



AVALIAR AS MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AOS ANTIVIRAIS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA HEPATITE B CRÔNICA EM PACIENTES ATENDIDOS NO LABORATÓRIO DE ENSINO E PESQUISA EM ANÁLISES CLÍNICAS, MARINGÁ, BRASIL

Isabella Letícia Esteves Barros (PIBIC/CNPq/Uem), Sonia Kaori Miyamoto, Hellen Capellari Menezes, Maria Ferreira dos Santos Neta, Dennis Armando Bertolini (Orientador), e-mail: dabertolini@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR.

Microbiologia – Microbiologia Médica

Palavras-chave: hepatite B, tratamento, genótipo.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi detectar as mutações associadas à resistência aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite B crônica em pacientes que já se encontravam em tratamento, cujas amostras foram encaminhadas ao LEPAC da Universidade Estadual de Maringá, no período de agosto de 2014 a julho de 2015. Foram recebidas 104 amostras provenientes da 15ª Regional de Saúde do Estado do Paraná, Ponta Grossa e dos Laboratórios Centrais do Paraná, de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul. Dessas amostras 86 foram analisadas pela metodologia do INNO-LiPA® HBV Multi-DR para a verificação de mutações e polimorfismos e, para a identificação dos genótipos do HBV, a metodologia INNO-LiPA™ HBV GT. Apenas 12 (14,0%) das 86 amostras apresentaram mutações e o genótipo mais prevalente em todas as regiões presentes no estudo foi o genótipo D, encontrado em 64 (74,4%) dos pacientes. Foram detectadas mutações que conferem resistência aos medicamentos Lamivudina, Adefovir, Entecavir e uma provável redução na sensibilidade ao Tenofovir.

Introdução

No Brasil, o protocolo de tratamento da hepatite B crônica baseia-se no uso dos seguintes fármacos: Interferon-alfa, Inteferon-alfa peguilado, Lamivudina, Tenofovir, Entecavir e Adefovir (Brasil, 2010). No entanto, um obstáculo à utilização de drogas que atuam em enzimas virais é a emergência de variantes resistentes (Kieffer et al., 2007).

As principais mutações responsáveis pela resistência à Lamivudina incluem rtM204V e rtM204I. A primeira ocorre geralmente concomitantemente com a mutação rtL180M, enquanto que a segunda pode ocorrer sozinha ou



juntamente com a rtL180M. As duas principais mutações de resistência ao Adefovir são a rtA181V/T e rtN236T.

O desenvolvimento de resistência ao Entecavir é rara e, além das mutações rtM204V e rtL180M que são responsáveis pela resistência à Lamivudina, mutação adicional rtI169T, rtT184G, rtS202I/G ou rtM250V é necessária para que ocorra resistência. Até o presente momento, não foi reportado nenhum caso de resistência primária ao Tenofovir em pacientes mono infectados com HBV.

Até o momento, dez genótipos do HBV (designados de A a J) são conhecidos, com uma distribuição geográfica característica. No Brasil, foram identificados os genótipos A, B, D, C e F, sendo os genótipos A, D e F os mais prevalentes (Mello et al., 2007).

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as mutações associadas à resistência aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite B crônica em pacientes que já se encontram em tratamento.

Materiais e métodos

A população de estudo é de pacientes portadores crônicos que estiverem em tratamento com medicamentos antivirais para a hepatite B crônica, cujas amostras foram encaminhadas ao LEPAC da Universidade Estadual de Maringá, no período de agosto de 2014 a julho de 2015, provenientes do estado do Paraná (15^a Regional de Saúde do Estado do Paraná, município de Ponta Grossa e LACEN-PR), do Estado de Santa Catarina (LACEN-SC) e do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN-RS).

As mutações foram detectadas pela metodologia do INNO-LiPA[®] HBV Multi-DR (Innogenetics Biotechnology for Healthcare, Bélgica), que se baseia na detecção de mutações ou polimorfismos nos códons 80, 173, 180/181, 204, 236, 184, 194, 202 e 250 do gene da polimerase do HBV.

Os genótipos A a H do HBV foram obtidos pela metodologia INNO-LiPA[™] HBV GT (Innogenetics Biotechnology for Healthcare, Bélgica).

Resultados e Discussão

Das 104 amostras recebidas, 86 (82,7%) foram positivas nas reações de PCR e, conseqüentemente, hibridizadas (Tabela 1).

De acordo com os dados obtidos, 13 (15,1%) pacientes utilizavam como medicamento o Tenofovir, 8 (9,3%) o Entecavir, 3 (3,5%) o Interferon e 2 (2,3%) a Lamivudina, sendo que um dos pacientes utilizava simultaneamente o Entecavir e a Lamivudina. No entanto, para 60 (69,8%) pacientes não foi informado qual medicamento usavam para o tratamento, sendo a maioria deles provenientes do LACEN-SC e LACEN-RS.



Tabela 1 - Número de amostras recebidas pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da UEM, no período de 08/2014 a 07/2015.

Procedência da Amostra	Amostras Recebidas n (%)	Amostras Híbridizadas n (%)
15ª RS	21 (20,2)	21 (100,0)
Ponta Grossa	23 (22,1)	5 (21,7)
LACEN-PR	10 (9,6)	10 (100,0)
LACEN-SC	17 (16,4)	17 (100,0)
LACEN-RS	33 (31,7)	33 (100,0)
TOTAL	104 (100,0)	86 (82,7)

Legenda: 15ª RS – 15ª Regional de Saúde do Estado do Paraná; LACEN-PR – Laboratório Central do Paraná; LACEN-SC – Laboratório Central de Santa Catarina; LACEN-RS – Laboratório Central do Rio Grande do Sul.

Foram identificados 12 (14,0%) pacientes em que o HBV apresentou mutações, sendo 5 (41,7%) da 15ª RS, 1 (8,3%) de Ponta Grossa, 2 (16,7%) do LACEN-PR, 1 (8,3%) do LACEN-SC e 3 (25,0%) do LACEN-RS.

Tabela 2 - Distribuição das mutações de resistência ao tratamento da hepatite B crônica nas amostras dos 86 pacientes das regiões estudadas conforme o códon, no período de 08/2014 a 07/2015.

Códon	Região					Total n (%)
	15ª RS	P.G.	LACEN-PR	LACEN-SC	LACEN-RS	
rtL80I	1	1	1	0	0	3 (14,3)
rtL80V	0	0	0	0	1	1 (4,8)
rtA180L/181T	0	0	0	0	1	1 (4,8)
rtL180M/181A	2	0	1	1	0	4 (19,0)
rtL180M/181A (F)	1	0	0	0	0	1 (4,8)
rtA194T (F)	0	0	0	0	1	1 (4,8)
rtS202G	1	0	1	1	0	3 (14,3)
rtM204I	1	0	1	0	0	2 (9,4)
rtM204V	2	0	1	1	0	4 (19,0)
rtM250V (F)	0	0	0	0	1	1 (4,8)
TOTAL n (%)	8(38,1)	1 (4,8)	5 (23,8)	3 (14,3)	4 (19,0)	21 (100,0)

Legenda: 15ª RS – 15ª Regional de Saúde do Estado do Paraná; P.G. – Ponta Grossa; LACEN-PR – Laboratório Central do Paraná; LACEN-SC – Laboratório Central de Santa Catarina; LACEN-RS – Laboratório Central do Rio Grande do Sul; (F) – fraco.

As mutações nos códons rtM204V e rtM204I conferem resistência ao medicamento Lamivudina, sendo que a primeira ocorre geralmente concomitantemente com a mutação rtL180M, enquanto que a segunda pode ocorrer sozinha ou juntamente com a rtL180M. Os pacientes que apresentaram a mutação rtM204V também possuíam a mutação no códon rtL180M, e os pacientes que apresentaram a mutação rtM204I a tiveram de forma isolada. A mutação rtM250V fraco foi verificada de forma isolada num paciente do LACEN-RS, sendo que apenas teria algum efeito sobre o



medicamento Entecavir se também apresentasse as mutações rtM204V e rtL180M, o que não ocorreu. A mutação no códon rtA181T confere resistência ao Adefovir. Já a mutação rtA194T foi relacionada com redução da sensibilidade ao Tenofovir. A mutação rtS202G confere resistência ao Entecavir quando combinada com mutações rtL180M e rtM204V, e todos os pacientes que apresentaram essa mutação, ocorreu essa associação. As mutações rtL80I/V são mutações compensatórias da resistência à Lamivudina, sendo que em um paciente do LACEN-PR ocorreu a associação rtL80I + rtM204I e em outro do LACEN-RS com rtL80V + rtA180L/181T (Tabela 2). Não foram encontradas mutações rtV173L, rtT184S/C/G/A/I/L/F/M, rtS202C/I, rtN236T e rtM250I/L.

Das 86 amostras, 64 (74,4%) tinham o genótipo D, 3 (3,5%) o D/G, 15 (17,4%) o A, 2 (2,3%) o A/D, 1 (1,2%) o F e 1 (1,2%) o G. A maior prevalência do genótipo D condiz com o genótipo mais encontrado na região sul do Brasil, segundo Mello et al. (2007) e Bertolini et al. (2012).

Conclusões

Foram detectadas mutações que conferem resistência ao medicamento Lamivudina (rtM204V, rtM204I, rtL180M), ao Adefovir (rtA181T), ao Entecavir (rtS202G, rtL180M e rtM204V) e uma provável redução na sensibilidade ao Tenofovir (rtA194T). O genótipo D foi o mais prevalente.

Agradecimentos

Agradecemos a Universidade Estadual de Maringá pela concessão da bolsa.

Referências

- 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. 12, n. 6, p. 1295-304, Aug. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento da hepatite viral crônica B e coinfeções. – **Ministério da Saúde**, Brasília, 2010.
- KIEFFER, T.L. et al. Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. **Hepatology**, v. 46, n. 3, p. 631-9, Sep. 2007.
- MELLO, F.C. et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiol.**, v. 7, p. 103, Nov. 2007.