



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PERFIL DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO VÍRUS
DA HEPATITE B AOS ANÁLOGOS DE NUCLEOS(T)ÍDEOS
EM PACIENTES COM HEPATITE B CRÔNICA.

MARIA ISABEL MAGALHÃES A. DOS SANTOS

SALVADOR - BAHIA

2014

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa

PERFIL DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO VÍRUS
DA HEPATITE B AOS ANÁLOGOS DE NUCLEOS(T)ÍDEOS
ENTRE PACIENTES COM HEPATITE B CRÔNICA.

MARIA ISABEL MAGALHÃES A. DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Luciano Kalabric Silva

SALVADOR - BAHIA

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

A DEUS, pela revelação da ciência da sabedoria e presença constante durante a construção de toda minha caminhada profissional.

Aos meus pais (Geovani Azevedo e Eliane Magalhães), por todo o amor incondicional, compreensão e dedicação.

A meus irmãos (Gabriel Magalhães e Sara Maria), por toda contribuição e companheirismo.

Aos portadores do vírus HBV que concordaram em participar deste estudo fornecendo informações valiosas e dividindo suas esperanças.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Kalabric, pela oportunidade de adentrar na área da Biologia Molecular, por todo conhecimento, dedicação, crédito e confiança que tem depositado em mim, bem como pelo total suporte para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Raymundo Paraná pelo apoio na construção deste projeto.

A Andreas Stöcker por toda a colaboração na padronização e validação da metodologia deste trabalho.

Ao LACEN-BA, em especial a Dra. Maria Alice S. Zarife e Haydee Lordelo, pela realização dos testes moleculares para quantificação da carga viral do vírus da Hepatite B.

Aos Chefes do LAPI, Dr. Eduardo Netto e Carlos Brites, pelo apoio na execução do trabalho, disponibilizando toda a infraestrutura do laboratório.

Ao Chefe do LPBM, Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pela colaboração e apoio na execução do trabalho.

A todos do LPBM e LAPI pelo apoio e amizade (Sidelcina Rugieri, Raissa Lanna, Aline Reis, Rômulo Freire, Juliana Miyazaki, Breno Dominguez, Mila Hughes, Mariana Cedraz).

As funcionárias do HUPES que contribuíram na coleta da amostra e disponibilização dos prontuários, Márcia e Ednalva respectivamente.

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

A todos os funcionários da Fiocruz-BA e LAPI.

Aos colegas da pós-graduação, pela excelente convivência e amizade firmada durante a realização das disciplinas.

A todos os amigos que percorreram juntos essa etapa tão importante da concretização de um dos sonhos da minha vida, que possamos prosseguir juntos em outros sonhos.

Ao sistema PDTIS de Plataformas da FIOCRUZ pelo seqüenciamento e recursos de bioinformática.

A Fiocruz pela concessão da bolsa de mestrado. E ao CNPq pelo Edital/Chamada: edital Universal-MCTI/CNPq N° 14/2012.

SANTOS, Maria Isabel Magalhães A. dos Perfil das mutações de resistência do vírus da Hepatite B aos análogos de nucleos(t)ídeos entre pacientes com hepatite B crônica. 78 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

Introdução: A doença causada pelo vírus da hepatite B (HBV) é um problema de saúde pública mundial. No Brasil, o sistema único de saúde (SUS) tem disponibilizado drogas antivirais para o tratamento de hepatite B crônica há mais de 10 anos, mas um sistema para o monitoramento e avaliação de resistência a estas drogas ainda não está disponível. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo determinar o perfil de mutações do HBV associadas com a resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos entre 81 pacientes com infecção crônica pelo HBV: virgens de tratamento para hepatite B e tratados com diferentes análogos de nucleosídeos e nucleotídeos, no Hospital Professor Edgar Santos (HUPES-UFBA)- Salvador-BA. **Metodologia:** O HBV-DNA foi isolado de amostras de soro, amplificado por nested-PCR, utilizando-se primers deduzidos da região flaqueadora da domínio rt do gene P e sequenciados (ABI Prism 3730, Applied Biosystems, EUA). Duas a seis sequências de cada isolado foram alinhadas e os sítios conflitantes foram resolvidos usando o software CLC Main Workbench v. 5.0 por inspeção visual dos eletroferogramas. As sequências consenso tinham um tamanho de 1032 pb (compreendendo os aminoácido 1-344 da rt). Estas sequências foram submetidas ao banco de dados HBVrt DB (Stanford University, EUA) para a análise de cada mutação de acordo com o genótipo e tratamento. **Resultado:** O genótipo A1 foi o mais prevalente (85,2%) seguido pelo genótipo A2 (4,9%) F (6,2%) e C1, D2 e D4 (1,2% cada). Seis pacientes (7 %) apresentaram mutações de resistência para LAM, ETV, TDF: dois com o padrão L180M + M204V e quatro com padrões diversos (L80I + L180M + M204I ;L80V + L180M + M204V; M204I; A194T). Todas estas mutações foram associadas ao genótipo A (quatro A1 e dois A2). Além disso, foi encontrado um paciente com HBV genótipo C típico do leste da Ásia. Destes pacientes, dois foram virgens de tratamento e quatro tinham histórico de tratamento para HIV ou HBV. Foram detectadas quatro mutações no gene S (três casos com a mutação sI195M e um a mutação sW196L) associadas às mutações do domínio rt do gene P, correspondendo à uma taxa de 6% de mutações de escape vacinal. A prevalência das mutações de resistência às drogas antivirais variou de acordo com a duração do tratamento e com o nível da barreira genética da droga utilizada. Neste estudo, foi encontrada uma forte associação entre a ocorrência de mutações de resistência do HBV e positividade para o AgHBe, co-infecção com o HIV e histórico de tratamento para HBV e/ou HIV. **Conclusão:** Antes da terapia ser iniciada é extremamente importante o monitoramento da carga viral e a identificação destas mutações para suportar decisões clínicas sobre o manejo dos pacientes e prevenir a emergência de vírus multi- resistentes.

Palavras-chave: HBV, Vírus da Hepatite B, Resistência, Análogos nucleos(t)ídeos.

SANTOS, Maria Isabel Magalhães A. dos Profile of resistance mutations of hepatitis B virus to analogs of nucleos (t) ide among patients with chronic hepatitis B. 78 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis B virus (HBV) infection is a public health issue. The Brazilian public health system (SUS) has provided antiviral drugs for chronic hepatitis B treatment for over 10 years, but a system for monitoring for drug-related resistance mutations is not available. **Objective:** This study aims to determine the presence of HBV mutations associated with resistance to nucleos(t)ide analogs among 81 patients with chronic HBV infection-naïve and treated from University Hospital Professor Edgard Santos, Salvador-BA (HUPES-UFBA). **Methods:** Briefly, HBV-DNA was PCR amplified with primers deduced from the flanking of the rt domain at the HBV P gene and sequenced using ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, USA). From two to six forward and reverse sequences of each isolate were assembled and conflicting sites were resolved using software CLC Main Workbench v. 5.0 by visual inspection of the electropherograms. Consensus sequence extended 1032 bp and encompassed the entire rt domain (from amino acid 1 to 344). Those sequences were submitted to the HBV drug resistance database (HBVrt DB, Stanford University, USA) to retrieve each mutation according to genotype and treatment. **Results:** HBV genotype A1 (85.2%) was the most prevalent followed by genotype A2 (4.9%), F (6.2%), and C1, D2 and D4 (1.2% each). Six patients (7%) exhibited resistance mutations to LAM, ETV and TDF: two with patterns L180M + M204V and four with other different patterns: L80I + L180M + M204I; L80V + L180M + M204V; M204I; A194T. All of these mutations were present in patients with genotype A (four A1 and two A2). Furthermore, this study found one patient with genotype C, common in East Asian. Of these patients, two were naïve and four had a history of treatment for HIV or HBV. In addition, four mutations in gene S (s1195M three cases with the mutation and one with the mutations W196L) associated with mutations in the rt domain of the P gene were detected, corresponding to a rate of 6% of vaccine escape mutations. Prevalence of drug-related resistance mutations varied according to treatment duration and the level of genetic barrier for the drugs used. **Conclusion:** In this study a strong association was found between the occurrence of HBV resistance mutations and HBeAg positivity, co-infection with HIV and a history of treatment for HBV and / or HIV. Once the drug therapy is initiated it is extremely important to monitor viral load and identify those mutations in order to support clinical decisions about patient management and also to prevent the emergence of multidrug-resistant viruses.

Keywords: HBV, Hepatitis B virus, Resistance, Nucleos(t)ides analogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Aminoácidos que predizem o sorotipo do AgHBs (Echevarri´a 2006)	20
Quadro 2	Associação entre os genótipos e sub-genótipos do HBV e subtipos do AgHBs. (Echevarri´a 2006)	21
Quadro 3	Mutações nos sub-domínios da transcriptase reversa do HBV associados com resistência às drogas disponíveis (Ghany M 2007)	28
Figura 1	A- Organização do genoma e a superposição dos genes do HBV (Echevarri´a 2006). B- Domínios da transcriptase reversa, em destaque a região YMDD (Alan Kay 2007)	19
Figura 2	Distribuição geográfica dos genótipos do vírus da hepatite B Adaptado de (Yun-Fan Liaw 2010)	22
Figura 3	Estimativa da soroprevalência do HBV no mundo (WHO 2012)	23
Figura 4	Desenho do estudo	31
Figura 5.	Gel de eletroforese em agarose a 1,0% dos amplicons com os primers F4 e R3a. MWM - Ladder de 100 bp. 1-15 – amostras. 16-amostra controle positivo.	36
Figura 6	Sumário dos dados de avaliação de uma sequência do HBV contendo as mutações de resistência V84M, A194T e M204V obtidos através do HBVrt DB (Stanford University, USA).	38
Figura 7	Linha do tempo dos pacientes com hepatite B crônica tratados no Complexo HUPES-UFBA, entre 2012 e 2013	43

Figura 8	Genotipagem dos isolados do HBV por análise em árvore filogenética utilizando método NJ.	45
Figura 9.	Alinhamento das sequências das amostras e uma sequência referências (Número de acesso Genbank GQ325766; GI:254763592). A amostra H-574 (N-2) apresenta uma mutação não sinônima L80I do domínio rt do gene P. A amostra H-075 apresenta uma mutação sinônima genótipo específica no mesmo <i>locus</i> .	46
Figura 10.	Alinhamento das sequências das amostras e uma sequência referências (Número de acesso Genbank GQ325766; GI:254763592). As amostras H-574 (N-2), H-549(T-17) e H-572 (T-18) apresentam a mutação L180M e também as mutações M204I/V do domínio rt do gene P.	46
Tabela 1	Características demográficas e clínicas na admissão dos pacientes com hepatite B crônica atendidos no HUPES, 2012-2013	41
Tabela 2	Dados clínico-laboratoriais pré-tratamento dos pacientes tratados com drogas antivirais no HUPES, 2012-2013	42
Tabela 3	Perfil genotípico dos pacientes com mutação de resistências aos análogos de nucleos(t)ídeos	47
Tabela 4	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com hepatite B crônica com/sem mutação, atendidos no HUPES entre 2012-2013	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADV	Adefovir
ALT	Alanina aminotransferase
ATV	Atazanavir sulfato
AZT	Zidovudine
bp	pares de base (do inglês, <i>base pair</i>)
BSA	Albumina de soro Bovino
cccDNA	do inglês covalently closed circular DNA
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEDAP	Centro Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
dNTP	desorribonucleotídeo
ETV	Entecavir
ETR	Etravirine
EFV	Efavirenz
FTC	Emtricitabine
HBV	vírus da hepatite B (do inglês, <i>hepatitis B virus</i>)
HCV	vírus da hepatite C (do inglês, <i>hepatitis C virus</i>)
HDV	Vírus da Hepatite D
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>human immunodeficiency virus</i>)
HUPES	Hospital Universitário Prof. Edgar Santos
INF	interferon
Kb	kilobases (1000 bases)
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública

LAM, 3TC	Lamivudina
LAPI -	Laboratório de Pesquisa em Infectologia
LdT	Telbivudina
LPV	Lopinavir
nts	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	fase de leitura aberta (do inglês, <i>open reading frame</i>)
PCR	Reação de cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
rt	transcriptase reversa (do inglês, <i>reverse transcriptase</i>)
RTV	Ritonavir
SUS	Sistema Único de Saúde
SVR	resposta viral sustentada (do inglês, <i>sustained virologic response</i>)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDF	Tenofovir

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	O VÍRUS DA HEPATITE B (HBV)	18
2.1.1	Sorotipos, Genótipos e Sub-genótipos do HBV	20
2.2	EPIDEMIOLOGIA DO HBV	24
2.3	TRATAMENTO ANTIVIRAL E RESISTÊNCIA	25
3	HIPÓTESES	30
4	OBJETIVO GERAL	31
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	31
5	METODOLOGIA	32
5.1	DESENHO EXPERIMENTAL	32
5.2	LOCAL DO ESTUDO.....	33
5.3	PARTICIPANTES	33
5.4	COLETA E ARMAZENAMENTO DE DADOS	36
5.5	COLETA DE AMOSTRAS.....	36
5.6	CARGA VIRAL DO HBV.....	37
5.7	EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DO HBV DNA POR PCR.....	37
5.8	PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS	39
5.9	MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS E DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO HBV	39
5.10	ANÁLISE DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO GENE RTHBV	40
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	41
6	RESULTADOS	42
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	42
6.2	GENOTIPAGEM O HBV.....	46
6.3	MUTAÇÕES RT E S	48

6.4	DESCRIÇÃO DOS CASOS	50
6.5	IMPLICAÇÕES CLÍNICAS	52
6.6	FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA	53
7	DISCUSSÃO	52
8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	56
8.1	LIMITAÇÕES DO PROJETO	56
9	CONCLUSÃO	57
10	APOIO FINANCEIRO	57
	REFERÊNCIAS	58

APÊNDICE I - Lista das principais mutações da resistência aos antivirais.

APÊNDICE II Tabela dos primers utilizados para amplificação da rt do HBV

APÊNDICE III - Termo de consentimento livre e esclarecido do participante.

APÊNDICE IV – Questionário de Identificação

APÊNDICE VI – Questionário de revisão de prontuário

APÊNDICE VI – Resumo publicado no XXIII Congresso Brasileiro de Virologia.

APÊNDICE VII – Resumo publicado no Congresso Brasileiro de Hepatologia 2013.

ANEXO I - Carta de aprovação do CEP-FIOCRUZ-BA

ANEXO II - Carta de aprovação do CEP-HUPES -BA

1 INTRODUÇÃO

Apesar da segurança e eficácia das vacinas, a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) constitui um problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morte por doença infecciosa no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 1/3 da população mundial já possuiu evidência sorológica de infecção pelo HBV, 350 milhões de pessoas estão infectadas cronicamente e 600.000 morrem a cada ano em consequência da hepatite B aguda ou crônica (KANE, 1995; WHO, 2008). Esta possui um alto risco de desenvolver as formas graves da doença como cirrose, insuficiência hepática, carcinoma hepatocelular e morte. (MADDREY, 2001).

O HBV pertence ao gênero *Orthohepadnavirus* da família *Hepadnaviridae*. Possui genoma de DNA parcialmente dupla fita com aproximadamente 3.200 nucleotídeos (nts.). Embora o HBV seja um vírus de DNA, necessita da atividade da transcriptase reversa durante o ciclo de replicação viral. Sabe-se ainda que os erros promovidos pela transcriptase reversa durante a replicação geram uma taxa de aproximadamente 1,4 a 3,2 x 10⁻⁵ substituições de nucleotídeos (nt.) por ano (Locarnini 1990). Esta taxa é considerada a mais alta entre os vírus de genoma DNA (DUFFY, 2008). Este fenômeno é responsável pela formação de grupos heterogêneos de seqüências do genoma viral num mesmo hospedeiro conhecidas como quasiespécies virais.

Sob a ação das drogas antivirais, a população quasiespécie do HBV pode evoluir selecionando formas mutantes resistentes às drogas ministradas. A fim de evitar a emergência de resistência e guiar nas decisões terapêuticas faz-se necessário o contínuo acompanhamento dos pacientes durante o tratamento

antiviral. Portanto, mutações virais possuem repercussões virológicas, laboratoriais e clínicas que podem finalmente determinar a falha terapêutica (MARTELL, 1992; CHEN, 2002).

Nos últimos vinte anos, avanços significativos no tratamento da hepatite B crônica vêm ocorrendo, inicialmente pelo emprego do Interferon-alfa (INF-alfa), que possibilitou mudar a história natural da doença, e mais recentemente pelo uso Interferon-peguilado (INF-peg), que beneficiou os pacientes por sua administração em dose única (1 dose/semana). Entretanto, os INFs tem uso restringido devido ao custo elevado e, principalmente, pelos seus efeitos colaterais. Esta limitação não ocorre com o uso dos análogos de nucleos(t)ídeos. Entretanto, como mencionado anteriormente, o uso por tempo prolongado de análogos de nucleos(t)ídeos pode determinar a emergência de cepas resistentes à droga (exemplo, mutantes YMDD). Isto pode ocorrer em até 32% dos pacientes com antígeno “e” do HBV reagente no soro (AgHBe ou proteína nuclear), após um ano de tratamento, podendo atingir 70% dos pacientes após quatro ou cinco anos de tratamento com Lamivudina (LAM). O advento das mutações, que conferem resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos, costumam agravar o quadro de hepatite B crônica, trazendo de volta o risco das complicações decorrentes do aumento da atividade necro-inflamatória hepática (“*flares*”) (THOMPSON, 2006).

Além disso, a resistência a uma droga pode predispor à resistência cruzada a outras drogas gerando, portanto, muitos pacientes infectados por vírus multi-resistentes. Sabe-se também que mutações na transcriptase reversa (região alvo dos análogos de nucleos(t)ídeos) predispõem mutações no gene S do HBV favorecendo um possível escape vacinal (LACOMBE, 2013).

A literatura científica internacional tem investido em pesquisas sobre rastreamento de resistência em variantes genotípicas do HBV que não correspondem às encontradas no Brasil. Por esse motivo, este estudo pode contribuir pela associação da resistência com os genótipos A1 e F.

Diante deste contexto e com o intuito de beneficiar os pacientes com hepatite B crônica é de grande importância o acompanhamento do tratamento antiviral: para o paciente, que recebe um tratamento de difícil aderência devido à necessidade de um tempo prolongado de uso; e para o médico e o sistema de saúde, que passam a ter um parâmetro técnico para avaliar os protocolos do tratamento, na decisão por um tratamento mais eficiente e com menos ônus ao sistema de saúde.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O VÍRUS DA HEPATITE B (HBV)

O HBV, também conhecido como partícula de Dane, pertence ao gênero *Orthohepadnavirus* da família *Hepadnaviridae*. O HBV possui um envelope glicolipoprotéico, um capsídeo icosaédrico e um genoma DNA (HBV-DNA) de fita dupla circular incompleta, sendo a fita negativa completa e a fita positiva incompleta. A fita positiva compreendendo cerca de dois terços $2/3$ do comprimento da fita negativa, sendo de tamanho variável entre os isolados (Madigan 2003).

O HBV-DNA tem um comprimento de aproximadamente 3.200 nucleotídeos (nts.) e possui quatro regiões de leitura aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) que se superpõem: Pré-S1/Pré-S2/S, Pré C/C, X e P. O gene S é responsável pela codificação das três proteínas do envelope ou de superfície sendo

elas: pequena (S), média (M), grande (L) que constituem os antígenos de superfície do HBV (AgHBs); o gene C que codifica a proteína do core (AgHBc) e o AgHBe; o gene X, que codifica a proteína X; e o gene P, que codifica a polimerase viral (Figura 1). A polimerase viral possui três domínios: DNA polimerase, transcriptase reversa e RNAase. Para melhor descrever as mutações neste gene, o domínio da transcriptase reversa foi sub-dividido em 7 sub-domínios classificadas de A-G (Figura 1) (MADIGAN, 2003; SHELDON, 2006). Mutações neste gene produzem um grande aumento na síntese do DNA viral e risco de carcinogênese hepática (ZHU, ZHANG et al., 2008)

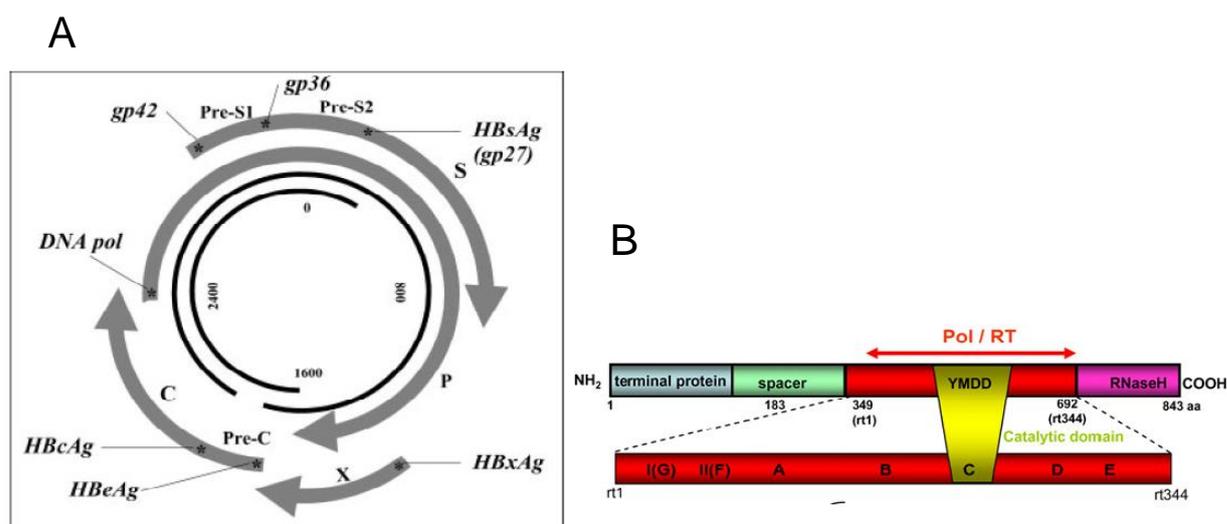


Figura 1. A- Organização do genoma e a superposição dos genes do HBV (Echevarría 2006). B- Domínios da transcriptase reversa, em destaque a região YMDD (Alan Kay 2007).

A replicação do HBV ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que o vírus liga-se a um receptor ainda desconhecido na célula hepática do hospedeiro através das proteínas L, M e S. Ao penetrar na célula, o HBV perde o envelope e o core, o DNA do HBV (HBV-DNA) é transportado até o núcleo, onde é convertido em uma molécula de DNA circular fechado covalentemente (cccDNA, do inglês *covalently closed circular DNA*) pelo próprio sistema de reparo da célula do

hospedeiro. O cccDNA servirá como molde para a transcrição dos RNAm pré-genômicos e para síntese das proteínas de superfície, do core, X e polimerase. Os RNAm pré-genômicos migram para o citoplasma e produzem a fita negativa do DNA, pela ação da transcrição reversa viral, formando um complexo RNA/DNA. Então, a fita negativa do DNA servirá como molde para a síntese da fita positiva incompleta pela ação da polimerase viral. Por fim, o HBV-DNA é envelopado para produzir novas partículas virais ou penetra novamente no núcleo, para manter o ciclo de replicação viral (LOK, 2001; MADIGAN, 2003).

2.1.1 Sorotipos, Genótipos e Sub-genótipos do HBV

A classificação do HBV foi baseada, inicialmente, em diferenças na seqüência de aminoácidos da AgHBs. Estes critérios dividiram o HBV em quatro sorotipos principais: adr, adw, ayr e ayw, onde as variantes d/y e w/r correspondiam a substituições de lisina (Lys) ou arginina (Arg) nas posições 122 e 160 do AgHBs. A incorporação da análise de novas diferenças expandiu esta classificação em nove sorotipos conhecidos como: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw3 adw4q (-), adrq e adrq (-) (Quadro 1) (OKAMOTO, 1987; NORDER, 1992). A identificação dos sorotipos permitiu distinguir isolados com distribuição geográfica mundial e foi utilizado para fins de epidemiologia. O determinante “a” é conservado entre os diferentes sorotipos e é utilizado na produção da vacina contra o HBV, devido ao seu papel antigênico na produção de anticorpos neutralizantes do AgHBs (OKAMOTO, 1987).

Quadro 1. Aminoácidos que predizem o sorotipo do AgHBs (Echevarri'a 2006).

Posição dos aminoácidos no AgHBs							Sorotipos do AgHBs
122	127	134	159	160	177	178	
Lys	Pro	Phe	Ala	Lys	Val	Pro	adw2
Lys	Thr	Phe	Ala	Lys	Val	Pro	adw3
Lys	Leu	Phe	Gly	Lys	Val	Gln	adw4q-
Lys	Pro	Phe	Ala	Arg	Val	Pro	adr
Lys	Pro	Phe	Val	Arg	Ala	Pro	adrq-
Arg	Pro	Phe	Ala	Lys	Val	Pro	ayw1
Arg	Pro	Tyr	Gly	Lys	Val	Pro	ayw2
Arg	Thr	Phe	Gly	Lys	Val	Pro	ayw3
Arg	Leu/Ile	Phe	Gly	Lys	Val	Pro	ayw4
Arg	Pro	Phe	Ala	Arg	Val	Pro	ayr

Com o desenvolvimento da biologia molecular, a determinação dos sorotipos do AgHBs foi substituída pela análise filogenética de seqüências de nucleos(t)ídeos do HBV-DNA. Atualmente, o HBV-DNA é classificado em oito genótipos (de A a H) e nove subtipos, com base nas diferenças das seqüências de nucleotídeos do gene S ou do genoma completo. Utiliza-se como padrão que diferentes genótipos devem apresentar uma divergência $\geq 8\%$ e que a determinação dos sub-genótipos, de um mesmo genótipo, devem apresentar divergência $> 4\%$ em sua seqüência de nucleotídeos (Okamoto H 1988; Norder H 1994; Stuyver L 2000; Arauz-Ruiz P 2002). Abaixo segue uma comparação entre os sistemas de classificação genotípico e por sorotipagem (Echevarri'a 2006) (Quadro 2).

Quadro 2. Associação entre os genótipos e sub-genótipos do HBV e subtipos do AgHBs. (Echevarri'a 2006).

Genótipos do HBV	Sub-genótipos	Sorotipos AgHBs
A	A2	adw2
	A1	ayw1, adw2
B	B1, B2, B3	adw2
	B4	ayw1
	B2	adw3
C	C1, C2, C4	adr
	C3	adrq-
	C1, C2	ayr
	C1, C3	adw2

	C4	ayw3
D	D1,D3,D4 D2,D3 Nao identificado D2	ayw2 ayw3 adw3 ayw4
E	-	ayw4
F	F1,F2 F1,F2	adw4q- ayw4
G	-	adw2
H	-	ayw4

O genótipo A normalmente é identificado em indivíduos brancos e negros encontrados no noroeste da Europa, América do Norte, regiões da África e no Brasil; os genótipos B e C em indivíduos asiáticos do extremo leste, China e Japão; o D é encontrado em todo o mundo, mas prevalece em países dos Bálcãs, Oriente Médio, podendo entender-se até a Índia; o genótipo E está restrito a áreas do oeste sub-Saara; o genótipo F é predominante entre ameríndios da América Central e do Sul; o genótipo G é encontrado nos EUA e França e o genótipo H foi recentemente encontrado na América Central (Echevarría 2006; Mitre 2010). No Brasil, os genótipos A, D e F são os mais prevalentes, com registros esporádicos do genótipo G (FILHO 2005; BOTTECCHIA 2008; HADDAD 2010) (Figura 2).

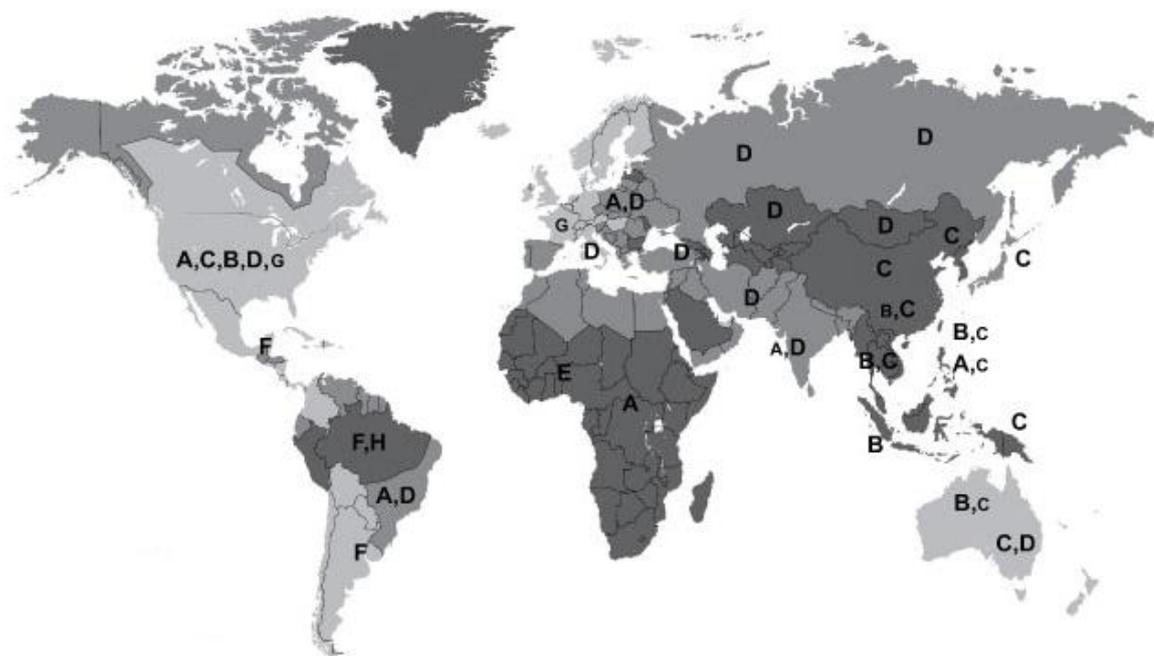


Figura 2. Distribuição geográfica dos genótipos do vírus da hepatite B Adaptado de (Yun-Fan Liaw 2010).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE B

A hepatite B é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 1/3 da população já possuiu evidência sorológica de infecção pelo HBV, mais de 350 milhões de pessoas estão infectadas cronicamente e 600.000 morrem a cada ano em consequência da Hepatite B aguda ou crônica (Kane 1995; WHO 2008). No Brasil estima-se uma soroprevalência de 2,6% (Toledo AC Jr 2005). A região do Acre encontra uma alta endemicidade, com uma soroprevalência em torno de 3,3% a 5,5%, enquanto no estado da Bahia a soroprevalência é de 1,3% (Tavares-Neto J 2004; Toledo AC Jr 2005; Matos SB 2013).

Embora as pessoas infectadas cronicamente pelo HBV se encontrem espalhadas por varias regiões do mundo, apresentam-se como áreas endêmicas o Sudeste Asiático, a África Central, a região do pacífico Sul e algumas populações indígenas do norte do Alaska e norte do Canadá (Figura 3) (André 2000; LOK 2001). No Brasil, há uma alta endemicidade na região Amazônica, Espírito Santo e oeste de Santa Catarina (Toledo AC Jr 2005), enquanto que a região Nordeste destaca-se com uma endemicidade intermediária (Brasil 2008).

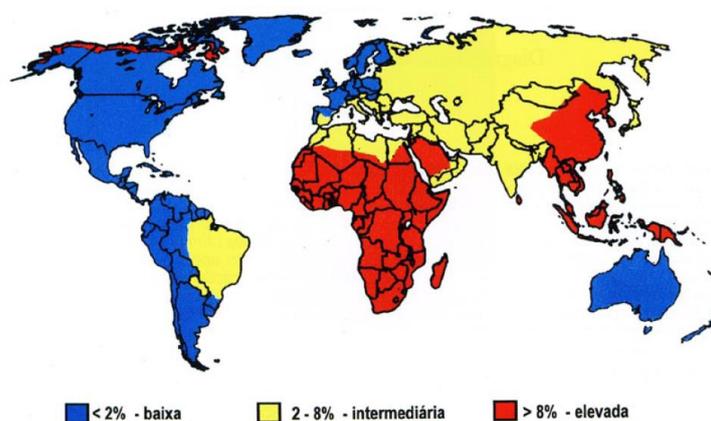


Figura 3. Estimativa da soroprevalência do HBV no mundo (FERREIRA 2000)

O HBV possui um tempo de incubação de aproximadamente quatro meses (45 - 180 dias) e pode ser transmitido por via percutânea, através de mucosas ou fluidos biológicos contaminados (Alter HJ 1977; Brasil 2008). Sendo assim, a transfusão sanguínea, hemoderivados, transplante de órgãos de pessoas contaminadas, o compartilhamento de seringas, lâminas de barbear, tatuagens, *piercings* e relações sexuais podem ser consideradas como fatores de risco para transmissão do HBV (Brasil 2008). Entre os grupos de risco destacam-se os usuários de drogas injetáveis e homens que fazem sexo com homens (Goldstein ST 2002).

É válido ressaltar que o HBV pode ser transmitido, ainda que em menor escala, pela transmissão nosocomial, entre os pacientes hemodialisados (Quale JM 1998), ocupacional entre profissionais de saúde (Antono SK 2010) e em maior escala através da transmissão vertical (Zahran KM 2010).

Com medidas eficazes de prevenção, tais como: cumprimento das normas de biossegurança, vacinação (Ni YH 2001) e controle de infecção nas salas de hemodiálise (Quale JM 1998), a transmissão do HBV tem sido bastante reduzida entre profissionais de saúde e hemodialisados. As transmissões ocupacional e vertical do HBV podem ser prevenidas pela utilização de imunoglobulina anti-hepatite B injetável, e a transmissão sexual pela prática de sexo seguro com utilização do preservativo (DE SOUZA 2002; Brasil 2008).

2.3 TRATAMENTO ANTIVIRAL E RESISTÊNCIA

A Hepatite B pode causar infecção aguda ou crônica. Não existe tratamento específico para as formas agudas da hepatite B. O uso de medicações sintomáticas para vômitos e febre deve ser realizado quando pertinente. Entretanto, faz-se

necessária a máxima atenção quanto às medicações utilizadas, já que se deve evitar o emprego de drogas que tenham potencial hepatotóxico. O repouso é medida imposta pela própria condição do paciente (Brasil 2008)

A infecção crônica pelo HBV acomete cerca de 5% a 10% dos indivíduos infectados adultos. A infecção crônica está associada com a persistência do AgHBs por mais de seis meses no sangue, com nível de replicação viral variável, e resposta inflamatória no fígado de moderada a grave. Na história natural da infecção, alguns indivíduos têm chance de progredir para cirrose ou câncer de fígado (Maddrey 2001). Por esta razão, a orientação para o não consumo de bebidas alcoólicas, prevenção da co-infecção com HIV, com VHC, controle de distúrbios metabólicos como obesidade e diabetes, são essenciais.

Entretanto, apenas uma baixa porcentagem dos casos de hepatite crônica B necessitará de tratamento, conforme o grau de comprometimento hepático, evidenciado através de exames anatomopatológicos e através do acompanhamento de marcadores de lesão hepática, como os níveis de transaminases. No Brasil, o tratamento com antivirais na hepatite B é indicado apenas para indivíduos: com idade superior a dois anos; presença do AgHBs por mais de seis meses; presença do AgHBe ou HBV-DNA $> 10^4$ cópias/mL; níveis de alanina aminotransferase (ALT) superiores a duas vezes o limite superior do valor de referência; e, ter realizado biópsia hepática nos últimos 24 meses, com evidências de atividade necro-inflamatória de moderada a intensa e presença de fibrose portal com septos, sem ou com cirrose, pela classificação proposta pela Sociedade Brasileira de Patologia, que corresponde a $\geq A2$ e/ou $\geq F2$ na escala METAVIR, respectivamente (DE SOUZA 2002; Brasil 2008).

O objetivo do tratamento com antivirais é alcançar a resposta virológica sustentada, com supressão da replicação do HBV-DNA e negatização da carga viral após a suspensão do tratamento, apresentando uma resposta bioquímica, normalização dos níveis de ALT, soroconversão do AgHbe para anti-Hbe, melhora histológica do fígado e diminuição da progressão dos danos hepáticos.

Entre as opções farmacológicas para o tratamento do HBV, estão disponíveis, os Interferons (INF) convencionais e peguilados (INF-alfa e INF-peg) e os análogos de núcleos(t)ídeos. Entre os análogos de núcleos(t)ídeos aprovados pelo Ministério da Saúde do Brasil, encontram-se a Lamivudina (LAM), Adefovir (ADV), Tenofovir (TDF), Entecavir (ETV), todos com a capacidade de interferir na atividade da transcriptase reversa da polimerase viral.

Os INFs foram as primeiras drogas utilizadas no tratamento dessas infecções podendo levar a resposta sustentada (perda do HBV-DNA e do AgHbe) em até um terço dos casos tratados. De acordo com vários estudos, o uso do INF por um período de quatro a seis meses induz uma remissão em torno de 25% a 40% dos pacientes tratados (Janssen HL 1999). Estudos de meta-análise, todos randomizados, revelaram um efeito benéfico e significativo do INF-alfa observando-se remissão em 33% dos pacientes tratados com esta droga, quando comparado com os índices de 12% entre os controles. Um dos maiores problemas com uso do INF, além do alto custo financeiro, estaria relacionado aos diversos efeitos colaterais observados durante o tratamento (Wong, Cheung et al. 1993).

Alguns análogos de núcleos(t)ídeos têm mostrado uma maior aceitação, segurança, menos contra-indicações e efeitos colaterais quando comparados ao INF-alfa e ao INF-peg (LOK 2001; DE SOUZA 2002). Entretanto, a resposta virológica sustentada (RVS) normalmente não é atingida após o período de um ano,

levando a tratamentos mais longos ou mesmo com prazo indeterminado. Apesar da eficácia na atividade antiviral, o uso prolongado dos análogos de núcleos(t)ídeos, principalmente a LAM, tem demonstrado o potencial para o desenvolvimento de resistência do HBV (DA SILVA 2000; THOMPSON 2006; BOTTECCHIA 2008; HADDAD 2010).

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

Mutações no genoma do HBV induzidas pela LAM têm sido descritas. Destacam-se as substituições na posição rt204, que inicia a região YMDD no domínio C da polimerase viral (THOMPSON 2006; HADDAD 2010). É válido ressaltar que o tratamento com outros análogos de núcleos(t)ídeos, como o ADV também pode induzir mutações na região da polimerase viral e, por isso, as mutações rtI233V e rtA184V são prováveis responsáveis pela resistência do HBV a este medicamento. (KIM 2010; SCHILDGEN 2010) (Quadro 3)

Quadro 3. Mutações nos sub-domínios da transcriptase reversa do HBV associados com resistência às drogas disponíveis (Ghany M 2007).

Droga	Domínio A	Domínio B	Domínio C	Domínio D	Domínio E
Lamivudina	rtL80V/I	rtI169T, rtV173L, rtL180M, rtA181T, rtT184S	rtM204V/I/S, rtQ215S	-	-
Telbivudina	-	-	rtM204I	-	-
Adefovir	rtV84M, rtS85A	rtA181T/V	rtV214A, rtQ215S	rtI233V, rtN236T, rtP237H	-
Tenofovir	-	rtA194T	-	-	-
Entecavir		rtI169T, rtS184S/A/I/L/F/G	rtS202G/I	-	rtM250V

Entre os fatores preditivos de resistência do HBV à LAM, destacam-se: sexo feminino, presença do HBV-DNA por mais de seis meses no soro, níveis de ALT superior ao limite normal, tempo de tratamento e mutação G1896A na região pré-core (THOMPSON 2006). Sabe-se ainda que os pacientes AgHBe positivos possuem uma carga viral mais elevada do que os AgHBe negativos (THOMPSON 2006). Estes dois fatores tem sido relacionados a uma pior resposta a monoterapia com LAM e um alto risco de desenvolvimento de resistência (DA SILVA 2000). Embora ainda existam poucos estudos, acredita-se que o genótipo também possa ter influência no desenvolvimento de resistência a este antiviral (ZOLLNER 2004; BOTTECCHIA 2008; HADDAD 2010). Finalmente, a resistência promovida pela monoterapia da LAM pode desencadear resistência do HBV aos demais análogos de nucleos(t)ídeos, a exemplo do ADV (SCHILDGEN 2010).

3 HIPÓTESES

- Não são esperadas mutações de resistência entre pacientes virgens de tratamento ou em pacientes que foram tratados exclusivamente com INF;
- A prevalência de mutações de resistência do HBV aos análogos de nucleos(t)ídeos (LAM, ETV, ADV e TDF) está associada com tratamento prolongado, genótipo, carga viral, presença do AgHBe e ALT elevada pré-tratamento.

4 OBJETIVO GERAL

Descrever o perfil de mutações do HBV associadas ao desenvolvimento de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos (LAM, ETV, ADV e TDF) entre pacientes com infecção crônica pelo HBV;

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a distribuição genotípica do HBV entre os pacientes com infecção crônica em Salvador;
- Determinar a frequência de mutações de resistência do HBV aos análogos de nucleos(t)ídeos em isolados de pacientes virgens de tratamento e tratados com INF-alfa e os diferentes análogos de nucleos(t)ídeos;
- Avaliar a associação entre tempo de tratamento, genótipo, carga viral, presença de AgHBe, e níveis de ALT pré-tratamento, com o risco de desenvolvimento de mutações de resistência do HBV aos análogos de nucleos(t)ídeos.

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a presença de mutações de resistência associadas com o escape à vacina contra o HBV.

5 METODOLOGIA

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O estudo é do tipo corte transversal e possui: um componente descritivo, representado pela avaliação da frequência das mutações de resistência do HBV aos análogos de nucleos(t)ídeos (LAM, ETV, ADV e TDF) entre os pacientes com infecção crônica virgens de tratamento e tratados; e um componente analítico, do tipo caso-controle, representado pela análise de associação entre tratamento, parâmetros bioquímicos e virológicos e o risco no desenvolvimento de mutações de resistência do HBV aos análogos de nucleos(t)ídeos.

A Figura 4 traz o desenho do estudo com as principais etapas do projeto:

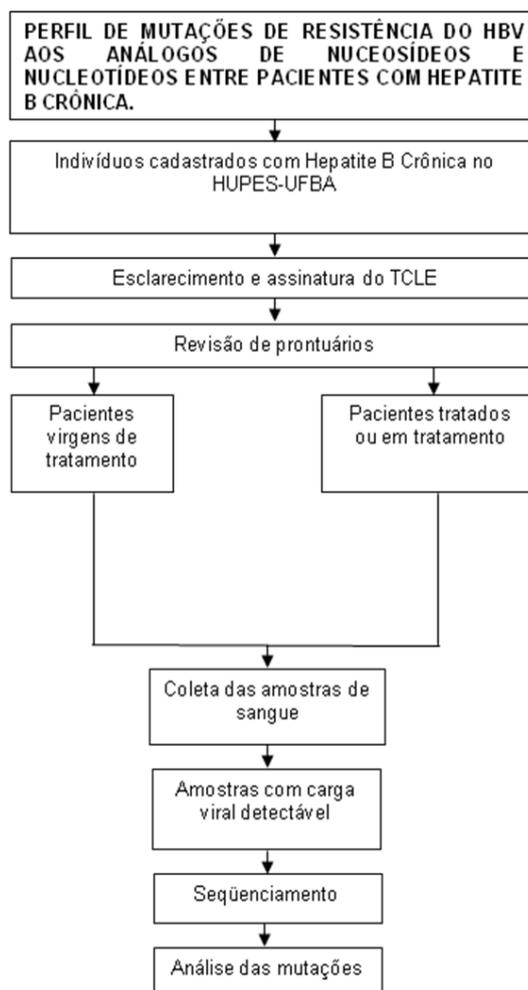


Figura 4. Desenho do estudo.

5.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA), Salvador-BA, em colaboração com Serviço de Hepatologia do Ambulatório Magalhães Neto, Hospital Universitário Prof. Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia (HUPES-UFBA), Salvador-BA, Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI-BA), Salvador-BA e o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-BA), Salvador-BA.

5.3 PARTICIPANTES

Participam do estudo pacientes com hepatite B crônica provenientes do Ambulatório Magalhães Netto do Complexo HUPES-UFBA virgens de tratamento ou tratados.

Critérios de:

- **Inclusão:** Foram recrutados todos os pacientes HBV-DNA detectável acompanhados no Hospital Professor Edgar Santos que fizeram coleta de sangue no setor NECBA, para a realização da carga viral, no período de julho de 2012 a maio de 2013 com presença de AgBHs por mais de seis meses, com exame confirmatório molecular representado pelo HBV-DNA qualitativo, virgens de tratamento ou tratados com análogos de nucleos(t)ídeos (LAM, ETV, ADV e TDF), que concordaram concordar em participar do estudo e manifestaram seu consentimento mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, APÊNDICE II) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da FIOCRUZ-BA e HUPES-UFBA. Para os menores de 18 anos, o consentimento foi assinado pelos pais ou responsáveis legais, e para os participantes iletrados, o consentimento foi obtido através da impressão digital. **IMPORTANTE:** A aprovação do projeto pelos CEP foi anterior à Resolução CNS 466/2012 que propõe o termo de assentimento para menores (II.2; II.24), por esta razão o mesmo não foi aplicado.
- **Não-inclusão:** Pacientes com carga viral indetectável na época da coleta da amostra de soro/plasma devido ao clareamento espontânea da infecção, flutuação da carga viral ou por resposta virológica sustentada ao tratamento.
- **Exclusão:** Pacientes com carga viral abaixo do limite de detecção dos métodos validados nesta pesquisa (160 cópias/mL ou 2 logs/mL).

Participantes que decidissem afastar-se do estudo por vontade própria (não tivemos perdas por este motivo);

- Pacientes internados que se encontrassem em um estado de inconsciência total ou parcial que não permitisse compreender os esclarecimentos e manifestar seu consentimento.

Definições de caso:

- Indivíduos com infecção crônica pelo HBV: indivíduo com persistência do marcador AgHBs por mais de 6 meses no soro;
- Falha primária do tratamento: ausência de redução da carga viral de mais de 1 log (cópias/mL) após seus primeiros meses de tratamento;
- Falha secundária do tratamento: aumento da carga viral em mais de 1 log (cópias/mL) acima do nível mais baixo atingido pela carga viral (“nadir”) em duas mensurações com intervalo mínimo de 1 mês;
- Resistência genotípica: Detecção de mutações não-sinônimas no domínio rt da polimerase do HBV, que foram associadas com o desenvolvimento de resistência do HBV aos análogos de nucleos(t)ídeos.

Cálculo do tamanho amostral:

O tamanho amostral de 60 indivíduos foi calculado utilizando-se o programa Statcalc (Epiinfo 3.54, CDC, Atlanta, EUA), levando-se em consideração o número de 356 pacientes tratados no HUPES em 2012 (dados obtidos no Hospital Manoel Vitorino, responsável pela dispensação dos medicamentos), a taxa de mutações de resistência à LAM no primeiro ano de tratamento de 6% (pior 0,5%) e o intervalo de confiança de 95%.

5.4 COLETA E ARMAZENAMENTO DE DADOS

O presente trabalho utilizou dois questionários como ferramenta para coleta de dados: questionário de identificação (RESVHB-id, APÊNDICE III) e questionário de revisão de prontuário (RESVHB-rp, APÊNDICE IV). Sexo e idade, além de dados clínicos, tais como, resultados de exames (dosagem da carga viral, aminotransferase, biópsia hepática), histórico de tratamento, co-infecção (HCV e HIV) foram registrados. Estes questionários foram aplicados em um estudo piloto com 20 pacientes atendidos no HUPES-UFBA para sua validação. Os dados provenientes das entrevistas e revisões dos prontuários foram cadastrados num banco de dados protegido por senha disponível na FIOCRUZ e acessível apenas pelos membros da pesquisa (REDCap, Vanderbilt University, EUA).

5.5 COLETA DE AMOSTRAS

Foi colhida uma amostra de sangue, de cada participante, para a realização dos exames descritos a seguir. A coleta foi feita em tubo a vácuo não aditivado de

10 mL através de punção venosa por um profissional de saúde capacitado. As amostras foram processadas dentro de 2H da coleta para separação do soro, posteriormente aliquotado e congelado em freezer -80C até o uso, para prevenir a degradação do DNA viral.

5.6 CARGA VIRAL DO HBV

A carga viral do HBV foi realizada no LACEN-BA através do sistema automatizado Cobas® TaqMan (Roche,USA).

5.7 EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DO HBV DNA POR PCR

O DNA total foi extraído de 200 μ L de cada amostra de soro utilizando-se o kit High Pure Viral Nucleic Acid Kit (ROCHE,EUA) conforme as orientações do fabricante. A escolha deste kit deveu-se ao seu bom desempenho na recuperação e pureza do DNA medidos através do quantificador Qubit Fluorometer quando comparado à de outros dois kits similares testados (dados não apresentados).

Para amplificar toda a região da transcriptase reversa (rt) do gene da polimerase viral foram testados primers previamente publicados e primers novos.

Duas regiões superpostas compreendendo todo o domínio da rt foram amplificadas utilizando-se os primers, que apresentaram o melhor desempenho, C-F e S-R2A, e RT-F4 e RT-3a (Apêndice II).

A amplificação utilizando os primers C-F e S-R2A foi realizada com um volume de 60 μ L contendo 5 μ L do DNA extraído, 1x PCR-Buffer sem $MgCl_2$, 0,20mM de cada dNTPs, 1,5 $MgCl_2$, 0,3 μ M de cada primer e 0,02 U/ μ L da Platinum Taq

Polymerase. A mistura de reagentes foi aquecida a 94°C por 2 min; seguindo-se de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos; e por fim mais uma etapa a 72°C por 5 minutos para o término de extensão das fitas já amplificadas. Amplificação com os primers RT-F4 e RT-3a foi realizada com 60 µl com as mesmas condições da reação proposta com a temperatura de anelamento de 59°C.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, pré-corados com SyBR Safe (Invitrogen, EUA) e visualizados com o auxílio de um transluminador sob luz azul (Figura 5).

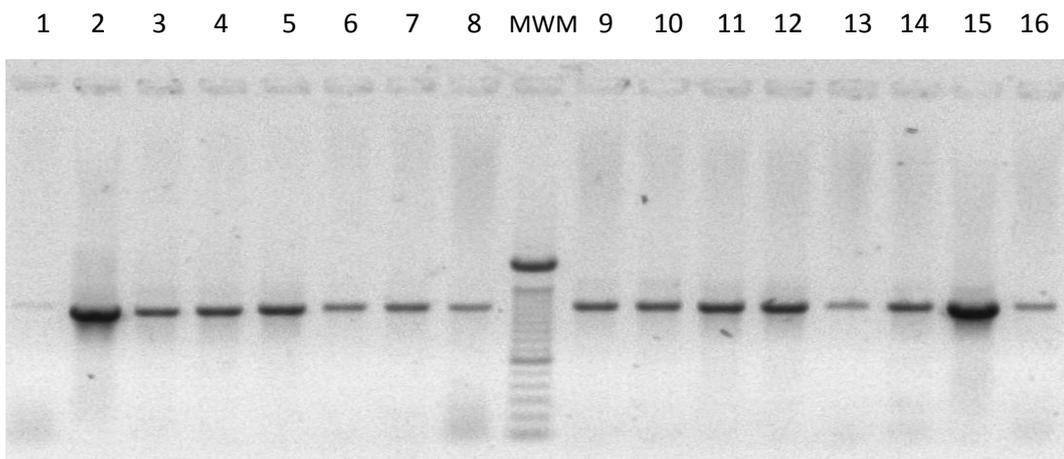


Figura 5. Gel de eletroforese em agarose a 1,0% dos amplicons com os primers F4 e R3a. MWM - Ladder de 100 bp. 1-15 – amostras. 16-amostra controle positivo.

Amostras com carga viral acima de 160 cópias/mL foram eficientemente amplificadas neste estudo.

5.8 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS

A purificação dos produtos do PCR foi realizada utilizando o *PureLink PCR Purification Kit* (Invitrogen, EUA) de acordo com as orientações do fabricante. O material foi enviado para seqüenciamento do gene da polimerase pelo método Big-dye terminator (ABI 3730).

5.9 MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS E DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO HBV

O mínimo de quatro sequências (max. 6) de cada isolado foram montadas juntamente com uma sequência referência genótipo A1 ou F (número de acesso no Genbank AB116092 e AY090459, respectivamente). As análises foram realizadas inicialmente utilizando-se software livre Staden Package e posteriormente, os resultados foram confirmado na Plataforma de Bioinformática da FIOCRUZ-BA utilizando-se os software CLC Main Workbench v. 6.9 por inspeção visual dos eletroferogramas e correção de sítios conflitantes. Para esta análise foi utilizada a função “assemble sequences to reference” e os parâmetros padrões do programa. Os contigs apresentaram um tamanho de 1032 pb (correspondendo aos aminoácido 1-344 da rt do HBV) (Stuyver L 2000). A sequência consenso de cada isolado foi comparada com sequências referência do HBV disponíveis no banco de dados HBVrt DB (Rhee, Margeridon-Thermet et al. 2010) para genotipagem. As sequências foram também analisadas no programa MEGA V. 5.05 através do algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ) e análise de *bootstrap* utilizando 100 replicatas (Tamura K 2011).

5.10 ANÁLISE DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO GENE RTHBV

As mutações de resistência aos antivirais para hepatite B crônica localizadas na rtHBV L80V/I, V84M, I169T, V173L, L180M, A181V/T, T184G, A194T, S202G/I, M204I/V/S, I233V, N236T e M250V (Apêndice I) foram pesquisadas utilizando-se uma ferramenta online disponível no banco de dados rtHBV DB (Stanford University, USA) (Rhee, Margeridon-Thermet et al. 2010) (Figura 6). Os resultados foram confirmados utilizando-se um programa desenvolvido neste estudo em Excel (Microsoft, EUA). O referido software também permitiu pesquisar as mutações com impacto no escape vacinal associadas às mutações na rt, localizadas no gene S rtM204I (sW196*/S/L), rtM204V (sI195M), rtL180M1+rtM204V/I (nenhuma mutação rtL180M), ou rtV173L+rtL180M+rtM204V/I (sE164D, sI195M).

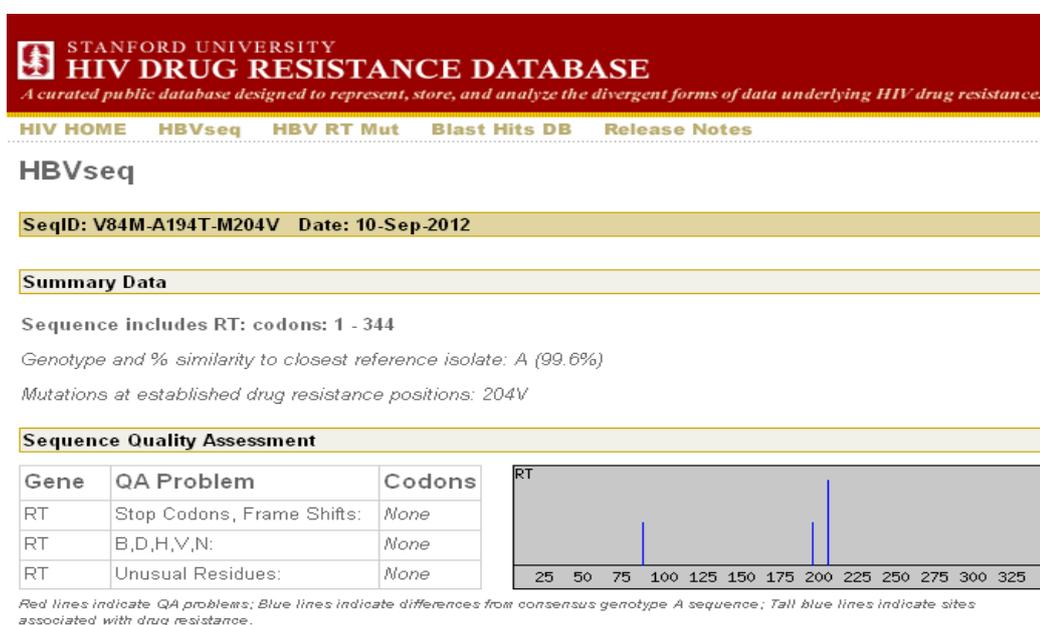


Figura 6. Sumário dos dados de avaliação de uma sequência do HBV contendo as mutações de resistência V84M, A194T e M204V obtidos através do HBVrt DB (Stanford University, USA).

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para análise estatística foi utilizado o programa SPSS 21 (IBM, EUA). Os eventos de interesse foram descritos através de frequências e de medidas de tendência central (média) e dispersão (desvio-padrão). Para a comparação de proporções foi utilizado o teste Chi-quadrado (corrigido por Yates) ou teste exato de Fisher quando recomendado. O *odds ratio* (OR) foi calculado utilizando-se o método dos produtos cruzados. Em todos os testes estatísticos foi adotado um nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Foram recrutados todos os pacientes HBV-DNA detectável acompanhados no Hospital Professor Edgar Santos que fizeram coleta de sangue no setor NECBA, para a realização da carga viral, no período de julho de 2012 a maio de 2013. Um total de 81 pacientes apresentaram carga viral acima de 160 cópias/mL que permitiu a pesquisa de mutações de resistência do HBV pelo método padronizado como descrito acima. Além disso, 90% (73/81) tinham prontuários no HUPES, que permitiu realizar a revisão dos dados clínicos e laboratoriais. A casuística apresentou uma maior frequência (56%) de indivíduos do sexo masculino com idade média (anos) $44,2 \pm 14,3$ (DP = desvio padrão). Foi possível observar que a maioria dos pacientes são mono-infectados pelo HBV e fibrose F1 - F3 (Tabela 1).

Entre os pacientes soropositivos para outras infecções, três portadores do HIV receberam tratamento com LAM primariamente para esta infecção e, por isso, foram incluídos no grupo de pacientes tratados. Contudo é válido ressaltar que apenas um paciente soropositivo para o HIV ainda aguarda resultado da biopsia para iniciar o tratamento para HBV. Apenas 25% (18/73) dos pacientes com hepatite B crônica tinham histórico de tratamento antiviral prévio ou em curso. O tratamento foi administrado entre pacientes predominantemente do sexo masculino (78%), com AgHBe positivo (73%), ALT alterada (72%), fibrose F1 - F3 (100%), conforme os dados obtidos na admissão (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas e clínicas na admissão dos pacientes com hepatite B crônica atendidos no HUPES, 2012-2013.

Características na admissão	Histórico de tratamento				Total	
	Naive N=55 [†] (%)	Média ± DP	Tratados N = 18 [†] (%)	Média ± DP	N = 73 [†] (%)	Média ± DP
Sexo						
Masc.:Fem.	27:28 (49:51)		14:4 (78:22)		41:32 (56:44)	
Idade (anos)		43,9 ± 14,2		46,9 ± 14,7		44,2 ± 14,3
Min. – Max.		17 – 71		18 - 76		17 - 76
Sorologia pos.						
AgHBe	5/45 (11)		11/15 (73)		16/60 (27)	
anti-HCV	1/39 (3)		0/16 (0)		1/55 (2)	
anti-HIV	0/28 (0)		3/13 (23)		3/41 (7)	
anti-HTLV I/II	1/18 (6)		1/7 (14)		2/25 (8)	
ALT		88,8 ± 332,1		73,4 ± 48,5		84,7 ± 284,9
> VR = 41 UI/dL	18/48 (38)		13/18 (72)		31/66 (47)	
Biopsia/Elastografia						
F0	3/8 (37)		0/7 (0)		3/15 (20)	
F1-F3	5/8 (63)		7/7 (100)		12/15 (80)	
F4	0/8 (0)		0/7 (0)		0/15 (0)	
Esteatose	13/25 (52)		3/7 (43)		16/32 (50)	

† Total varia conforme disponibilidade do dado. DP = desvio padrão.

Os dados clínico-laboratoriais pré-tratamento e o histórico de tratamento encontram-se na Tabela 2. A revisão do prontuário não foi possível em um paciente. A soropositividade do AgHBe e os níveis de ALT mantiveram-se praticamente inalterados entre a admissão e o pré-tratamento. Um dos pacientes não pesquisou o AgHBe no pré-tratamento, porém este era positivo na admissão. A média da carga viral do HBV foi de $7,3 \pm 7,6$ log/mL, muito superior a 2.000 cópias/mL ou 3 log/mL, valor que é preconizado pelos protocolos do Ministério da Saúde como um dos critérios para indicação do tratamento (Tabela 2).

Tabela 2. Dados clínico-laboratoriais pré-tratamento dos pacientes tratados com drogas antivirais no HUPES, 2012-2013.

Características	N=18[†] %	Média ± DP
Pré-tratamento		
AgHBe pos.		10/14 (71)
ALT		72,3 ± 67,2
> VR = 41 UI/dL		12/16 (75)
HBV-DNA (log/mL)		7,3 ± 7,6
Histórico de tratamento		
Prévio		3/17 (18)
Em curso		14/17 (82)
Duração do tratamento (anos)		3,0 ± 4,1
Min. – Max.		<1 - 11
Número de esquemas		
1		14/17 (82)
2		3/17 (18)
Tipo de esquema terapêutico		
Monoterapia		14/18 (78)
Conjugada		4/18 (22)
Droga antiviral		
INF		3/18 (16)
LAM		3/18 (16)
ETV		8/18 (44)
TDF		7/18 (39)

[†] Total varia conforme a disponibilidade do dado.

O tratamento para Hepatite B está em curso em 76% (13/17) dos pacientes. Quatro pacientes suspenderam o tratamento (Figura 7). O motivo da suspensão estava disponível apenas no caso T-2, que teve intolerância ao medicamento (monoterapia com TDF). Os outros três pacientes apresentaram soroconversão para anti-HBe seguida de melhora bioquímica e/ou redução da carga viral e encontram-se sob acompanhamento. A duração média do tratamento foi de 3 anos, sendo que o mínimo foi inferior a 1 ano e o máximo 11 anos. A maioria dos pacientes foram tratados com um único esquema terapêutico (82%) e monoterapia (78%). Em nossa casuística, o ETV foi a droga mais frequentemente administrada (44%), seguida pelo TDF (39%), INF (16%) e LAM (16%) (Tabela 2).

A linha do tempo de dezesseis pacientes com histórico de tratamento esta representada na Figura 7. O paciente tratado mais antigo foi admitido em 1998 (T-5), porém só iniciou seu tratamento em 2012, uma espera de quatorze anos. O tempo

de acompanhamento e início do tratamento foi influenciado pelas características clínicas individuais e pela disponibilidade das drogas antivirais. Os análogos INF e/ou LAM foram administrados aos pacientes que iniciaram o tratamento há mais tempo. Na medida em que as outras drogas antivirais, com maior barreira genética e menores efeitos colaterais foram disponibilizadas, gradualmente estas foram sendo utilizadas preferencialmente (Figura 7).

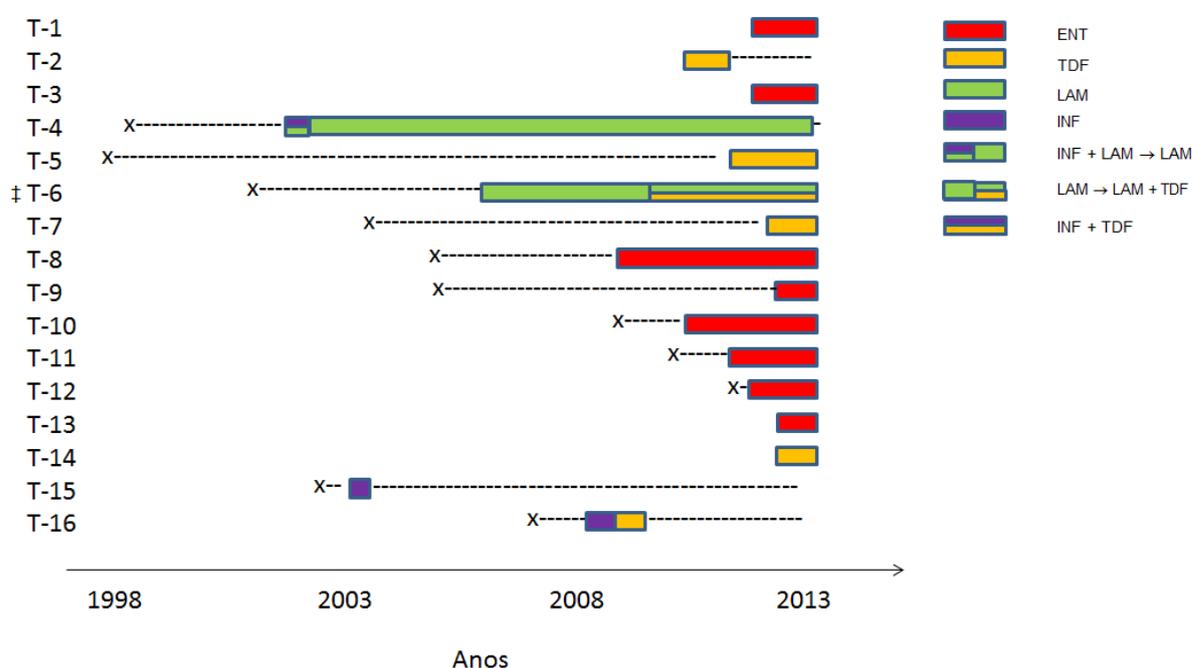


Figura 7. Linha do tempo dos pacientes com hepatite B crônica tratados no Complexo HUPES-UFBA, entre 2012 e 2013.

Nota: O "x" representa a admissão, a linha tracejada o período de acompanhamento e o retângulo o período de tratamento do paciente. † Pacientes soropositivos para HIV.

Os casos T-17 e T-18 são pacientes tratados no Couto Maia e no CEDAP respectivamente e por este motivo não estão representados na linha do tempo.

O paciente T-4 apresentou um maior período de tratamento, um total de onze anos; Foi admitido em 2001 com 28 anos de idade e após um ano de acompanhamento iniciou o tratamento com terapia conjugada INF + LAM, neste período apresentava fibrose \geq F2 e atividade necroinflamatória A3, anti- AgHbe negativo e transaminases elevadas. O tratamento estendeu até o ano de 2013 e o motivo da suspensão estava indisponível. Para três pacientes a data de admissão é

posterior a data do início do tratamento e isso acontece em virtude dos mesmos terem iniciado o tratamento em outros centros e posteriormente serem transferidos ao serviço de gastro- Hepatologia – complexo HUPES para acompanhamento.

6.2 GENOTIPAGEM O HBV

A amplificação e sequenciamento do HBV-DNA para pesquisa das mutações de resistência foi realizada em todas as amostras testadas. Ao todo foram analisados 81 *contigs* com o tamanho de 1032 pb, que correspondendo a área total do domínio *rt* do gene P. Entre os isolados testados, o genótipo A1 foi o mais prevalente (85.2%) seguido pelo genótipo A2 (4.9%) F (6.2%) e C1, D2 e D4 (1.2% cada) (Figura 8).

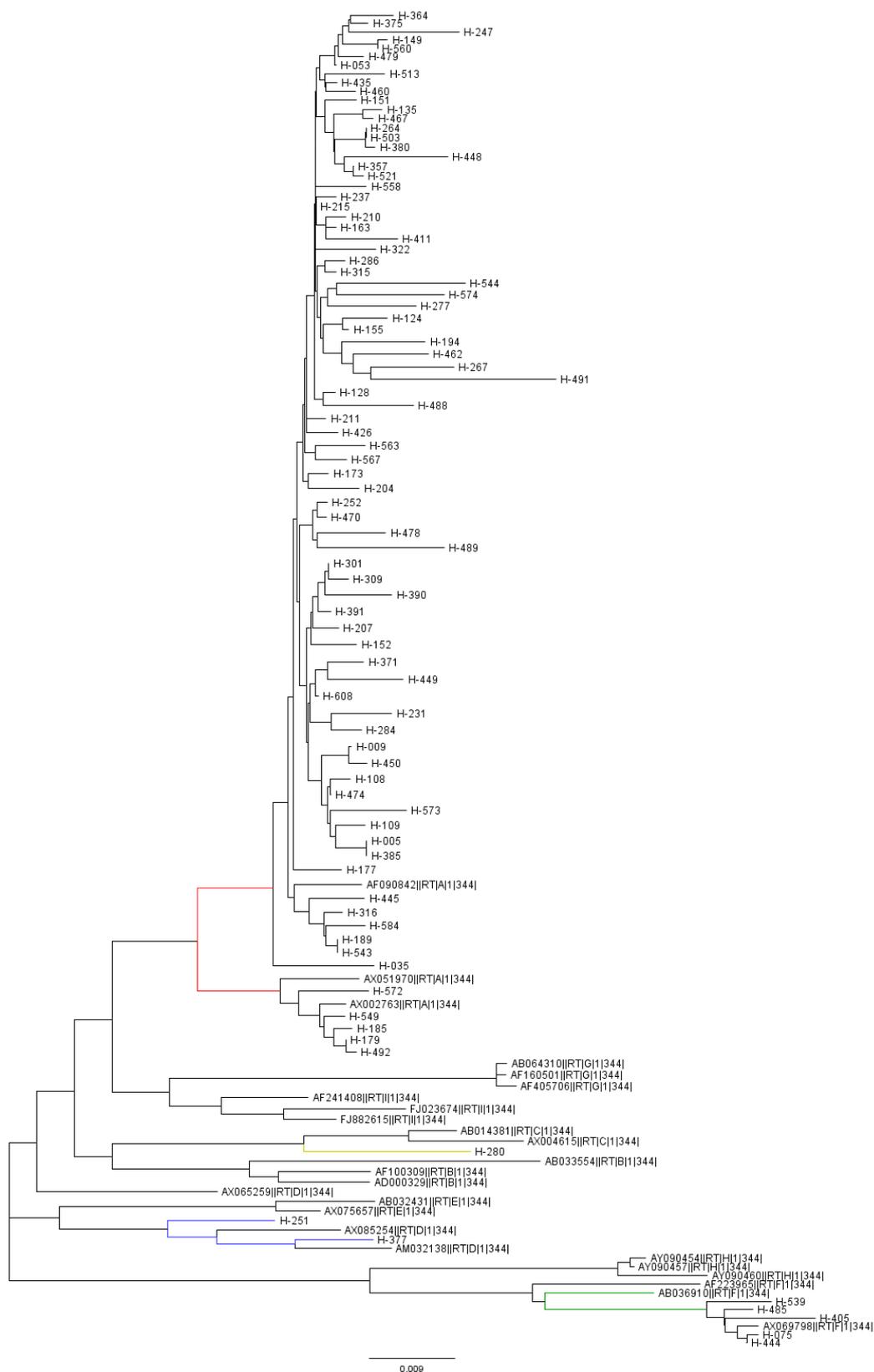


Figura 8. Genotipagem dos isolados do HBV por análise em árvore filogenética utilizando método NJ. Sequências referências do HBVrt DB (Stanford University, USA) selecionadas do do Genbank .

6.3 MUTAÇÕES RT E S

Seis isolados (7 %) apresentaram mutações associadas ao desenvolvimento de resistência aos análogos de nuclot(s)ídeos no domínio rt do gene P (resistência genotípica): dois pacientes apresentaram o padrão L180M + M204V e quatro apresentaram outros padrões (L80I + L180M + M204I; L80V + L180M + M204V; M204I; A194T) (Figura 9 e 10).

```

gi|2547635 : 229 TTG TCC TGG TTA TCG CTG GAT
              77 Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp
H-479RT-A1 : 229 ... .. T.. ...
              77 ... ..
H-574RT-A1 : 229 ... .. ATA ... ..
(N-2)         77 ... .. Ile ... ..
H-185RT-A2 : 229 ... ..
              77 ... ..
H-549RT-A2 : 229 ... ..
              77 ... ..
H-572RT-A2 : 229 ... ..
              77 ... ..
H-280RT-C1 : 229 ... ..
              77 ... ..
H-377RT-D2 : 229 ... ..
              77 ... ..
H-251RT-D4 : 229 ... ..
              77 ... ..
H-075-F2a   : 229 ... .. C.. .. T.. ...
              77 ... ..

```

Figura 9. Alinhamento das sequências das amostras e uma sequência referências (Número de acesso Genbank GQ325766; GI:254763592). A amostra H-574 (N-2) apresenta uma mutação não sinônima L80I do domínio rt do gene P. A amostra H-075 apresenta uma mutação sinônima genótipo específica no mesmo *locus*.

```

gi|2547635 : 526 AGT CCG TTT CTC TTG GCT CAG
              176 Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln
H-479RT-A1 : 526 ... ..
              176 ... ..
H-574RT-A1 : 526 ... .. ATG ... ..
(N-2)         176 ... .. Met ... ..
H-185RT-A2 : 526 ... ..
              176 ... ..
H-549RT-A2 : 526 ... .. ATG ... ..
(T-17)        176 ... .. Met ... ..
H-572RT-A2 : 526 ... .. ATG ... ..
(T-18)        176 ... .. Met ... ..
H-280RT-C1 : 526 ... .. C.. ...
              176 ... ..
H-377RT-D2 : 526 ..C .. .. C.. ...
              176 ..C .. .. C.. ...
H-251RT-D4 : 526 ..C .. .. C.. ...
              176 ..C .. .. C.. ...
H-075-F2a   : 526 ..C .. .. C.. ...
              176 ..C .. .. C.. ...

gi|2547635 : 598 GCT TTC AGC TAT ATG GAT GAT
              200 Ala Phe Ser Tyr Met Asp Asp
H-479RT-A1 : 598 ... ..
              200 ... ..
H-574RT-A1 : 598 ... .. ATT ... ..
(N-2)         200 ... .. Ile ... ..
H-185RT-A2 : 598 ... ..
              200 ... ..
H-549RT-A2 : 598 ... .. GTG ... ..
(T-17)        200 ... .. Val ... ..
H-572RT-A2 : 598 ... .. GTG ... ..
(T-18)        200 ... .. Val ... ..
H-280RT-C1 : 598 ... .. T ... ..
              200 ... ..
H-377RT-D2 : 598 ... .. T ... ..
              200 ... ..
H-251RT-D4 : 598 ... .. T ... ..
              200 ... ..
H-075-F2a   : 598 ... .. T ... ..
              200 ... ..

```

Figura 10. Alinhamento das sequências das amostras e uma sequência referências (Número de acesso Genbank GQ325766; GI:254763592). As amostras H-574 (N-2), H-549(T-17) e H-572 (T-18) apresentam a mutação L180M e também as mutações M204I/V do domínio rt do gene P.

Todas as mutações foram identificadas em isolados com genótipo A. Além disso, quatro cepas com mutações no gene S associadas às mutações do domínio rt do gene P foram detectadas. Isto corresponde a uma taxa de 6% de mutações de escape vacinal. Três casos apresentaram a mutação sI195M e um a mutação sW196L. Apesar de estes códons sobreporem apenas a região da mutação rtM204V/I, as mutações no gene S foram encontradas apenas entre os casos com mutações compensatórias rtL80I/V e rtL180M (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil genotípico dos pacientes com mutação de resistências aos análogos de nucleos(t)ídeos.

Caso	Origem	Genótipo	Mutações	
			Gene P	Gene S
T-6	BRA/BA/SSA	A1	L80V+L180M+M204V	I195M
T-11	BRA/BA/SSA	A1	M204I	-
T-17	BRA/BA/SSA	A2	L180M+M204V	I195M
T-18	BRA/BA/SSA	A2	L180M+M204V	I195M
N-1	BRA/BA/SSA	A1	A194T	-
N-2	BRA/BA/SSA	A1	L80I+L180M+M204I	W196L

N = paciente naïve; T = paciente tratado.

6.4 DESCRIÇÃO DOS CASOS

Segue abaixo a descrição dos casos com isolados com mutação de resistência. Três pacientes soropositivos para o HIV foram tratados por diversas drogas do coquetel anti-AIDS a saber: Telbivudina (LdT), Zidovudine (AZT), Etravirine (ETR), Efavirenz (EFV), Lopinavir (LPV) Ritonavir (RTV), Atazanavir sulfato (ATV), Emtricitabine (FTC), Lamivudina (LAM ou 3TC).

- **Caso T-6:** IGS, sexo masculino, tem 20 anos de idade. É acompanhado desde 2001, período em que foi diagnosticado para Hepatite B. Paciente HIV positivo tratado com o seguinte esquema terapêutico: LAM + LdP + RTV + TDF. Iniciou o tratamento para HBV em 2006 e já fez uso de dois esquemas terapêuticos para o tratamento de Hepatite B crônica. O 1º esquema é caracterizado por monoterapia com Lamivudina já a terapia de regaste (segundo esquema terapêutico) foi iniciado em 2010 com LAM + TDF. Com o tratamento foi possível observar a normalização das transaminases, contudo o paciente ainda não obteve a soroconversão do AgHbe além disso entre o ano de 2010 e 2013 foi observado um aumento da carga viral (3.58 log/mL para 5.73 log/mL). Paciente com HBV genótipo A1 e presença de mutação de resistência no padrão: rtL80V + rtL180M + rtM204V.
- **Caso T-11:** SSN, sexo masculino, residente em Lajedinho-BA (interior da Bahia), tem 49 anos de idade. Entre os riscos para aquisição da Hepatite B afirmou ter utilizado seringa não descartável e realizado tratamento dentário. O paciente não possui hábito de consumir bebidas alcoólicas. É acompanhado desde 2010, período em que foi diagnosticado para Hepatite B. Faz uso de um único esquema terapêutico ao qual foi iniciado em 2012. O esquema é caracterizado por monoterapia com ETV e o paciente afirma aderência ao antiviral (doses diárias e de acordo com orientações do médico). Possui AgHbe positivo e os exames no momento do estudo demonstraram um aumento de aproximadamente 2x mais dos níveis de transaminase em relação aos exames realizados pré-tratamento.

Na Biopsia realizada em 2011 demonstrou um grau de fibrose F3 e atividade necroinflamatória A2. A carga viral na amostra na qual foi realizada os testes moleculares foi 2,21 log/mL 3x menor do que a carga viral mensurada antes do tratamento. Paciente com HBV genótipo A1 e presença da mutação rtM204I.

- **Caso T-17:** ESP, sexo masculino, tem 30 anos de idade. É acompanhado desde abril de 2013, período em que foi diagnosticado para Hepatite B. Paciente HIV positivo tratado com o seguinte esquema terapêutico: AZT + LAM + ETR. Aguarda o resultado da biopsia para iniciar o tratamento para hepatite B crônica. Possui AgHbe positivo, ALT elevada e carga viral de 8.34 log/mL. Paciente com HBV genótipo A2 e presença de mutação de resistência no padrão: rtL180M + rtM204V.
- **Caso T-18:** JLB, sexo masculino, possui 45 anos reside em Salvador-BA. Entre os riscos para aquisição da Hepatite B, o paciente apesar de se classificar como heterossexual, afirmou já ter feito sexo com homem. Não possui hábito de consumir bebidas alcoólicas, drogas e/ou tabagismo. Paciente soropositivo para HIV desde julho de 2007 e para HBV desde junho de 2011. Possui anti-Hbe negativo e os níveis de ALT e carga viral apresentaram uma elevação entre os resultados antes do tratamento e os resultados atuais (ALT 2x e carga viral 2 logs). Já fez uso de quatro esquemas terapêuticos, dois específicos para o tratamento do HIV e outros dois para o tratamento da co-infecção com HBV e HIV. Para o 1º esquema foi utilizado EFV + 3TC + AZT, em virtude de queixas por sonolência foi aplicado o 2º esquema terapêutico com AZT + 3TC + LPV/RIT, diante do diagnóstico positivo para HBV foi trocado o esquema anterior por TDF+3TC+LPV/RTV e há 1 ano, devido ao desconforto por diarreia, foi introduzido o 4ª esquema terapêutico caracterizado por TDF+3TC+ATV+RTV. Para todos os esquemas o paciente afirma possuir adesão de 100% (dado relatado em prontuário). Paciente com HBV genótipo A2 e presença de mutação de resistência no padrão: rtL180M + rtM204V.
- **Caso N-1:** VJE, sexo masculino, residente em Salvador-BA, tem 62 anos de idade. Entre os riscos para aquisição da Hepatite B afirmou ter utilizado seringa não descartável, realizado tratamento cirúrgico e dentário. O paciente possui hábito de consumir bebidas alcoólicas. É acompanhado desde 1999, período em que foi diagnosticado para hepatite B e até o momento não faz uso de tratamento antiviral. Possui anti-Hbe positivo e os níveis de ALT permanecem elevados (>41

dL/mL) desde do período da admissão. Apresenta esteatose diagnosticado por método de imagem. Os dados de biópsia e carga viral durante o acompanhamento não estavam disponíveis. A única carga viral foi realizada na amostra na qual foi disponibilizadas para os testes moleculares e esta foi 2,68 log/mL. Paciente com HBV genótipo A1 e presença da mutação rtA194T.

- **Caso N-2:** RCS, sexo feminino, residente em Salvador-BA. Este caso vem sendo acompanhado em outra unidade de saúde e não foi possível realizar a revisão de prontuários, ainda. A paciente possui HBV-DNA qualitativo detectável. Na amostra utilizada para a pesquisa de mutações de resistência não foi possível realizar o HBV-DNA quantitativo.. A paciente possui HBV genótipo A1 e mutação rtL80I, rtL180M e rtM204I.

6.5 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

O desenho do nosso estudo não previu a coleta longitudinal de dados, contudo, pretendíamos através da revisão dos prontuários coletar os dados referentes à carga viral pré-tratamento e a dosagem mais recente. Dos quatro pacientes tratados com resistência genotípica: um tem um histórico recente de tratamento (<1 ano) com ETV e apresentou uma redução de 4 logs entre a carga viral pré-tratamento e a carga viral de um ano de tratamento (T-11). Outro paciente tinha um histórico com período longo de tratamento com LAM+TDF (> 5 anos) e apresentou elevação da carga viral que pode representar falha terapêutica (T-6). Infelizmente, os dados foram incompletos no prontuário de dois pacientes impedindo qualquer interpretação sobre as implicações clínicas das mutações de resistência nestes casos.

6.6 FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA

Tomando-se como desfecho a ocorrência de mutações, foram associados significativamente a este evento: positividade para o AgHBe, co-infecção com o HIV e histórico de tratamento para HBV e/ou HIV (Tabela 4). Devido à falta de dados de alguns pacientes e o tamanho amostral, não foi possível avaliarmos o impacto da carga viral pré-tratamento sobre a ocorrência de mutações de resistência.

Tabela 4. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com hepatite B crônica com/sem mutação, atendidos no HUPES entre 2012-2013.

Características	Com Mutação		Sem Mutação		P
	N = 6 [†]	Média±DP	N = 75 [†]	Média±DP	
AgHBe					0,01
Pos.	3		12		
Neg.	0		44		
HIV					
Soropositivo	2		0		< 0,01
Soronegativo	1		37		
ALT, UI/dL	83,5 ± 19,0		72,8 ± 74,3		
Nível ALT					
> VR=41 UI/dL	3		28		ns
≤ VR=41 UI/dL	1		33		
Carga viral, log/mL	1	6,28	9	5,54 ± 1,65	nd
Genótipo					ns
A	6		65		
Não-A	0		8		
Hist. Tratamento					0,01
Tratado	4		14		
Naive	1		53		
Droga antiviral					ns
LAM	1		1		
Outras*	2		13		
Duração trat., meses	2	76 ± 76	14	30 ± 35	ns

[†] Total varia conforme a disponibilidade do dado. ns = não significativo. nd = não determinado.

* Alguns pacientes foram tratados para HIV com outros análogos de nucleos(t)ídeos.

7 DISCUSSÃO

Inicialmente é importante enfatizar que o HBVrt DB foi testado contra as 18 mutações de resistência listadas, as quais o presente estudo pretende avaliar (Apêndice I). O HBVrt DB foi capaz de reconhecer quinze destas mutações como mutações de resistência e falhou no reconhecimento das mutações A194T e V84M. Contudo, tais mutações foram analisadas através da inspeção visual sitio a sitio como já descrito anteriormente, atingindo portanto o objetivo inicial.

Além disso, diante dos resultados expostos observamos que o perfil genotípico das populações estudadas foi muito similar e apresentou os três genótipos (A, D, F) circulantes no Brasil (Araujo, Mello et al. 2004; BOTTECCHIA 2008). Curiosamente foi encontrado um paciente com genótipo C, apesar de este genótipo ser característico na região do leste da Ásia o mesmo vem sendo descrito no Brasil, recentemente (Bertolini DA 2012). Ainda, foi possível observar uma maior frequência de infecção pelo HBV em Homens e com idade média superior a 40 anos. Dados que corroboram com a literatura nos quais apontam uma maior frequência de infecção da Hepatite B no grupo dos homens (BOTTECCHIA 2008).

É válido ressaltar que a amostragem incluiu pacientes virgens de tratamento, fator este que já contribui para uma taxa reduzida de mutações de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos . Apesar disso, devemos enfatizar que este fator não foi determinante, uma vez que encontramos dois isolados virgens de tratamento com mutações de resistência(Lacombe, Boyd et al. 2013); Além disso, devemos considerar que o seqüenciamento foi realizado em nível da sequência consenso o que reduz ainda mais a probabilidade de encontrar mutações de resistência, uma vez que para que as mesmas apareçam no seqüenciamento devem atingir e fixar-se

em aproximadamente 50% das quasiespecies que sofreram pressão seletiva positiva (Anna S. Lok 2007).

As principais mutações de resistência encontram-se entre a posição do aminoácido 80 á 250 (Ghany M 2007). Sendo as mutações no motivo YMDD na posição 204 as mais freqüentes e relevantes para a resistência a Lamivudina (DA SILVA 2000; HADDAD 2010).

Na população analisada, observamos a presença de dos seguintes padrões de mutação: L180M + M204V e quatro com diferentes padrões: L80I + L180M + M204I; L80V + L180M + M204V; M204I; A194T.

Entre os fatores que predispõem a resistência do HBV aos análogos além do AgHbs persistente por mais de 6 meses no soro, situação que caracteriza a hepatite B crônica, encontram-se a carga viral e transaminases elevada antes do tratamento, bem como a duração (tempo) de tratamento (THOMPSON 2006) presença de AgHbe pré-tratamento e co-infecção com HIV.

Neste estudo foi possível observar uma forte associação dos fatores: histórico de tratamento, status AgHBe positivo pré-tratamento e co-infecção com HIV com o desenvolvimento de mutação de resistência ($p=0,01$, $p= 0,01$ e $p < 0,01$ respectivamente).

A resistência fenotípica que se caracteriza pelo *rebound* da carga viral e o aumento das transaminases esta correlacionada com a resistência genotípica (BOTTECCHIA 2008); Nos pacientes estudados não foi possível avaliar este aumento uma vez que não foram coletados dados laboratoriais seqüenciais, antes da detecção das mutações, contudo observamos que tanto a carga viral como as transaminases estiveram elevadas no momento da detecção da mutação. Além

disso, foi possível observar a elevação da carga viral em um dos pacientes (T-6) que apresentou mutação de resistência e foi tratado por mais de 5 anos com INF+LAM.

Com já mencionado as mutações de resistência relacionadas à Lamivudina encontram-se principalmente no motivo YMDD. Neste motivo destacam-se as mutações M204V e M204I como as principais mutações de resistência à Lamivudina, podendo a mutação M204V ser a mais freqüente (ZOLLNER 2004; THOMPSON 2006; HADDAD 2010). É possível, ainda, relatar que a mutação M204V reduz o *fitness* viral quando comparado a M204I. Em virtude desta característica a mutação M204V encontra-se combinada com a mutação compensatória L180M para aumentar esta capacidade de replicação, enquanto a M204I pode ser mais facilmente encontrada de modo individual (ZOLLNER 2004; THOMPSON 2006; HADDAD 2010).

Sabe-se que o Tenofovir é o análogo com maior barreira genética, portanto com poucas ou quase nenhuma mutação de resistência associado. Recentemente vem sendo descrito a mutação A194T com mutação de resistência, *in vitro*, associado ao TDF. Tal mutação já foi descrita na literatura em um caso monoinfectado para HIV tratado com TDF por 6 meses (Lacombe, Boyd et al. 2013). No nosso estudo o paciente que apresentou o vírus com esta mutação era virgem de tratamento e apresentava carga viral < 2.000 UI/mL ou 3 log/mL.

Embora ainda existam poucos estudos, acredita-se que o genótipo também possa ter influência no desenvolvimento de resistência aos antivirais, estando à mutação M204I mais freqüente no genótipo D quando comparado ao genótipo A. (ZOLLNER 2004; BOTTECCHIA 2008; HADDAD 2010).

Neste trabalho todas as mutações encontradas, estavam presentes nos pacientes com o genótipo A. Contudo a análise de associação não apresentou resultado estatisticamente significativo.

O trabalho contemplou também análise das mutações no gene S, com impacto no escape vacinal, associadas às mutações na RT. Foi encontrada uma taxa de 6% de sequências com mutações de escape vacinal, taxa inferior a relatada em trabalhos com pacientes co-infectados com HIV (Lacombe, Boyd et al. 2013). Estas mutações para o grupo de pacientes co-infectados com HIV apresentam o genótipo D e o tratamento prolongado com Lamivudina como fatores de risco para o desenvolvimento destas mutações. No entanto, neste trabalho foi observada tais mutações nas sequências consenso do HBV de três pacientes co-infectados com HIV e um mono-infectado, todos genótipos A.

Por fim, esperávamos encontrar uma menor taxa de mutação de resistência, uma vez que as análises foram envolvidas pacientes virgens de tratamento e como já mencionado este fator tende a reduzir a taxa de resistência. Outro fator a ser considerado deve-se ao tempo da terapia; Se considerarmos LAM, o antiviral com menor barreira genética e mais utilizado no Brasil, espera-se encontrar uma taxa de 6% de mutação em um período de um ano de tratamento (THOMPSON 2006). Apesar da maioria dos pacientes incluídos nestes estudos serem virgens ou apresentarem menos que um ano de tratamento foi encontrada uma taxa de 7%, superior a reportada na literatura.

Diante destes resultados e com o intuito de aumentar o poder do estudo, faz-se necessário a análise de mutação de resistência em uma amostragem maior bem como utilizando a metodologia de seqüenciamento em nível de quasiespécies virais.

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

8.1 LIMITAÇÕES DO PROJETO

Neste projeto foram analisadas as mutações á nível da seqüência consenso e isso pode acarretar a não visualização de algumas mutações, podendo subestimar a freqüência das mutações de resistência uma vez que estas devem aparecer na seqüência consenso apenas quando as mesmas forem favoráveis ao vírus e mantidas durante o curso evolucionário com uma representação de mais de 50% das quasiespécies.

Além disso, utilizamos uma população com 81 pacientes virgens e tratados, no entanto o tamanho amostral foi calculado para 90 pacientes tratados.

9 CONCLUSÃO

Na população estudada observamos uma maior frequência de homens e pacientes AgHbe negativo 25%, contudo entre os pacientes tratados a porcentagem para AgHbe positivo foi mais elevada com 71%. Com relação à genotipagem do HBV foi observada uma maior prevalência do genótipo A1 (85,2%) seguido pelo genótipo A2 (4,9%) F (6,2%) e C1, D2 e D4 (1,2% cada). Foi encontrada uma taxa de 7% de cepas mutantes aos análogos de nucleos(t)ídeos e uma forte associação entre a ocorrência de mutações de resistência para o HBV em pacientes com co-infecção para HIV, histórico de tratamento e anti-Hbe negativo. A fim de aumentar o poder do estudo, será necessário um estudo com um número maior de pacientes bem como a análise a nível quasiespécies virais.

Por fim, diante dos resultados apresentados antes de a terapia ser iniciada é extremamente importante o monitoramento da carga viral e a identificação de mutações de resistência, para suportar decisões clínicas sobre o manejo dos pacientes e prevenir a emergência de vírus multi-resistentes.

10 APOIO FINANCEIRO

Este estudo conta com recursos da FIOCRUZ – BA e o edital Universal-MCTI/CNPq N° 14/2012.

Além da contrapartida das instituições parceiras LACEN-BA, para a realização dos exames, e infraestrutura disponibilizada pelo Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES).

REFERÊNCIAS

- ALAN KAY, F. Z. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. **Virus Res.**, v. 127, p. 164–176, 2007.
- ALTER, H. J. et al. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by hepatitis B surface antigen-positive saliva and semen. **Infect. Immun.**, v. 16, n. 6, p. 928-933, 1977.
- ANDRÉ, F. Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa. **Vaccine**, v. 18, p. 20-22, 2000.
- ANNA, S. L. F. Z. et al. Antiviral Drug-Resistant HBV: Standardization of Nomenclature and Assays and Recommendations for Management. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 254-265, 2007.
- ANTONO, S.K. R. R. et al. Occupational risk for human immunodeficiency virus, hepatitis B, and hepatitis C infection in health care workers in a teaching hospital in Indonesia. **Am. J. Infect. Control.**, v. 38, n. 9, p. 757-758, 2010.
- ARAUJO, N. M. et al. High proportion of subgroup A? (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. **Arch. Virol.**, v. 149, n. 7, 2004.
- ARAUZ-RUIZ, P. N. H. et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **J. Gen. Virol.**, v. 83, n. 8, p. 2059-2073, 2002.
- BERTOLINI, D.A. et al. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. **Infect Genet Evol.** v.6,n.12,p. 1295-1304, 2012.
- BOTTECCHIA, M. S. et al. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. **BMC Microbiol.**, v. 8, n. 11, p. 1-10, 2008.
- BRASIL, M. S. Doenças Infecciosas e Parasitárias-Brasília/DF, 2008.
- CHEN, S. W., Y. M. Genetic evolution of structural region of hepatitis C virus in primary infection. **World J gastroenterol.** v.8, p.686-693, 2002.
- DA SILVA, L. C. D. F. et al. Predictive factors for response to lamivudine in chronic Hepatitis B. **Rev. Inst. Med. trop.** v. 42, p.189-196,2000.
- DE SOUZA, R. R. Secretária de Assistência à Saúde. Portaria nº 860, Anexo: PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS - HEPATITE VIRAL CRÔNICA B - Lamivudina, Interferon-alfa, 2002.
- DUFFY, S. et al. Rates of evolutionary change in virus: patterns and determinants. . **Nature Publishing Group.**v. 9, p. 267-276, 2008.

ECHEVARRIÁ, J. M. A. Hepatitis B Virus Genetic Diversity. **Journal of Medical Virology**. v. 78,p. 36–42, 2006.

FERREIRA, M. S. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, p. 389-400,2000.

FILHO, H. P. D. S. Epidemiologia molecular dos Vírus B e C da Hepatite das Regiões Norte e Nordeste do Brasil. Salvador, **Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Doutorado**. v. 29, 2005.

GHANY M, L. T. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. **Gastroenterology**.v.132,n.4,p.1574-1585,2007.

GOLDSTEIN ST, A. M. et al. Incidence and risk factors for acute hepatitis B in the United States, 1982-1998: implications for vaccination programs. **J Infect Dis**. v. 185, n.6, p. 713-719, 2002.

HADDAD, R. M., et al. Hepatitis B virus genotyping among chronic hepatitis B patients with resistance to treatment with lamivudine in the city of Ribeirão Preto, State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.43,p. 224-228, 2010.

JANSSEN HL, G. G. et al. Interferon alfa for chronic hepatitis B infection: increased efficacy of prolonged treatment. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). **Hepatology**. v.30,n.1,p. 238-243, 1999.

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

KIM, J. H. J., et al. Hepatitis B Viral Surface Mutations in Patients with Adefovir Resistant Chronic Hepatitis B with A181T/V Polymerase Mutations.**J Korean Med Sci** . v.25, p. 257-264,2010.

LACOMBE, K., et al. High incidence of treatment-induced and vaccine-escape hepatitis B virus mutants among human immunodeficiency virus/hepatitis B-infected patients. **Hepatology**. v.58,n.3,p. 912-922,2013.

LACOMBE, K. B. et al. High Incidence of Treatment-Induced and Vaccine-Escape Hepatitis B Virus Mutants Among Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis B–Infected Patients.**Hepatology** .v.58, n.3, p. 913-922, 2013.

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

LOCARNINI, S. B., C. Antiviral chemotherapy for chronic hepatitis B infection: lessons learned from treating HIV-infected patients.**Journal of Hepatology** . v.30, p. 36-550, 1990.

LOK, A. S. F. M., B. J. AASLD Practice Guidelines: Chronic Hepatitis B. **Hepatology**. v.34, p. 1225 - 1241, 2001.

MADDREY, W. C. Hepatitis B--an important public health issue. **Clin Lab**. v.47,n.1-7,p. 51-55, 2001.

MADIGAN, M. T. M., et al. **Brock Biología de los Microorganismos**. Pearson Prentice Hall, 2003.

MARTELL, M. E., et al. Hepatitis C Virus (HCV) Circulates as a Population of Different but Closely Related Genomes: Quasispecies Nature of HCV Genome Distribution. **Journal of virology**. v. 66, n.5, p.3225-3229, 1992.

MATOS SB, J. A., et al. Prevalence of serological markers and risk factors for bloodborne pathogens in Salvador, Bahia state, Brazil. **Epidemiol Infect**. v. 1, n.141, p. 181-187, 2013.

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

NI YH, C. M. et al. Hepatitis B virus infection in children and adolescents in a hyperendemic area: 15 years after mass hepatitis B vaccination. **Ann Intern Med**. v.135, n.9, p. 796-800, 2001.

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

Norder H, C. A., et. al. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. **Journal of General Virology**. v.73, p. 3141-3314, 1992.

Okamoto H, I. M., et. al. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. **J Virol**. v. 61, n.10, p. 3030-3034, 1987.

Okamoto H, T. F., et. al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **J Gen Virol**. v. 69, n.10, p. 2575-2583, 1988.

Quale JM, L. D., et. al. Deja vu: nosocomial hepatitis B virus transmission and fingerstick monitoring. **Am J Med**. v.105, n.4, p. 296-301,1998.

Rhee, S. Y., et al. Hepatitis B virus reverse transcriptase sequence variant database for sequence analysis and mutation discovery. **Antiviral Res**. v. 88, n.3, p. 269-275. 2010.

SCHILDGEN , O. O., et. al. Selection and Counterselection of the rtI233V Adefovir Resistance Mutation during Antiviral Therapy. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**. v. 48, n.2, p. 631–634, 2010.

Sheldon J, R. B., et. al. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. **J Viral Hepat.** v.13, n.7, p. 427-434, 2006.

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

Tamura K, P. D., et. al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution.** v. 28, p. 2731-2739, 2011.

Tavares-Neto J, A. D., et. al. Seroprevalence of hepatitis B and C in the Western Brazilian Amazon region (Rio Branco, Acre): a pilot study carried out during a hepatitis B vaccination program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8. n. 2, p. 133-139, 2004.

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

Toledo AC Jr, G. D., et. al. Seroprevalence of hepatitis B and C in Brazilian army conscripts in 2002: a cross-sectional study. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases.** v.9, n. 5, p. 374-383, 2005.

WHO. Hepatitis B. Acessado em: 24/01, 2011, disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>, 2008.

WHO , Hepatitis B, countries or areas at risk , 2012.

Wong, D. K., et al. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. **Ann Intern Med.** v. 119, n.4, p. 312-323, 1993.

Yun-Fan Liaw, M. R. B., et al. The natural history of chronic HBV infection and geographical differences. **Antiviral Therapy.** v. 3, n.15 , p.25-33, 2010.

ZOLLNER, B. P., et al. Viral Features of Lamivudine Resistant Hepatitis B Genotypes A and D. **Hepatology.** v. 39, p. 42-50, 2004.

Zahran KM, B. M., et al. Pattern of hepatitis virus infection among pregnant women and their newborns at the Women's Health Center of Assiut University, Upper Egypt. **Int J Gynaecol Obstet.** v. 111, n.2, p. 171-174, 2010.

Zhu, R., H. P. Zhang, et al. Hepatitis B virus mutations associated with in situ expression of hepatitis B core antigen, viral load and prognosis in chronic hepatitis B patients. **Pathol Res Pract.** v.204, n.10, p. 731-742, 2008.

APÊNDICE I - Lista das principais mutações da resistência aos antivirais

N	Locus	Mutação	Posição	Droga*	Repercussão
1	P, domínio A da rt	L80V	367..369	LAM	-
2	P, domínio A da rt	L80I	367..369	LAM	Mutação <u>compensatória</u> da M204I/V
3	P,rt	V84M	379..381	ADF	Potenciais Mutações de resistência
4	P, domínio B da rt	I169T	634..636	ETV	-
5	P, domínio B da rt	V173L	646..648	LAM, FTC	Mutação <u>compensatória</u> da M204I/V.
6	P, domínio B da rt	L180M	667..669	LAM, FTC, ETV	Mutação concomitante a mutação M204V. Mutação compensatória da M204I/V
7	P, domínio B da rt	A181V	670..672	LAM, ADF	Normalmente em monoterapia com Adefovir esta associada á rtN236T , provocando uma baixa efetividade para o este medicamento ou em terapia com Adefovir e Lamivudina pode-se apresentar associada á rtM204I/V provocando resistência a estes medicamentos.
8	P, domínio B da rt	A181T	670..672	LAM, ADF	Normalmente em monoterapia com Adefovir esta associada á rtN236T , provocando uma baixa efetividade para o este medicamento ou em terapia com Adefovir e Lamivudina pode-se apresentar associada á rtM204I/V provocando resistência a

					estes medicamentos.
9	P, domínio B da rt	T184G	679..681	LAM, ETV	Mutação compensatória da M204V.
10	P, domínio B da rt	A194T	709..711	TDF	In vitro é associada a mutações de resistência a Lamivudina; Reduz a susceptibilidade ao Tenofovir.
11	P, motivo YMDD do domínio C da rt	S202G/I	733..735	ETV	Mutação compensatória confere um aumento de resistência ao Entecavir em amostras já resistentes a Lamivudina.
12	P, motivo YMDD do domínio C da rt	M204I	739..741	LAM, FTC, LdT, pacientes tratados com ETV e experimentados com LAM	Mutação de resistência e reduz fitness viral in vitro.
13	P, motivo YMDD do domínio C da rt	M204V	739..741	LAM, FTC, pacientes tratados com ETV e experimentados com LAM	Mutação de resistência e reduz fitness viral in vitro . Foi mais descrita nos genótipos A e B do que nos genótipos C e D
14	P, motivo YMDD do domínio C da rt	M204S	739..741	LAM, FTC	-
15	P,domínio D da rt	I233V	832..834	ADF	-
16	P, domínio D da rt	N236T	835..837	ADF	Mutação concomitante a mutação A181T/V
17	P, domínio D da rt	M250V	877..879	ETV	Potenciais Mutações de resistência

* LAM – Lamivudina , FTC – Emtricitabine, ENT - Entecavir , ADV – Adefovir, TDF- Tenofovir, LdT - Telbivudina.

APÊNDICE II - Tabela dos primers utilizados para amplificação da rt do HBV.

Oligonucleotídeos		Sentido	Frequência*	Posição	Gene	Tamanho	Tamanho do amplicon
C-F	A ser publicada.	+	-	-	S	-	
S-R2A	A ser publicada.	-	-	-	S	-	
RT-F4	A ser publicada.	+	89/94	-	P	-	
RT-R3a	A ser publicada.	-	87/94	-	P	-	

*Frequência: número de sequencias referência com similaridade de 100% sobre o total de sequencias referências pesquisadas.

APÊNDICE III - Termo de consentimento livre e esclarecido do participante.

APÊNDICE IV – Questionário de Identificação

APÊNDICE V – Questionário de revisão de prontuário.

APÊNDICE VI – Resumo publicado no XXIII Congresso Brasileiro de Virologia.

ABSENCE OF PRIMARY MUTATIONS ASSOCIATED WITH DRUG RESISTANCE IN ANTIVIRAL-NAIVE PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B INFECTION

Maria Isabel Magalhães Andrade dos Santos¹; Hermes Pedreira da Silva Filho¹; Suiane da Costa Negreiros do Valle²; Sidelcina Rugieri Pacheco¹; Raymundo Paraná³, Mitermayer Galvão dos Reis ^{1,4} & Luciano Kalabric Silva¹.

¹Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM/Fiocruz-BA), Salvador, Bahia, Brasil; ² Hospital Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil.; ³ Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), Salvador, Bahia, Brasil; ⁴ Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio) Coordenador Executivo, Brasil.

Hepatitis B virus (HBV) infection is a public health issue, one of main causes of death from infectious diseases worldwide. Brazil public health system (SUS) has provided antiviral drugs for chronic hepatitis B treatment for over 10 years, but a system for monitoring for drug-related resistance mutations is not available. This study aims to determine the presence of HBV primary mutations associated with nucleoside and nucleotides analogs in antiviral-naïve patients with chronic hepatitis B infection. HBV reverse transcription (rt) gene sequences from 37 isolates from antiviral-naïve patients from Cruzeiro do Sul Hospital were analyzed. These sequence data were obtained to validate molecular methods and HBV genotyping from previous

collaborating studies with HUPES and FIOCRUZ-BA. Briefly, HBV-DNA was amplified with a nested-PCR with primers FHBS1-RHBS1 and FHBS2-RHBS2, and sequenced using ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, USA). Sequences from forward (FHBS2) and reverse (RHBS2) primers were aligned to obtain a contig with length ranging from 310 to 369 bp, corresponding to the rt amino acid position from 51 to 172. Conflicting sites were edited by comparison with reference sequence X04615 after visual inspection. Consensus sequences were used for interrogating a local HBV drug resistance database (HBVrt DB, Stanford University, USA) to retrieve the prevalence of each mutation according to genotype and treatment. HBV genotype A (62.1%) was most prevalent followed by genotype F (31.0%) and D (6.9%). Despite the high rate of co-infection with Delta virus (58.6%), no primary drug-related resistance mutation was observed in this rt region. Other regions will be evaluated in the future. After the initiation of drug therapy it is extremely important to monitor viral load and identify drug-related resistance mutations in order to support clinical decision about the patient management in addition to preventing the emergence of multidrug-resistant viruses.

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

Financial support: FAPESB/CNPq No 020/2009 PRONEX/CNPq/FAPESB,
Application number: 7201/2009.

Área: Virologia Humana

APÊNDICE VII – Resumo publicado no Congresso Brasileiro de Hepatologia 2013.

MUTATIONS ASSOCIATED WITH DRUG RESISTANCE IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B INFECTION

Maria Isabel Magalhães Andrade dos Santos,¹ Andreas Stoecker,² Breno Frederico de Carvalho Dominguez Souza,² Mila de Oliveira Hughes Veiga do Rosário,² Sidelcina Pacheco Rugiere,¹ Raymundo Paraná,³ Mitermayer G. Reis¹ & Luciano K. Silva¹

¹ Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador-BA.

² Laboratório do Serviço de Gastro-Hepatologia / de Pesquisa em Infectologia (SGH/LAPI), HUPES-UFBA, Salvador-BA. ³ Ambulatório Magalhães Neto, HUPES-UFBA, Salvador-BA.

Hepatitis B virus (HBV) infection is a public health issue. The Brazilian public health system (SUS) has provided antiviral drugs for chronic hepatitis B treatment for over 10 years, but a system for monitoring for drug-related resistance mutations is not available. This study aims to determine the presence of HBV mutations associated with resistance to nucleos(t)ide analogs among 85 patients with chronic HBV infection-naïve and treated from University Hospital Professor Edgard Santos, Salvador-BA (HUPES-UFBA). Briefly, HBV-DNA was PCR amplified with primers deduced from HBV S and P genes and sequenced using ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, USA). Two to six forward and reverse sequences of each isolate were assembled and conflicting sites were revised using software CLC Main Workbench v. 5.0 by visual inspection of the electropherograms. Consensus sequence lengths ranged from 1011 to 1034 bp and encompassed the entire rt domain (from amino acid 1 to 344). Those sequences were submitted to the HBV drug resistance database

(HBVrt DB, Stanford University, USA) to retrieve each mutation according to genotype and treatment. HBV genotype A1 (84.71%) was the most prevalent followed by genotype A2 (5.88%), F (5.88%), and C1, D2 and D4 (1.18% each). Six patients (7.06%) exhibited resistance mutations to LAM, ENT and TDF, two with patterns L180M + M204V, one with patterns L80I + L180M + M204I and three others with different patterns: L80V + L180M + M204V; M204I; A194T. All of these mutations were present in patients with genotype A (four A1 and two A2). Furthermore, this study found one patient with genotype C, common in Asian east. Prevalence of drug-related resistance mutations varies according to treatment duration and the level of genetic barrier for the drugs used. Once the drug therapy is initiated it is extremely important to monitor viral load and identify those mutations in order to support clinical decisions about patient management and also to prevent the emergence of multidrug-resistant viruses.

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

Financial support: MCTI/CNPq 14/2012 (Processo 478322/2012-7), FAPESB/CNPq 020/2009 (PRONEX PNX0017/2009), Bolsa PQ/CNPQ nível 2 (Processo 301409/2012-9), Bolsa de mestrado FIOCRUZ-BA.

ANEXO I - Carta de aprovação do CEP-FIOCRUZ-BA

ANEXO II - Carta de aprovação do CEP-HUPES -BA