

CARACTERÍSTICAS DAS CEPAS DO VÍRUS DA HEPATITE B PRESENTES NOS PACIENTES AGUDOS E CRONICAMENTE INFECTADOS PERTENCENTES A 10ª REGIONAL DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ – BRASIL

Bárbara Gimenez Sartor (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Dennis Armando Bertolini (Orientador), e-mail: dabertolini@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

40101096 DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS
21201013 VIROLOGIA

Palavras-chave: Hepatite B, genótipo, mutação core.

Resumo:

O vírus da hepatite B (HBV) está classificado atualmente em 10 genótipos (A-J) e, de acordo com estudos anteriores, o genótipo está associado à progressão da doença e resposta às terapias antivirais. Desse modo, o objetivo desse estudo foi caracterizar as cepas do vírus da hepatite B presentes nos pacientes agudos e cronicamente infectados pertencentes a 10ª Regional de Saúde do Estado do Paraná. O DNA viral extraído das amostras foi amplificado, sequenciado, analisado e comparado aos dados preexistentes no GenBank. Foram analisadas amostras de 18 pacientes e encontrado os genótipos D (77,8%) e A (22,2%), sendo que essas cepas do vírus apresentaram diversas mutações na região Promotora Basal do Core e pré-core/core. Tais resultados poderão auxiliar em pesquisas relacionadas aos genótipos circulantes e mutações pré-existentes, com o intuito de melhorar a efetividade terapêutica e o quadro clínico geral do paciente.

Introdução

Atualmente, o HBV está classificado em 10 genótipos (A-J) de acordo com a divergência das sequências de seu DNA, possuindo distribuições geográficas distintas. Poucos dados de genótipos do HBV estão disponíveis no Brasil, mas sabe-se que A, D e F são os principais genótipos circulantes no país.

No Estado do Paraná, genótipos A (14,0%), C (1,3%), D (82,9%), F (1,3%) e H (0,4%) foram identificados em amostras de doadores de sangue HBsAg positivos (Bertolini *et al.* 2012). No Brasil, aproximadamente 15% da população já teve contato com o HBV, dos quais 1 a 3% é cronicamente infectada (Fernandes *et al.* 1999).

Mutações no gene promotor basal do core (PBC) e gene Pré-Core/Core podem provocar alterações da expressão viral, com aumento do dano hepático (Hussain *et al.*, 2003).

Este estudo teve como objetivo caracterizar as cepas do vírus da hepatite B presentes nos pacientes agudos e cronicamente infectados pertencentes a 10ª Regional de Saúde do Estado do Paraná.

Materiais e métodos

Tipo de Pesquisa, Local e Coleta de dados: Estudo retrospectivo com busca ativa de pacientes cronicamente infectados pelo HBV que estavam acompanhamento médico e terapêutico junto ao Centro Especializado de Doenças Infecto Parasitárias em Cascavel-PR 10ª Regional de Saúde (10ª RS) do estado do Paraná. Foram obtidas 27 amostras de pacientes, todas obedecendo aos critérios de inclusão.

Genotipagem do HBV e mutações nos genes Promotor Basal do Core e Pré-core/Core: As amostras foram extraídas utilizando-se o kit de extração PureLink® DNA/RNA Mini Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Foi realizada a amplificação genômica da região RT do gene da polimerase do HBV (S-Pol). O fragmento com aproximadamente 1306pb foi amplificado pela reação de nested-PCR utilizando-se Taq DNA Polimerase Platinum (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) com os primers PS3132Fe PS3201F/ P1285R (Tabela 1).

A amplificação dos genes do Promotor Basal do Core (PBC) e Pré-Core/Core do HBV também foi feita, utilizando-se uma reação de nested-PCR para amplificação dos genes do Promotor Basal do Core (PBC) e pré-core/core utilizando os primers EP1.1 e EP2.1 (Tabela 1).

Reação de sequenciamento: Os produtos de PCR foram submetidos à reação de sequenciamento conforme descrito por Sanger *et al.* (1977) utilizando-se o kit ABI Prism® BigDye™ Terminator cycle sequencing ready reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA). Após precipitação e purificação do produto da reação, as amostras foram desnaturadas e sequenciadas utilizando o sequenciador automático ABI 3500XL (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análise das sequências: As sequências obtidas foram analisadas inicialmente utilizando os programas Phred-Phrap (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). O programa CAP3, disponível no mesmo site, foi utilizado para montar as sequências consenso de cada amostra a partir do alinhamento das sequências geradas nas reações de sequenciamento.

A caracterização dos diferentes genótipos e subgenótipos do HBV foi realizada por meio da comparação entre as sequências obtidas com 533 sequências de diferentes genótipos/subgenótipos do HBV depositadas no *Genbank*. Para isto foram utilizados os programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.9.0 (Hall, 1999) e *Clustal X* versão 2.0.9 (Thompson, 1997). As análises filogenéticas foram realizadas através da utilização do pacote *Mega X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)* utilizando o método de neighbor-joining, com as distâncias genéticas calculadas de acordo com o modelo Kimura 2-parâmetros. A confiança da árvore foi testada através de análises de “bootstrap” com 1000 replicações.

A identificação das mutações nas regiões PBC e pré-core/core foi realizada pela análise visual do alinhamento das sequências de nucleotídeos. As sequências obtidas foram submetidas à análise para caracterização de alterações de nucleotídeos nas seguintes posições: 1762, 1764, 1814-1816, 1858, 1862, 1888, 1896 e 1899.

Aspectos éticos: Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Características clínicas e sócio-epidemiológicas de pacientes portadores crônicos da hepatite B

residentes na macrorregião oeste e sudoeste do estado do Paraná - Brasil”, o qual já se encontra aprovado pelo Comitê de Ética (Parecer nº 2.191.247, de 28/07/2017).

Resultados e Discussão

Foram obtidas 27 amostras que apresentaram carga viral detectável, no entanto em apenas 18 amostras houve a amplificação da região RT do gene da polimerase do HBV. Foram encontrados os genótipos HBV/D (77,8%) e HBV/A (22,2%), dentre os quais foi possível verificar a presença de quatro subgenótipos: HBV/D1 (22,2%), HBV/D3 (55,6%), HBV/A1 (16,7%) e HBV/A2 (5,6%).

Esses resultados dos genótipos estão de acordo com o estudo realizado por Bertolini e colaboradores. No entanto, nosso estudo tem abrangência somente sobre a 10ª RS, mas detectou a presença do subgenótipo HBV/D3 representando mais da metade dos casos.

O segundo genótipo encontrado em nosso estudo foi o HBV/A, com prevalência do subgenótipo HBV/A1 superior ao HBV/A2. O subgenótipo HBV/A1 também é considerado o mais prevalente em outras regiões do Brasil.

Entre as 18 amostras obtidas, conseguiu-se amplificação da região pré-core/core em 16 delas. Entre todas as amostras analisadas para os genes PBC e pré-core/core, apenas 2 (11,1%) não apresentaram mutação nestas regiões. As demais amostras apresentaram uma ou mais mutações quando comparadas aos seus respectivos genótipos selvagens. Por serem pacientes crônicos em tratamento, a pressão medicamentosa pode provocar a seleção de cepas mutantes, tanto para a região PBC, pré-core/core, como para a região da RT da polimerase, pois nossas amostras tiveram alta frequência de mutação para ambas regiões.

Mutações na região PBC e pré-core/core do HBV estão implicadas diretamente na replicação viral e patogênese hepática. As mutações A1762T e o G1764A, responsáveis pela diminuição da síntese de mRNA pré-core (PC), foram detectadas no gene promotor basal do core (PBC) e, também, descritos em pacientes com hepatite negativa para HBeAg.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados nas reações de *nested*-PCR e sequenciamento do HBV.

| Primer | Posição | Sequência | Referência |
|---------|-----------|---|---------------------------|
| EP.1.1 | 1606-1625 | 5' TCA TGG AGA CCA CCG TGA AC 3' | Takahashi et al. 1995 |
| 2032R | 2160-2131 | 5' CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT 3' | Kaneko et al. 1989 |
| EP.2.1 | 1653-1672 | 5' CAT AAG AGG ACT CTT GGA CT 3' | Takahashi et al. 1995 |
| 2017R | 2154-2125 | 5' ATG GGA TCC CTG GAT GCT GCC TCT TCC AAA 3' | Kaneko et al. 1989 |
| PS3132F | 3132-3151 | 5' CCT CCY GCH TCY ACC AAT CG 3' | Alvarado Mora et al. 2011 |
| 2920R | 1417-1398 | 5' ACG TCC YKC KHA GDA TCC AG 3' | Alvarado Mora et al. 2011 |
| PS3201F | 3201-3221 | 5' CAY CCH CAG GCM ATG CAG TGG 3' | Alvarado Mora et al. 2011 |
| P1285R | 1285-1266 | 5' CWA GGA GTT CCG CAG TAT GG 3' | Alvarado Mora et al. 2011 |
| RADE2 | 989-970 | 5' TCG CTG GAT GTG TCT GCG GCG TTT TAT 3' | Gomes-Gouvêa et al. 2015 |
| HBV477R | 477-456 | 5' GGA CAV ACG GGC AAC ATA CCT T 3' | Gomes-Gouvêa et al. 2015 |
| P781F | 781-804 | 5' GAR TCC CTT TWT RCC KCT RTT ACC 3' | Gomes-Gouvêa et al. 2015 |
| L372 | 370-396 | 5' TCG CTG GAT GTG TCT GCG GCG TTT TAT 3' | Gomes-Gouvêa et al. 2015] |

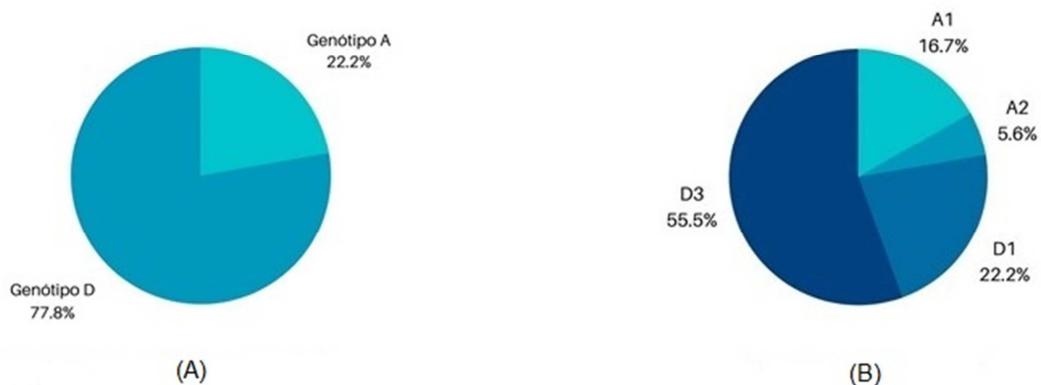


Figura 1 – Distribuição dos genótipos e subgenótipos encontrados em 18 amostras amplificadas na região RT do gene da polimerase do HBV em pacientes pertencentes à 10ª Regional de Saúde do Estado do Paraná. (A) Distribuição dos genótipos; (B) Distribuição dos subgenótipos.

Conclusões

Nossos dados apontam para maior prevalência do genótipo D do HBV, fortemente associado com alta atividade histológica e consequente fibrose e carcinoma hepatocelular. Também foi verificado a presença de diversas mutações na região PBC e pré-core/core associadas à piora geral do quadro patológico.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Araucária e UEM pela concessão da bolsa.

Referências

BERTOLINI DA, GOMES-GOUVEA MS, GUEDES DE CARVALHO-MELLO IM, SARACENI CP, SITNIK R, GRAZZIOTIN FG, et al. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. **Infection Genetics and Evolution**, 2012; v. 12, n. 6, p.1295–304, 2012.

FERNANDES J V, BRAZ RDE F, NETO F V, DA SILVA MA, DA COSTA NF, FERREIRA AM. Prevalence of serologic markers of hepatitis B virus in hospital personnel. **Revista de Saude Publica**, v. 33, n 2, p. 122–8, 1999.

HUSSAIN M, CHU C-J, SABLON E, LOK ASF. Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV precore and core promoter variants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3699–3705, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.