicht, 1993; Newbold et al., 1995).

O cccDNA é crucial para a persistência da infecção (Grimm et al., 2011). Evidências sugerem que cada célula infectada contenha 1-50 moléculas de cccDNA funcionando como mini cromossomo episossomal de longa meia-vida, representando um intermediário replicativo do ciclo do HBV, relativamente resistente ao tratamento com antivirais e clareamento imune (Hongthanakorn e Lok, 2010; Grimm et al., 2011).

Uma vez sintetizado, o cccDNA serve como molde para a transcrição de todos os RNAs virais, associados ao genoma ou codificantes para todas as proteínas virais necessárias ao ciclo replicativo de HBV (Cattaneo et al., 1984; Beck and Nassal, 2007; Liang, 2009). Dessa forma, ele pode ser transcrito em RNA pré-genômico (pgRNA), de aproximadamente 3,5 Kb de comprimento, e diferentes RNAs sub-genômicos (sgRNA), cujos comprimentos variam de 0,8-2,4 Kb (Beck and Nassal, 2007; Liang, 2009; Grimm et al., 2011).

No citosol, uma única molécula de pgRNA é incorporada juntamente com a transcriptase reversa a um capsídeo em montagem. No interior desse nucleocapsídeo, a transcrição reversa do pgRNA em DNA genômico ocorre. Inicialmente, o pgRNA é

retrotranscrito na fita negativa de DNA, a qual dará origem à fita positiva e, finalmente, ao rcDNA (Beck e Nassal, 2007; Grimm et al., 2011). Esse nucleocapsídeo poderá ser reimportado ao núcleo, para a amplificação das moléculas de cccDNA ou, ser envelopado pelas proteínas de superfície, e liberado via retículo endoplasmático na forma de uma nova geração de vírions infecciosos maduros (Bruss, 2007; Grimm et al., 2011) (Figura 1.7). Alternativamente, o genoma viral pode ser integrado ao genoma hospedeiro, através de enzimas celulares, embora essa estratégia não seja essencial ao ciclo do HBV (Wang e Rogler, 1991).

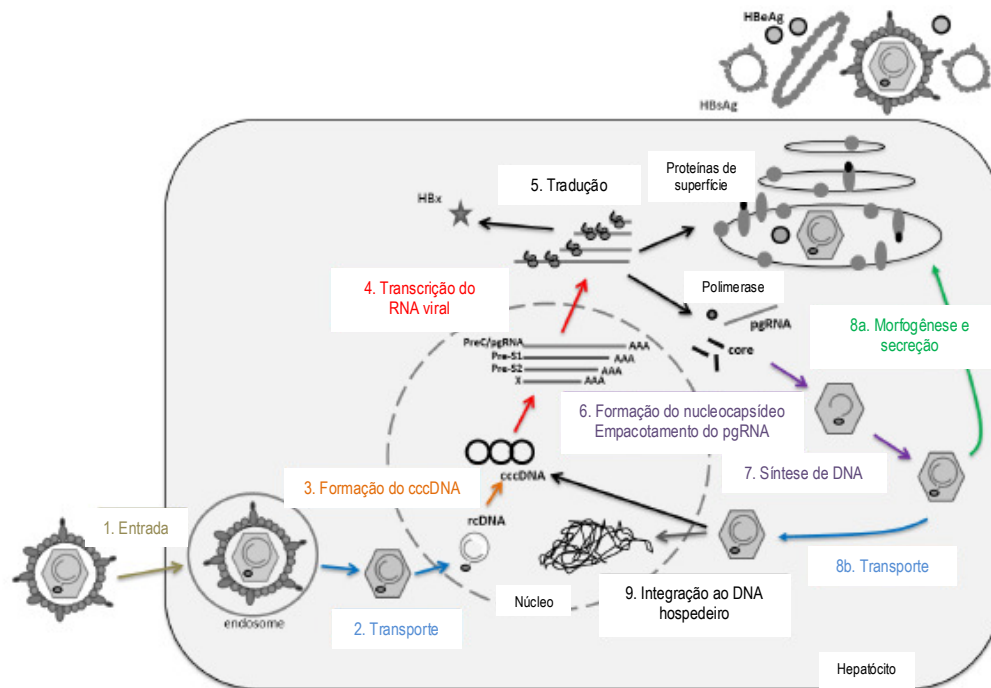


Figura 1.7: Revisão esquemática do ciclo replicativo de HBV - Adaptado de Lucifora and Protzer, 2012.

Além de servir como modelo para a transcrição reversa, após ser exportado do núcleo, o pgRNA é também traduzido a HBcAg e polimerase viral. Já os sgRNAs são traduzidos a proteínas do envelope, HBeAg e HBxAg (Wei et al., 2010; Grimm et al., 2011).

Curiosamente, além de revestirem a partícula Dane, essas proteínas do envelope também podem brotar em excesso na forma de partículas subvirais envelopadas vazias (SVP). Por não apresentarem nucleocapsídeo, essas partículas não são infecciosas, podendo ser encontradas nas formas esférica e filamentosa (Heermann et al., 1984; Ganem, 1991). Trata-se de um fenômeno natural específico de HBV, associado à habilidade da proteína S do

envelope de formar espontaneamente tais partículas no retículo endoplasmático rugoso (Dubois et al., 1980).

1.6. Genótipos e distribuição

Sabe-se que os vírus que se replicam mais rapidamente apresentam maior probabilidade de desenvolverem mutações e por elas serem selecionados (Carman, 1998). O HBV é um vírus cujo ciclo replicativo produz altos títulos de partículas virais no sangue, de cerca de 10^8 a 10^{10} vírions/mL (Elgouhari et al., 2008). Além disso, possui a transcriptase reversa, que é uma enzima suscetível a erros, devido à falta de capacidade de revisão exonucleolítica $3' \rightarrow 5'$ (Zhang et al., 2007). Essa característica provoca uma alta taxa de erro nos ciclos replicativos, através de mutações pontuais, deleções e inserções, e determina uma rápida evolução em seu genoma ao longo do tempo (Kao, 2011).

De fato, a taxa de substituição nucleotídica está estimada em aproximadamente $1,4-3,2 \times 10^{-5}$ substituições/sítio/ano, cerca de dez vezes maior que outros vírus de DNA (Okamoto et al., 1987; Orito et al., 1989; Lau e Wright, 1993). Embora algumas mutações proporcionem uma vantagem replicativa, em função da compactação do genoma, outras podem gerar vírions não viáveis (Morozov et al., 2000), como aquelas que interferem em promotores, repetições diretas e em outros elementos envolvidos na replicação (Torresi, 2002).

Quando viáveis, as substituições nucleotídicas no genoma viral podem gerar variabilidade, com a existência de vários genótipos, subgenótipos, mutantes, recombinantes e quasiespécies (Kao, 2002). Além da diversidade, elas também podem provocar diversos efeitos, como evasão da imunidade natural ou induzida por vacina, resistência às drogas, alterações na patogenicidade, alterações no tropismo por tecidos e espécie e, persistência viral (Jazayeri et al., 2010).

Os genótipos representam populações virais estáveis geneticamente, com distintas histórias evolucionárias. Acredita-se que tenham surgido em populações humanas específicas, e migrado com seus hospedeiros para diferentes áreas no mundo, levando à presente distribuição geográfica (Echevarria e Avellon, 2006).

Existem oito genótipos reconhecidos para HBV, classificados de A - H, os quais são discriminados por uma divergência de pelo menos 8% nas suas sequências nucleotídicas completas; ou, uma divergência de 3-5% no gene para o antígeno de superfície (Okamoto et al., 1988; Norder et al., 1994; Stuyver et al., 2000; Arauz-Ruiz et al., 2002). Embora suas classificações como genótipos ainda seja controversa, dois novos candidatos foram propostos,

Cabe ressaltar que a infecção por um determinado genótipo não exclui a possibilidade de coinfeção dentro de um mesmo hospedeiro por outro genótipo, ou ainda coinfeção por tipos recombinantes de HBV (Chen et al., 2004a; Wang et al., 2005; Chen et al., 2006). Sendo assim, o HBV pode circular como uma complexa mistura de variantes geneticamente distintas, mas estreitamente relacionadas, que estão em equilíbrio em um determinado momento da infecção sob uma dada circunstância (Zhang et al., 2007).

Estudos demonstram que os diferentes genótipos e a maioria dos subgenótipos apresentam propriedades epidemiológicas e virológicas particulares. Além da distinta distribuição geográfica, evidências sugerem que os genótipos sejam resultado da biologia do HBV (Yang et al., 2007), determinando o curso da doença (Schaefer, 2007), bem como afetando a resposta à terapia antiviral (Stein e Loomba, 2009).

Na Europa, por exemplo, a cronificação das infecções está mais frequentemente associada ao genótipo A do que ao genótipo D. Enquanto que, na Ásia, os quadros graves estão mais correlacionados ao genótipo B do que ao genótipo C (Kao et al., 2000).

1.7. Patogenia

O ciclo replicativo do HBV não é diretamente citotóxico para os hepatócitos. Entretanto, a resposta imune dirigida aos antígenos virais expostos na superfície dos hepatócitos é que determina a injúria tecidual (Ratnam e Visvanathan, 2008). O equilíbrio dinâmico entre a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro é determinante para a patogênese da doença hepática (Shi e Shi, 2009).

A forma pela qual a infecção irá se manifestar depende da idade do indivíduo, seu estado imunológico e rota de transmissão da infecção. Adultos imunocompetentes normalmente apresentam uma doença autolimitada, na qual a eliminação viral é observada em cerca de 95% dos casos, e adquirindo imunidade ao longo da vida. Já as infecções adquiridas precocemente, vertical ou horizontalmente, tendem a evoluir com um prognóstico favorável à cronificação (Ganem e Prince, 2004; Lok e McMahon, 2007)

A eliminação do HBV está associada a uma forte resposta coordenada por células T CD4+ e T CD8+ à infecção viral, combinada com um componente humoral imune eficaz (Ferrari et al., 1990; Rehermann et al., 1995; Thimme et al., 2003). O perfil de infecção crônica está relacionado a uma diminuição dessa resposta por células T específica, insuficiente para a eliminação viral do fígado (Ratnam e Visvanathan, 2008).

Dessa forma, a inflamação crônica mediada pelo sistema imune, a contínua morte celular e a subsequente proliferação celular podem aumentar a frequência de alteração genética e o risco de desenvolvimento de câncer. A presença de células e citocinas inflamatórias ativam as vias geradoras de oxidantes celulares, que induzem danos oxidativos no DNA (Coussens e Werb, 2002; Takagi et al., 2002; Lupberger e Hildt, 2007). O aumento do *stress* oxidativo pode induzir mutações genéticas e alterações cromossômicas. Sendo assim, um efeito pró-carcinogênico pode ser desencadeado através de uma doença inflamatória necrótica sem a erradicação final de HBV do fígado (Shi e Shi, 2009).

Novos estudos têm demonstrado que além do efeito não citopático tradicionalmente aceito, o HBV pode estar envolvido diretamente com a morte celular dos hepatócitos (Lu et al., 2007). As proteínas virais HBx e HBsP estariam envolvidas na indução de apoptose nas células infectadas, que passariam a expor resíduos de fosfatidilserina em suas membranas, além de adquirirem uma conformação mais arredondada (Milich et al., 1997).

Além disso, evidências experimentais sugerem que HBx, uma proteína multifuncional com potencial oncogênico, possa interagir com um grande número de fatores celulares e modular suas funções normais, levando à desregulação das atividades celulares (Hagen et al., 1994; Bouchard e Schneider, 2004).

1.8. Manifestações clínicas

A infecção pelo HBV é capaz de provocar uma ampla faixa de manifestações clínicas, variando desde um estado de portador assintomático com uma histologia hepática normal à grave, às doenças hepáticas crônicas, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular (Lee, 1997; McMahon, 2005).

A infecção aguda pode se manifestar como hepatite anictérica (subclínica) em 66% dos pacientes, hepatite icterica em 33% dos pacientes ou, raramente, como hepatite fulminante, em aproximadamente 1% dos casos (Liang, 2009).

A infecção crônica pode ser assintomática (estado de portador de HBsAg), ou pode ser manifestada por sinais e sintomas de cirrose ou carcinoma hepatocelular, ou ambos. O resultado desse perfil de infecção depende não só do vírus, através dos níveis de HBV-DNA, genótipo e padrões de mutação, mas também de fatores relacionados ao hospedeiro, como idade, sexo, *background* genético e estado imunológico (Liang, 2009).

Manifestações extra-hepáticas também são relatadas em cerca de 1-10% dos casos de infecção por HBV, como doença do soro, poliarterite nodosa, crioglobulinemia mista,

glomerulonefrite membranosa e anemia aplásica. Embora a patogênese das desordens não esteja clara, acredita-se que a causa seja a injúria mediada pela deposição de complexos imunes relacionados aos altos níveis de antígenos HBV (Elgouhari et al., 2008).

1.8.1. Infecção aguda

No perfil agudo de infecção, o período de incubação do HBV varia de duas semanas a quatro meses, seguido de um período prodrômico ou pré-ictérico e, em seguida, uma fase ictérica (Liang, 2009). Inicialmente, os pacientes se queixam de fadiga, náusea, anorexia e desconforto no hipocôndrio direito, além de apresentarem sintomas semelhantes à gripe, como coriza, fotofobia, dor de cabeça e mialgia (Elgouhari et al., 2008). Nesse período prodrômico, os níveis de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) se elevam (Elgouhari et al., 2008), bem como os níveis de HBsAg e HBV DNA (Liang, 2009).

Após dez dias do início dos sintomas, a icterícia se torna aparente através da colúria, aliada à febre de baixo grau e hepatomegalia levemente dolorosa (Elgouhari et al., 2008). Nessa fase ictérica, os níveis de bilirrubina também se elevam (Elgouhari et al., 2008), mas os níveis virais diminuem (Liang, 2009).

Na convalescença, a icterícia é resolvida, mas os sinais e/ou sintomas podem durar ainda algumas semanas. Nessa fase, o HBsAg é eliminado do organismo, e os níveis de HBV-DNA não são detectados no soro (Liang, 2009). Com a recuperação, os níveis de ALT se normalizam dentro de 1-4 meses. Embora o nível de ALT também reflita a injúria hepatocelular, ele não tem valor prognóstico. (Elgouhari et al., 2008).

Os casos de hepatite fulminante são evidenciados pelo aparecimento súbito de febre, dor abdominal, vômito e icterícia, seguido de desorientação, confusão e coma. Os níveis de HBsAg e HBV-DNA caem rapidamente à medida que a falência hepática se desenvolve, fazendo com que, inclusive, alguns pacientes sejam HBsAg negativos no início do coma hepático. Devido à gravidade nas alterações das funções hepatocelulares e consequente citotoxicidade, trata-se de um quadro clínico que requer transplante (Liang, 2009).

1.8.2. Infecção crônica

O perfil crônico de infecção apresenta um curso dinâmico e variável (Liang, 2009). São conhecidos quatro estágios naturais de infecção: estágio de tolerância imune, estágio de *clearance* imune ou estágio imunorreativo, estágio de portador HBsAg inativo e, estágio de reativação. Entretanto, nem todos os pacientes crônicos irão atravessar todos esses estágios (Shi e Shi, 2009).

O estágio de tolerância imune é evidenciado em pacientes que adquiriram a infecção perinatal ou na infância. É caracterizado pela presença de HBeAg, altos níveis séricos de HBV-DNA, níveis séricos normais das aminotransferases e com mínima ou nenhuma inflamação detectada por biópsia hepática (Takashima et al., 1992). São considerados pacientes com baixo risco de progressão à cirrose ou hepatocarcinoma (Shi e Shi, 2009).

A fase imunorreativa é verificada após 20-30 anos do início da fase de tolerância imune e, em pacientes que adquiriram o HBV na fase adulta. Nessa fase, embora a replicação e viremia de HBV continuem no fígado, os níveis séricos se tornam mais baixos que na fase anterior. É caracterizada pela presença de HBeAg, altos níveis séricos de HBV-DNA e aminotransferases, além de inflamação ativa e necrose no fígado (Shi e Shi, 2009). Do total de pacientes que se encontram nessa fase, 12-20% evoluem para um quadro de doença hepática severa dentro de 5 anos (Pungpaong et al., 2007).

O estágio de portador HBsAg inativo corresponde ao estágio no qual são encontrados a maioria dos pacientes com infecção crônica. Nessa fase ocorre a soroconversão de HBeAg, na qual a maioria dos pacientes permanecem negativos para HBeAg e positivos para anti-HBe, os níveis de HBV-DNA se tornam baixos ou indetectáveis, os níveis de ALT se normalizam, e as biópsias revelam leve inflamação e fibrose mínima à cirrose inativa. A progressão desse grupo é, normalmente, benigna (Liang, 2009; Shi e Shi, 2009).

A fase de reativação ocorre em 20-30% dos portadores HBsAg inativos. Nesse estágio, devido à mutação na região do pré-core ou core, as células infectadas param de secretar o antígeno 'e', considerado um antígeno alvo em hepatócitos infectados (Tsai et al., 1992; Milich e Liang, 2003; Chen et al., 2005). No entanto, a carga viral permanece elevada, assim como as transaminases, havendo uma exacerbação da injúria hepática e um pior prognóstico (Shi e Shi, 2009). Comparado aos pacientes da fase imunorreativa, os pacientes da fase de reativação tendem a ser mais velhos, apresentam menores níveis de HBV-DNA no soro, e um dano hepático mais avançado (Elgouhari et al., 2008).

De uma forma geral, pacientes com evidências de hepatite B crônica - com transaminases elevadas associadas à inflamação e/ou fibrose na biópsia hepática - não

apresentam sintomas, ou têm sintomas inespecíficos como fadiga, ou desconforto no hipocôndrio direito. Os pacientes com doença mais grave ou cirrose apresentam sinais de icterícia, esplenomegalia, ascite, edema periférico, encefalopatia e hemorragias gastrointestinais.

Embora não classificada como um dos estágios da infecção crônica, também é possível verificarmos um quadro de infecção classificada como oculta (Conjeevaram e Lok, 2001; Torbenson e Thomas, 2002). Acredita-se que a infecção oculta persistente seja uma consequência natural, a longo prazo, de um quadro de infecção aguda resolvida ou, fruto de uma exposição a uma pequena quantidade de hepadnavírus. Em ambos os casos, o vírus se replica a baixos títulos no hospedeiro (Shi e Shi, 2009).

Esse tipo de infecção é caracterizada pela não detecção do HBsAg na presença do HBV-DNA (Hu, 2002). Trata-se de uma espécie de infecção residual, detectada pelos ensaios de amplificação de ácido nucleico, que aumentam a sensibilidade à detecção dos genomas de hepadnavírus. Os indivíduos portadores desse tipo de infecção funcionam como reservatórios a partir dos quais o vírus pode retomar o processo de replicação ativa após episódio de imunossupressão ou imunodeficiência (Schreiber et al., 1996; Chamorro et al., 2005; Hui et al., 2006).

1.9. Diagnóstico

O diagnóstico de infecção por HBV é baseado em observações clínicas, análises bioquímicas, histológicas, sorológicas (Liang, 2009) e moleculares (Allain e Cox, 2011). Antígenos virais, seus respectivos anticorpos e seu material genético podem ser detectados no soro de pacientes infectados por HBV, funcionando como marcadores da infecção. A adequada interpretação dos resultados é essencial para o correto diagnóstico das várias formas clínicas e/ou fases da infecção na qual se encontra o paciente (Elgouhari et al., 2008), bem como para determinar se a sua eventual imunidade é fruto de infecção prévia ou vacinação, ou mesmo se ele está susceptível à infecção (Quadro 1.1).

Marcador	Resultado	Interpretação
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Negativo Negativo	Susceptível
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Positivo Positivo	Imune devido à infecção natural
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Negativo Positivo	Imune devido à vacinação contra hepatite B
HBsAg anti-HBc IgM anti-HBc anti-HBs	Positivo Positivo Positivo Negativo	Infecção Aguda
HBsAg anti-HBc IgM anti-HBc anti-HBs	Positivo Positivo Negativo Negativo	Infecção Crônica
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Positivo Negativo	Possibilidades de interpretação: 1-Infecção resolvida (mais comum) 2-Anti-HBc falso-positivo; portanto, susceptível 3-Hepatite B oculta 4-Infecção aguda resolvida

Quadro 1.1: Interpretação dos testes sorológicos para Hepatite B. Adaptado de <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/PDFs/SerologicChartv8.pdf>. Acessado em 16/07/2012.

Os primeiros marcadores sorológicos de infecção aguda são o HBV-DNA, o HBsAg e o HBeAg, os quais aparecem antes do início dos sintomas. O HBsAg correspondendo a um marcador de infecção ativa, e o HBeAg correlacionado a altos níveis de replicação viral e infectividade. Após o início da doença clínica, também é possível verificar IgM anti-HBc, a qual declina à medida que IgG anti-HBc se eleva; permanecendo a última em níveis elevados ao longo da vida. Dessa forma, anti-HBc total funciona como marcador a longo prazo de exposição ao HBV. Durante a recuperação clínica do paciente ou convalescença, HBV-DNA, HBsAg e HBeAg são eliminados, e a soroconversão é verificada, com a detecção de anticorpos anti-HBs e anti-HBe. Anticorpos anti-HBs estão associados à imunidade contra HBV (Liang, 2009) (Figura 1.9A).

Semelhante ao perfil agudo de infecção, o padrão inicial da infecção crônica apresenta os mesmos marcadores, como HBV-DNA, HBsAg e HBeAg, frequentemente detectados em

altos títulos. Além disso, a detecção de anti-HBc total também funciona como marcador a longo prazo de contato com HBV nesses pacientes. Entretanto, de forma diferenciada, não se verifica a resolução da infecção nesse perfil. Mesmo após seis meses de infecção, os níveis de HBsAg caem, mas não são completamente eliminados, persistindo no organismo; e o processo replicativo viral se mantém. Dessa forma, não é possível detectar a produção de anticorpos anti-HBs e anti-HBe (Liang, 2009). Além disso, a manutenção de uma alta carga viral na cronicidade funciona como um indicador de progressão hepática mais severa (Elgouhari et al., 2008) (Figura 1.9B).

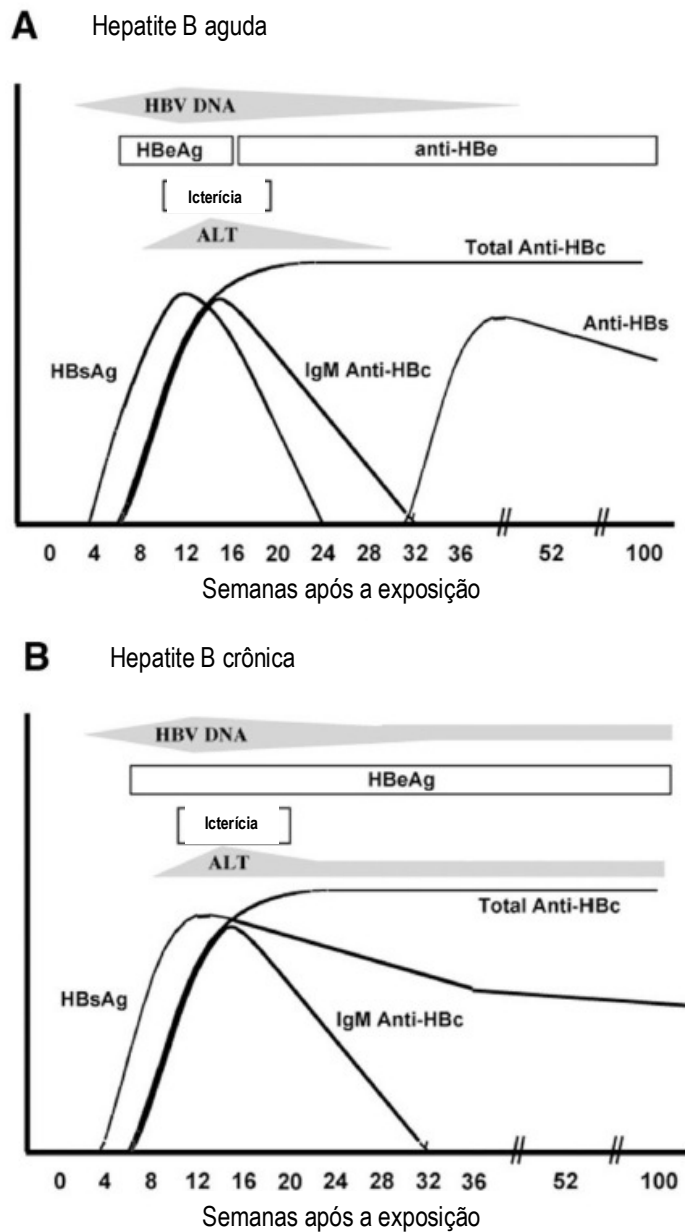


Figura 1.9: Perfil sorológico da hepatite B aguda (A) e crônica (B) – Adaptado de Liang, 2009.

1.10. Profilaxia

As medidas profiláticas à infecção pelo HBV envolvem a prevenção de comportamentos de risco, como a prevenção à exposição ao sangue e outros fluidos corporais, o rastreamento de gestantes infectadas, e estratégias de imunização ativa, através de vacinas, e passiva, através de globulina hiperimune específica (HBIG) (Kwon e Lee, 2011).

Em 1981, a primeira vacina contra hepatite B foi autorizada. Embora fosse uma vacina eficaz e imunogênica, por ser preparada a partir de plasma humano, a estratégia de imunização contra HBV não isentava os pacientes de prováveis riscos de infecção por outros agentes infecciosos presentes nesse plasma (Gomes et al., 2011).

Devido a isso, uma nova vacina foi desenvolvida, dessa vez baseada na tecnologia do DNA recombinante. Através de engenharia genética, leveduras ou células de mamíferos são utilizadas como vetores de expressão do gene codificante para HBsAg para a produção dessas vacinas (Assad e Francis, 1999). Além de mais segura, essa estratégia demonstra conferir efetiva imunogenicidade contra o HBV, já que cerca de 90% dos indivíduos adultos imunocompetentes e 95% das crianças/adolescentes vacinados desenvolvem uma resposta humoral adequada (Hessel e West, 2002), além de minimizar a incidência de câncer hepático (Blumberg, 1997).

O presente esquema preconizado de vacinação contra HBV envolve três doses da vacina recombinante, em intervalos de um mês e seis meses após a dose inicial. A capacidade de proteção conferida pela vacinação está diretamente relacionada à resposta humoral do indivíduo, medida pelo título de anticorpos anti-HBs após o esquema vacinal. Estima-se que cerca de, no mínimo, 10 mUI/mL de anticorpos anti-HBs são necessários para essa proteção (Szmunes et al., 1980; Jack et al., 1999).

Em casos de urgência de imunização após exposição ao vírus, seja através de exposição perinatal de recém-nascidos cujas mães são HBsAg reagentes, exposição percutânea ou de mucosa em acidentes ou, exposição sexual a um portador de HBV, a imunoprofilaxia passiva através da administração de HBIG é recomendada (Perrillo et al., 1984). Ela também é indicada para a redução do risco de infecção por HBV recorrente após transplante hepático (Terrault et al., 1996).

1.11. Tratamento

O objetivo principal do tratamento da hepatite B crônica é alcançar a supressão sustentada da replicação do HBV a níveis indetectáveis, prevenindo ou reduzindo as complicações de cirrose, descompensação hepática, carcinoma hepatocelular e morte (Lok e McMahon, 2009). Para isso, a aderência dos pacientes faz-se necessária, minimizando uma insuficiente supressão virológica, o avanço da resistência e a progressão da doença (EASL, 2009).

O tratamento atual para a hepatite B crônica é limitado a duas classes de terapêuticos disponíveis, os imunomoduladores e os nucleosídeos/nucleotídeos inibidores da transcriptase reversa (NRTI) (Xie et al., 2010). Os parâmetros de resposta ao tratamento a serem considerados são a soroconversão de HBeAg a anti-HBe, o desaparecimento de HBV-DNA do soro, a normalização dos níveis das transaminases e a melhora da histologia hepática (Gomes et al., 2011).

Dentre os imunomoduladores, encontramos o interferon-alfa (INF- α) e o interferon-alfa peguilado, os quais potencializam a defesa imune do hospedeiro contra a infecção viral (Xie et al., 2010). As vantagens dessa escolha são a curta duração do tratamento e a ausência de resistência antiviral (Fattovich et al., 1996). Entretanto, a taxa de resposta ao tratamento dentre os pacientes crônicos é de cerca de 20-30%; e, o desenvolvimento de efeitos colaterais graves limita sua tolerabilidade (Perrillo, 2009).

Com relação à classe de NRTIs, existem cinco drogas aprovadas e disponíveis para o tratamento de pacientes crônicos, que são Lamivudina, Adefovir dipivoxil, Entecavir, Telbivudina e Tenofovir disoproxil fumarato (Dienstag, 2008). Os análogos de nucleosídeos e nucleotídeos atuam bloqueando a transcrição reversa do RNA pré-genômico a HBV-DNA (Xie et al., 2010) e são bem tolerados (Gomes et al., 2011). Entretanto, o maior inconveniente associado à sua escolha é a emergência de resistência à droga. Várias mutações no gene da polimerase de HBV associadas à resistência são descritas, além daquelas que conferem resistência cruzada a outros NRTIs (Chotiyaputta e Lok, 2009). Segundo o Ministério da Saúde, não há registros publicados até o momento de resistência ao Tenofovir.

Diante da emergência de resistência aos NRTIs, o tratamento de pacientes crônicos pode ser otimizado através da genotipagem das mutações associadas à resistência, guiando a escolha do NRTI adequado, além da combinação, por exemplo, com INF- α peguilado, resultando em melhor tolerabilidade ao imunomodulador e maior eficácia ao tratamento do que o verificado em uma monoterapia (Xie et al., 2010).

Diante disso, estudos sobre os mecanismos de infecção viral, associados à replicação e patogênese são necessários para a identificação de novos alvos terapêuticos no ciclo de HBV ou no sistema imune do hospedeiro (Xie et al., 2010).

1.12. HBV em animais

O HBV apresenta uma estreita faixa de hospedeiros de ocorrência natural, como o homem e determinados primatas não humanos, nos quais é possível manter o seu ciclo replicativo. A maioria dessas espécies hospedeiras em potencial não são usadas comumente em pesquisas médicas devido à dificuldade de disponibilidade e manutenção em cativeiro, além do alto custo de aquisição e manutenção (Feitelson et al., 1988; Testut et al., 1996; Dandri et al., 2005; Menne e Cote, 2007;).

Embora o HBV seja hospedeiro-específico, suspeita-se que sua habilidade de cruzar barreiras entre as espécies poderia prejudicar as tentativas de erradicação da infecção humana através de imunização (Makuwa et al., 2005). Altas taxas de erro da transcriptase reversa viral e eventos de recombinação interespecífica poderiam promover uma ampla variação em seu genoma, alterando sua patogenicidade e transmissibilidade; aumentando, portanto, a oportunidade de infecção de novos hospedeiros (Li et al., 2010).

E, a interação entre humanos e animais domésticos hospedeiros desse vírus poderia favorecer a recombinação interespecífica de HBV entre espécies naturalmente infectadas. Reforçando essa hipótese, trabalhos recentemente publicados na literatura merecem destaque, e sugerem reflexões acerca de novas possibilidades de hospedeiro e transmissão de HBV. O primeiro trabalho foi publicado por Li et al., 2010, o qual detecta a prevalência sorológica de 24,8% de HBsAg, 25% de anti-HBs e 63,9% de anti-HBc em suínos na China, avaliada através de ensaio imunoenzimático comercial. Nesse estudo, a análise por microscopia eletrônica do soro de animais HBsAg reagentes evidenciou partículas semelhantes às partículas esféricas e Dane do HBV. Além disso, ensaios de imunohistoquímica identificaram a presença de HBsAg e HBcAg no fígado de alguns animais.

Outro trabalho bastante inovador de Dalton et al., 2010 sugere uma provável associação entre o consumo de carne de porco e a taxa de mortalidade por doença hepática crônica. Essa pesquisa realizada em dezoito países desenvolvidos sugere que o consumo de carne de porco possa servir como um marcador substituto para outro fator ainda não

identificado presente na carne suína, responsável pelo aumento da mortalidade por doença hepática.

Por último, o trabalho de Tian et al., 2012 detectou a prevalência sorológica de 28,68% de HBsAg, 53,49% de anti-HBs e 17,05% de anti-HBc em galinhas na China. A análise por microscopia eletrônica do soro de animais HBsAg reagentes também evidenciou partículas semelhantes às partículas esféricas e Dane do HBV. Ensaios de imunohistoquímica identificaram a presença de HBsAg e HBcAg no fígado de alguns animais. Análises moleculares revelaram 92,2% e 97,9% de similaridade com o HBV humano.

2. Justificativa

A literatura evidencia a existência de um vírus geneticamente relacionado ao vírus causador da hepatite B humana em um rebanho suíno na China (Li et al., 2010), e aponta uma provável associação entre o consumo de carne de porco e a mortalidade por doença hepática crônica (Dalton et al., 2010). Tendo em vista a capacidade de o HBV cruzar barreiras específicas e realizar recombinações genéticas, o presente estudo é de extrema relevância para a detecção pioneira de evidências de sua circulação em criações comerciais nacionais de suínos e javalis.

A descoberta de um vírus relacionado à hepatite B em suínos e/ou javalis oferece amplas possibilidades de estudo *in vivo* caso seja confirmada a infecção natural por HBV nesses animais. Recentemente, a espécie *Sus scrofa* vem ganhando relevante papel como animal experimental para investigações biomédicas, devido a semelhanças anatômicas e fisiológicas com humanos; e poderá viabilizar estudos sobre os mecanismos de replicação, patogenia, e novas drogas antivirais, que são restritos atualmente a um único modelo experimental em chimpanzés.

Além disso, diante da confirmação da infecção em suínos, esse estudo pode sugerir a possibilidade de homens e animais compartilharem o HBV na natureza. Como os suínos são de importância econômica para a indústria nacional de alimentos, a emergência de vírus não rastreados em rebanhos pode sugerir a necessidade de vigilância da população viral nesse hospedeiro mamífero. A confirmação de que os suínos podem ser, de fato, hospedeiros naturais para o HBV possibilitará alertar aos órgãos de saúde sobre a possibilidade de transmissão zoonótica desse vírus.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a ocorrência de infecção pelo HBV em suínos domésticos e javalis, através de métodos sorológicos e moleculares.

3.2. Objetivos Específicos

- Detectar a infecção ativa pelo HBV nas amostras de soro através da pesquisa de antígeno de superfície HBsAg;
- Determinar a prevalência da hepatite B em suínos através da detecção de anticorpos anti-HBc e anti-HBs nas amostras de soro;
- Detectar a presença de HBV-DNA nas amostras de soro através de PCR qualitativo;
- Quantificar a carga viral de HBV-DNA nas amostras de soro através de PCR em tempo real;
- Caracterizar o HBV-DNA através do sequenciamento nucleotídeo parcial do genoma;
- Comparar o HBV-DNA com sequências de *Orthohepadnavirus* disponíveis no *GenBank*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Comitê de Ética

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, registrado sob licença LW-49/11.

4.2. Grupo de Estudo

Nesse estudo, 376 suínos *Sus scrofa* de creche (4 semanas/1 mês) à idade de abate (25 semanas/6 meses) e de ambos os gêneros foram investigados para os marcadores sorológicos de HBV. A população de estudo foi dividida em dois grupos: Grupo A, correspondendo a 288 suínos domésticos de rebanhos dos estados de Santa Catarina e Rio de Janeiro; e, grupo B, correspondendo a 88 javalis do estado de São Paulo.

4.3. Coleta das Amostras

Cinco mL de sangue venoso foram coletados da veia marginal da orelha ou veia cefálica através de seringa de 10 mL e agulha calibre 18G, e transferidos para tubos a vácuo contendo gel separador e ativador de coágulo (BD Vacutainer® SST II Advance). Os tubos foram mantidos refrigerados (4°C) até o processamento.

Após 10-15 minutos de retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente (20-22°C). Os soros foram separados e armazenados em alíquotas a -20°C e -80°C até posterior análise.

4.4. Avaliação dos Marcadores Sorológicos

As amostras de soro foram testadas para os marcadores sorológicos de hepatite B (HBsAg, anti-HBc e anti-HBs) usando *kits* imunoenzimáticos (ELISA) comerciais (DiaSorin®). Para o ensaio de HBsAg, a interpretação dos resultados foi determinada pelo

valor de absorvância ou densidade óptica (DO) das amostras a 450 nm, comparando-se ao valor *cut-off*, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras na zona cinza do teste (intervalo de $\pm 10\%$ do valor *cut-off*) foram classificadas como amostras indeterminadas. Para anti-HBc, o limite foi aumentado de 10% para 20% do *cut-off*, uma vez que esse ensaio é competitivo.

As amostras reativas e indeterminadas para HBsAg e/ou anti-HBc foram retestadas em duplicata e, em seguida, encaminhadas ao último ensaio sorológico. Após triagem sorológica para HBsAg e/ou anti-HBc, as amostras foram testadas para anti-HBs e, na sequência, encaminhadas à avaliação molecular.

4.5. Testes Moleculares

4.5.1. Alinhamento das sequências de *Orthohepadnavirus*

Para garantir a amplificação do HBV-DNA nas amostras suínas, oligonucleotídeos interespecíficos foram desenhados para a região mais conservada do genoma (região S do HBsAg). Para esse fim, 110 sequências nucleotídicas completas de *Orthohepadnavirus* disponíveis no *GenBank* foram alinhadas usando o *software BioEdit 7.1.3 - ClustalW Alignment Multiple*. Esse alinhamento incluiu sequências de chimpanzé, orangotango, gibão, macaco-barrigudo, marmota, esquilo e dos genótipos humanos circulantes no Brasil (HBV A, D e F). A avaliação do par de oligonucleotídeos dos mamíferos (MF e MR) foi realizada através do *software OligoAnalyzer 3.1* para uma região de 429 pb da superfície de HBV (região S do HBsAg) (Tabela 4.1).

4.5.2. Otimização do ensaio de PCR

Com a finalidade de determinar a temperatura ótima de hibridização do novo par de oligonucleotídeos desenhado, ensaios de amplificação foram realizados com um gradiente de temperatura de 50°C-60°C para amostras controle-positivas de origem humana para HBV, uma com 1.89×10^{10} cópias/mL e outro com 9.7×10^4 cópias/mL .

Além disso, para confirmar a capacidade de os oligonucleotídeos desenhados amplificarem diferentes genótipos humanos de HBV, plasmídeos contendo insertos de clones relacionados aos genótipos de HBV A, D, E, F e G foram submetidos à amplificação sob as seguintes condições, estabelecidas nesse estudo: 25 µL de volume final de reação constituída por 1 µL DNA extraído, 0.2 mM dNTP, Tampão PCR 1X, 3 mM MgCl₂, 10 pmol de oligonucleotídeos MF-MR, 0.5 U Taq polymerase (Invitrogen®) e H₂O RNase free. As condições do ciclo também estabelecidas nesse estudo foram desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, hibridização a 54°C por 40 s e extensão a 72°C por 2 min, seguida de extensão final a 72°C por 7 min.

Finalmente, para verificar o limite de detecção desses novos oligonucleotídeos, os mesmos controles positivos do teste de gradiente de temperatura foram usados. Diluições seriadas de 10 vezes (1-10) desses controles positivos foram amplificadas com os oligonucleotídeos MF-MR desenhados e condições estabelecidas no presente estudo; e o resultado comparado ao produto de amplificação com oligonucleotídeos usados para o diagnóstico humano de HBV (Tabela 4.1), através de *semi-nested* PCR, de acordo com as condições estabelecidas pelo Laboratório de Virologia Molecular (IOC/FIOCRUZ). As condições de amplificação para o PCR1 são: 25 µL de volume final de reação constituída por 1 µL DNA extraído, 0.2 mM dNTP, Tampão PCR 1X, 3 mM MgCl₂, 10 pmol de oligonucleotídeos PS1-S2, 0.5 U Taq polymerase (Invitrogen®) e H₂O RNase free. As condições do ciclo para o PCR1 são desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, hibridização a 52°C por 40 s e extensão a 72°C por 2 min, seguida de extensão final a 72°C por 7 min. As condições de amplificação para o PCR2 são: 25 µL de volume final de reação constituída por 1 µL do produto de PCR1, 0.2 mM dNTP, Tampão PCR 1X, 3 mM MgCl₂, 15 pmol de oligonucleotídeos PS1-SR, 1.5 U Taq polymerase (Invitrogen®) e H₂O RNase free. As condições do ciclo para o PCR2 são desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, hibridização a 55°C por 20 s e extensão a 72°C por 1 min, seguida de extensão final a 72°C por 7 min.

Para todos os testes, *amplicons* foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (0.2 µg/mL) e observados através de luz ultravioleta (UV). Controles negativos foram incluídos em cada ensaio de PCR para excluir a possibilidade de contaminação.

4.5.3. Diagnóstico por PCR qualitativo

Após a triagem sorológica e a otimização do PCR, 200 µL de soro referentes às amostras de suínos reativas e indeterminadas para, pelo menos, um marcador de HBV foram submetidas ao *Kit* de Purificação de DNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi eluído em 50 µL de Tampão AE (15-60 ng DNA/µL) e armazenado a -80°C até os ensaios de amplificação.

As amostras foram amplificadas através de dois protocolos. Inicialmente, através de *semi-nested* PCR usada para o diagnóstico humano de HBV - PCR1 com os oligonucleotídeos PS1-S2 e PCR2 com oligonucleotídeos PS1-SR (Tabela 4.1), para amplificação de 1.100 pb da região de superfície de HBV (pré-S/S região de HBsAg), de acordo com as condições descritas anteriormente, estabelecidas pelo Laboratório de Virologia Molecular (IOC/FIOCRUZ). Em seguida, com os oligonucleotídeos MF-MR para a amplificação de 429 pb da região S de HBsAg, de acordo com as condições descritas anteriormente, estabelecidas no presente estudo.

Controles negativos foram incluídos em cada ensaio de PCR para excluir a possibilidade de contaminação. *Amplicons* foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (0.2 µg/mL) e observados através de luz ultravioleta (UV).

4.5.4. Reações de sequenciamento

Os produtos de PCR com o tamanho esperado foram purificados do gel de agarose usando os reagentes e protocolo do *kit* QIAquick Gel Extraction (Qiagen®) e, em seguida, sequenciados usando os reagentes e protocolo do *kit* Big Dye® Terminator 3.1 na plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) e na empresa Ludwig Biotecnologia (Rio Grande do Sul), de acordo com Otto et al., 2008. As amostras foram sequenciadas usando oligonucleotídeos previamente utilizados nas reações de PCR e mais três opções de oligonucleotídeos internos, como PS2R, S3 e S10 (Tabela 4.1), também desenhados previamente pelo Laboratório de Virologia Molecular (IOC/FIOCRUZ).

4.5.5. PCR quantitativo

As amostras foram avaliadas em duplicata por PCR em Tempo Real para a quantificação da carga viral, utilizando-se o método TaqMan®. O PCR em Tempo Real foi realizado em 25 µL de um volume final de PCR constituído de 5 µL DNA extraído, Tampão Master Mix 1X, 25 pmol de oligonucleotídeos S14-S17 (Tabela 4.1), e 7.5 pmol de sonda 5'-FAM-TGT TGA CAA RAA TCC TCA CAA TAC CRC AGA-TAMRA-3'. Um plasmídeo de HBV diluído serialmente de 2×10^8 a 2×10^1 cópias/µL foi usado como curva-padrão. As condições do protocolo foram 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 60 s, de acordo com Sucupira et al., 2006 (Sucupira et al., 2006). A amplificação foi analisada usando o *software* Applied Biosystems 7500.

4.5.6. Análise Filogenética

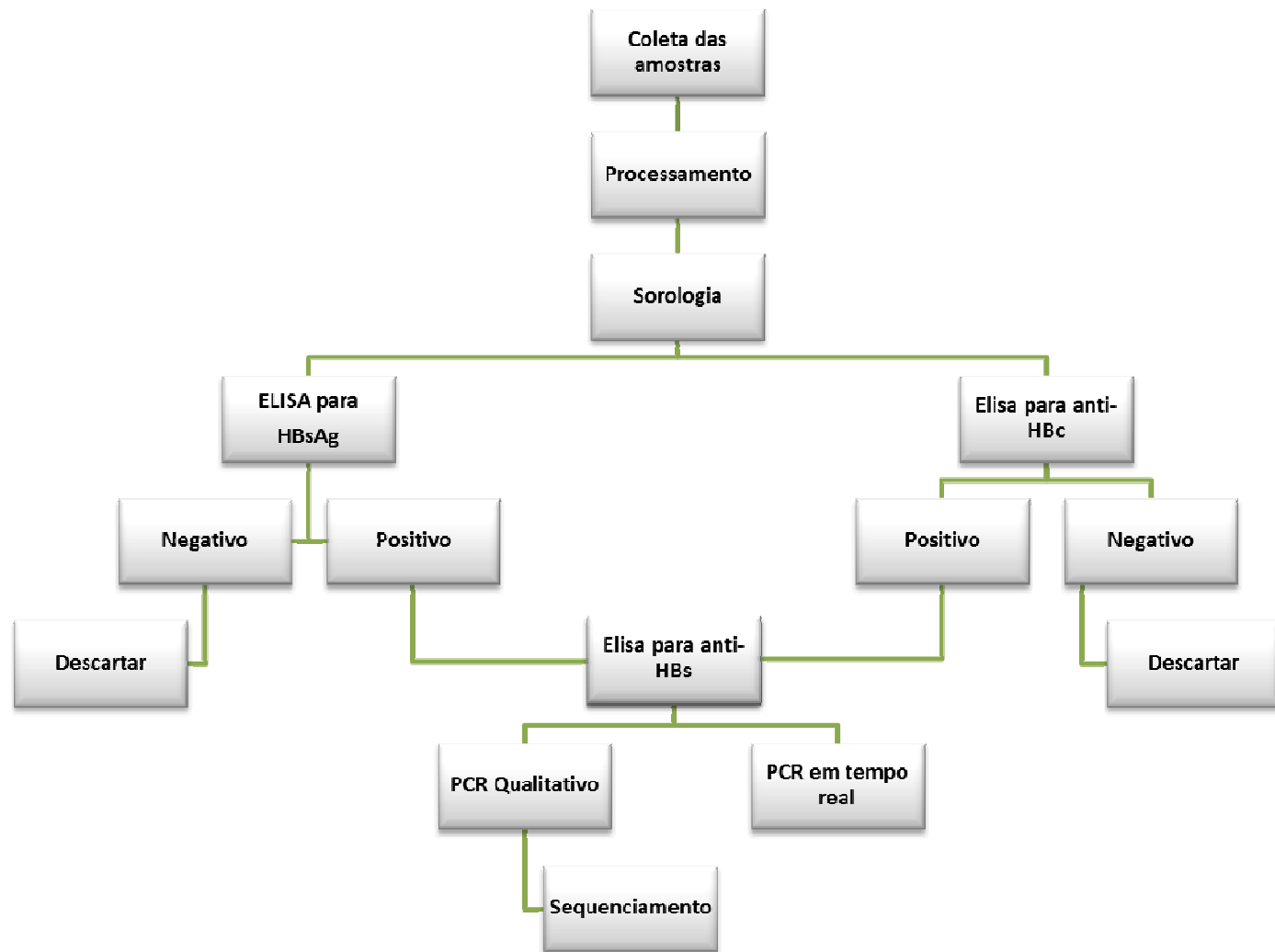
Árvores filogenéticas foram construídas pelo método *neighbor-joining* (1000 réplicas de *bootstrap*) e o modelo de Kimura 2-parâmetros usando o *software* MEGA 5Beta #6.1. Com o mesmo *software*, uma matriz de identidade de nucleotídeos foi construída, utilizando sequências nucleotídicas consenso de cada *Orthohepadnavirus* utilizado para o desenho dos oligonucleotídeos interespecíficos.

Tabela 4.1: Oligonucleotídeos para a região de superfície do HBV, usados para amplificação parcial do genoma ^(A), quantificação da carga viral ^(B) e sequenciamento parcial do genoma ^(C)

Oligonucleotídeos ^(A, B, C)	Sequência (5' → 3')	Localização*	Tamanho	GC %	Tm médio (°C)	Amplicon
Mamíferos F (MF) ^(A, C)	GAY TSG TGG TGG ACT TCT CTC	nt 251-271	21	54.8	55.9	MF-MR 429 pb
Mamíferos R (MR) ^(A, C)	TAA AYT GAG CCA DGA GAA ACG G	nt 679-658	22	44.7	54.8	
PS1 F ^(A, C)	CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA	nt 2820-2839	20	40.0	49.6	PS1-S2 1.200 pb
S2 R ^(A, C)	GGG TTT AAA TGT ATA CCC AAA GA	nt 839-817	23	34.8	50.6	
SR R ^(A, C)	CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC	nt 704-685	20	50.0	54.7	PS1-SR 1.100 pb
S10 F ^(C)	GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TC	nt 256-278	23	43.5	53.8	
S3 R ^(C)	CCT TGA GCA GGA GTC GTG CAG GT	nt 543-521	23	60.9	63.3	
PS2 R ^(C)	GGT CCC CAG TCC TCG AGA AG	nt 143-124	20	65.0	59.2	
S14 F ^(B)	GGA CCC CTG CTC GTG TTA CA	nt 182-201	20	60.0	59.4	S14-S17 90 pb
S17 R ^(B)	GAG AGA AGT CCA CCM CGA GTC TAG A	nt 271-247	25	54.0	59.8	
Sonda ^(B)	TGT TGA CAA RAA TCC TCA CAA TAC CRC AGA	nt 216-245	30	40.0	59.9	

*Nucleotídeos (nt) estão numerados de acordo com a sequência referência de HBV disponível no *GenBank* (NC_003977.1)

5. Fluxograma



6. Resultados

6.1. Sorologia para HBsAg, anti-HBc e anti-HBs

Das 376 amostras de suínos analisadas, 3 (0,80%) foram reativas para HBsAg, indicando infecção ativa, 28 (7,45%) foram reativas para anti-HBc, indicando exposição prévia ao vírus e, 6 (1,60%) demonstraram reatividade para anti-HBs, indicando resolução da infecção e imunidade. Além disso, foram observadas que mais 17 (4,52%) amostras de suínos foram caracterizadas como indeterminadas para anti-HBc e 2 (0,53%) para HBsAg. (Tabela 6.1).

Após a triagem sorológica inicial, um total de 49 amostras reagentes e indeterminadas foram encaminhadas aos ensaios moleculares posteriores.

Tabela 6.1: Prevalência dos marcadores sorológicos de HBV em suínos do Brasil

Grupo	Rebanho	n	HBsAg, n (%)		Anti-HBc, n (%)		Anti-HBs, n (%)	
			R	I	R	I	R	I
A – Suínos Domésticos	Rio de Janeiro	38	0	---	0	---	0	---
	Santa Catarina	250	3 (1,2)	2 (0,8)	11 (4,4)	13 (5,2)	2 (0,8)	---
B – Javalis	São Paulo	88	0	---	17 (19,3)	4 (4,5)	4 (4,5)	---
	Total	376	3 (0,80)	2 (0,53)	28 (7,45)	17 (4,52)	6 (1,60)	---

Legenda:

R: Sorologia Reagente

I: Sorologia Indeterminada

A figura 6.1 mostra a reatividade das amostras para os marcadores analisados, indicando as médias das razões entre os valores de absorvância (DO) de cada amostra e o *cut-off* do seu respectivo ensaio. Para o ensaio competitivo de avaliação de anti-HBc (Figura 6.1A), a média da razão *DO/cut-off* das amostras anti-HBc reagentes variou de 0,14 a 0,90. Para o ensaio direto de avaliação de HBsAg (Figura 6.1B), a média da razão *DO/cut-off* das amostras HBsAg reagentes variou de 1,11 a 3,95. Por último, para o ensaio direto de avaliação de anti-HBs (Figura 6.1C), a média da razão *DO/cut-off* das amostras anti-HBs reagentes variou de 1,71 a 15,96. De acordo com o fabricante, a sensibilidade analítica para o kit HBsAg é < 0.03 PEI U/mL, do kit anti-HBc é < 0.5 PEI U/mL e, do kit anti-HBs é < 10 UI/L.

Figura 6.1A

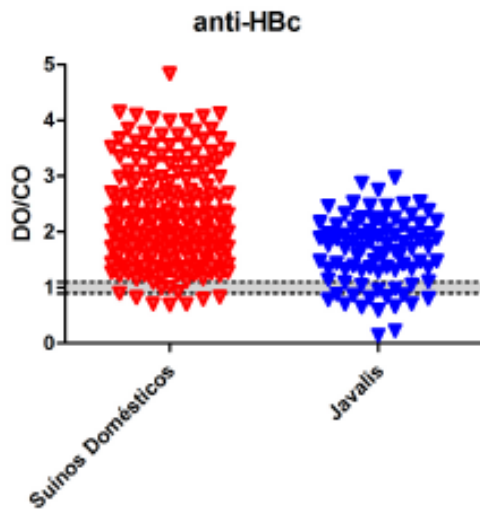


Figura 6.1B

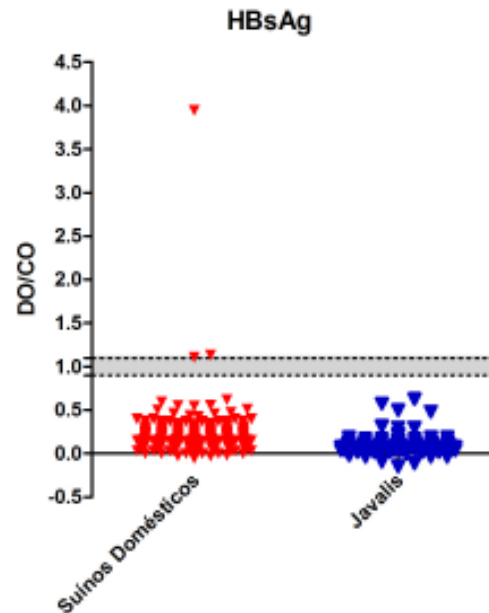


Figura 6.1C

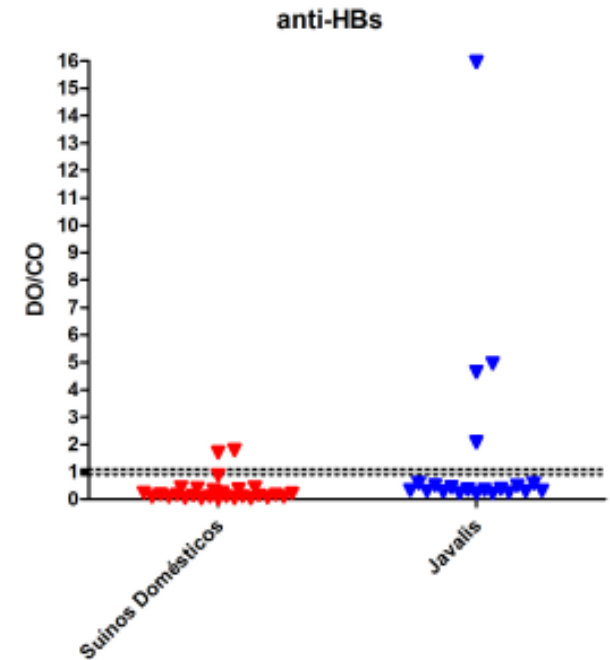


Figura 6.1 (A, B e C): Nível de reatividade das amostras suínas para os marcadores de HBV analisados. Entre as linhas pontilhadas, a zona cinza, correspondendo ao intervalo entre $\pm 10-20\%$ do valor *cut-off*, para o qual as amostras são classificadas como indeterminadas. Como o ensaio para anti-HBc é competitivo (Figura 6.1A), as amostras reagentes encontram-se abaixo da zona cinza. Para o ensaio direto de HBsAg (Figura 6.1B) e anti-HBs (Figura 6.1C), as amostras reagentes encontram-se acima da zona cinza.

6.2. Diagnóstico Molecular

As reações de amplificação com gradiente de temperatura de 50°C-60°C utilizando os oligonucleotídeos recém-sintetizados, classificados como MF-MR, para amostras controle-positivas de origem humana para HBV revelaram banda visível apenas para o controle positivo forte (Figura 6.2A), com carga viral estimada de 10^{10} cópias/mL, em uma estratégia de amplificação de reação única. O controle positivo fraco (Figura 6.2B), com carga viral estimada de 10^4 cópias/mL não apresentou banda visível em nenhuma das temperaturas da faixa testada. A figura 6.2A, a seguir, revela um máximo de eficiência de amplificação para 54°C, temperatura estabelecida, portanto, como ideal para esse novo par de oligonucleotídeos desenhado. Dessa forma, ficou estabelecido que para a tentativa de amplificação das amostras da população de estudo com os oligonucleotídeos MF-MR seriam adotadas as seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s; hibridização a 54°C por 40 s; extensão a 72°C por 2 min e, extensão final a 72°C por 7 min.

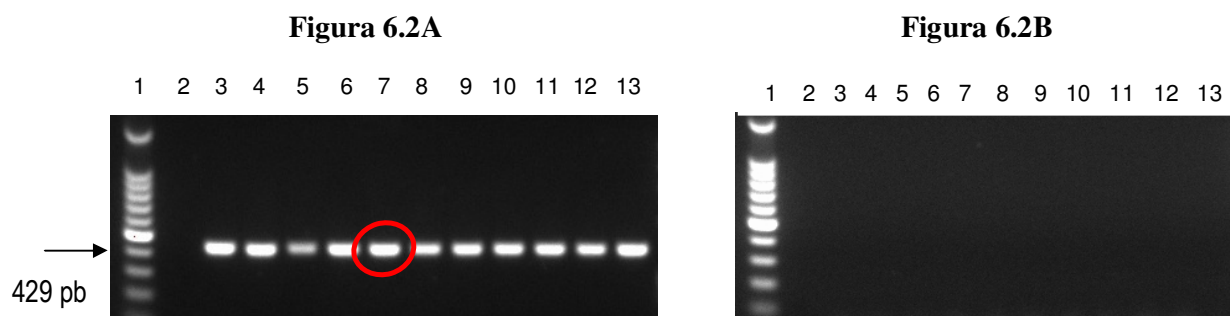


Figura 6.2 (A e B): Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Análise da amplificação de amostras controle-positivo forte (A) e fraco (B), com carga viral estimada em 10^{10} cópias/mL e 10^4 cópias/mL, respectivamente, com oligonucleotídeos interespecíficos (MF-MR). Identificação das amostras: 1) Padrão de PM 100 pb; 2) Controle negativo; 3) a 13) Gradiente de Temperatura de 50°C a 60°C.

A tentativa de amplificação dos genótipos HBV A, D, E, F e G com os oligonucleotídeos interespecíficos demonstra que os mesmos foram capazes de amplificar todos os clones disponíveis (Figura 6.3A), assim com os oligonucleotídeos PS1-S2 (Figura 6.3B) descritos na literatura, sendo ambas as estratégias em reação única. À semelhança do experimento anterior, apenas a amostra controle- positivo forte apresentou banda visível.

Figura 6.3A

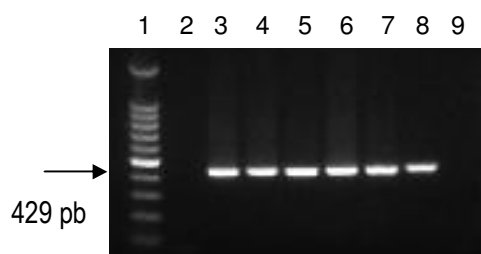
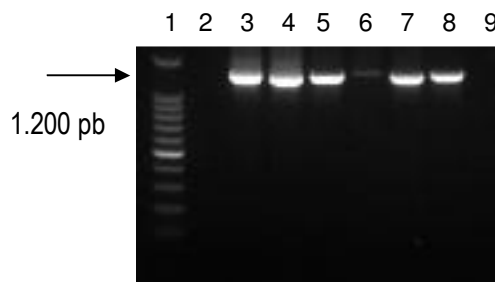


Figura 6.3B



Figuras 6.3 (A e B): Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Análise da amplificação dos plasmídeos contendo insertos referentes aos clones dos genótipos HBV A, D, E, F e G com oligonucleotídeos interespecíficos (MF-MR) (A) e, com PS1-S2 (B). Identificação das amostras: 1) Padrão de PM 100 pb; 2) Controle negativo; 3) clone HBV A; 4) clone HBV D; 5) clone HBV E; 6) clone HBV F; 7) clone HBV G; 8) controle positivo forte; 9) controle positivo fraco.

Com relação ao limite de detecção, verificou-se que a estratégia de amplificação com duas reações – PCR1 com os oligonucleotídeos PS1-S2 e PCR2 com os oligonucleotídeos PS1-SR – utilizada para o diagnóstico humano de HBV possibilitou a detecção até o fator de diluição 10^{-6} da amostra controle-positivo forte, equivalente a um valor final de 10^4 cópias/mL (Figura 6.4A). Para o controle positivo fraco, o *semi-nested* PCR possibilitou detectar apenas a amostra sem fator de diluição (10^0), também equivalente a um valor de 10^4 cópias/mL, correspondendo ao título de partida (Figura 6.4B).

Figura 6.4A

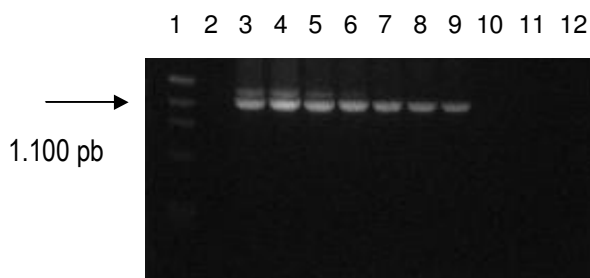


Figura 6.4B

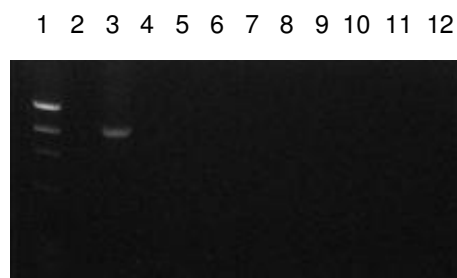


Figura 6.4 (A e B): Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Análise do limite de detecção para a *semi-nested* PCR - PCR1 com oligonucleotídeos PS1-S2 e, PCR2 com oligonucleotídeos PS1- SR, com as amostras controle-positivo forte (A) e fraco (B).

Identificação das amostras: 1) Padrão de PM phi X 174; 2) Controle negativo;

3) a 12) Diluições seriadas da amostra controle-positivo x 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} .

Quando comparamos esse resultado com o padrão obtido para o novo par de oligonucleotídeos sintetizado, percebemos que os oligonucleotídeos interespecíficos MF-MR foram capazes de amplificar apenas até o fator de diluição 10^{-3} da amostra controle-positivo forte, equivalente a um valor final de 10^7 cópias/mL (Figura 6.5A). Na figura 6.5B verificamos que o mesmo par de oligonucleotídeos amplificou o controle positivo fraco sem fator de diluição (10^0), equivalente a um valor de 10^4 cópias/mL, correspondendo ao título de partida, apenas para a amostra oriunda do PCR1, amplificada inicialmente com os oligonucleotídeos PS1-S2. Verificou-se também que a tentativa de amplificação com duas reações com o mesmo oligonucleotídeo interespecífico não funciona.

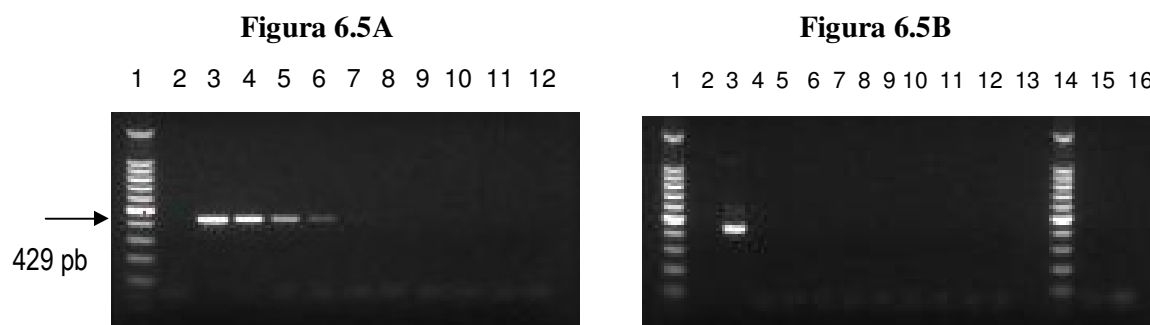


Figura 6.5 (A e B): Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Análise do limite de detecção dos oligonucleotídeos interespecíficos (MF-MR) para a amostra controle-positivo forte (A). Identificação das amostras: 1) Padrão de PM 100 pb; 2) Controle negativo; 3) a 12) Diluições seriadas da amostra controle-positivo forte x 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} . Na figura B verifica-se a 2ª reação de PCR com os oligonucleotídeos interespecíficos (MF-MR) para a amostra controle-positivo fraco, a partir de PCR1 realizado tanto com os oligonucleotídeos PS1-S2 (poços 2-12) quanto com os oligonucleotídeos MF-MR (poços 15-16). Identificação das amostras: 1) Padrão de PM 100 pb; 2) Controle negativo; 3) a 12) Diluições seriadas da amostra controle-positivo fraco x 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , amplificadas inicialmente a partir de PCR1 PS1-S2; 13) Vazio; 14) Padrão de PM 100 pb; 15) Controle negativo; 16) Amostra controle-positivo fraco x 10^0 , amplificada inicialmente a partir de PCR1 MF-MR.

Como o limite de detecção do PCR interespecífico otimizado com uma reação foi de 10^7 cópias/mL e do *semi-nested* PCR para diagnóstico humano foi de 10^4 cópias/mL, foi possível concluir que a estratégia de amplificação por *semi-nested* com os oligonucleotídeos PS1-S2 e, em seguida, PS1-SR parecia mais adequada para o diagnóstico molecular das amostras da nossa população de estudo, cujo título é desconhecido.

Sendo assim, as amostras com pelo menos um resultado sorológico reagente ou indeterminado foram avaliadas para investigação da presença de HBV-DNA através dessa estratégia. A figura 6.6A indica que, do total de 49 amostras testadas, somente duas amostras (SW 216 e JV 45) exibiram produtos de PCR com 1.100 pb.

Em uma nova tentativa de reamplificação, usando os oligonucleotídeos MF-MR internos, quatro amostras (SW 216, JV 45, SW 170 e SW 203) foram amplificadas com o tamanho esperado de 429 pb (Figura 6.6B).

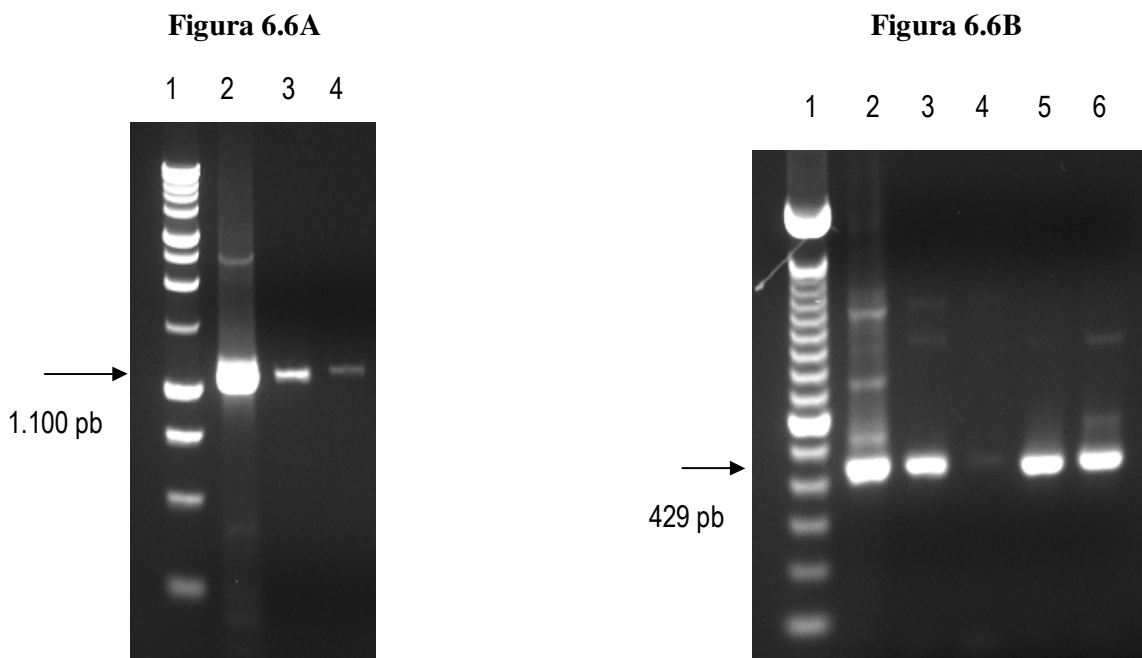


Figura 6.6 (A e B): Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Análise da amplificação das amostras de suínos reagentes para, pelo menos, um marcador sorológico com PS1-S2, seguida de PS1-SR (A) e, após reamplificação com MF-MR (B). Os poços representam: (A) 1Kb DNA ladder / (B) 100 pb DNA ladder, (2) Amostra controle-positivo, (3) Suíno Doméstico 216, (4) Javali 45, (5) Suíno Doméstico 170, (6) Suíno Doméstico 203.

6.3. Análise Filogenética

Dentre as quatro amostras positivas no PCR qualitativo, a presença do HBV-DNA foi confirmada em três delas (SW 170, SW 203 e SW 216) através do sequenciamento parcial do genoma. Cada amostra foi sequenciada quatro vezes, usando diferentes oligonucleotídeos. As mutações nas sequências nucleotídicas foram reproduzíveis em cada fita da mesma amostra (Figura 6.7).

Figura 6.7

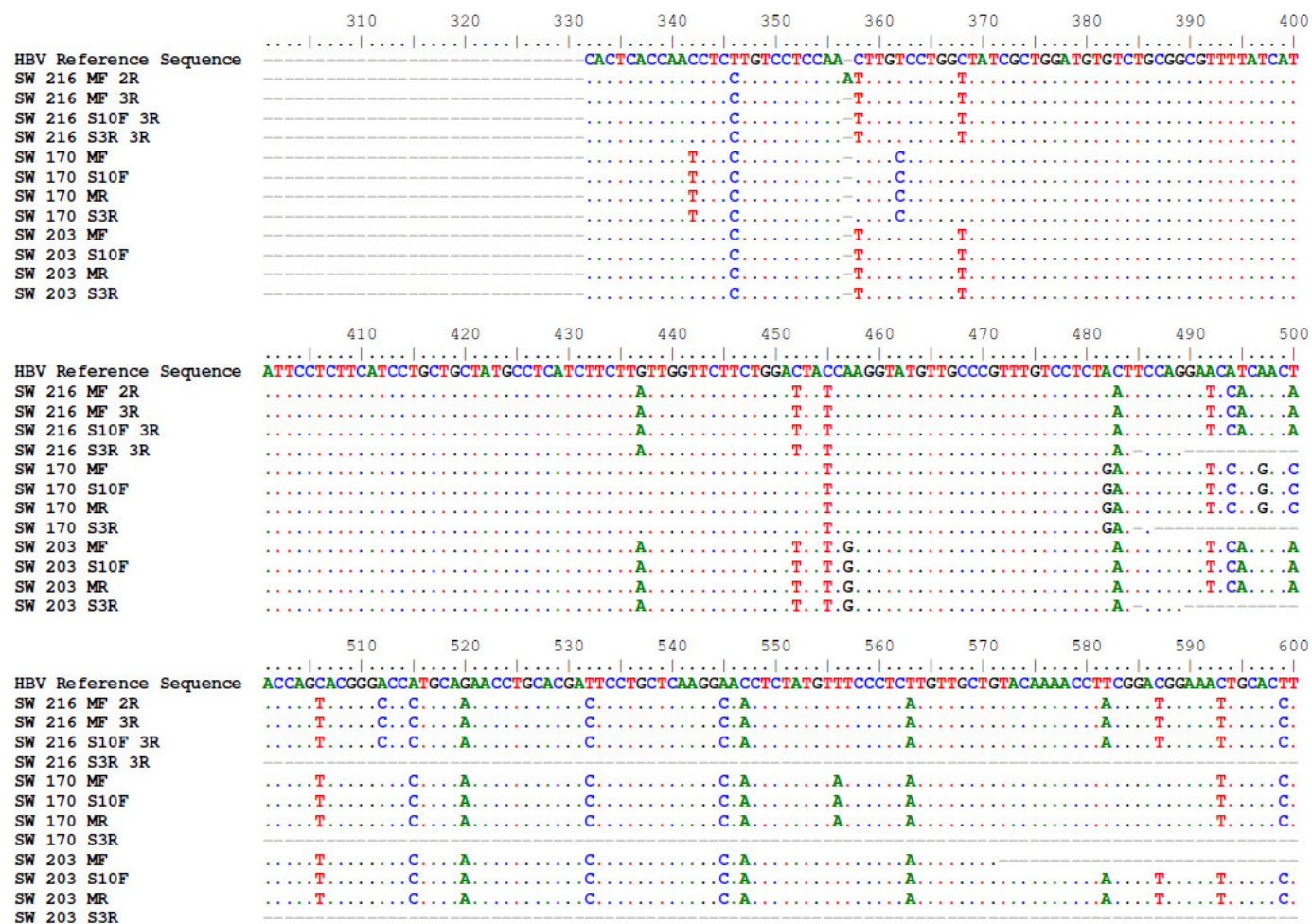


Figura 6.7: Sequenciamento parcial do genoma das amostras positivas no PCR qualitativo, usando quatro oligonucleotídeos. Em destaque, as mutações nas sequências nucleotídicas reproduzíveis em cada fita da mesma amostra, após as diferentes estratégias de sequenciamento.

Analisando a matriz de identidade de nucleotídeos com *Orthohepadnavirus*, a similaridade entre as sequências nucleotídicas dos suínos variou de 90,8% a 96,3% com as sequências consenso de HBV humano, de 84,1% a 90,8% com as sequências consenso de primatas não humanos e, de 70,7% a 72,4% com as sequências consenso de roedores (Tabela 6.2).

Analisando a matriz de identidade de nucleotídeos com *Avihepadnavirus*, a similaridade entre as sequências nucleotídicas dos suínos variou de 40% a 40,5% com as sequências consenso de patos, de 37,4% a 38,2% com as sequências consenso de gansos, de 37,1% a 37,9% com as sequências consenso de garças e, de 35,8% a 36,3% com as sequências consenso de cegonhas (Tabela 6.3).

Tabela 6.2: Matriz de Identidade de Nucleotídeos com *Orthohepadnavirus*

Sequência	216 (S10F)	170 (S10F)	203 (S10F)	HBV A	HBV D	HBV F	Chimpanzé	Orangotango	Gibão	Macaco - Barrigudo	Marmota	Esquilo
216 (S10F)												
170 (S10F)	0,949											
203 (S10F)	0,988	0,955										
Consensus HBV A	0,958	0,93	0,963									
Consensus HBV D	0,919	0,93	0,924	0,913								
Consensus HBV F	0,908	0,916	0,913	0,905	0,933							
Consensus Chimpanzé	0,891	0,896	0,896	0,908	0,91	0,905						
Consensus Orangotango	0,899	0,894	0,908	0,899	0,908	0,883	0,888					
Consensus Gibão	0,863	0,869	0,869	0,888	0,871	0,866	0,908	0,88				
Consensus Macaco-Barrigudo	0,841	0,841	0,846	0,835	0,849	0,835	0,824	0,827	0,813			
Consensus Marmota	0,71	0,724	0,715	0,715	0,727	0,721	0,699	0,696	0,688	0,701		
Consensus Esquilo	0,707	0,715	0,71	0,713	0,713	0,721	0,707	0,707	0,696	0,671	0,858	

Tabela 6.3: Matriz de Identidade de Nucleotídeos com *Avihepadnavirus*

Sequência	216 (S10F)	170 (S10F)	203 (S10F)	Pato	Ganso	Garça	Cegonha
216 (S10F)							
170 (S10F)	0,949						
203 (S10F)	0,988	0,955					
Consensus Pato	0,4	0,405	0,405				
Consensus Ganso	0,374	0,382	0,379	0,770			
Consensus Garça	0,374	0,371	0,379	0,663	0,375		
Consensus Cegonha	0,358	0,360	0,363	0,668	0,378	0,851	

Devido a maior porcentagem de identidade com as sequências de mamíferos, as sequências suínas foram incluídas em árvores filogenéticas do gênero *Orthohepadnavirus* e, em seguida, dos genótipos humanos.

As árvores filogenéticas mostram que as sequências nucleotídicas dos suínos estão intimamente relacionadas às sequências humanas, seguindo as sequências de primatas não humanos e, por último, as sequências de roedores (Figura 6.8). Quando analisamos com as sequências-protótipo de HBV humano, a maioria das sequências suínas ficavam próximas ao genótipo A, e uma ao genótipo G (Figura 6.9).

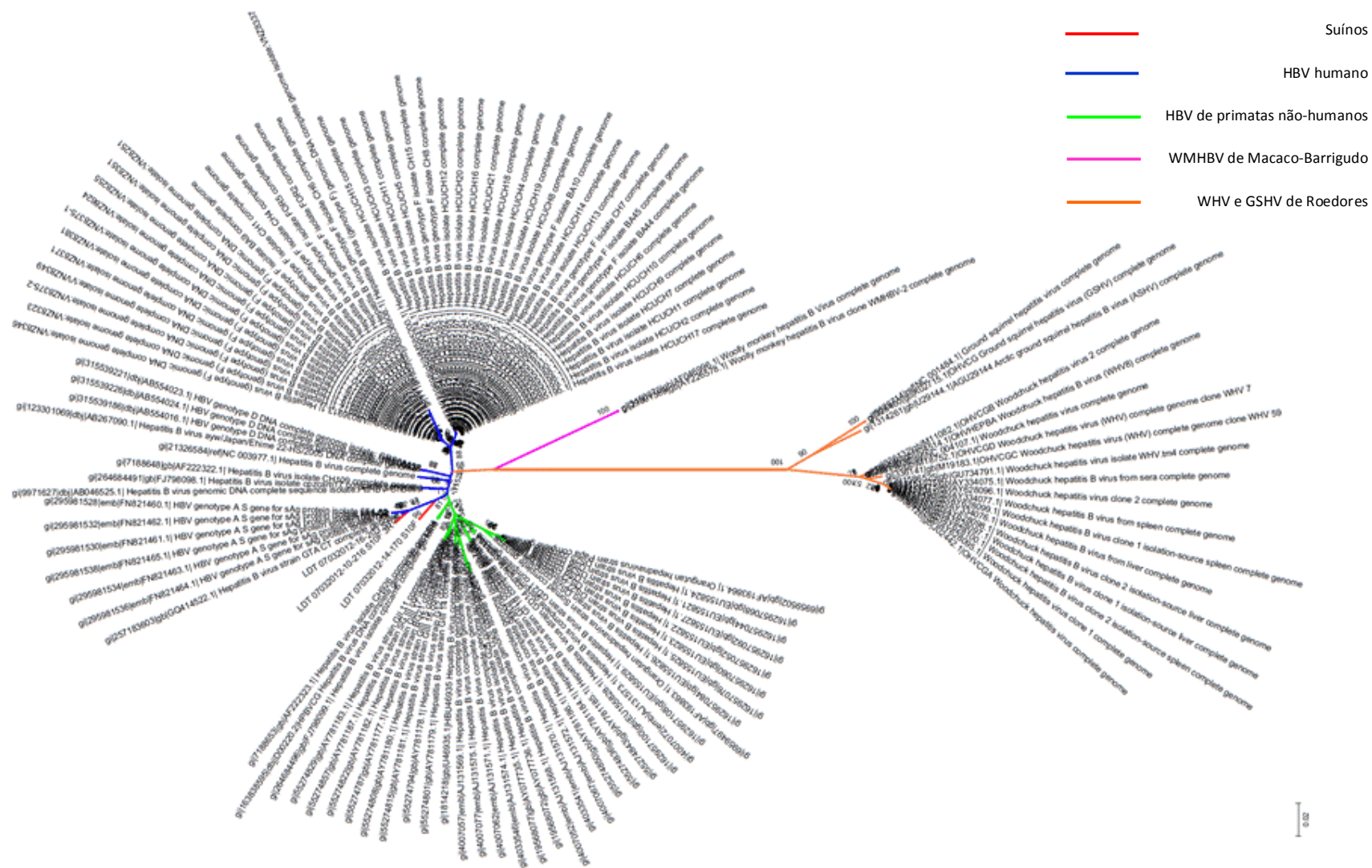


Figura 6.8: Análise filogenética de *Orthohepadnavirus* baseada em seqüências parciais do genoma. Os números dos nós indicam a porcentagem de réplicas de *bootstrap* (1000 tentativas) suportando os agrupamentos. Em destaque os grupos de mamíferos relacionados aos *Orthohepadnavirus*: HBV humano (cor azul), HBV de primatas não humanos (cor verde), WHV e GSHV de roedores (cor laranja), WMHBV do macaco-barrigudo (cor rosa) e, seqüências dos suínos (cor vermelha).

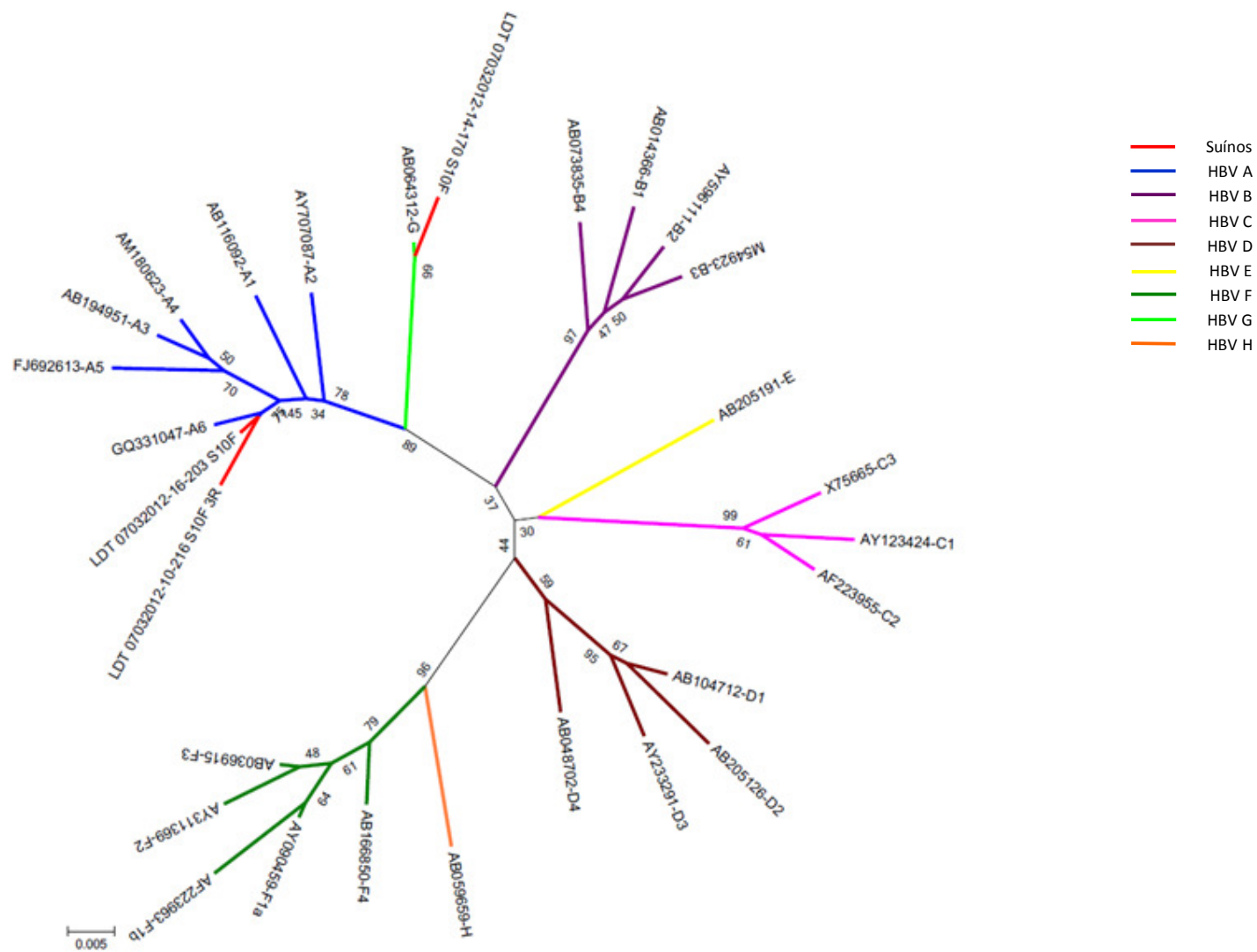


Figura 6.9: Análise filogenética dos genótipos humanos de HBV baseada em seqüências parciais do genoma. Os números dos nós indicam a porcentagem de réplicas de *bootstrap* (1000 tentativas) suportando os agrupamentos. Em destaque as seqüências dos suínos (cor vermelha) e os genótipos humanos de HBV: HBV A, HBV B, HBV C, HBV D, HBV E, HBV F, HBV G, HBV H.

6.4. Quantificação da carga viral

Uma relação linear foi obtida entre o valor do ciclo *threshold* (Ct) e o \log_{10} da concentração de HBV-DNA. A análise de regressão produziu um coeficiente de correlação médio de 0,99 e um valor médio de y-intercept de 41,90. O *slope* médio de -3,34 se aproxima da eficiência de amplificação máxima teórica de 100% (*slope* de -3,32). Do total de 49 amostras testadas, duas amostras (SW 171 e SW 175) puderam ser quantificadas. As cargas virais foram estimadas em $4,43 \times 10^3$ cópias/mL e $4,55 \times 10^3$ cópias/mL.

A seguir, uma tabela resumida com os resultados dos testes sorológicos e moleculares obtidos para as principais amostras do estudo (Tabela 6.4).

Tabela 6.4: Resumo dos testes sorológicos e moleculares obtidos para as principais amostras do estudo

Resultado					
ID	Sorológico			Molecular	
Animal	Anti-HBc	HBsAg	Anti-HBs	PCR qualitativo	PCR quantitativo
SW 216	R	--	--	1.100 pb e 429 pb	--
JV 45	R	--	R	1.100 pb e 429 pb	--
SW 170	I	--	--	429 pb	--
SW 203	I	--	--	429 pb	--
SW 171	--	I	--	--	4,43 x 10 ³ cópias/mL
SW 175	I	--	--	--	4,55 x 10 ³ cópias/mL

Legenda:

R: Sorologia Reagente

I: Sorologia Indeterminada

7. Discussão

Suspeita-se que os passos iniciais da infecção pelo HBV relacionados à adesão das partículas virais aos hepatócitos tenham um papel crítico na especificidade das espécies hospedeiras (Chouteau et al., 2001). Embora estudos prévios indiquem que a infecção por HBV seja hospedeiro-específica (Yang et al., 2007), a literatura registra sua circulação em populações de humanos e em alguns macacos (Warren et al., 1999; Grethe et al., 2000; Hu et al., 2000; Lanford et al., 2000; MacDonald et al., 2000). Recentemente, um grupo de pesquisadores chineses detectou evidências da circulação de um novo membro da família *Hepadnaviridae* endêmico em suínos (Li et al., 2010) e do HBV em galinhas (Tian et al., 2012), embora ainda não estejam seguros de que a infecção seja realmente causada pelo vírus que causa a infecção em humanos ou por um vírus similar ao HBV.

Nesse cenário, o objetivo do presente estudo foi investigar a susceptibilidade suína à infecção por hepadnavírus, baseado em evidências indiretas da circulação de HBV, através da detecção de anticorpos, e detecção direta desse vírus em rebanhos brasileiros, através da detecção de antígenos e material genético.

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), diferentes marcadores sorológicos ou combinações de marcadores são utilizados para identificar infecção aguda ou crônica por HBV. Em caso de período de janela imunológica e infecção oculta por HBV, uma vez que os níveis de HBsAg são indetectáveis e a carga viral é baixa, o diagnóstico molecular tem sido descrito como uma ferramenta útil de detecção da infecção por HBV, além da detecção de anti-HBc e/ou anti-HBs (Allain e Cox, 2011).

Por essa razão, optamos pela realização de ambos os testes, sorológicos e moleculares. Inicialmente, realizamos a triagem sorológica para os principais marcadores de HBV e, em seguida, os ensaios de detecção genômica. A avaliação sorológica dos rebanhos suínos das regiões Sul e Sudeste do Brasil revelou que apenas 0,80% da população de estudo estava ativamente infectada. Além disso, mais 0,53% das amostras se apresentou na zona cinza do imunoensaio enzimático (EIA) para HBsAg. Quando o marcador considerado foi o anti-HBc, a prevalência aumentou para 7,45% dos suínos, e mais 4,52% na zona cinza do EIA. Uma vez que anti-HBc representa um marcador de exposição a longo prazo (Tseliou et al., 2000), ele sinaliza a exposição prévia dessa população ao vírus.

De acordo com a literatura, um resultado anti-HBc reagente associado a um resultado HBsAg não reagente pode representar que há uma infecção em curso escondida do sistema imune, com uma conseqüente baixa quantificação de HBV na circulação, justificando o resultado HBsAg não reagente (Allain e Cox, 2011).

Com relação à avaliação sorológica do marcador anti-HBs, 1,60% dos suínos foram soro reativos. No entanto, dependendo do período de infecção, o título de anticorpos neutralizantes pode ser indetectável, como ocorre em casos de janela imunológica (Allain e Cox, 2011).

Nossos dados iniciais de triagem sorológica demonstram que os suínos brasileiros foram previamente expostos a um vírus similar ao HBV como observado em rebanhos da China (Li et al., 2010). Assim como ocorreu nas investigações de Li et al., 2010, a incidência de infecção por um vírus similar ao HBV em suínos foi semelhante à prevalência da infecção pelo HBV em humanos da mesma região. Diante das semelhantes taxas de infecção, pesquisadores discutem se os porcos podem contribuir como reservatórios para a manutenção da circulação do hepadnavírus, assim como ocorre com os primatas não humanos em áreas endêmicas para HBV (Starkman et al., 2003; Yang et al., 2007).

Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a prevalência da infecção aguda por HBV em humanos varia de 0,3-0,5% (Ministério da Saúde, 2010). Dados preliminares do '*Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais no Brasil*' registram 104.454 novos casos confirmados de hepatite B entre os anos de 1999 a 2010. Esses casos foram confirmados através de, pelo menos, um ensaio sorológico reagente (HBsAg, IgM anti-HBc ou HBeAg) e/ou detecção de HBV-DNA. Embora caracterizadas como áreas de baixa endemicidade, as regiões Sul e Sudeste concentram 68,2% das notificações nesse período (Pereira et al., 2011; Ministério da Saúde).

Conforme mencionado anteriormente, devido ao painel sorológico encontrado no rebanho brasileiro das regiões Sul e Sudeste, os ensaios moleculares poderiam ajudar com a detecção genômica nos casos de infecção oculta e período de janela imunológica. Nesse estudo, a carga viral do hepadnavírus pode ser quantificada em duas amostras, variando de $4,43 \times 10^3$ cópias/mL a $4,55 \times 10^3$ cópias/mL. Ambas as amostras foram caracterizadas como indeterminadas na zona cinza do EIA, uma para o marcador HBsAg e outra para o marcador anti-HBc.

Embora a replicação de HBV em humanos produza altos títulos durante a viremia (10^8 a 10^{10} vírions/mL) (Elgouhari et al., 2008), o ensaio de quantificação da carga viral mostrou que o hepadnavírus apresenta um baixo título de replicação em suínos. Corroborando essa ideia, a literatura revela que fatores hospedeiro-específicos regulem a conversão do DNA na forma circular relaxada (rcDNA) para a forma circular covalentemente fechada (cccDNA), que atua como um intermediário replicativo do ciclo viral, crucial para a persistência da infecção (Urban et al., 2010). Devido ao hepatotropismo viral, testes imunohistoquímicos e

histopatológicos devem ser realizados para detectar a presença do vírus similar ao HBV e revelar uma provável injúria hepática associada para esclarecer essa hipótese.

Além disso, dados de Li et al., 2010 também sugerem essa hipótese, uma vez que a presença de HBeAg considerado um marcador de replicação de HBV foi detectada em apenas 0,5% dos suínos investigados.

No presente estudo, a detecção genômica viral foi realizada a fim de confirmar a possibilidade da infecção em casos de janela imunológica e infecção oculta. De um total de 49 amostras, duas exibiram produtos de PCR com tamanhos esperados. Comparando a detecção genômica com a sorologia, uma amostra foi caracterizada como positiva para o marcador anti-HBc e, outra, para ambos os marcadores anti-HBc e anti-HBs. Após reamplificação usando oligonucleotídeos internos, duas amostras adicionais exibiram produtos de PCR esperados. Ambas as amostras foram caracterizadas como indeterminadas na zona cinza do EIA para o marcador anti-HBc.

Notavelmente, nenhuma das cargas virais dessas quatro amostras pode ser quantificada. No entanto, em três delas foi possível confirmar a presença do DNA do hepadnavírus por sequenciamento. Esse estudo mostrou, pela primeira vez, a circulação de um vírus similar ao HBV em suínos, detectado por PCR qualitativo e confirmado por sequenciamento parcial do genoma viral. Embora pertençam a um mesmo rebanho, os dados revelam que os suínos positivos para a proteína *small* do HBsAg estavam infectados por vírus com distintas sequências nucleotídicas. Além disso, as mutações nas sequências nucleotídicas de cada animal foram reproduzidas em cada fita da mesma amostra usando diferentes oligonucleotídeos para o sequenciamento.

Com os dados encontrados, não é possível afirmar se a detecção de um vírus similar ao HBV em suínos pode representar um potencial fator de risco para a saúde pública humana. Embora a rota de transmissão não esteja clara, suspeita-se que o contato mais estreito devido à domesticação desses animais possa favorecer o compartilhamento mútuo de hepdnavírus entre homens e animais. Essa hipótese é corroborada pela habilidade já demonstrada de o HBV cruzar barreiras entre espécies (Makuwa et al., 2005), e alterar sua patogenicidade e transmissão através mutações decorrentes da replicação e recombinação intergenotípica e interespecífica, aumentando, portanto, essa possibilidade (Li et al., 2010). Para investigarmos a provável origem de infecção, a coleta de outros fluidos biológicos deve ser avaliada para a presença de marcadores de HBV.

A árvore filogenética de *Orthohepadnavirus* indicou que as sequências de hepadnavírus encontradas em suínos obtidas nesse estudo estão intimamente relacionadas às sequências de HBV humanas. De fato, a matriz de identidade de nucleotídeos revelou uma

maior similaridade entre as sequências nucleotídicas proveniente dos suínos com o HBV humano, do que com as sequências de hepadnavírus de primatas não humanos, roedores e aves. Dentre os animais de ocorrência natural para HBV, suínos e humanos estão, de fato, em um contato mais próximo, favorecendo um provável cruzamento de barreiras intra e interespecífico.

Curiosamente, quando analisamos essas novas sequências encontradas em suínos, dentro da árvore filogenética de genótipos protótipos de HBV humano, notamos que as primeiras ficaram próximas a dois grupos de genótipos. Duas amostras podiam ser atribuídas ao genótipo A, um dos genótipos mais prevalentes no Brasil (Araujo et al., 2004; Mello et al., 2008). E, a outra poderia ser atribuída ao genótipo G, comum em países como EUA, México e França e, descrito em casos de coinfeções com outros genótipos, principalmente o A (Santos et al., 2010).

Contudo, os oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho são eficientes para a detecção interespecífica de *Orthohepadnavirus*. Para a classificação do HBV nos genótipos seria necessária a amplificação das suas sequências nucleotídicas completas; ou, da região do gene para o antígeno de superfície (Okamoto et al., 1988; Norder et al., 1994). Para confirmar a classificação no genótipo G, por exemplo, algumas particularidades devem ser verificadas, como o tamanho do genoma, já que a sequência protótipo de HBV G é a mais longa, com 3248 nucleotídeos, além da deleção do aminoácido 11 em pré-S1 e da inserção de 12 aminoácidos em HBc (Stuyver et al., 2000; Schaefer, 2007).

Cabe ressaltar que o produto de sequenciamento de nosso estudo corresponde a uma região de alta conservação entre as sequências de hepadnavírus de diferentes mamíferos, cujo comprimento é de aproximadamente 11,2% do genoma de HBV. Portanto, o sequenciamento completo da região pré-S/S mais do que apenas da região S poderia nos fornecer uma informação mais precisa a respeito da porcentagem de identidade de nucleotídeos com os *Orthohepadnavirus* descritos na literatura, e permitir a elaboração de hipóteses sobre sua origem evolutiva.

O mecanismo envolvendo a habilidade de cruzar barreiras de diferentes espécies é amplamente conhecido para o vírus *Influenza*. Focando nesse modelo, pesquisadores discutem a habilidade do vírus *Influenza* circulante em hospedeiros mamíferos, incluindo o homem e os suínos, de rapidamente evoluir devido às mutações durante o processo replicativo e *reassortment* com vírus animais (Smith et al., 2009). Nesse caso, o *reassortment* entre vírus de diferentes espécies poderia causar a emergência de cepas para a população humana (Cox e Subbarao, 2000). Entretanto, esse evento requer que a nova cepa seja capaz de se replicar e eficientemente ser transmitida entre humanos.

A respeito do papel dos suínos da circulação zoonótica do vírus *Influenza*, eles poderiam atuar como reservatórios para a adaptação dos vírus aviários, tanto pelo *reassortment* com vírus humanos ou suínos, ou através de mudanças adaptativas (Horimoto e Kawaoka, 2005). Como mencionado acima, essas mudanças adaptativas devem ser capazes de transmissão sustentada entre humanos para merecer atenção e monitoramento.

O vírus da hepatite E (HEV) provou ser comum em rebanhos suínos brasileiros (Vital et al., 2005; dos Santos et al., 2009). Além disso, estudos nacionais indicam uma provável transmissão zoonótica de cepas suínas em áreas urbanas da região Sudeste do Brasil em casos esporádicos (Lopes dos Santos et al., 2010). A emergência de vírus não rastreados em suínos enfatiza a relevância da vigilância da população viral em hospedeiros mamíferos como os suínos domésticos (McHardy e Adams, 2009). Cabe ressaltar que esses animais são de importância econômica para a indústria nacional de alimentos e, as fiscalizações ou inspeções sanitárias se restringem à avaliações de lesões visíveis presentes nos rebanhos e animais de abatedouros.

A confirmação de que os suínos também são hospedeiros naturais de hepadnavírus poderá viabilizar pesquisas sobre os mecanismos de replicação, patogenia, e novas drogas antivirais em um novo modelo experimental de estudo de HBV, que atualmente está restrito a chimpanzés. Devido a semelhanças anatômicas e fisiológicas com humanos, a espécie *Sus scrofa* já vem ganhando relevante papel como animal experimental para investigações biomédicas.

Nossos dados não nos permitem confirmar se estamos diante de um novo vírus suíno ou, de um vírus humano circulando em suínos. Estudos adicionais são necessários para se determinar uma provável infecciosidade desse agente, bem como avaliar possíveis riscos epidemiológicos. Devido a isso, esse trabalho traz novas perspectivas para avaliação de riscos zoonóticos, estudos de infectividade em primatas não humanos e pesquisas sobre HBV no hospedeiro suíno, já que além da sua abundante disponibilidade, esses animais já são amplamente utilizados em pesquisas médicas (Li et al., 2010).

8. Conclusões

- O presente trabalho demonstrou evidências sorológicas e moleculares da circulação de um vírus similar ao HBV em suínos brasileiros;
- A infecção ativa pelo hepadnavírus foi detectada em três animais, através da pesquisa de antígeno HBsAg em soro;
- A prevalência da infecção pelo hepadnavírus em suínos foi de 7,45%, avaliada através da pesquisa de anticorpos anti-HBc em soro. A pesquisa de anticorpos anti-HBs registrou uma prevalência de 1,60% em suínos;
- A presença do DNA do vírus similar ao HBV foi detectada nas amostras de soro de quatro animais, através de PCR qualitativo para as regiões pré-S/S e região S do genoma;
- A carga viral foi detectada em amostras de soro de dois animais através de PCR em tempo real; e foi estimada com valor médio de $4,49 \times 10^3$ cópias/mL;
- O sequenciamento nucleotídico parcial da região S do genoma confirmou a infecção por um vírus similar ao HBV em três animais;
- Comparando as sequências de hepadnavírus suíno encontradas com as sequências de *Orthohepadnavirus* disponíveis no *GenBank*, as amostras suínas demonstraram similaridade com o HBV humano de 90,8-96,3% de identidade.

9. Perspectivas

Diante dos resultados observados nesse estudo, acredita-se que o sequenciamento completo da região pré-S/S ou mesmo do genoma total forneça informações mais acuradas com relação à origem da cepa de hepadnavírus encontrada nas amostras dos suínos infectados, bem como sua classificação genotípica. Além disso, estudos envolvendo infecção experimental são necessários para avaliação do potencial infeccioso desse material biológico.

A confirmação de que os suínos podem ser, de fato, hospedeiros naturais para um vírus similar ao HBV possibilitará o progresso de estudos relacionados à infecção pelo HBV em um modelo animal mais vantajoso e conveniente, que é mais acessível e já amplamente utilizado em pesquisas médicas.

Por último, diante da possibilidade de risco zoonótico, esse trabalho traz perspectivas de investigação de risco profissional de infecção pelo HBV em profissionais em contato estreito com suínos e seus derivados.

10. Referências Bibliográficas

Allain JP, Cox L. Challenges in hepatitis B detection among blood donors. *Curr Opin Hematol.* 2011 Nov;18(6):461-6.

Alvarado Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvea MS, Gutierrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, et al. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: a Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol.* 2011 Jan;11(1):103-8.

Andre F. Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa. *Vaccine.* 2000 Feb 18;18 Suppl 1:S20-2.

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

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* 2002 Aug;83(Pt 8):2059-73.

Arboleda M, Castilho MC, Fonseca JC, Albuquerque BC, Saboia RC, Yoshida CF. Epidemiological aspects of hepatitis B and D virus infection in the northern region of Amazonas, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995 Sep-Oct;89(5):481-3.

Assad S, Francis A. Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine.* 1999 Aug 20;18(1-2):57-67.

Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* 1971. 35 (3): 235–41.

Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol.* 2007 Jan 7;13(1):48-64.

Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol.* 2006 Jun;87(Pt 6):1439-49.

Bianchi JB. *Historia hepatica sen Thoria et praxis omnium morborum hepatitis et bilis.* Tom I. 1725 De Tourne, Geneva:149.

- Blumberg BS. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 8;94(14):7121-5.
- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA*. 1965 Feb 15;191:541-6.
- Blumberg BS, Sutnick AI, London WT. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. *Bull N Y Acad Med*. 1968 Dec;44(12):1566-86.
- Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol*. 2004 Dec;78(23):12725-34.
- Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 7;13(1):65-73.
- Carman WF. Infections associated with medical intervention: hepatitis viruses and HGV. *Br Med Bull*. 1998;54(3):731-48.
- Cattaneo R, Will H, Schaller H. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J*. 1984 Sep;3(9):2191-6.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <http://www.cdc.gov/hepatitis/B/bFAQ.htm#overview>. Acessado em 16/07/2012.
- Chamorro AJ, Casado JL, Bellido D, Moreno S. Reactivation of hepatitis B in an HIV-infected patient with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Jul;24(7):492-4.
- Chang SF, Netter HJ, Bruns M, Schneider R, Frolich K, Will H. A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology*. 1999 Sep 15;262(1):39-54.
- Chen BF, Kao JH, Liu CJ, Chen DS, Chen PJ. Genotypic dominance and novel recombinations in HBV genotype B and C co-infected intravenous drug users. *J Med Virol*. 2004 May;73(1):13-22.
- Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. Evolution of Hepatitis B virus in an acute hepatitis B patient co-infected with genotypes B and C. *J Gen Virol*. 2006 Jan;87(Pt 1):39-49.

- Chen M, Sallberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV, et al. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol*. 2005 Mar;79(5):3016-27.
- Chen MT, Billaud JN, Sallberg M, Guidotti LG, Chisari FV, Jones J, et al. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 12;101(41):14913-8.
- Chotiyaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009 Aug;6(8):453-62.
- Chouteau P, Le Seyec J, Cannie I, Nassal M, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus. *J Virol*. 2001 Dec;75(23):11565-72.
- Conjeevaram HS, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection: a hidden menace? *Hepatology*. 2001 Jul;34(1):204-6.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7.
- Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med*. 2000;51:407-21.
- Dalton HR, Bendall RP, Pritchard C, Henley W, Melzer D. National mortality rates from chronic liver disease and consumption of alcohol and pig meat. *Epidemiol Infect*. 2010 Feb;138(2):174-82.
- Dandri M, Volz TK, Lutgehetmann M, Petersen J. Animal models for the study of HBV replication and its variants. *J Clin Virol*. 2005 Dec;34 Suppl 1:S54-62.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970 Apr 4;1(7649):695-8.
- Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, et al. Subgenotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol*. 2008 Jan;80(1):20-6.
- Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*. 2008 Oct 2;359(14):1486-500.

dos Santos DR, Vitral CL, de Paula VS, Marchevsky RS, Lopes JF, Gaspar AM, et al. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J.* 2009 Dec;182(3):474-80.

Dubois MF, Pourcel C, Rousset S, Chany C, Tiollais P. Excretion of hepatitis B surface antigen particles from mouse cells transformed with cloned viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Aug;77(8):4549-53.

EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50: 227-242.

Echevarria JM, Avellon A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol.* 2006;78 Suppl 1:S36-42.

Elgouhari HM, Abu-Rajab Tamimi TI, Carey WD. Hepatitis B virus infection: understanding its epidemiology, course, and diagnosis. *Cleve Clin J Med.* 2008 Dec;75(12):881-9.

Fattovich G, Giustina G, Favarato S, Ruol A. A survey of adverse events in 11,241 patients with chronic viral hepatitis treated with alfa interferon. *J Hepatol.* 1996 Jan;24(1):38-47.

Feitelson MA, DeTolla LJ, Zhou XD. A chronic carrierlike state is established in nude mice injected with cloned hepatitis B virus DNA. *J Virol.* 1988 Apr;62(4):1408-15.

Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, et al. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol.* 1990 Nov 15;145(10):3442-9.

Findlay GM, Maccallum FO. Hepatitis and Jaundice Associated with Immunization against Certain Virus Diseases: (Section of Comparative Medicine). *Proc R Soc Med.* 1938 May;31(7):799-806.

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

Franco O. História da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro 1969: Divisão de Cooperação e Divulgação, Departamento Nacional de Endemias Rurais, Ministério da Saúde; 1969.

Ganem D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991;168:61-83.

Ganem D. Hepadnaviridae and their replication, in: Fields BN, Knipe DN, Howley PM editors. *Virology.* 1996 (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA) Vol. 2, 2703-39.

Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med.* 2004 Mar 11;350(11):1118-29.

Ganem D, Schneider RJ. Hepadnaviridae and their replication. In: Knipe DN, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B et al., editors. *Fields Virology.* 2001 (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA) Vol.4

Gavilanes F, Gonzalez-Ros JM, Peterson DL. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem.* 1982 Jul 10;257(13):7770-7.

Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell.* 1980 Oct;21(3):801-9.

Gish RG, Gadano AC. Chronic hepatitis B: current epidemiology in the Americas and implications for management. *J Viral Hepat.* 2006 Dec;13(12):787-98.

Gomes SA, Mello FC, Araujo NM. Hepatitis B virus (HBV) variants in hemodialysis patients. In: Penido MG, editor. *Special problems in hemodialysis patients.* 2011. In Tech Publisher, Croatia, 13-34.

Grethe S, Heckel JO, Rietschel W, Hufert FT. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol.* 2000 Jun;74(11):5377-81.

Grimm D, Thimme R, Blum HE. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol Int.* 2011 Jun;5(2):644-53.

Guo H, Mason WS, Aldrich CE, Saputelli JR, Miller DS, Jilbert AR, et al. Identification and characterization of avihepadnaviruses isolated from exotic anseriformes maintained in captivity. *J Virol.* 2005 Mar;79(5):2729-42.

Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA. Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg Vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology.* 1983 Sep-Oct;3(5):656-62.

Hagen TM, Huang S, Curnutte J, Fowler P, Martinez V, Wehr CM, et al. Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20;91(26):12808-12.

Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*. 1984 Nov;52(2):396-402.

Hessel L, West DJ. Antibody responses to recombinant hepatitis B vaccines. *Vaccine*. 2002 May 22;20(17-18):2164-5.

Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B virus. In: Knipe DN, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B et al., editors. *Fields Virology*. 2001 (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA) Vol.4, 2971-3036.

Hongthanakorn C, Lok AS. New pharmacologic therapies in chronic hepatitis B. *Gastroenterol Clin North Am*. 2010 Sep;39(3):659-80.

Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Aug;3(8):591-600.

Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat*. 2002 Jul;9(4):243-57.

Hu X, Margolis HS, Purcell RH, Ebert J, Robertson BH. Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 15;97(4):1661-4.

Hui CK, Cheung WW, Zhang HY, Au WY, Yueng YH, Leung AY, et al. Kinetics and risk of de novo hepatitis B infection in HBsAg-negative patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *Gastroenterology*. 2006 Jul;131(1):59-68.

Infectious Disease Illustrations. Disponível em: <http://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>. Acessado em 16/07/2012.

Interpretation of Hepatitis B Serologic Test Results. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/PDFs/SerologicChartv8.pdf>. Acessado em 16/07/2012.

Jack AD, Hall AJ, Maine N, Mendy M, Whittle HC. What level of hepatitis B antibody is protective? *J Infect Dis*. 1999 Feb;179(2):489-92.

- Jazayeri SM, Alavian SM, Carman WF. Hepatitis B virus: origin and evolution. *J Viral Hepat.* 2010 Apr;17(4):229-35.
- Jilbert AR, Freiman JS, Gowans EJ, Holmes M, Cossart YE, Burrell CJ. Duck hepatitis B virus DNA in liver, spleen, and pancreas: analysis by in situ and Southern blot hybridization. *Virology.* 1987 Jun;158(2):330-8.
- Jutavijittum P, Jiviriyawat Y, Yousukh A, Kunachiwa W, Toriyama K. Genotypes of hepatitis B virus among voluntary blood donors in northern Thailand. *Hepatol Res.* 2006 Aug;35(4):263-6.
- Jutavijittum P, Yousukh A, Samounry B, Samounry K, Ounavong A, Thammavong T, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections among Lao blood donors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2007 Jul;38(4):674-9.
- Kang HY, Lee S, Park SG, Yu J, Kim Y, Jung G. Phosphorylation of hepatitis B virus Cp at Ser87 facilitates core assembly. *Biochem J.* 2006 Sep 1;398(2):311-7.
- Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002 Jun;17(6):643-50.
- Kao JH. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *Korean J Intern Med.* 2011 Sep;26(3):255-61.
- Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2002 Jul;2(7):395-403.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2000 Mar;118(3):554-9.
- Klingmuller U, Schaller H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol.* 1993 Dec;67(12):7414-22.
- Kock J, Schlicht HJ. Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol.* 1993 Aug;67(8):4867-74.
- Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat.* 2005 Sep;12(5):456-64.

Kramvis A, Restorp K, Norder H, Botha JF, Magnius LO, Kew MC. Full genome analysis of hepatitis B virus genotype E strains from South-Western Africa and Madagascar reveals low genetic variability. *J Med Virol.* 2005 Sep;77(1):47-52.

Kwon SY, Lee CH. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Korean J Hepatol.* 2011 Jun;17(2):87-95.

Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, 3rd, Rico-Hesse R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 12;95(10):5757-61.

Lanford RE, Chavez D, Rico-Hesse R, Mootnick A. Hepadnavirus infection in captive gibbons. *J Virol.* 2000 Mar;74(6):2955-9.

Lau JY, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet.* 1993 Nov 27;342(8883):1335-40.

Lee M, Keeffe EB. Study of adherence comes to the treatment of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2011 Jan;54(1):6-8.

Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med.* 1997 Dec 11;337(24):1733-45.

Leemans WF, Janssen HL, de Man RA. Future perspectives for the management of chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol.* 2007 May 14;13(18):2554-67.

Li W, She R, Liu L, You H, Yin J. Prevalence of a virus similar to human hepatitis B virus in swine. *Virol J.* 2010;7:60.

Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology.* 2009 May;49(5 Suppl):S13-21.

Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis.* 1997 Jun;175(6):1285-93.

Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2007 Feb;45(2):507-39.

Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology.* 2009 Sep;50(3):661-2.

Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology.* 2007 Jul;46(1):254-65.

Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MF, de Sousa PS, Gaspar AM, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol.* 2010 Mar;47(3):276-9.

Lu YW, Tan TL, Zhang J, Chen WN. Cellular apoptosis induced by replication of hepatitis B virus: possible link between viral genotype and clinical outcome. *Virol J.* 2007;4:117.

Lucifora J, Protzer U. Hepatitis B Virus X Protein: A key regulator of the virus life cycle. In: Garcia ML, Romanowski V, editors. *Viral Genomes.* 2012. In Tech Publisher, Croatia, 141-154

Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol.* 2007 Jan 7;13(1):74-81.

Lürman A. Eine ikterusepidemie. *Berlin Klin Wschr* 1885;22:20-23.

MacDonald DM, Holmes EC, Lewis JC, Simmonds P. Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. *J Virol.* 2000 May;74(9):4253-7.

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

Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology.* 1995;38(1-2):24-34.

Mahtab MA, Rahman S, Khan M, Karim F. Hepatitis B virus genotypes: an overview. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2008 Oct;7(5):457-64.

Makuwa M, Souquiere S, Clifford SL, Mouinga-Ondeme A, Bawe-Johnson M, Wickings EJ, et al. Identification of hepatitis B virus genome in faecal sample from wild living chimpanzee (*Pan troglodytes troglodytes*) in Gabon. *J Clin Virol.* 2005 Dec;34 Suppl 1:S83-8.

Mandart E, Kay A, Galibert F. Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. *J Virol.* 1984 Mar;49(3):782-92.

Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 May;77(5):2941-5.

Mason WS, Aldrich C, Summers J, Taylor JM. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Jul;79(13):3997-4001.

McCaffrey AP. RNA interference inhibitors of hepatitis B virus. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep;1175:15-23.

McHardy AC, Adams B. The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLoS Pathog*. 2009 Oct;5(10):e1000566.

McMahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis*. 2005;25 Suppl 1:3-8.

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.

Menne S, Cote PJ. The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 7;13(1):104-24.

Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2003 Nov;38(5):1075-86.

Milich DR, Schodel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J Virol*. 1997 Mar;71(3):2192-201.

Ministério da Saúde (MS). Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>. Acessado em 16/07/2012.

Ministério da Saúde (MS). Estudo de prevalência de Base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. 2010. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2010/50071/estudo_prevalencia_hepatites_pdf_26830.pdf. Acessado em 16/07/2012.

Morozov V, Pisareva M, Groudinin M. Homologous recombination between different genotypes of hepatitis B virus. *Gene*. 2000 Dec 30;260(1-2):55-65.

Mulders MN, Venard V, Njayou M, Edorh AP, Bola Oyefolu AO, Kehinde MO, et al. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis.* 2004 Jul 15;190(2):400-8.

Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res.* 2008 Jun;134(1-2):235-49.

Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, et al. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol.* 1995 Jun;69(6):3350-7.

Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology.* 2004;47(6):289-309.

Norder H, Courouce AM, 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.* 1994 Feb;198(2):489-503.

Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through maternal-fetal transmission. *Jpn J Exp Med.* 1987 Aug;57(4):231-6.

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

Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM, Yousukh A, Samounry B, Thammavong T, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis.* 2008 Nov;14(11):1777-80.

Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, et al. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Sep;86(18):7059-62.

Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraive WM, Mendonca-Lima L, et al. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res.* 2008;7(3):861-71.

Patient R, Hourieux C, Roingeard P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol.* 2009 Nov;11(11):1561-70.

Pereira GFM, Givisiez JM, Coelho RA, Oliveira SB, Amorim TR. *Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais.* 2011 Jul; Ano II – nº 01.

Perrillo R. Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B. *Hepatology.* 2009 May;49(5 Suppl):S103-11.

Perrillo RP, Campbell CR, Strang S, Bodicky CJ, Costigan DJ. Immune globulin and hepatitis B immune globulin. Prophylactic measures for intimate contacts exposed to acute type B hepatitis. *Arch Intern Med.* 1984 Jan;144(1):81-5.

Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol.* 2006 Oct;45(4):529-38.

Pult I, Netter HJ, Bruns M, Prassolov A, Sirma H, Hohenberg H, et al. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology.* 2001 Oct 10;289(1):114-28.

Pungpapong S, Kim WR, Poterucha JJ. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. *Mayo Clin Proc.* 2007 Aug;82(8):967-75.

Ratnam D, Visvanathan K. New concepts in the immunopathogenesis of chronic hepatitis B: the importance of the innate immune response. *Hepatol Int.* 2008 May;2(Supplement 1):12-8.

Rehermann B, Fowler P, Sidney J, Person J, Redeker A, Brown M, et al. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med.* 1995 Mar 1;181(3):1047-58.

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

Salzano FM, Blumberg BS. The Australia antigen in Brazilian healthy persons and in leprosy and leukaemia patients. *J Clin Pathol.* 1970 Feb;23(1):39-42.

Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Vieira DS, Pinho JR, Carrilho FJ, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. *Virology.* 2010;7:315.

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

Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med*. 1996 Jun 27;334(26):1685-90.

Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Mar;64(1):51-68.

Sherlock S. The natural history of hepatitis B. *Postgrad Med J*. 1987;63 Suppl 2:7-11.

Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2009 Jul 7;15(25):3099-105.

Smith GJ, Bahl J, Vijaykrishna D, Zhang J, Poon LL, Chen H, et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 14;106(28):11709-12.

Sohn JA, Litwin S, Seeger C. Mechanism for CCC DNA synthesis in hepadnaviruses. *PLoS One*. 2009;4(11):e8093.

Soussan P, Garreau F, Zylberberg H, Ferray C, Brechot C, Kremsdorf D. In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest*. 2000 Jan;105(1):55-60.

Souto FJD. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *Gastroenterol Endosc Dig*. 1999 18:143-150.

Sprengel R, Kaleta EF, Will H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol*. 1988 Oct;62(10):3832-9.

Starkman SE, MacDonald DM, Lewis JC, Holmes EC, Simmonds P. Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology*. 2003 Sep 15;314(1):381-93.

Stein LL, Loomba R. Drug targets in hepatitis B virus infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2009 Apr;9(2):105-16.

Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2000 Jan;81(Pt 1):67-74.

Sucupira MV, Mello FC, Santos EA, Niel C, Rolla VC, Arabe J, 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.* 2006 Sep;101(6):655-60.

Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Sep;75(9):4533-7.

Szmunes W, Stevens CE, Harley EJ, Zang EA, Oleszko WR, William DC, et al. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med.* 1980 Oct 9;303(15):833-41.

Takagi A, Deguchi R, Kobayashi K, Miwa T. Cytokine expressions and H. pylori-associated gastric mucosal lesion. *Keio J Med.* 2002 Dec;51 Suppl 2:51-2.

Takashima H, Araki K, Miyazaki J, Yamamura K, Kimoto M. Characterization of T-cell tolerance to hepatitis B virus (HBV) antigen in transgenic mice. *Immunology.* 1992 Mar;75(3):398-405.

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

Terrault NA, Zhou S, Combs C, Hahn JA, Lake JR, Roberts JP, et al. Prophylaxis in liver transplant recipients using a fixed dosing schedule of hepatitis B immunoglobulin. *Hepatology.* 1996 Dec;24(6):1327-33.

Testut P, Renard CA, Terradillos O, Vitvitski-Trepo L, Tekaiia F, Degott C, et al. A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol.* 1996 Jul;70(7):4210-9.

Thimme R, Blum HE. (Therapy of hepatitis B). *Praxis (Bern 1994).* 2006 Sep 6;95(36):1383-8.

Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, et al. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2003 Jan;77(1):68-76.

- Tian J, Xia K, She R, Li W, Ding Y, Wang J, et al. Detection of Hepatitis B Virus in Serum and Liver of Chickens. *Viol J*. 2012 Jan 4;9(1):2.
- Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis*. 2002 Aug;2(8):479-86.
- Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol*. 2002 Aug;25(2):97-106.
- Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*. 2008 Jun;82(11):5657-63.
- Triyatni M, Ey P, Tran T, Le Mire M, Qiao M, Burrell C, et al. Sequence comparison of an Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses. *J Gen Virol*. 2001 Feb;82(Pt 2):373-8.
- Trueba D, Phelan M, Nelson J, Beck F, Pecha BS, Brown RJ, et al. Transmission of ground squirrel hepatitis virus to homologous and heterologous hosts. *Hepatology*. 1985 May-Jun;5(3):435-9.
- Tsai SL, Chen PJ, Lai MY, Yang PM, Sung JL, Huang JH, et al. Acute exacerbations of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens. Implications for hepatitis B e antigen seroconversion. *J Clin Invest*. 1992 Jan;89(1):87-96.
- Tseliou P, Spiliotakara A, Dimitracopoulos GO, Christofidou M. Detection of hepatitis B virus DNA in blood units with anti-HBc as the only positive serological marker. *Haematologia (Budap)*. 2000;30(3):159-65.
- Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol*. 2010 Feb;52(2):282-4.
- Vial T, Descotes J. Clinical toxicity of the interferons. *Drug Saf*. 1994 Feb;10(2):115-50.
- Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, et al. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology*. 2007 Jan;45(1):102-10.
- Vitral CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, dos Santos DR, Gaspar AM. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Apr;100(2):117-22.

- Wang Z, Liu Z, Zeng G, Wen S, Qi Y, Ma S, et al. A new intertype recombinant between genotypes C and D of hepatitis B virus identified in China. *J Gen Virol*. 2005 Apr;86(Pt 4):985-90.
- Wang HP, Rogler CE. Topoisomerase I-mediated integration of hepadnavirus DNA in vitro. *J Virol*. 1991 65, 2381-2392.
- Warren KS, Heeney JL, Swan RA, Heriyanto, Verschoor EJ. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol*. 1999 Sep;73(9):7860-5.
- Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Aug;58(4):267-72.
- Wei Y, Tiollais PK. Molecular biology of hepatitis B virus. *Clin Liver Dis* 1999; 3:189-219.
- Weiser B, Ganem D, Seeger C, Varmus HE. Closed circular viral DNA and asymmetrical heterogeneous forms in livers from animals infected with ground squirrel hepatitis virus. *J Virol*. 1983 Oct;48(1):1-9.
- World Health Organization (WHO). Fact Sheets: Infectious diseases. Hepatitis B. 2008 Aug. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>. Acessado em 16/07/2012.
- Xie YH, Hong R, Liu W, Liu J, Zhai JW. Development of novel therapeutics for chronic hepatitis B. *Virol Sin*. 2010 Aug;25(4):294-300.
- Yang J, Xi Q, Deng R, Wang J, Hou J, Wang X. Identification of interspecies recombination among hepadnaviruses infecting cross-species hosts. *J Med Virol*. 2007 Nov;79(11):1741-50.
- Yu H, Yuan Q, Ge SX, Wang HY, Zhang YL, Chen QR, et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One*. 2010;5(2):e9297.
- Zhang Q, Wu G, Richards E, Jia S, Zeng C. Universal primers for HBV genome DNA amplification across subtypes: a case study for designing more effective viral primers. *Virol J*. 2007;4:92.

Zoulim F. Emerging drugs for hepatitis B. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2007 May;12(2):199-217.

Anexo