

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**HEPATITE B: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO VÍRUS  
E ANÁLISE DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA  
IMUNE**

Tese de doutorado  
Carolina de Souza Gusatti

Porto Alegre  
Setembro/ 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**HEPATITE B: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO VÍRUS  
E ANÁLISE DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA  
IMUNE**

Carolina de Souza Gusatti

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientadora: Maria Lucia Rosa Rossetti

Porto Alegre,  
Setembro/2015

#### Instituições e Fontes Financiadoras:

Este trabalho foi realizado em duas instituições:

- 1) Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), Porto Alegre, RS, Brasil
- 2) Setor de Hepatites Virais - Secretaria Municipal de Saúde Chapecó, SC, Brasil

#### Agentes Financiadores:

Este trabalho foi financiado pelas agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), através dos editais PPSUS-FAPERGS/MS/CNPq/SESRS 002/2013, processo nº 1257-2551/13-8; PADCT-FEPPS-003/2014 processo nº 001817-2069/14-1 e PADCT/FEPPS-05/2010; PNPDS-1959/2009

Ao meu pai, **Flávio** (*em memória*), por acreditar em um sonho que começou em 2004. À minha mãe **Sônia**, por todo seu amor e companheirismo. Aos dois, por seus preciosos valores éticos e morais que levo comigo e por acreditarem que seria possível, mesmo nos momentos mais difíceis.

**Dedico**

## Agradecimentos

Agradeço a **Deus**, por me permitir ter a companhia de pessoas maravilhosas, dispostas a me ajudar a traçar essa caminhada.

À minha orientadora, dra. **Maria Lucia R. Rossetti**, que desde o princípio depositou confiança em meu trabalho e por ter me aceito de braços abertos em seu laboratório. À sua dedicação, orientação, confiança e amizade, serei eternamente grata.

Ao dr. **Christian Niel**, por sua amizade, empenho e dedicação em maravilhosas discussões científicas que proporcionaram ampliar os conhecimentos adquiridos e nortearam o desenvolvimento deste estudo.

Aos colegas de laboratório do **Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, em especial à **Cíntia Costi, Maria Laura Halon, Tarciana Grandi, Rúbia Medeiros, Thaiane Rispoli e Mayara Prado** pelos debates científicos que ajudaram na execução deste trabalho.

Ao **Setor de Hepatites Virais de Chapecó-SC**, em especial à enf. **Maria Luiza Trizotto**, aos drs. **Arlete F. R. Medeiros e Fabiano Winckler** e às auxiliares **Ana Gregorio, Edília Romanini, Sara Oliveira, Solange Mattiello e Marta Almeida** por prontamente me acolherem e não medirem esforços no recrutamento e seleção dos pacientes. A dedicação e o trabalho realizado por esses excelentes profissionais transformam o mundo em que vivem e modificam para melhor a sociedade.

À dra. **Márcia Susana Nunes Silva**, por sua amizade e dedicação e ajuda na execução deste trabalho.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, seus professores e funcionários, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**, por proporcionarem aos seus alunos formação de excelência.

Aos queridos **Luciano Saucedo** e **Sílvia Centeno**, do PPGBCM, sempre dispostos a ajudar a solucionar as dúvidas que surgiram ao longo desta caminhada.

Às agências de fomento brasileiras, em especial à **CAPES** pela bolsa de estudos, sem a qual não seria possível completar esta formação acadêmica.

Aos **drs. Marilene Henning Vainstein** e **Arnaldo Zaha** por fazerem parte da comissão de acompanhamento e mostrarem-se disponíveis a ajudar na solução dos percalços encontrados.

À dra. **Sidia Maria Callegari Jacques**, por sua ajuda nas análises estatísticas fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos **amigos**, por sempre estarem presentes nos momentos alegres e tristes e por acreditarem que seria possível.

À minha **família**, em especial a minha irmã **Letícia** e meu cunhado **Guilherme**, por me proporcionarem sentir a maior felicidade do mundo, na forma da linda **Maria Luiza**. Por todo o amor e compreensão pelas ausências, muito obrigada.

Aos **pacientes**, pela disposição em participar deste estudo.

A todos que ajudaram a traçar essa caminhada,

**MUITO OBRIGADA!**

## Índice

Lista de Abreviaturas.....	8
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	12
Resumo.....	14
Abstract.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	17
1.2 A CIDADE DE CHAPECÓ E A HEPATITE B.....	19
1.3 O VÍRUS DA HEPATITE B, SUBTIPOS E GENÓTIPOS.....	21
1.4 DIAGNÓSTICO DA HEPATITE B.....	23
1.5 IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HBV.....	26
1.6 POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNP's) EM CITOCINAS HUMANAS.....	31
1.6.1 SNPs EM CITOCINAS Th1.....	32
1.6.2 SNPs EM CITOCINAS Th2.....	34
1.6.3 SNPs EM CITOCINAS Th17.....	36
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 GERAL:.....	38
2.2 ESPECÍFICOS:.....	38
3 RESULTADOS: CAPÍTULO 1.....	39
Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapecó, Southern Brazil, Originate from Italy.....	39
4 RESULTADOS: CAPÍTULO 2.....	54
Association between cytokine gene polymorphisms and outcome of Hepatitis B Virus Infection in in Southern Brazil.....	54
5 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....	78
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
7 Apêndice.....	105
CURRICULUM VITAE Resumido.....	114

## Lista de Abreviaturas

95% IC	Intervalo de confiança de 95%
Ala ou A	Alanina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
Anti-HBc	Anticorpo contra antígeno do core
Anti-HBe	Anticorpo contra antígeno “e”
Anti-HBs	Anticorpo contra antígeno de superfície
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
Arg ou R	Arginina
AST	Aspartato aminotransferase
bDNA	<i>Branched-DNA</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CD4+	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8+	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
Células Th0	Células T indiferenciadas
Células Th1	Células T de Resposta pró-inflamatória (Th1)
Células Th17	Células T de resposta Th17
Células Th2	Células T de Resposta anti-inflamatória (Th2)
Células Treg	Células T regulatórias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Gly ou G	Glicina
HBcAg	Antígeno do core do vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno “e” do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B



HBxP	Proteína “x” do vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HWE	<i>Hardy–Weinberg Equilibrium</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IFN- $\alpha/\beta$	Interferon- $\alpha/\beta$
IL-1 R	Receptor da Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-17 <sup>a</sup>	Interleucina 17A
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
Leu ou L	Leucina
Lys ou K	Lisina
OBI	<i>Occult B Infection</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Phe ou F	Fenilalanina
Pro ou P	Prolina
SBE	<i>Single base extension</i>
Ser ou S	Serina
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Thr ou T	Treonina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$

Tyr ou Y

Tirosina

Val ou V

Valina

## Lista de Figuras

### Introdução

**Figura 1:** Mapa Mundial da Prevalência da Hepatite B Crônica em adultos, em 2012.(Fonte: adaptado de CDC, *CDC Health Information for International Travel - Yellow Book*, 2014).....17

**Figura 2:** Mapa do Estado de Santa Catarina com a incidência de HBV por município de notificação no SINAN, em 2011(Fonte: adaptado de Dive-PEHV/SC, 2011).....20

**Figura 3:** Fases da infecção pelo HBV (Fonte: adaptado de Chang e Lewin, 2007).....29

### Resultados

Capítulo 1:

**Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapecó, Southern Brazil, Originate from Italy**

**Fig. 1.** Phylogenetic analysis based on HBV small S nucleotide sequences.....44

## Lista de Tabelas

### Introdução:

<b>Tabela 1:</b> Prevalência dos marcadores sorológicos para hepatite B no Brasil, por região, na faixa etária de 20-69 anos.....	18
---	----

### Resultados

#### Capítulo 1:

#### **Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapecó, Southern Brazil, Originate from Italy**

<b>Table 1.</b> Demographic, epidemiological and serological characteristics of HBV chronically infected patients accompanied in Chapecó, southern Brazil (1996, 2006 and 2013).....	42
<b>Table 2.</b> HBV DNA detection and viral load in HBsAg positive and negative subjects.....	42
<b>Table 3.</b> Distribution of HBV genotypes and serological subtypes among HBV chronically infected patients.....	43
<b>Table 4.</b> Geographical origins of the surnames of 88 HBV/D infected patients living in Chapecó, southern Brazil, traced from four free databases.....	45
<b>Table 5.</b> Countries of origin of the families of the grandparents of HBV/D infected patients living in Chapecó, southern Brazil.....	46

## Capítulo 2

### **Association Between Cytokine Gene Polymorphisms and Outcome of Hepatitis B Virus Infection in Southern Brazil**

**Table I:** Demographic, epidemiological, serological, molecular and biochemical features of patients with chronic or resolved HBV infection.....74

**Table II.** Frequencies of the genetic profiles of nine cytokine SNPs in patients with chronic vs. resolved HBV infection.....75

**Table III.** Haplotype frequencies and multivariate analysis of TNF- $\alpha$  genetic variant in patients with chronic and resolved HBV infection.....76

**Supplemental material:** Genotypes and alleles frequencies.....77

#### **Apêndice**

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos iniciadores e sonda utilizado para amplificação de fragmentos do HBV .....101

**Tabela 2:** Painel de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a genotipagem de SNPs humanos por extensão de base única (SNE).....102

## Resumo

A hepatite B é uma doença viral infectocontagiosa mundialmente disseminada. É caracterizada por ser uma inflamação hepática que possui risco de cronicidade em 10 a 20% dos casos ocorridos em adultos. Atualmente, acredita-se que aproximadamente 240 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas. A prevalência da doença varia em todo o mundo. Embora o Brasil seja considerado um país de endemicidade baixa, existem regiões onde a prevalência da doença é acentuadamente superior à média nacional, como a região Amazônica, e a região oeste catarinense. A imunopatogênese da infecção por sua vez, é influenciada tanto por fatores relacionados ao vírus da hepatite B (HBV), como genótipo, carga viral e mutações genéticas, quanto a características do hospedeiro infectado, como idade, sexo e polimorfismos genéticos. O presente trabalho buscou determinar fatores virais e do hospedeiro que estejam influenciando no curso natural da hepatite B, através da análise do perfil molecular viral e de polimorfismos de base única (SNPs) de genes de citocinas de pacientes infectados, estabelecendo possíveis marcadores moleculares de progressão da doença. Neste estudo, foram coletadas 363 amostras de indivíduos infectados com HBV em Chapecó, SC. Em relação aos fatores virais analisados, encontramos uma baixa proporção de indivíduos (15,3%, 31/202) com carga viral acima de 2000UI/mL e uma frequência de 5,6% (9/161) de hepatite oculta. A genotipagem viral foi realizada em 91 amostras e destas, 88 (97%) apresentaram HBV/D e 3 (3%) HBV/A, contrastando com a realidade de outras regiões brasileira, onde há um predomínio de HBV/A (64,3-44,7%), seguidos de HBV/D (47,6-16,6%) e HBV/F (29,2-7,7%). A análise de subtipos virais revelou uma alta frequência do subtipo ayw2. Para justificar a frequência elevada de HBV/D subtipo ayw 2 na região sul, foi realizada uma busca pela origem genealógica e geográfica dos pacientes infectados e uma análise filogenética foi executada. Os resultados mostraram que o HBV/D encontrado no sul do Brasil é filogeneticamente muito próximo ao HBV/D3 amplamente disseminado na Itália, assim como para o subtipo ayw2, e sua alta frequência teria poder ser justificada pelo processo de imigração italiana ocorrido durante o final no século XIX e início do século XX. Entre os fatores do hospedeiro, foi realizada uma análise comparativa entre pacientes cronicamente infectados e com infecção resolvida, avaliando variáveis epidemiológicas e genéticas. A análise epidemiológica mostrou que sexo masculino, via de transmissão sexual e baixo nível educacional estão associados a cronicidade da doença. Os genótipos dos SNPs foram analisados através de regressão logística e os resultados mostraram que o alelo A (genótipos AA e GA) do SNP -308 do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) está associado à cronicidade da hepatite B em indivíduos do sul do Brasil e pode ser considerado um potencial marcador molecular de progressão à cronicidade da hepatite B nesta população.

## Abstract

Hepatitis B is a viral infectious disease spread worldwide. It is a liver inflammation with a chronicity risk about 10 to 20% of adulthood cases. Currently, approximately 240 million people are chronically infected. The disease prevalence varies worldwide. Although Brazil is considered a low endemic country, there are regions where the prevalence is markedly higher than the national average, such as the Amazon region (Northern Brazil) and the west region of Santa Catarina, in southern Brazil. The immunopathogenesis of infection is influenced by factors relating to hepatitis B virus (HBV), such as genotype, gene mutations and viral load, and by characteristics of the infected host, such as age, sex and genetic polymorphisms. This study aimed to determine viral and host factors that are influencing on the natural course of the hepatitis B, through the viral molecular profile analysis and single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping of cytokines genes from patients infected in an attempt to suggest molecular markers of disease progression. In this study, were collected 363 samples from individuals infected with HBV in Chapecó, SC. Regarding viral factors analyzed, we found a low proportion of individuals (15.3%, 31/202) with viral load above 2000 IU/mL and a frequency of 5.6% (9/161) of occult hepatitis infection (OBI). Viral genotyping was performed on 91 samples. Of these, 88 (97%) had HBV/D and three (3%) had HBV/A, in contrast with the reality of other Brazilian regions where there is a predominance of HBV/A (64.3 to 44.7%), followed by HBV/D (47.6 to 16.6%) and HBV/F (29.2 to 7.7%). The viral subtypes analysis has revealed a high frequency of subtype *ayw2*. To justify the high frequency of HBV/D and subtype *ayw2* in the Brazilian southern region, a search for genealogical and geographical origin of the patients was performed and a phylogenetic analysis was conducted. The results showed that HBV/D in southern Brazil is phylogenetically close to HBV/D3 widespread in Italy as well as the *ayw2* subtype and its high frequency would could be justified by the Italian immigration process occurred during late nineteenth and early twentieth century. Among the host factors, were conducted a comparative analysis of chronically infected patients and HBV resolved subjects, evaluating epidemiological and genetic variables. Epidemiological analysis showed that male sex, vertical transmission and low educational level have an association with chronic disease. The genotypes of the SNPs were analyzed by logistic regression and the results showed that the A allele (AA and GA genotypes) of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) -308 SNP is associated with chronic hepatitis B in individuals of southern Brazil and can be considered a potential molecular marker of progression to chronic hepatitis B in this population.

## 1 INTRODUÇÃO

A hepatite B é uma doença infectocontagiosa causada pelo vírus da hepatite B (HBV) e que representa um grande problema de saúde pública, visto a ampla distribuição geográfica, os altos índices de prevalência na população mundial e seu potencial patogênico no desenvolvimento de cirrose e hepatocarcinoma. Estima-se em todo mundo que existam 240 milhões de pessoas cronicamente infectadas e que cerca de 780 mil pessoas morram, a cada ano, das consequências da doença (WHO, 2015). A maioria dos infectados se recupera, porém 5 a 10% são incapazes de eliminar o vírus, tornando-se portadores crônicos (LIANG, 2009).

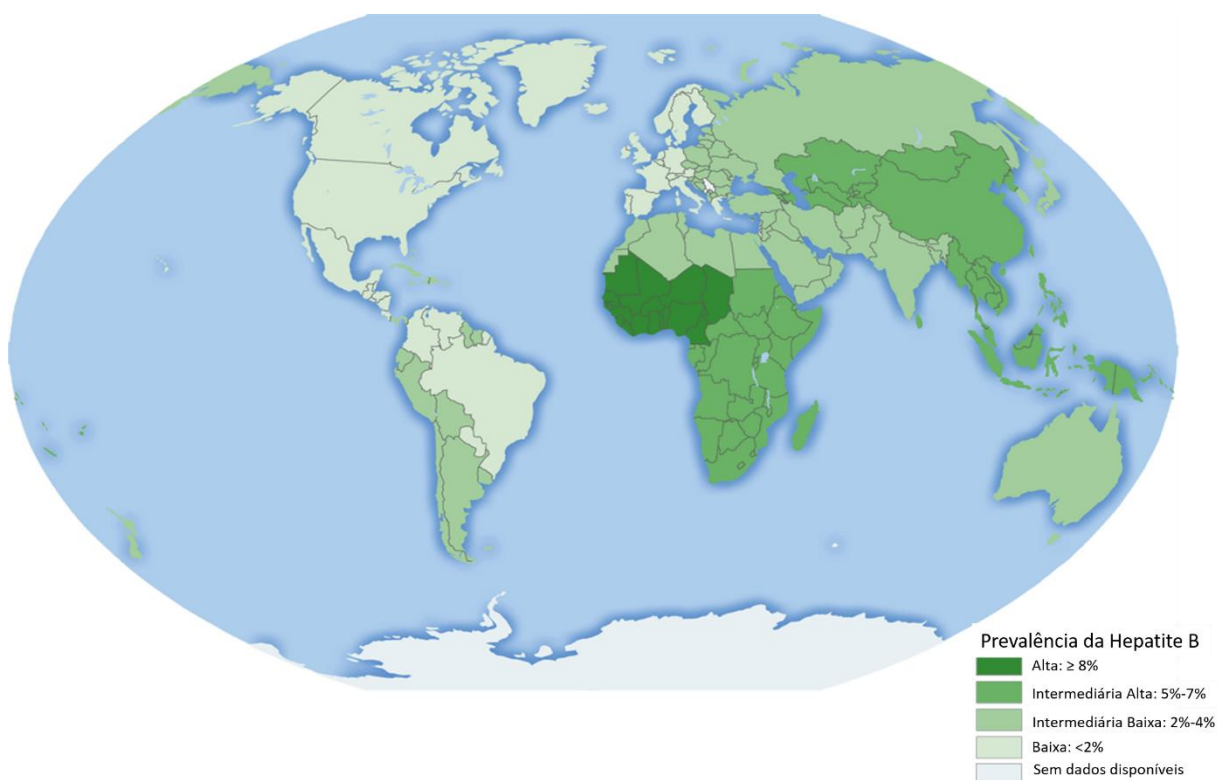
A incidência mundial de casos agudos de hepatite B tem decrescido nos últimos anos. Essa redução pode ser atribuída à aplicação de uma vacina segura e efetiva, realizada já na infância e em populações de alto risco (WHO, 2009). Entretanto, o controle global da doença permanece desafiador, uma vez que casos de resistência a drogas terapêuticas vêm sendo descritos e que o número de pessoas que tem infecção crônica pelo HBV permanece alto (GHANY & DOO, 2009; LAVANCHY, 2012).

Embora ainda controverso, tem se discutido quais os fatores do hospedeiro, bem como quais os fatores virais podem estar envolvidos na história natural da hepatite B, influenciando no desfecho clínico da infecção (GODKIN *et al.*, 2005; THIO *et al.*, 1999; JIANG *et al.*, 2003).



## 1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Mundialmente a hepatite B tem uma distribuição heterogênea, sendo identificadas regiões de alta (>7%), média (2-7%) ou baixa endemicidade (<2%) do HBV. Altos índices da doença são observados no leste Asiático, África Subsaariana, na Região Amazônica e partes do Leste Europeu. O Oriente Médio e Índia são consideradas regiões de endemicidade intermediária. Já a região oeste da Europa e a América do Norte apresentam baixa prevalência da doença, conforme descrito na figura 1 (WHO, 2015).



**Figura 1:** Mapa Mundial da Prevalência da Hepatite B Crônica em adultos, em 2012 (Fonte: adaptado de CDC, *CDC Health Information for International Travel -Yellow Book*, 2014).

O Brasil é considerado um país com baixa endemicidade, com taxa do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) média de 0,63% e do anticorpo contra proteína do core do vírus da hepatite B (anti-HBc) de 11,52% na

faixa etária de 20 a 69 anos (tabela 1) (BRASIL, 2012). No Brasil, segundo dado do Ministério da Saúde, o número de casos confirmados de hepatite B tem se mantido estável, atingindo a taxa de 6,5 casos por 100.000 habitantes em 2005 e 6,9 por 100.000 habitantes em 2010. No período de 1999 a 2011, foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), 120.343 casos de Hepatite B. Entre o período de 2000 a 2011, foram registrados, no Sistema de Informação de Mortalidade (SIM), 9.659 óbitos relacionados à doença, sendo 5.521 como causa básica e 4.138 como causa associada, a maioria dos quais nas regiões Sudeste (47,3%) e Sul (20,4%) (BRASIL, 2012).

Embora a região sul do Brasil seja considerada de baixa endemicidade, existem cidades com prevalência aumentada da doença, como na cidade de Caxias do Sul (região serrana do Rio Grande do Sul), Chapecó (na região oeste de Santa Catarina) e Foz do Iguaçu, Francisco Beltrão e Cascavel (na região sudoeste do Paraná), chegando a possuírem um índice 2 a 10 vezes maior que a média da região (NOVA, 2010, BERTOLINI *et al.*, 2012; MENEGOL *et al.*, 2013).

Tabela 1: Prevalência dos marcadores sorológicos para hepatite B no Brasil, por região, na faixa etária de 20-69 anos

<b>Região Brasileira</b>	<b>HBsAg (%)</b>	<b>Anti-HBc (%)</b>
Norte	0,92	14,7
Nordeste	0,53	11,7
Sudeste	0,40	7,9
Sul	0,55	11,3
Centro-oeste	0,76	12,7

Adaptado de BRASIL, 2012

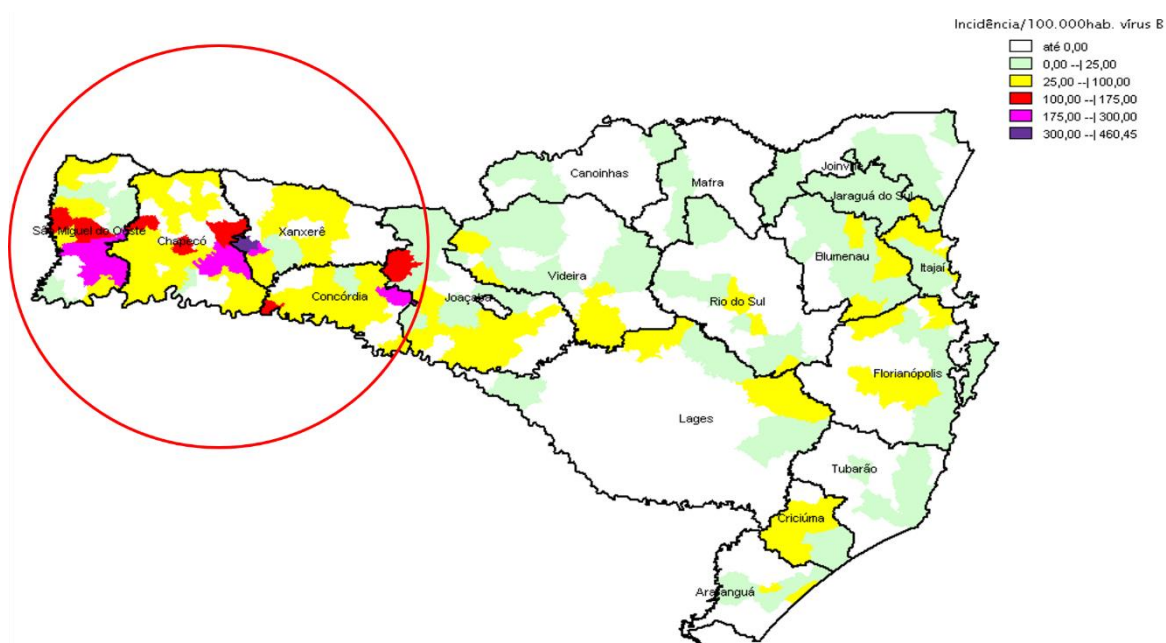
## 1.2 A CIDADE DE CHAPECÓ E A HEPATITE B

A cidade de Chapecó fica localizada na região oeste do estado de Santa Catarina, no sul do Brasil (latitude: 27° 5" 47"; longitude: 52° 37" 6"). Atualmente, possui 202.009 habitantes e uma área de 626,057 km<sup>2</sup> (IBEGE, 2015). No final do século XIX e início do século XX, a região inicialmente habitada por indígenas da etnia Kaingang, começou a ser colonizada por europeus de origem italiana e alemã, culminando com sua fundação no ano de 1917 (CEOM, 2004).

Em relação a composição étnica da população chapecoense, observa-se um elevado número de euro-descendentes, evidenciado pelo último Censo Demográfico, realizado pelo IBGE (2010). Segundo o documento, a cidade possui uma composição étnica de 76,68% de brancos, seguido de 19,24% de pardos, 2,69% de negros, 0,79% de indígenas e 0,60% de amarelos, contrastando, portanto, com os índices gerais do Brasil, em que brancos e pardos são a maioria, com índices próximos (somam 47,73% e 43,13%, respectivamente), seguidos de negros, com 7,61%, amarelos com 1,09% e indígenas, representando 0,43% da população brasileira.

A região oeste de Santa Catarina e em especial a cidade de Chapecó, possui um índice aumentado de portadores de HBV em relação à outras regiões do estado (figura 1). ROSINI *et al.* (2003) realizaram um perfil comparativo da soroprevalência de HBsAg e anti-HBc no período de 1999 a 2001 no estado de Santa Catarina em doadores de sangue e seus resultados demonstraram que a cidade de Chapecó apresentou um índice médio de soroprevalência do HBsAg de

2,12%, aproximadamente 2,5 vezes o índice médio encontrado no estado (0,82%). Da mesma forma, para o marcador de exposição ao vírus (anti-HBc), a soroprevalência média no período foi de 19,95%, aproximadamente 2,8 vezes maior do que a média estadual (7,09%). Nos últimos anos, com a implementação de políticas de imunização contra a hepatite B, a prevalência da doença tem diminuído, porém continua superior à média nacional e da região sul do Brasil. No período de 2007 a 2015, foram notificados ao SINAN, 1005 novos casos da doença na cidade, aproximadamente 10% de todos os casos notificados no estado no mesmo período (SINAN, 2015).



**Figura 2:** Mapa do Estado de Santa Catarina com a incidência de HBV por município de notificação no SINAN, em 2011. Circulado em vermelho, a região oeste catarinense, com maior incidência/prevalência de casos de Hepatite B no estado (Fonte: adaptado de Dive-PEHV/SC, 2011).

### 1.3 O VÍRUS DA HEPATITE B, SUBTIPOS E GENÓTIPOS

O Vírus da Hepatite B (HBV) pertence ao gênero *Orthohepadnavirus*, família *Hepadnaviridae*. O DNA é circular, apresentando fitas parcialmente duplas e compostas por 3200 nucleotídeos, constituídos por quatro genes, conhecidos como C (Core e pré-Core), S (Antígeno de Superfície), P (Polimerase) e X (que codifica a proteína HBx (HBxP), provavelmente associada à regulação da replicação e do estabelecimento da infecção por HBV). O gene C é composto pelas regiões “core” e “pré-core”, que codificam respectivamente, os antígenos HBcAg e HBeAg. O gene S, composto pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S, codifica três formas do antígeno de superfície (HBsAg) que variam em tamanho, denominados “Large”, “Middle” e “Small”, respectivamente (VYAS & YEN, 1999; KEW, 2011, BALMASOVA *et al.*, 2014)

Variações dos aminoácidos 120 a 168 na composição do “small” HBsAg classificam o HBV em nove diferentes subtipos (*adrq+ adrq-, ayr, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adw2 and adw4*), baseado em seus determinantes sorológicos e antigenicidade. A presença de uma lisina (Lys ou K) ou uma arginina (Arg ou R) na posição 122 confere a especificidade *d/y*. Similarmente, na posição 160, os resíduos de lisina ou arginina conferem especificidade *w/r*. Determinantes adicionais são deduzidos a partir de resíduos na posição 127, onde prolina (Pro ou P), treonina (Thr ou T) ou leucina (Leu ou L) conferem especificidade *w1/w2, w3 e w4* respectivamente e nas posições 134, 143, 159, 161 e 168, onde fenilalanina (Phe ou F) ou tirosina (Tyr ou Y), na posição 134; treonina ou serina (Ser ou S) na posição 143; alanina (Ala ou A) ou glicina (Gly ou G) na posição 159; tirosina ou

fenilalanina na posição 161 e uma valina (Val ou V) ou alanina na posição 168, diferenciam os subdeterminantes *w1* e *w2* (NORDER *et al.*, 1992; SCHAEFER, 2005, THOMAS *et al.*, 2014).

Variações nas sequências de DNA de isolados de HBV possibilitam a classificação em 10 diferentes genótipos de A até J. As divergências de sequência ocorrem no genoma completo, de forma que variações acima de 7,5% no genoma total caracterizam diferentes genótipos (HUY *et al.*, 2008, RONCATO *et al.*, 2008, TATEMATSU *et al.*, 2009).

Os genótipos de HBV tem distribuição geográfica mundial distinta, sendo algumas regiões do planeta mais prevalentes para certos genótipos do que outras. Os genótipos mais amplamente disseminados são o A e o D (encontrados nos continentes europeu, americano e africano). Os genótipos B e C são encontrados no leste e sudeste asiáticos; o genótipo E no oeste africano; o genótipo F é disseminado entre indígenas americanos; o genótipo G é encontrado na Europa e no continente norte americano; o genótipo H é encontrado na América Central. Por fim, os genótipos I e J até o momento são restritos à Ásia, onde foram encontrados isolados virais no Vietnã e Japão, respectivamente (SUGAUCHI *et al.*, 2001, ARAUZ-RUIZ *et al.*, 2002, DEVESA & PUYOL, 2007, HUY *et al.*, 2008, CAO, 2009, TATEMATSU *et al.*, 2009, ABDOU CHEKARAOU *et al.*, 2010, TRAN *et al.*, 2010, KAO, 2011, MULYANTO *et al.*, 2011, THEDJA *et al.*, 2011; MULYANTO *et al.*, 2012, SUNBUL, 2014).

Além da classificação em genótipos, estudos de filogenia e filogeografia baseados em sequências de genoma completo do HBV tem proporcionado

classificar o vírus não somente em genótipos, mas também em subgenótipos. Estudos deste tipo proporcionam um melhor entendimento sobre as dinâmicas populacionais que determinam a distribuição geográfica do vírus (MELLO *et al.*, 2013; YOUSIF e KRAMVIS, 2013, LAGO *et al.*, 2014). Os subgenótipos são designados por numeração arábica e constituem-se de subgrupos de genótipos que obedecem dois critérios em particular: divergência de 4 a 7,5% do genoma total e possuírem uma alta proximidade filogenética. Até o momento foram descritos mais de 40 subgenótipos diferentes, sendo que os genótipos C e D os que possuem o maior número de subgenótipos documentados (POURKARIM *et al.*, 2014).

O Brasil também possui uma distribuição de genótipos desigual, com prevalência do genótipo A (subgenótipos A1 e A2), D e F (subgenótipos F1, F2 e F4). Os Genótipos A e F são prevalentes nas regiões Norte e Nordeste, genótipo A na região Sudeste e Centro Oeste e o genótipo D na região Sul (MELLO *et al.*, 2007 e 2013, BECKER *et al.*, 2010; BERTOLINI *et al.*, 2012; COMPRI *et al.*, 2012, LAGO *et al.*, 2014).

#### **1.4 DIAGNÓSTICO DA HEPATITE B**

O diagnóstico laboratorial da hepatite B é realizado através da utilização de testes sorológicos (ou imunológicos) e de testes moleculares, que determinam a presença do vírus, bem como a carga viral e seu genótipo.

A metodologia de diagnóstico sorológico mais utilizada é o ensaio imunoenzimático (*ELISA*) por ser uma técnica rápida, de custo baixo e com altos níveis de especificidade e sensibilidade. A pesquisa de marcadores de sorologia possui significado muito importante no diagnóstico e prognóstico da doença

hepática causada pela infecção pelo HBV. O diagnóstico sorológico se dá, principalmente, por meio da pesquisa de antígenos e anticorpos contra o HBV no organismo do hospedeiro. Os marcadores frequentemente pesquisados para hepatite B são os antígenos: HBsAg e HBeAg e os anticorpos anti-HBc IgG e IgM, anti-HBe e anti-HBs (DÉNY & ZOULIM, 2010). Na última década, desenvolveu-se um teste rápido para a triagem diagnóstica de hepatite B. Este teste baseia-se na metodologia de imunocromatografia e contém, em sua matriz sólida, anticorpos contra o HBsAg circulante do sangue testado (BRASIL, 2011).

Na hepatite B, o antígeno HBsAg indica infecção ativa, enquanto o antígeno HBeAg é o marcador de transmissibilidade da infecção. Pacientes que possuem esses dois marcadores em níveis elevados tendem a um prognóstico desfavorável, enquanto que o surgimento de anticorpos contra os antígenos HBsAg e HBeAg, favorecem a soroconversão e recuperação da infecção. O anticorpo anti-HBc indica contato com o vírus, que pode ser recente, apontado pela presença de anticorpos do tipo IgM ou prévio, quando estão presente somente anticorpos do tipo IgG. Além disso, a presença do marcador anti-HBs indica a condição de imunidade e pode ser dada pela vacinação, sem apresentar contato com o vírus, quando no indivíduo nenhum outro marcador está presente (BRASIL, 2009; BONINO *et al.*, 2010).

O teste que determina o número de cópias virais circulantes é conhecido como carga viral ou teste molecular quantitativo. A determinação da carga viral tem importância prognóstico-terapêutica, uma vez que é utilizada como ferramenta para o monitoramento da resposta ao tratamento (SCOTT & GRETCH, 2007).

Deve-se levar em consideração que pacientes HBeAg negativos, com baixa replicação viral, ou com níveis flutuantes de HBV-DNA, podem ser diagnosticados



erroneamente como portadores inativos e, portanto, devem ser acompanhados com medições consecutivas, pelo menos duas vezes ao ano, antes de serem classificados como verdadeiramente inativos (STRAUSS *et al.*, 2009).

A quantificação do HBV-DNA vem se tornando uma ferramenta importante no manejo dos pacientes com hepatite crônica B, uma vez que o risco de carcinoma hepatocelular começa a crescer significativamente a partir de 10.000 cópias/mL (2.000 UI) (TSIANG *et al.*, 1999). Além disso, a quantificação do HBV-DNA é a melhor forma de monitoramento do tratamento com antivirais. Evidências clínicas sugerem que a supressão máxima e rápida da replicação viral durante o tratamento seja fator importante para a soroconversão do HBeAg, como também na prevenção do desenvolvimento de resistência aos antivirais (YUEN *et al.*, 2001). GALLEGO *et al.* (2008), demonstraram que a taxa de resistência à lamivudina foi significativamente menor nos pacientes com HBV-DNA inferior a 10<sup>3</sup> cópias/mL (13%) do que naqueles que permaneceram com viremia superior a 10<sup>3</sup> cópias/mL (62%) no sexto mês de tratamento.

Existem vários ensaios disponíveis para quantificar a carga viral do HBV, os quais, de acordo com as informações dos fabricantes, apresentam características baseadas no método de amplificação do DNA viral (RAPTI *et al.*, 2007). A técnica de amplificação de sinais (*branched-DNA*, *bDNA*) baseia-se na detecção do produto da amplificação por quimiluminescência, sendo os limites de linearidade de 2 x 10<sup>3</sup> a 1 x 10<sup>8</sup> cópias/mL. A amplificação de alvos específicos por reação em cadeia da polimerase (PCR), cujo método de detecção do produto amplificado é o ensaio imunoenzimático (EIA), apresenta limites de linearidade de 2 x 10<sup>2</sup> a 1 x 10<sup>5</sup> cópias/mL. Já a amplificação de alvos específicos por PCR em tempo real, cujo

método de detecção do produto da amplificação é a fluorescência, apresenta limites de linearidade de  $1,7 \times 10^2$  a  $6,4 \times 10^8$  cópias/mL (CHEVALIEZ *et al.*, 2012).

A tecnologia da PCR em tempo real trouxe possibilidades consideráveis ao método tradicional de PCR. Dessa forma, acrescentou-se ao já sensível método de PCR, maior praticidade, menor tempo para obtenção do resultado e diminuição da possibilidade de contaminação cruzada.

### **1.5 IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HBV**

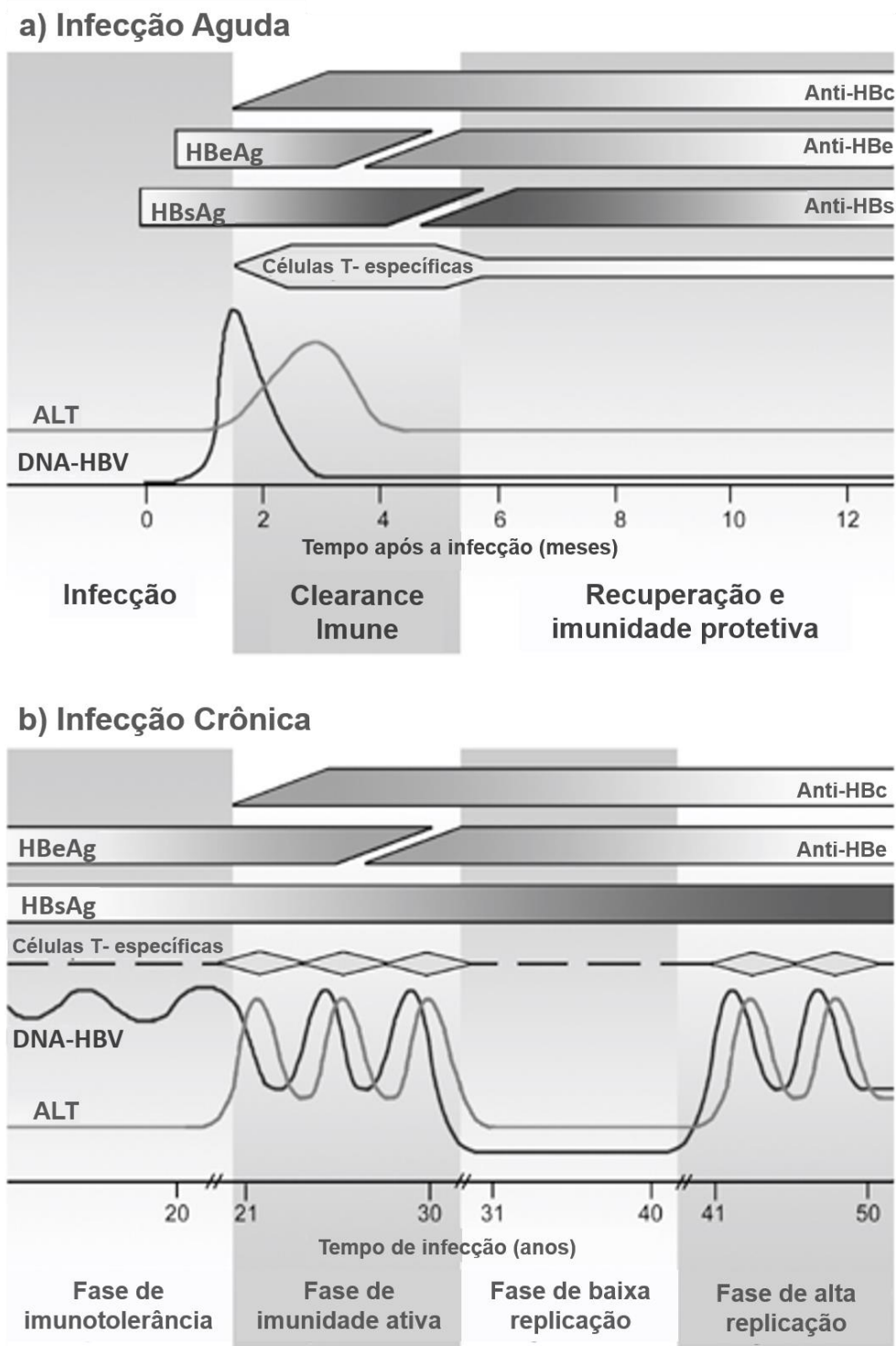
A transmissão do HBV se dá pelo contato sanguíneo e de fluidos corpóreos contaminados, através das vias parenteral e percutânea. As transmissões sexual e vertical também são frequentes, principalmente em regiões altamente endêmicas, onde o controle e a prevenção da disseminação da doença possuem falhas, como a baixa adesão aos programas de imunização e de combate à doenças sexualmente transmissíveis (WHO, 2009).

O desfecho clínico da hepatite B (resolução da infecção, hepatite fulminante, cronicidade com evolução ou não, para cirrose e hepatocarcinoma) depende de fatores relacionados ao vírus, como a carga viral e genótipo, e também de fatores relacionados ao hospedeiro, como idade, rota de transmissão e resposta imunológica (YE *et al.*, 2010; EL-SERAG, 2012). A resposta imune inata e adaptativa atuam para a eliminação da infecção viral, através da ativação de monócitos, macrófagos, neutrófilos, células de Kupffer, linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APCs) (como as células dendríticas) (THOMAS *et al.*, 2014).

Após a infecção aguda, que tem duração aproximada de 40 a 180 dias, o vírus tende a ser eliminado espontaneamente em cerca de 80 a 90% dos casos de adultos infectados. Porém, o risco de infecção crônica aumenta em recém-nascidos e crianças, podendo chegar a 90% (REHERMANN & NASCIMBENI, 2005). Em pacientes que conseguiram eliminar o vírus (infecção resolvida), observa-se um aumento inicial dos níveis de transaminases, bem como o surgimento de marcadores de infecção HBV-DNA, HBsAg, HBeAg e anti HBc IgM seguido do aparecimento de anti-HBs e anti-HBe, do surgimento do anticorpo anti-HBc IgG e a normalidade dos níveis das transaminases (figura 2a), e da diminuição da carga viral a níveis indetectáveis. Em pacientes crônicos após o período inicial de incubação, os níveis de HBV-DNA e HBsAg permanecem altos, sem a produção de anti-HBs, os níveis de HBeAg podem diminuir com o surgimento de anti-HBe ou não e os níveis de transaminases sofrem períodos de oscilação (figura 2b) (CHANG & LEWIN, 2007).

Na hepatite B aguda, “a clearance” do DNA viral é mediada por citocinas produzidas por células do sistema imune inato e adaptativo, como interferons (IFN- $\gamma$  e INF- $\alpha/\beta$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). A hepatite clínica está associada a produção de células T inflamatórias específicas e não específicas contra o HBV. Partículas virais processadas pelas células APCs são capazes de induzir células T citotóxicas (CD8+) e T auxiliares (CD4+), do tipo Th1 (pró-inflamatórias) e Th2 (anti-inflamatórias). Enquanto as células Th1 CD4+ estão relacionadas à eliminação do vírus, com sua integração direta às células T CD8+ através da produção de citocinas pró-inflamatórias, as células Th2 CD4+ atuam na apresentação de antígenos às células B, para a consequente produção de anticorpos. O aumento da

atividade citotóxica mediado por células T CD8+ coincide com o aumento dos níveis de transaminases e previne, por consequência, a infecção de novos hepatócitos. Em seguida, há o declínio da carga viral e dos níveis de ALT (alanina aminotransferase) com consequente surgimento de anticorpos específicos (CHANG & LEWIN, 2007)



**Figura 3:** Fases da infecção pelo HBV. a) infecção aguda pelo HBV: Após o período inicial de incubação, há uma fase de combate ativo à infecção (através de resposta imune inata) seguida de recuperação e resolução da doença, com o surgimento de anticorpos específicos (resposta imune adaptativa). b) Infecção Crônica pelo HBV: Após o período de incubação inicial, há uma fase de imunotolerância (ou tolerância imune), que permite a persistência do vírus no organismo. As respostas imune inatas e adaptativas são fracas, incapazes de eliminar por completo o vírus. Pode haver formação de anticorpos, suficientes para manter os níveis de HBV-DNA baixos por um período

prolongado (aproximadamente 20 anos). Após este período, os níveis de carga viral tendem a subir, elevando os riscos de complicações hepáticas (Fonte: adaptado de CHANG & LEWIN, 2007).

O processo de cronicidade é convencionalmente dividido em quatro fases distintas e subsequentes: imunotolerância, “*clearance*” imune, estado de portador inativo e fase de reativação. Na fase de imunotolerância ao vírus (caracterizada pela presença de HBeAg sérica, altos níveis de carga viral, níveis normais de ALT e inflamação hepática mínima), partículas de HBsAg combinadas com HBeAg induzem a proliferação de células T regulatórias (CD25+ CD4+ ou T reg) e células Th2, responsáveis pela inibição da produção de células T efetoras e por consequência, a redução do dano hepático. A fase de “*clearance*” imune é caracterizada pela soroconversão do HBeAg à anti-HBe. Há uma supressão da replicação e redução da carga viral da corrente sanguínea, consequência da diminuição da resposta Th2 e ativação da resposta Th1 no fígado. A secreção de citocinas media o dano hepático, com o aumento da atividade inflamatória, dos níveis de ALT e de fibrose. A soroconversão coincide com a remissão do processo inflamatório e a maioria dos pacientes permanece neste estado inativo por longos períodos, permanecendo com o marcador HBeAg negativo, carga viral indetectável e atividade enzimática hepática normal. O último estágio da infecção, a fase de reativação viral, ocorre em uma proporção de 20 a 30% dos portadores crônicos, onde se pressupõe que a ausência de HBeAg resultaria em uma diminuição da resposta Th2 específica e subsequentemente no aumento da inflamação hepática mediada por células Th1. Este processo de reativação viral aumenta o risco para a descompensação da função hepática e dano com evolução para cirrose e hepatocarcinoma (BERTOLETTI *et al.*, 2010, BALMASOVA *et al.*, 2014).

## 1.6 POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNP's) EM GENES DE CITOCINAS HUMANAS

Citocinas são proteínas sinalizadoras secretadas por células humanas do sistema imune ou não que, entre outras funções, regulam a resposta inflamatória desencadeada após uma infecção. Neste contexto, o papel das citocinas, bem como da resposta imune celular na patogênese e erradicação do HBV em pacientes crônicos tem sido investigada (WANG *et al.*, 2011). O nível de imunidade dos hospedeiros correlaciona-se com relevantes polimorfismos genéticos, especialmente com polimorfismos de base única (SNP- do inglês “*Single Nucleotide Polymorphism*”) presentes na região promotora de genes que codificam essas proteínas, provavelmente determinando tanto a susceptibilidade à doença, quanto o desfecho clínico da infecção (GAO *et al.*, 2009).

Tem-se descrito que citocinas de resposta Th1, incluindo, a interleucina 2 (IL-2), interferon- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) estão envolvidos principalmente na imunidade mediada por células e possuem um papel crucial na proteção contra patógenos intracelulares. Já as citocinas de resposta Th2, como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e a interleucina 10 (IL-10), regulam, na maioria das vezes, a resposta imune humoral. Embora seus efeitos sejam benéficos contra patógenos extracelulares, quando superestimuladas, também podem estar associadas com doenças progressivas desencadeadas por patógenos intracelulares (CHEONG *et al.*, 2006).

### 1.6.1 SNPs EM CITOCINAS Th1

A resposta pró-inflamatória desencadeada após a infecção por HBV depende, em grande parte, da liberação de citocinas responsáveis pela ativação das células efetoras do sistema imune (THURSZ *et al.*, 2011). Entre as principais citocinas pró-inflamatórias responsáveis por este fenômeno, destacam-se o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 2 (IL-2) e a interleucina 6 (IL-6).

O TNF- $\alpha$  é um importante fator estimulatório do sistema imune. Sua função consiste no estímulo de secreção de outras citocinas, aumento da expressão de moléculas de adesão bem como ativação de neutrófilos. É produzido por uma gama de células, como macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células natural killer (NK) (XIA *et al.*, 2011).

Estudos tem mostrado associação entre SNPs na região promotora deste gene com o desfecho clínico da infecção pelo HBV. Em uma metanálise, ZHENG *et al.* (2012) avaliaram o SNP no promotor do gene TNF- $\alpha$ -238 (rs361525), em diversas populações mundiais e seus resultados indicam que o alelo A (genótipos GA+AA), para a população europeia, está associado com um maior risco de cronicidade para hepatite B em comparação a indivíduos com cura espontânea após a infecção. Este mesmo estudo mostrou que na população Asiática este polimorfismo não parece estar associado ao risco de cronicidade de hepatite B. XIA *et al.* (2011) avaliaram, também por metanálise, os polimorfismos TNF- $\alpha$  (-1031,-863,-857,-308 e -238) em pacientes com hepatite B crônica versus pacientes com cura espontânea e seus resultados indicam: 1) uma associação positiva entre o genótipo GG do TNF- $\alpha$  -238 e a cura espontânea em europeus, 2) que a presença do genótipos GG/GG+GA na posição -308 do TNF- $\alpha$  (rs1800629) aumentaria o



risco de persistência da infecção por HBV e 3) que o genótipo CC do SNP TNF- $\alpha$  - 863 estaria associado à “clearance” viral.

A IL-2 é uma potente citocina de resposta do tipo Th1 que possui efeito imunorregulatório na estimulação de proliferação e ativação de linfócitos T, B e células NK. GAO *et al.* (2009) avaliaram a presença do polimorfismo IL-2 -330 (rs2069762) e demonstraram que o genótipo TT foi fortemente associado com o aumento do risco para cronicidade em chineses portadores do HBV, HCV e co-infectados HBV/HCV. Uma possível explicação para essa associação consiste na análise de experimentos que mostraram que pacientes com o genótipo TT possuem baixa produção de interleucina-2 e como consequência são incapazes de erradicar o vírus, tornando-se persistentemente infectados.

A IL-6 é uma citocina com múltiplas funções, essencial na regulação da resposta imune (PARK *et al.*, 2003), estando relacionada ao crescimento e diferenciação das células B e T, à regeneração do fígado e a proteção contra o dano hepático (NATTERMANN *et al.*, 2007). Segundo FISHMAN *et al.* (1998), o polimorfismo na região promotora -174 (rs1800795) C/G da IL-6 está associado com diferenças na produção de IL-6: os indivíduos genótipos GG e GC possuem uma grande produção de IL-6, contrastando com indivíduos genótipo CC, classificados como baixos produtores de IL-6.

Recentemente, estudos vêm testando a associação deste polimorfismo com desfecho clínico de infecções. BARRET *et al.* (2003) demonstraram que o genótipo CC está relacionado ao “clearance” viral em pacientes irlandeses com cura espontânea para Hepatite C. NATTERMANN *et al.* (2007) encontraram associação

entre o genótipo GG e a resposta ao tratamento com interferon e ribavirina em pacientes alemães com Hepatite C. Já para RIBEIRO *et al.* (2007), que testaram um número baixo de pacientes brasileiros portadores do HBV, não foi possível encontrar associação deste polimorfismo em pacientes crônicos versus curados espontaneamente. Da mesma forma, o estudo de PARK *et al.* (2003), não conseguiu mostrar associação do polimorfismo com a progressão a carcinoma por Hepatite B em pacientes coreanos.

### **1.6.2 SNPs EM CITOCINAS Th2**

Em contraste com os efeitos das citocinas pró-inflamatórias, as interleucinas de resposta do tipo Th2, atuam como inibidores dos mecanismos efetores da resposta Th1 e na indução de células B, para a ativação da produção de anticorpos. Entre os principais efetores de resposta Th2 estão a interleucina 10 (IL-10) e a interleucina 4 (IL-4).

A IL-10 tem a função de inibição da ativação antigênica específica, proliferação e produção de citocinas de células Th1 pela redução da capacidade de apresentação de antígeno pelos monócitos/macrófagos, associado com a diminuição da expressão de moléculas do HLA de classe II. Em células B, a interleucina-10 estimula a proliferação, a secreção de imunoglobulina e a conversão de anticorpos IgM a IgG. A IL-10 também regula a diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, bem como superestimula a síntese do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1R). KARIM *et al.* (2007) quantificaram os níveis desta interleucina e demonstraram um aumento dos níveis em pacientes crônicos de Hepatite B. Os resultados obtidos neste estudo, também foram corroborados com os resultados obtidos por ARABABADI *et al.* (2010), em que os níveis de IL10 de

pacientes com infecção oculta também foram maiores do que os níveis de IL-10 encontrados em pacientes que conseguiram resolver a infecção sem interferência medicamentosa.

Estudos têm correlacionado o SNP IL-10 -1082 (rs1800896) com a persistência da infecção HBV. Enquanto GAO *et al.* (2009) encontraram diferenças significativas entre os genótipos (AA para o aumento de risco e AG para a redução de risco de cronicidade), para WANG *et al.* (2011) esta associação não foi significativa. Com o intuito de investigar tais discrepâncias em termos de resultados, ZHANG *et al.* (2011) realizaram uma metanálise em uma coorte chinesa e comprovaram que o alelo A está associado, naquela população, com a redução do risco de infecção persistente por HBV.

O SNP IL-10-592 (rs1800872), também tem sido associado às hepatites virais. CHEONG *et al.* (2006) relacionaram o alelo A com a persistência viral e o alelo C ao “clearance” viral em pacientes coreanos portadores de HBV. Em contraste, para WANG *et al.* (2012), em pacientes chineses portadores de HBV, o “clearance” viral está associada ao genótipo AA.

A IL-4, por sua vez, é uma potente citocina que está relacionada com a ativação de células B e produção de IgE, a diferenciação de células imaturas (Th0) em células Th2, bem como na diminuição da resposta inflamatória mediada por células Th1.

Estudos realizados nos últimos anos indicam que polimorfismos no gene da IL-4 podem estar relacionados com a resposta à vacina da Hepatite B e na susceptibilidade à infecção por HBV (WANG *et al.*, 2012). Para GAO *et al.* (2009),

o alelo C (genótipos CC+CT) do polimorfismo -589 (rs2243250) está relacionado a níveis anormais da enzima alanina-aminotransferase (ALT) em pacientes chineses infectados por HBV e pelo vírus da hepatite C (HCV). Já CUI *et al.* (2013), avaliaram por metanálise, a resposta à vacina da Hepatite B em pacientes asiáticos e caucasianos e encontraram associação entre o alelo T e altos níveis de produção de anticorpos.

### 1.6.3 SNPs EM CITOCINAS Th17

Esta subclasse de células T, as células Th17, tem atividade pró-inflamatória, e estão associadas a iniciação e manutenção do processo imune. Induzem diversos fatores pró-inflamatórios, como citocinas, metaloproteínas e quimiocinas acarretando um recrutamento intenso de neutrófilos e conseqüentemente, inflamação no tecido afetado (KORN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2014; VALVERDE-VILLEGAS *et al.*, 2015)

A principal citocina produzida pelas células Th17 é a interleucina 17A (IL-17A). Estudos tem relacionado o aumento da produção desta citocina com a persistência viral e por conseqüência, à infecção crônica e também ao dano hepático grave (ZHANG *et al.*, 2010 e WANG *et al.*, 2011, SUN *et al.*, 2012), porém existem poucas informações a respeito dos principais polimorfismos presentes no gene da IL17A: IL17A-692 (rs8193036) e IL-17A-197 (rs2275913), com o desfecho clínico das Hepatites B e C. NAN *et al.* (2013), em seu estudo conduzido com pacientes chineses portadores do HCV, mostraram que os níveis de IL-17A estão associados com a infecção crônica, porém os SNPs avaliados não foram associados. Já para LI *et al.* (2012), os genótipos GG e AG do rs2275913 (e o

aumento dos níveis de IL-17A) estão associados com o hepatocarcinoma causado pela infecção com o HBV em pacientes chineses.

Neste contexto, polimorfismos genéticos de base única (SNP's) em regiões críticas para a transcrição/tradução de citocinas podem levar a uma produção alterada dessas moléculas efetoras, influenciando em seu papel na resposta inflamatória desencadeada durante o processo infeccioso.

Embora este seja um assunto estudado mundialmente, em especial em países do continente Asiático, pouco se sabe sobre associações de polimorfismos em genes relacionados a resposta imune na população brasileira, e em especial na população do sul do país, evidenciando a importância de estudos dessa natureza nesta população.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL:

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar os fatores virais e do hospedeiro que possam estar relacionados ao desfecho clínico de indivíduos infectados por HBV na cidade de Chapecó, SC, buscando estabelecer possíveis marcadores moleculares de progressão da Hepatite B nesta população.

### 2.2 ESPECÍFICOS:

- Verificar o perfil epidemiológico de indivíduos infectados por HBV arrolados ao estudo (pacientes crônicos e com infecção resolvida);
- Quantificar a carga viral do HBV em pacientes infectados;
- Realizar a genotipagem do HBV presente em pacientes crônicos de Hepatite B;
- Realizar a genotipagem dos SNPs humanos TNF $\alpha$  -308 G/A (rs1800629), TNF $\alpha$  -238 G/A rs361525), IL2 -330 G/T (rs2069762), IL4 -589 C/T (rs2243250), IL6 -174 G/C (rs1800795), IL10 -592 C/A (rs1800872), IL10 -1082 A/G (rs1800896), IL17A -692 T/C (rs8193036) e IL17A-197 G/A (rs2275913) em pacientes crônicos e indivíduos com infecção por HBV resolvida;
- Analisar a associação dos SNPs estudados com o desfecho clínico da infecção pelo HBV;
- Estabelecer possíveis marcadores moleculares de progressão da Hepatite B.

### 3 RESULTADOS: CAPÍTULO 1

**Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapecó, Southern Brazil,  
Originate from Italy**

Artigo submetido a revista Plos ONE em 3/07/2015. Fator de Impacto: 3,53

Aceito para a publicação em 30/07/15

**Autores:** Carolina de Souza Gusatti, Cintia Costi, Maria Laura Halon, Tarciana Grandi, Arlete Ferrari Rech Medeiros, Cláudia Maria Dornelles da Silva, Selma Andrade Gomes, Marcia Susana Nunes Silva, Christian Niel, Maria Lucia Rosa Rossetti

## RESEARCH ARTICLE

# Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapecó, Southern Brazil, Originate from Italy


Carolina Souza Gusatti<sup>1,2</sup>, Cintia Costi<sup>2</sup>, Maria Laura Halon<sup>2</sup>, Tarciana Grandi<sup>2</sup>, Arlete Ferrari Rech Medeiros<sup>3</sup>, Cláudia Maria Dornelles Silva<sup>2</sup>, Selma Andrade Gomes<sup>4</sup>, Marcia Susana Nunes Silva<sup>5</sup>, Christian Niel<sup>4\*</sup>, Maria Lucia Rosa Rossetti<sup>1,2,5</sup>

1 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 2 Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, Brazil, 3 Setor de Hepatites Virais, Secretaria Municipal de Saúde, Chapecó, Brazil, 4 Laboratório de Virologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, 5 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Brazil

\* [niel@ioc.fiocruz.br](mailto:niel@ioc.fiocruz.br)



CrossMark  
click for updates

 OPEN ACCESS

**Citation:** Gusatti CS, Costi C, Halon ML, Grandi T, Medeiros AFR, Silva CMD, et al. (2015) Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapecó, Southern Brazil, Originate from Italy. PLoS ONE 10 (8): e0135816. doi:10.1371/journal.pone.0135816

**Editor:** Isabelle A Chemin, CRCL-INSERM, FRANCE

**Received:** July 3, 2015

**Accepted:** July 27, 2015

**Published:** August 14, 2015

**Copyright:** © 2015 Gusatti et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by the research funding agencies CAPES, FAPERGS, FEPPS and CNPq, the Brazilian Ministry of Health, and the Post-Graduate Program in Cellular and Molecular Biology of the Federal University of Rio Grande do Sul (PPSUS-FAPERGS/MS/CNPq/SESRS 002/2013, process n° 1257-2551/13-8; PADCT-FEPPS-05/2010; PNPDS- 1959/2009). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Hepatitis B virus genotype A1 (HBV/A1), of African origin, is the most prevalent genotype in Brazil, while HBV/F predominates in the other South American countries. However, HBV/D is the most common in the three states of southern Brazil, where ‘islands’ of elevated prevalence, as Chapecó and other cities, have been described. In this study, 202 HBV chronic carriers attending in 2013 the viral hepatitis ambulatory of Chapecó, were investigated. In comparison with previous studies performed in the same ambulatory, a rapid aging of the HBV infected population was observed (mean age of the newly diagnosed patients increasing from 29.9 ± 10.3 years in 1996 to 44.4 ± 13.3 years in 2013), probably due to a singular vaccination schedule at Chapecó that included not only children but also adolescents. Phylogenetic and BLAST analyses (S region) classified 91 HBV isolates into genotypes A (n = 3) and D (n = 88). The majority of HBV/D isolates were closely related to D3 sequences. To understand the reasons for the absence or near absence of genotypes A and F, and how HBV/D was introduced in the south of Brazil, HBV/D infected patients were inquired about their genealogical and geographical origins. Forty-three (52%) patients have their four grandparents of Italian origin, vs. seven (8%) who have their four grandparents of Brazilian origin. At all, 65 out of 83 (78%) patients had at least one grandparent originating from Italy. Taking into consideration the fact that Italy is one of the few countries where subgenotype D3 is predominant, the results strongly suggested that HBV/D was introduced in Brazil through Italian immigration which culminated between 1870 and 1920.



**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Despite the availability of a prophylactic vaccine for more than 20 years, hepatitis B remains one of the major public health problems worldwide. More than 240 million people are chronically infected with hepatitis B virus (HBV) and more than 780,000 die every year due to the acute or chronic consequences of hepatitis B [1]. HBV prevalence, measured by the presence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the serum, varies from < 1% to > 10% depending on the country.

In Brazil, endemicity is low, and public immunization programs have been implemented since the early 1990s. The estimated HBsAg prevalence among people aged 20 to 69 years varies from 0.40% to 0.92% in the capitals of the 26 states [2]. However, some areas show prevalence rates markedly higher than the average, not only in the Amazon region, but also in some southern counties, as Chapecó [3,4] and Caixas do Sul [5].

HBV isolates have been classified into eight genotypes (A to H), based on a genomic sequence divergence > 7.5% over the entire DNA genome [6]. Additionally, genotypes I [7] and J [8] have been proposed. The most cosmopolitan genotypes are A and D. Genotypes B and C are found in East and Southeast Asia, genotype E in West Africa, and genotype F is spread among indigenous Americans [9]. Within genotype D, at least seven subgenotypes have been described. HBV/D1 is the most prevalent subgenotype in Greece, Turkey and North Africa, D2 in northeastern Europe (Russia, Belarus, Estonia) and Albania, and D3 in Italy and Serbia. The other subgenotypes circulate mainly outside Europe and the Americas [10,11]. Chronic patients infected with HBV/A show a favorable response to alpha-interferon more frequently than those infected with HBV/D (reviewed in [12]).

In South America, genotype A is predominant in Brazil [13], which is the only Portuguese speaking country, while genotype F has been shown to be the most prevalent in the other, Spanish speaking countries [14]. However, genotype D is widespread in southern Brazil. Recent studies have suggested that (i) the majority of HBV/A isolates circulating in Brazil (subgenotype A1) originated from the slaves removed from Southeast Africa at the middle of the 19th century [15], and (ii) HBV genotypes from European origin explained the elevated endemicity found in some southern Brazil areas [16].

In this study, 91 HBV isolates from chronic patients living in Chapecó (southern Brazil) were genotyped. Eighty-eight (97%) belonged to genotype D. In an attempt to understand the reasons of the absence or near absence of genotypes A and F in this population, and how HBV/D was introduced in the south of Brazil, the question of the genealogical and geographical origins of the patients was addressed, and a phylogenetic analysis was performed.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

All subjects, who knew to be or have been infected with HBV, gave their written consent to participate to the study, and answered questions about age, ethnicity, health status, occupation, lifestyle including drug use and sexual behaviour, blood transfusion, surgery, hemodialysis, presence of HBV carriers in the family, and others allowing to evaluate risk factors for HBV infection. This study was approved by the Ethics in Research Committee of Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (national registration number CAAE 20225713.5.0000.5320). Consent forms and questionnaires were kept separately in a laboratory located in a State other than that where patients lived. The names of the patients could not be linked to any study data collected.

## Subjects

Blood samples were collected in 2013 from 202 adults attending the viral hepatitis ambulatory of the Department of Health of Chapecó County, State of Santa Catarina, southern Brazil. All of them were HBsAg positive patients, diagnosed as HBV chronic carriers between 1991 and 2013. Four (2%) and two (1%) of them were anti-HIV and HCV RNA positive, respectively. Information about HBV serological status and treatment of the patients, as well as date of notification of the disease, was collected in medical records. Additionally, 161 HBsAg negative, anti-hepatitis B core (anti-HBc) positive individuals were recruited among (i) those who had been taken care in the past in the ambulatory, (ii) family members of the above-described chronic carriers, and (iii) health care workers of community health centers of Chapecó County.

## Viral DNA extraction

Viral DNA extraction was performed from 200  $\mu$ L of plasma by using the HiYield Viral Nucleic Acid Extraction kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) according to the manufacturer's instructions, with the following modifications: 0.5 mg/mL of proteinase K was added to the lysis buffer, and lysis was performed for 15 min at 60°C. DNA was recovered in 50  $\mu$ L of DNase/RNase-free water and stored at -20°C.

## Calculation of viral load, nucleotide sequencing, subtyping and genotyping

HBV DNA detection and quantification was performed by TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR). After alignment of HBV sequences available in the GenBank database by using Clustal X (Conway Institute, Dublin, Ireland), BioEdit (Abbott Company, Carlsbad, CA) and PrimerExpress (Applied Biosystems, Foster City, CA) softwares, a consensus sequence was obtained which was used to design forward (5'-TTGTCCTGGYTATCGYTGGATGTG-3') and reverse (5'-GATGAGGCATAGCAGCAGGATG-3') PCR primers and fluorescent probe (6-FAM-TGCGGCGTTTTATCAT-MGB-NFQ). The PCR product was a 72-base-pair (bp) fragment of the surface antigen gene. PCR assay was performed on an ABI 7500 platform (Applied Biosystems) in a 30  $\mu$ L reaction containing 9  $\mu$ L of DNA template, TaqMan universal master mix (Applied Biosystems), 300 nM of each primer and 250 nM of probe. Samples with known viral load were used as controls. Samples and controls were tested in triplicate. The test was linear from 1.0 log IU/mL to 8.0 log IU/mL, and the reaction efficiency was 98.3%.

HBV DNAs of the real-time PCR positive samples were then amplified by using a conventional PCR assay described previously [17], which generated a 485-bp fragment located in the S region of the genome. Amplicons were purified with PureLink PCR Purification Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). Nucleotide sequencing was done in both directions with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, and sequencing reactions were analyzed on a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Deduced amino acid sequences were used to predict the subtypes of the HBV isolates by determination of the residues present at positions 122, 127, 134 and 160 of the S protein, as described previously [18].

Genotypes of the HBV isolates were first determined by using the BLAST algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) which calculates the percent identities between a given query nucleic acid sequence and a database of sequences of known genotypes. Moreover, the high-quality portion (358 bp) of the sequences were aligned with those of 231 genotype D isolates, i.e. all those which were completely sequenced (3,182 bp) and whose subgenotype was informed in Genbank. Reference strains belonging to the other genotypes were included in the

alignment. This was performed by using Clustal-X from MEGA software version 6 [19]. Maximum likelihood method was used to construct a phylogenetic tree.

### Genealogical origins of the patients

All but one patient were born in Brazil, and the one remaining was Haitian. However, it was noticed that many patients had not Portuguese-sounding surnames, as it is usual in Brazil, due to Portuguese colonization. It was therefore decided to conduct a genealogical research using the surnames of the HBV infected patients to determine their ancestry. This was conducted in four, freely accessible databases containing a very large number of family names, in order to determine the geographical origin of the surnames of the patients. In all four databases, the search queries were the own family names of the patients. Only exact matches were considered, excluding close matches and alternative spellings. However, the object of the search varied from one database to another. Database *MyHeritage* ([www.myheritage.com](http://www.myheritage.com)), whose purpose is to reconstruct the history of the families, was queried for the most common among the birth countries of the persons carrying the same last names as those of patients. As most non-indigenous Brazilians are descendant of Europeans, only European countries were considered. Similarly, the database of the *Statue of Liberty-Ellis Island Foundation* ([www.libertyellisfoundation.org](http://www.libertyellisfoundation.org)), which identifies passengers of the ships that brought immigrants to The United States, was screened for the most common last residence/birth country of the people carrying the surnames of the patients. The presence of those family names was also investigated in the database of the *Ferrara Cidadania Italiana* company ([www.ferraracidaniaitaliana.com.br](http://www.ferraracidaniaitaliana.com.br)), which includes names of Italians who immigrated in Brazil. Finally the *Cognomix* database ([www.cognomix.it](http://www.cognomix.it)), which shows the geographical distribution of surnames within Italy, was used to determine the regions of Italy where each surname is more disseminated.

In addition, all patients were asked about the places of birth of their parents and grandparents as well as the countries of origin of the families of their four grandparents.

### Statistical analysis

Categorical variables of epidemiological features were compared using Pearson's  $\chi^2$  test or Fisher's exact test, as appropriate. Continuous variables were compared using ANOVA. *P* values  $< 0.05$  were considered statistically significant. Data were analysed using SPSS 20.0 software (IBM, Armonk, NY).

## Results

### Characteristics of the patients

[Table 1](#) shows the demographic, epidemiological and serological characteristics of 202 HBV chronically infected patients attending in 2013 the viral hepatitis ambulatory of Chapecó, southern Brazil. Data were compared with those of similar, although smaller, groups of patients of the same ambulatory notified in 1996 and 2006, respectively, whose data have been published previously [20]. The male:female ratio was almost identical (54.5–56.0% of males) in the three groups. An aging of the chronically HBV infected population over the years was observed: while about two-thirds of the patients were 20–39 years old in 1996 and 2006, more than 60% were aged 40 to 59 years in 2013. Of note, the mean age at notification (new-comers) increased significantly, from 29.9 years in 1996 to 34.9 in 2006 and 44.4 in 2011–2013 ( $p < 0.01$ ). Patients were primarily (87.6%) whites, without significant variation of the proportion over time. Vertical transmission was the major risk factor identified, with 24.8% of patients whose mother and/or siblings were HBV carriers, followed by sexual and parenteral

**Table 1. Demographic, epidemiological and serological characteristics of HBV chronically infected patients accompanied in Chapecó, southern Brazil (1996, 2006 and 2013).**

Feature	2013 (this work)	2006 [20]	1996 [20]	p value
Number of patients	202	66	84	
Males	110 (54.5%)	36 (54.5%)	47 (56.0%)	NS
Age range, years				<0.01
18–19	1 (0.5%)	4 (6.1%)	13 (15.5%)	
20–39	55 (27.2%)	42 (63.6%)	59 (70.2%)	
40–59	124 (61.4%)	18 (27.3%)	11 (13.1%)	
≥ 60	22 (10.9%)	2 (3.0%)	1 (1.2%)	
Age at notification (newcomers only)	44.4 ± 13.3 <sup>a</sup>	34.9 ± 11.9	29.9 ± 10.3	<0.01
Ethnicity				NS
Whites	177 (87.6%)	63 (95.5%)	77 (91.7%)	
Blacks or mulattos	25 (12.4%)	3 (4.5%)	6 (7.1%)	
Risk factor				-
Vertical	50 (24.8%)	n.a.	n.a.	
Parenteral	36 (17.8%)	n.a.	n.a.	
Sexual	22 (10.9%)	n.a.	n.a.	
Unknown	94 (46.5%)	-	-	
Serological markers				
HBeAg	17 (8.4%)	8 (12.1%)	2 (2.4%)	NS
Anti-HBe	170 (84.1%)	n.a.	n.a.	
Anti-HBs	0	n.a.	n.a.	

NS, not significant; n.a. not available

<sup>a</sup> Based on the 64 patients notified between 2011 and 2013.

doi:10.1371/journal.pone.0135816.t001

transmission. Hepatitis B 'e' antigen (HBeAg) marker was detected in a small proportion (8.4%) of the patients, as it was the case for the groups studied in 1996 and 2006 (Table 1).

### Viral load and occult infection

DNAs extracted from all 363 samples of this study, including 161 anti-HBc positive, HBsAg negative samples, were submitted to real time PCR. On a total of 202 HBsAg positive samples, 120 (59.4%) gave positive results, with a proportion slightly higher in the group of untreated patients (63.2%) than among those under treatment (51.5%) (Table 2). No significant difference of mean viral load was noted between the two groups (3.0 vs. 3.1 log IU/mL). As expected,

**Table 2. HBV DNA detection and viral load in HBsAg positive and negative subjects.**

HBV DNA detection	HBsAg positive		Anti-HBc positive, HBsAg negative (n = 161)
	Under treatment (n = 66)	Not treated (n = 136)	
Real-time PCR positive samples	34 (51.5%)	86 (63.2%)	9 (5.6%)
Viral load of positive samples			
< 100 IU/mL	11	14	2
100–2000 IU/mL	13	51	7
> 2000 IU/mL	10	21	0
Mean ± SD (log IU/mL)	3.1 ± 1.7	3.0 ± 1.3	2.1 ± 0.3

doi:10.1371/journal.pone.0135816.t002

a strong positive correlation ( $p = 0.0015$ ) was observed between detection of HBV DNA and HBe antigenaemia (not shown). Interestingly, nine out of the 161 anti-HBc positive, HBsAg negative samples gave PCR positive results, that suggested the occurrence of occult infection, although at low (5.6%) frequency and viral load (mean 2.1 log IU/mL).

### Genotypes and subtypes distribution

Direct sequencing of the S region, and subsequent subtyping and genotyping, were achieved for 91 HBsAg positive samples. Table 3 summarizes the results. Three (3%) and 88 (97%) samples belonged to genotypes A and D, respectively. Within genotype A, the two isolates derived from patients born in Brazil were classified as *adw2*, while the third one, from the only patient born out of Brazil (Haiti), was *ayw1*. Within genotype D, 60, 21 and 5 HBV isolates were subtyped as *ayw2*, *ayw3* and *ayw4*, respectively. Two additional *ayw* samples could not be fully subtyped, due to the presence of an Ala residue at position 127 of the small S protein in place of the usual residues Pro for subdeterminant *w1/2*, Thr for *w3*, or Leu for *w4*. Moreover, one of these two *ayw* samples showed base ambiguities at several genome positions, suggesting a mixed infection with two HBV/D isolates.

A phylogenetic tree is shown in Fig 1, that was constructed with the 91 sequences determined in this study along with 30 sequences available in GenBank and representative of the different HBV genotypes and HBV/D subgenotypes. Although it was judged preferable to restrict the classification of the isolates from Chapecó to the genotype-, not subgenotype level, because partial sequencing of the HBV genome may not be appropriate to ascertain the subgenotype [21,22], it could be observed that a majority (60/91) of them were closely related to isolates characterized as D3 after sequencing of their complete genomes. A good correlation could be observed between genotype D2 and subtype *ayw3* (blue filled circles) on one hand, and between genotype D3 and subtype *ayw2* (red) on the other hand.

### Origin of the patient family names

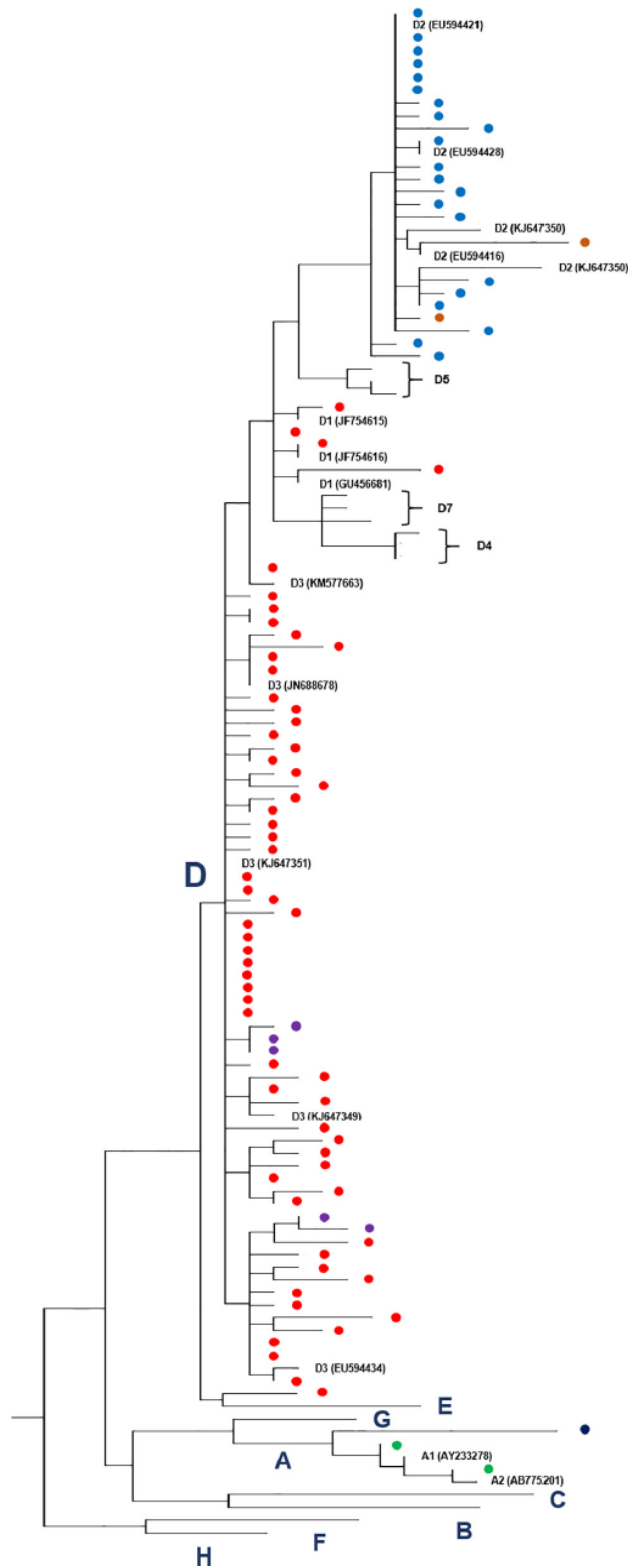
Genotypes HBV/A and HBV/F have been described as predominant in Brazil [13,23] and the other South American countries [14], respectively. While seeking the reason why genotypes A and F were absent or almost absent in the group under study (97% of HBV/D), it was noticed that many patients had not Portuguese-sounding family names, as it is generally the case in Brazil, due to Portuguese colonization. In an attempt to unveil the origin of HBV/D, it was

**Table 3. Distribution of HBV genotypes and serological subtypes among HBV chronically infected patients.**

Genotype	Subtype	<i>n</i>	Birth country
A	All	3	
	<i>adw2</i>	2	Brazil
	<i>ayw1</i>	1	Haiti
D	All	88	
	<i>ayw2</i>	60	Brazil
	<i>ayw3</i>	21	Brazil
	<i>ayw4</i>	5	Brazil
	<i>ayw<sup>a</sup></i>	2	Brazil
	Total		91

<sup>a</sup> not fully subtyped due to the presence of an alanine residue at position 127 of the small S protein

doi:10.1371/journal.pone.0135816.t003



**Fig 1. Phylogenetic analysis based on HBV small S nucleotide sequences.** The phylogenetic tree, performed by using the maximum likelihood method, incorporates 30 isolates which sequences are available in GenBank along with the 91 isolates from this study represented by filled circles. The following color-code indicates serotypes: green, *adw2*; dark blue, *ayw7*; red, *ayw2*; light blue, *ayw3*; purple, *ayw4*; brown, *ayw*.

GenBank accession numbers not indicated on the figure are: Genotype B, D00329; C, AB112066; D4, KF192838, KF192840 and KF192841; D5, GQ205378, GQ205379 and GQ205389; D7, FJ904430, FJ904444 and FJ904447; E, X75664; F, X69798; G, AB056513; H, AY090454.

doi:10.1371/journal.pone.0135816.g001

then decided to search for the geographical origins of the surnames of all the 88 HBV/D infected patients. This search was performed in four online, freely accessible databases, each of them created with a different purpose (Table 4). By retrieving data from the two largest databases, *MyHeritage* (family history;  $1.7 \times 10^9$  profiles) and *Statue of Liberty-Ellis Island Foundation* (immigrants in the USA;  $5.1 \times 10^7$  ship passenger records), Italy was found to be the most common country of birth (or last residence) of the persons carrying the surnames of the patients (43/88 [49%] and 36/73 [49%] cases, respectively). Moreover, the surnames of 34 (39%) patients were found among the records of Italian immigrants in Brazil, compiled in the *Ferrara Cidadaia Italiana* database. From the *Cognomix* database, it was inferred that Veneto was the region of Italy where the surnames of the patients were the most disseminated, in agreement with historical records of Italian immigration in Brazil [24].

### Genealogical origins of the patients

A survey was then conducted directly with the 88 HBV/D infected patients who were asked about the places of birth of their parents and grandparents as well as the countries of origin of the families of their four grandparents. These questions were answered by 87 (all but one) patients. However, four of them did not know the origin of any of their grandparents. Table 5 shows the results obtained from the remaining 83 patients. Interestingly, 43 (52%) patients declared that their four grandparents were of Italian origin, vs. only seven (8%) who had their four grandparents originated from Brazil. At all, 65 out of 83 (78%) patients had at least one grandparent originating from Italy, compared with 29 (35%), 11 (13%), six (7%) and two (2%) from Brazil, Germany, Portugal and Poland, respectively. Finally, three (4%) patients declared that one of their grandparents was indigenous.

**Table 4. Geographical origins of the surnames of 88 HBV/D infected patients living in Chapecó, southern Brazil, traced from four free databases.**

Database					Results		
Name	Countries	Purpose (search for)	Number of records	Research tool	No. (%) of patients surnames present in the database	Searched item	Countries/ regions of Italy
MyHeritage	All	Family history	$1.7 \times 10^9$ profiles	'Supersearch'	88 (100%)	Most common birth country <sup>a</sup>	Italy, 43 Portugal, 11 Others, 34
Statue of Liberty-Ellis Island Foundation	All	Immigrants in the USA	$5.1 \times 10^7$ ship passengers	'Passenger search'	73 (83%)	Most common last residence/ birth country <sup>a</sup>	Italy, 36 Portugal, 18 Others, 19
Ferrara Cidadaia Italiana	Italy	Italian immigrants in Brazil	$3.5 \times 10^5$ records	'Search your surname'	34 (39%)	–	–
Cognomix	Italy	Italian surnames	$1.1 \times 10^4$ surnames	'Maps of Italian surnames'	48 (54%)	Geographical distribution of the surnames in Italy <sup>b</sup>	Veneto, 17 Lombardy, 6 Others, 5

In all searches, only exact matches were considered, excluding close matches and alternate spellings.

<sup>a</sup> Only European countries were considered.

<sup>b</sup> Only surnames carried by more than one hundred people were considered.

doi:10.1371/journal.pone.0135816.t004

**Table 5. Countries of origin of the families of the grandparents of HBV/D infected patients living in Chapecó, southern Brazil.**

Origins of the families	<i>n</i>
Italy (4)	43
Italy (3), Brazil (1)	2
Italy (3), Germany (1)	1
Italy (3), Poland (1)	1
Italy (2), Brazil (2)	3
Italy (2), Portugal (2)	1
Italy (2), unknown (2)	2
Italy (2), Germany (1), indigenous (1)	1
Italy (2), Brazil (1), unknown (1)	1
Italy (1), Brazil (3)	1
Italy (1), Portugal (3)	2
Italy (1), Brazil (2), Germany (1)	1
Italy (1), Brazil (2), unknown (1)	1
Italy (1), Brazil (1), unknown (2)	1
Italy (1), Brazil (1), Germany (1), Portugal (1)	1
Italy (1), Brazil (1), Germany (1), unknown (1)	1
Italy (1), unknown (3)	2
Brazil (4)	7
Brazil (3), Portugal (1)	1
Brazil (3), unknown (1)	1
Brazil (2), Germany (2)	1
Brazil (2), unknown (2)	2
Brazil (2), Germany (1), Portugal (1)	1
Brazil (2), Germany (1), indigenous (1)	1
Brazil (2), Germany (1), unknown (1)	1
Brazil (1), Poland (3)	1
Brazil (1), Germany (1), indigenous (1), unknown (1)	1
Germany (4)	1
<b>Total</b>	<b>83</b>

Patients were asked about the countries of origin of their four grandparents families. All four may originate from the same country or not. Brazil, Brazilian non-indigenous families.

doi:10.1371/journal.pone.0135816.t005

## Discussion

The city of Chapecó, founded in 1917, is located in the western part of the State of Santa Catarina, a region of southern Brazil colonized by Italian, German and other European immigrants. In Chapecó, the prevalence of HBsAg and anti-HBc has been reported to be 2- to 10-fold higher than in other cities of the State [4]. In this study, demographic data of HBV chronic carriers, accompanied in 2013 at the hepatitis ambulatory of Chapecó, were compared with those obtained in the same ambulatory in 1996 and 2006 [20]. While neither the male:female ratio nor the distribution by ethnic groups varied significantly, a very fast increase was observed with respect to the mean age at which patients were directed to the ambulatory and notified of their disease, from 29.9 years in 1996, 34.9 in 2006 and 44.4 in 2011–2013. This rapid increase likely resulted from the hepatitis B compulsory vaccination campaign initiated in 1994 in Chapecó, which targeted not only babies but also children and adolescents of school age [25], thus



reducing considerably the proportion of HBV infected young adults (< 35 years old) in the last two decades.

A low percentage (15.3%) of HBV carriers, whether under treatment or not, showed a viral load > 2000 IU/mL, consistent with the low proportion (8.4%) of HBeAg positive patients. Otherwise, 9/161 (5.6%) anti-HBc positive, HBsAg negative subjects (serological pattern typical of past infection) tested positive for HBV DNA by real time PCR, suggesting the occurrence of occult B infection [26]. The HBV DNA positivity rate in this group was higher than that (3.3%) found among candidate blood donors from the same geographic region whose blood was rejected due to anti-HBc reactivity [17], although the difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

HBV isolates have been classified in at least eight genotypes (A–H) and nine main serological subtypes (*adw2*, *adw4*, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adrq<sup>+</sup>* and *adrq<sup>-</sup>*) [9,18]. HBV genotype A has been shown to be more sensitive to interferon treatment than HBV/D [27,28], and interferon has been suggested as first-line therapy in all genotype A patients [12]. Genotyping of HBV isolates may thus be a valuable tool to support therapeutic decisions, particularly in countries or regions where both genotypes A and D circulate, and where interferons are considered as a treatment option, as it is the case in Brazil. On a total of 91 HBV isolates genotyped in this study, 88 (97%) were from genotype D. Such a high percentage of genotype D is unusual in South America, where HBV/A (in Brazil) and HBV/F (in the other countries) are the most prevalent [13,14,23]. This peculiar condition should constitute a strong evidence to guide the treatment decisions to be taken by the health authorities for patients of Chapecó and surrounding region.

Genotype D includes mainly *ayw2* and *ayw3* isolates, which are predominant in Italy and other Mediterranean countries. Here, 81/88 HBV/D isolates were predicted to be *ayw2* and *ayw3*, likely related to isolates circulating in Italy (see below). The ‘w’ sub-determinant could not be defined for two *ayw* isolates. Both showed the atypical substitution Ala127 in the small S protein, previously found in a Russian isolate [29]. Moreover, one of them was associated with another HBV/D isolate (mixed infection). The remaining five HBV/D isolates were *ayw4*. Worldwide, most *ayw4* isolates belong to genotype E. To our knowledge, the D/*ayw4* isolates characterized in this study are the first reported so far in South America. However, D/*ayw4* isolates have already been described in North Africa [30] and the Middle East [31]. In Brazil, about eleven million people (5–6% of population) are descendents from Lebanese, Syrian and other Arab immigrants who arrived in the 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> centuries. Whether D/*ayw4* isolates were introduced in Brazil through Arab immigration deserves further investigation.

HBV genetic variability has been useful in epidemiological and transmission studies, tracing human migrations [9,15]. In South America, where genotypes A and F predominate, the three states of southern Brazil, namely Paraná, Rio Grande do Sul and Santa Catarina, seem to be an exception. Indeed, high (67–100%) proportions of genotype D have been reported in different cities of these states [14,32–35]. A recent report has proposed that HBV/A1 strains, predominant in Brazil, have been brought by the slaves removed from Southeast Africa at the middle of the 19th century [15]. Complementarily, the present study intended to investigate how HBV/D was introduced in southern Brazil. In the late nineteenth and early twentieth centuries, large numbers of European immigrants arrived in southern Brazil. The existence of ‘islands’ of enhanced HBsAg prevalence (1.5–3% vs. 0.5% countrywide), such as Chapecó [4] and Caxias do Sul [5], in a region recently colonized by European immigrants, as well as the fact that genotype D is one of the most prevalent in Europe [36–39], may suggest that HBV/D was imported into South America through that immigration. At this respect, Bertolini and collaborators [40] have mentioned an elevated HBV prevalence among Brazilian women of Italian and German descent, and suggested that the high prevalence of HBV/D in the south of Brazil was due to the

intense migration of settlers from European countries [16]. However, this hypothesis has not been well documented so far.

In this study, a search for the geographical origins of the surnames of 88 HBV/D infected patients living in Chapecó, southern Brazil, was performed in an attempt to unveil the origin of genotype D in Brazil. The use of online family names databases to search for the geographic origin of viruses is a novelty. In practice, these tools do require neither a large amount of personal information (only patient family names are necessary) nor purchasing of any package, since access is free. Taken into consideration the lack of consensus on the HBV evolutionary rate that makes it difficult to reconstruct the timescale of the HBV origin [11], the method used in this study of searching for the geographical origins of the virus through human migrations may constitute a valuable complement to phylogeny and phylogeography studies.

Data obtained by screening of two large databases (*MyHeritage* and *Statue of Liberty-Ellis Island Foundation*) showed that Italy was by far the most common country of birth (or last residence) of the persons having the same surnames as the patients (approximately 50% of the cases) (Table 4). Moreover, the surnames of 34 (39%) patients were found among the records of Italian immigrants in Brazil in the *Ferrara Cidadania Italiana* company database. Noteworthy, this number was probably underestimated because (i) only 350,000 of the 1.4 million Italian people who immigrated in Brazil between 1870 and 1920 [41,42] have been registered in that database and (ii) many surname transcription mistakes were made both at the entrance of immigrants and at the time of birth registration of their descendants. Veneto and Lombardy, in this order, were the regions of Italy where the surnames of the patients appeared to be most disseminated, consistent with historical records of Italian immigration in southern Brazil [24]. Furthermore, when asked about the geographical origins of their grandparents, 52% of the HBV/D infected patients answered that their four grandparents had an Italian origin, and 78% had at least one grandparent originating from Italy.

HBV subgenotype D3 has been reported as the most prevalent in Italy [38,43], one of the few countries where this happens. Although partial sequencing of the viral genome may not be appropriate to ascertain HBV subgenotypes, it is interesting to note that the majority (60/91) of HBV isolates from Chapecó were closely related to D3 isolates. Thus, the data set collected in this study strongly suggested that a large proportion of the HBV/D isolates circulating in southern Brazil were introduced through the Italian immigration, which culminated between 1870 and 1920. However, as there have been a lot exchanges between Brazil and Europe, it cannot be excluded that some HBV/D isolates were introduced from other countries.

The prevalence and distribution of the different HBV genotypes in Brazil are largely the result of settlement. The fact that genotype F is widespread in the indigenous populations of South America attests to its presence in pre-Columbian times. Logically, the other genotypes should have been brought by the successive waves of colonization (or deportation in the case of the slaves). So, HBV/A1 would have been introduced from Southeastern Africa by illegal slave trafficking in the mid-nineteenth century [15], and HBV/D entered in southern Brazil through Italian immigration in the late nineteenth and early twentieth centuries (this study). Assuming that (i) the prevalence of HBsAg carriers was around 3% in the Italian general population in the pre-vaccination era [44], and (ii) half of the 1.4 million Italians who emigrated to Brazil between 1870 and 1920 settled in the three states of southern Brazil, the number of HBV infected Italian people who arrived in Southern Brazil can be estimated to 21,000, i.e. 1.5–2% of the local population at the time. The fact that the immigrant population concentrated in some counties could explain the persistence, until now, of ‘islands’ of elevated prevalence.

Three D3 sequences (accession numbers JN688678, KJ647351 and KJ647349), closely related to Brazilian sequences (Fig 1), were from Argentinian isolates. Italians were by far the

most numerous immigrants in Argentina during the 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> centuries. It is therefore possible that a number of HBV/D isolates circulating in Argentina are also of Italian origin.

Barros and collaborators [45] recently reported proportions of 67% and 28% of genotypes A1 and D, respectively, among chronically HBV infected patients living in the State of Maranhão, Northeastern Brazil. Among HBV/D isolates, subgenotype D4 was predominant. The authors suggested that this subgenotype has been introduced in Maranhão by means of the slave trade during the late 18<sup>th</sup> century. Further studies are needed to confirm the assumption that the HBV/D isolates circulating in Brazil came from two different continents (Europe and Africa).

### Acknowledgments

The authors acknowledge the health care workers of the Viral Hepatitis Division of the Municipal Health Department of Chapecó for recruitment of patients and collection of blood samples, and the patients who kindly agreed to participate of this study. We also thank Dr. Marilene H. Vainstein for helpful scientific contributions. This work was supported by the research funding agencies CAPES, FAPERGS, FEPPS and CNPq, the Brazilian Ministry of Health, and the Post-Graduate Program in Cellular and Molecular Biology of the Federal University of Rio Grande do Sul (PPSUS-FAPERGS/MS/CNPq/SESRS 002/2013, process n° 1257-2551/13-8; PADCT-FEPPS-05/2010; PNPDS-1959/2009).

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MSNS CC CSG. Performed the experiments: CSG MLH CC. Analyzed the data: CSG CC CN TG MLRR SAG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MSNS CMDS MLRR. Wrote the paper: CSG CN. Participated in the collection of samples and obtained clinical data from the patients: CSG AFRM. Carried out the preparation of the samples: CSG MLH.

### References

1. World Health Organization. 2015. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
2. Brazilian Ministry of Health. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. 2010. Available: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2010/50071/estudo\\_prevalencia\\_hepatites\\_pdf\\_26830.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2010/50071/estudo_prevalencia_hepatites_pdf_26830.pdf).
3. Kupek EJ. Residual transfusion risk for hepatitis B and C in southern Brazil, 1991–1999. *J Viral Hepat.* 2001; 8: 78–82. PMID: [11155155](#)
4. Rosini N, Mousse D, Spada C, Treitinger A. Seroprevalence of HBsAg, Anti-HBc and anti-HCV in Southern Brazil, 1999–2001. *Braz J Infect Dis.* 2003; 7: 262–267. PMID: [14533987](#)
5. Menegol D, Spilki FR. Seroprevalence of hepatitis B and C markers at the population level in the municipality of Caxias do Sul, southern Brazil. *Braz J Microbiol.* 2013; 44: 1237–1240. doi: [10.1590/S1517-83822014005000013](#) PMID: [24688517](#)
6. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol.* 2008; 80: 27–46. PMID: [18041043](#)
7. Huy TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol.* 2008; 82: 5657–5663. doi: [10.1128/JVI.02556-07](#) PMID: [18353958](#)
8. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.* 2009; 83: 10538–10547. doi: [10.1128/JVI.00462-09](#) PMID: [19640977](#)
9. Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology* 2014; 57: 141–150. doi: [10.1159/000360947](#) PMID: [25034481](#)
10. Yousif M, Kramvis A. Genotype D of hepatitis B virus and its subgenotypes: An update. *Hepatol Res.* 2013 Apr; 43(4):355–64. doi: [10.1111/j.1872-034X.2012.01090.x](#) PMID: [22978460](#)

11. Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, Sorrentino C, Lo Presti A, Tanzi E, et al. Enigmatic origin of hepatitis B virus: an ancient travelling companion or a recent encounter? *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 7622–7634. doi: [10.3748/wjg.v20.i24.7622](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7622) PMID: [24976700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24976700/)
12. Wiegand J, Hasenclever D, Tillmann HL. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir Ther.* 2008; 13: 211–220. PMID: [18505172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18505172/)
13. Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol.* 2007; 7: 103. PMID: [18036224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18036224/)
14. Alvarado-Mora MV, Pinho JR. Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antivir Ther.* 2013; 18: 459–465. doi: [10.3851/IMP2599](https://doi.org/10.3851/IMP2599) PMID: [23792558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23792558/)
15. Lago BV, Mello FC, Kramvis A, Niel C, Gomes SA. Hepatitis B virus subgenotype A1: evolutionary relationships between Brazilian, African and Asian isolates. *PLoS One* 2014; 9: e105317. doi: [10.1371/journal.pone.0105317](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105317) PMID: [25122004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25122004/)
16. Bertolini DA, Gomes-Gouvêa MS, Guedes de Carvalho-Mello IM, Saraceni CP, Sitnik R, Graziotin FG, et al. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 1295–1304. doi: [10.1016/j.meegid.2012.04.009](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.009) PMID: [22538208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22538208/)
17. Silva CM, Costi C, Costa C, Michelon C, Oravec R, Ramos AB, et al. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. *J Infect.* 2005; 51: 24–29. PMID: [15979486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15979486/)
18. Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol.* 1992; 73: 3141–3145. PMID: [1469353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1469353/)
19. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30: 2725–2729. doi: [10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197) PMID: [24132122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132122/)
20. Nova ML. Estudo epidemiológico, clínico e molecular do vírus da hepatite B na cidade de Chapecó, Oeste de Santa Catarina. Master's thesis. Sao Paulo University. São Paulo. 2010. Available: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5147/tde-22062010-120502/pt-br.php>.
21. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 7152–7168. doi: [10.3748/wjg.v20.i23.7152](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7152) PMID: [24966586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24966586/)
22. Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, et al. Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infect Genet Evol.* 2013; 16: 355–361. doi: [10.1016/j.meegid.2013.03.021](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.021) PMID: [23538336](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23538336/)
23. Araujo NM, Mello FC, Yoshida CF, Niel C, Gomes SA. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of hepatitis B virus. *Arch Virol.* 2004; 149: 1383–1395. PMID: [15221538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15221538/)
24. Trento A. Do outro lado do Atlântico. Um século de imigração italiana no Brasil. 1989. Ed. Nobel. São Paulo.
25. Scaraveli NG. Prevalência dos marcadores das hepatites B e C em adolescentes de Chapecó. Master's thesis. Federal University of Santa Catarina. Florianópolis. 2009. Available: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/92224/263946.pdf?sequence=1>.
26. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2008; 49: 652–657. doi: [10.1016/j.jhep.2008.07.014](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.07.014) PMID: [18715666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18715666/)
27. Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, et al. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005; 54: 1009–1013. PMID: [15951551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15951551/)
28. Zhang Y, Wu Y, Ye S, Wang T, Zhao R, Chen F, et al. The response to interferon is influenced by hepatitis B virus genotype in vitro and in vivo. *Virus Res.* 2013; 171: 65–70. doi: [10.1016/j.virusres.2012.10.027](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.027) PMID: [23123214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23123214/)
29. Tallo T, Norder H, Tefanova V, Krispin T, Primägi L, Mukomolov S, et al. Hepatitis B virus genotype D strains from Estonia share sequence similarity with strains from Siberia and may specify ayw4. *J Med Virol.* 2004; 74: 221–227. PMID: [15332270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15332270/)
30. Kitab B, El Feydi AE, Afifi R, Derdabi O, Cherradi Y, Benazzouz M, et al. Hepatitis B genotypes/subgenotypes and MHR variants among Moroccan chronic carriers. *J Infect.* 2011; 63: 66–75. doi: [10.1016/j.jinf.2011.05.007](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.05.007) PMID: [21640384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21640384/)
31. Mohebbi SR, Amini-Bavil-Olyae S, Zali N, Damavand B, Azimzadeh P, Derakhshan F, et al. Characterization of hepatitis B virus genome variability in Iranian patients with chronic infection, a nationwide study. *J Med Virol.* 2012; 84: 414–423. doi: [10.1002/jmv.23200](https://doi.org/10.1002/jmv.23200) PMID: [22246826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22246826/)

32. Becker CE, Mattos AA, Bogo MR, Branco F, Sitnik R, Kretzmann NA. Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2010; 47: 13–17. PMID: [20520969](#)
33. Reis LM, Soares MA, França PH, Soares EA, Bonvicino CR. Clonal analysis of hepatitis B viruses among blood donors from Joinville, Brazil: evidence of dual infections, intragenotype recombination and markers of risk for hepatocellular carcinoma. *J Med Virol.* 2011; 83: 2103–2112. doi: [10.1002/jmv.22246](#) PMID: [22012717](#)
34. de Mello FM, Kuniyoshi AS, Lopes AF, Gomes-Gouvêa MS, Bertolini DA. Hepatitis B virus genotypes and mutations in the basal core promoter and pre-core/core in chronically infected patients in southern Brazil: a cross-sectional study of HBV genotypes and mutations in chronic carriers. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47: 701–708. doi: [10.1590/0037-8682-0158-2014](#) PMID: [25626648](#)
35. Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JR, Mello IM, Bertolini DA, Lemos MF, et al. Hepatitis B virus infection in haemodialysis centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health* 2004; 4: 13. PMID: [15113436](#)
36. Dal Molin G, Poli A, Crocè LS, D'Agaro P, Biagi C, Comar M, et al. Hepatitis B virus genotypes, core promoter variants, and precore stop codon variants in patients infected chronically in North-Eastern Italy. *J Med Virol.* 2006; 78: 734–740. PMID: [16628589](#)
37. Deterding K, Constantinescu I, Nedelcu FD, Gervain J, Nemecek V, Srtunecy O, et al. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *J Med Virol.* 2008; 80: 1707–1711. doi: [10.1002/jmv.21294](#) PMID: [18712830](#)
38. Sagnelli C, Ciccozzi M, Pisaturo M, Zehender G, Lo Presti A, Alessio L, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus genotypes circulating in acute hepatitis B patients in the Campania region. *J Med Virol.* 2014; 86: 1683–1693. doi: [10.1002/jmv.24005](#) PMID: [24980631](#)
39. Servant-Delmas A, Mercier M, El Ghouzzi MH, Girault A, Bouchardeau F, Pillonel J, et al. National survey of hepatitis B virus (HBV) polymorphism in asymptomatic HBV blood donors from 1999 to 2007 in France. *Transfusion* 2010; 50: 2607–2618. doi: [10.1111/j.1537-2995.2010.02725.x](#) PMID: [20553432](#)
40. Bertolini DA, Pinho JR, Saraceni CP, Moreira RC, Granato CF, Carrilho FJ. Prevalence of serological markers of hepatitis B virus in pregnant women from Paraná State, Brazil. *Braz. J Med Biol Res.* 2006; 39: 1083–1090. PMID: [16906283](#)
41. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro. 2000. Available: <http://cod.ibge.gov.br/20Y51>.
42. Levy MS. O papel da migração internacional na evolução da população brasileira (1872 a 1972). *Rev Saude Publica* 1974; 8 (Suppl): 49–90.
43. De Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E, Colzani D, Schiavini M, Milazzo L, et al. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology* 2007; 365: 113–124. PMID: [17451771](#)
44. Sagnelli E, Sagnelli C, Pisaturo M, Macera M, Coppola N. Epidemiology of acute and chronic hepatitis B and delta over the last 5 decades in Italy. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 7635–7643. doi: [10.3748/wjg.v20.i24.7635](#) PMID: [24976701](#)
45. Barros LM, Gomes-Gouvêa MS, Kramvis A, Mendes-Corrêa MC, dos Santos A, Souza LA, et al. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. *Infect Genet Evol.* 2014; 24: 68–75. doi: [10.1016/j.meegid.2014.03.007](#) PMID: [24642137](#)

## 4 RESULTADOS: CAPÍTULO 2

### **Association Between Cytokine Gene Polymorphisms and Outcome of Hepatitis B Virus Infection in Southern Brazil**

Manuscrito submetido à revista **Journal of Medical Virology** em 01/12/15.

Fator de Impacto: 2.347

**Autores:** Carolina de Souza Gusatti, Cintia Costi, Rúbia Marília de Medeiros, Maria Laura Halon, Tarciana Grandi, Arlete Ferrari Rech Medeiros, Cláudia Maria Dornelles da Silva, Rodrigo Rodenbusch, Marcia Susana Nunes Silva, Christian Niel, Maria Lucia Rosa Rossetti

# Association Between Cytokine Gene Polymorphisms and Outcome of Hepatitis B Virus Infection in Southern Brazil

Carolina de Souza Gusatti,<sup>1,2</sup> Cintia Costi,<sup>2</sup> Rúbia Marília de Medeiros,<sup>3</sup> Maria Laura Halon,<sup>2</sup> Tarciana Grandi,<sup>2</sup> Arlete Ferrari Rech Medeiros,<sup>4</sup> Cláudia Maria Dornelles da Silva,<sup>2</sup> Rodrigo Rodenbusch,<sup>2</sup> Márcia Susana Nunes Silva,<sup>5</sup> Christian Niel,<sup>6\*</sup> and Maria Lucia Rosa Rossetti<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Post-graduation course on Cellular and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Centre for Scientific and Technological Development, State Foundation on Medical Production and Research, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Post-graduation course on Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup>Section of Viral Hepatitis, Municipal Department of Health, Chapecó, Brazil.

<sup>5</sup>Post-graduation course on Cellular and Molecular Biology Applied to Health, Brazilian Lutheran University, Canoas, Brazil.

<sup>6</sup>Molecular Virology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

**Shortened title: Cytokine polymorphisms and HBV infection**

Supported by CAPES, FAPERGS, FEPPS, CNPq, the Brazilian Ministry of Health, and the Post-Graduate Program in Cellular and Molecular Biology of the Federal University of Rio Grande do Sul (grants PPSUS-FAPERGS/MS/CNPq/SESRS 1257-2551/13-8, PADCT-FEPPS 001817-2069/14-1 and PNPDS 1959/2009).

Conflict of interest: The authors have declared no conflicting interests

\*Correspondence to: Dr. Christian Niel, Molecular Virology Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Brasil, 4365. 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail: [niel@ioc.fiocruz.br](mailto:niel@ioc.fiocruz.br)

## ABSTRACT

A number of studies have demonstrated associations between cytokine gene polymorphisms and outcome of hepatitis B virus (HBV) infection. However, no general consensus has been reached, possibly due to differences between ethnic groups. In this study, 345 individuals living in southern Brazil, including 196 chronic HBV carriers and 149 subjects who had spontaneously recovered from acute infection, were enrolled to evaluate the influence of cytokine gene polymorphisms on the outcome of HBV infection. Most participants were of European descent. Genotyping of IL2 -330 G/T, IL4 -589 C/T, IL6 -174 G/C, IL10 -592 C/A, IL10 -1082 A/G, IL17A -197 G/A, IL17A -692 T/C, TNF- $\alpha$  -238 G/A and TNF- $\alpha$  -308 G/A single nucleotide polymorphisms was performed by using the minisequencing (single base extension) method. By univariate analysis, notable differences of genotype frequencies between the two groups of subjects were observed for IL6 -174 G/C (rs1800795), IL10 -592 C/A (rs1800872) and TNF- $\alpha$  -308 G/A (rs1800629) polymorphisms, with *P* values < 0.1. By multivariable analysis, a statistically significant association was found between genotypic profile AA+GA in TNF- $\alpha$  -308 and hepatitis B chronicity (OR, 1.82; 95% CI, 1.01-3.27; *P* = 0.046). In southern Brazil, the carriers of the -308A allele in the TNF- $\alpha$  gene promoter have a moderately higher risk of becoming chronic patients in case of HBV infection.

**KEY WORDS:** chronicity; clinical outcome; HBV; immune response; SNP



## INTRODUCTION

Hepatitis B is a worldwide spread disease, with an estimated 240 million people chronically infected. HBV vertical transmission, or infection during the first year of life, results in persistent infection in 80-90% of cases. In contrast, < 5% of otherwise healthy persons who are infected as adults will develop chronic hepatitis [WHO, 2015]. Individuals persistently infected with HBV can develop liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC), with mean incidence rates of 800 and 300 per 100,000 persons-years, respectively [Lee et al., 2013]. This diversity, in both the rate of virus clearance and the outcome of the disease in persistently infected individuals, cannot be fully explained by differences in viral or environmental factors. Thus, differences in host genetic factors may affect the natural history of hepatitis B [Thio et al., 2003; Chang, 2010].

A disequilibrium in the immunoregulatory response mediated by CD4(+) and CD8(+) T cells, by either decreasing the pro-inflammatory (Th1) response or increasing the anti-inflammatory (Th2) activity, may lead to viral persistence, with a serious risk of chronic liver failure [Bertoletti and Naoumov, 2003]. The role of cytokines and cellular immune response in both pathogenesis and viral clearance has been investigated in HBV infected patients [Bertoletti and Gehring, 2006; Bertoletti et al., 2010]. While the production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL) 2 and IL6, typically increases during the acute phase of HBV infection, facilitating viral clearance, anti-inflammatory cytokines, such as IL4 and IL10, act as inhibitors of the main effector mechanisms of Th1 response and contribute for chronicity [Wang et al.,

2004; Gao et al., 2009]. Furthermore, the increase of Th17 response (pro-inflammatory response in liver tissue), typically mediated by IL17A, has been associated with the development of HCC in hepatitis B patients [Wu et al., 2010; Zhang et al., 2010; Sun et al., 2012; Xue-Song et al., 2012].

It has been shown that levels of immunity depend on single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter regions of cytokine genes. By modulating gene expression, these SNPs may influence the susceptibility to hepatitis B and its clinical outcome. Thus, a number of reports have described statistically significant associations between determined SNPs and outcome of HBV infection [Cheong et al., 2006; Singh et al., 2007; Gao et al., 2009; Macedo et al., 2010; Wang et al., 2012; Hejr et al., 2013]. Otherwise, as notable discrepancies have been observed from one country to another, ethnicity has been suggested to play an important role in HBV infection outcome [Xia et al., 2011; Zhang et al., 2011; Zheng et al., 2012].

In this study, the influence of IL2 -330 G/T (rs2069762), IL4 -589 C/T (rs2243250), IL6 -174 G/C (rs1800795), IL10 -592 C/A (rs1800872), IL10 -1082 A/G (rs1800896), IL17A-197 G/A (rs2275913), IL17A -692 T/C (rs8193036), TNF- $\alpha$  -238 G/A (rs361525) and TNF- $\alpha$  -308 G/A (rs1800629) SNPs in the outcome of HBV infection was investigated in a group of patients living in southern Brazil, most of whom were European descendants.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients and Controls**

Blood samples were collected from 345 adults living in Chapecó, state of Santa Catarina, southern Brazil, who were divided into two groups: Group 1 consisted of 196 HBV chronically infected patients attending a viral hepatitis ambulatory [Gusatti et al., 2015] while group 2 comprised 149 subjects who resolved spontaneously HBV infection (anti-HBc positive, HBsAg and HBV DNA negative individuals). Patients infected with HIV or HCV were excluded from this study.

All participants knew to be or have been infected with HBV, gave their written consent to participate to the study, and answered questions about demographic and epidemiological features [Gusatti et al., 2015]. Participants were classified as whites, blacks and mulattos by self-identification. Information about HBV serological status and biochemical data were collected in medical records.

This study was approved by the Ethics in Research Committee of Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (national registration number CAAE 20225713.5.0000.5320).

### **DNA Extraction**

Human DNA was extracted from 200 µL of buffy coat using the NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's

instructions. The extracted DNA was recovered in 100  $\mu$ L of elution buffer (5mM Tris/HCl, pH 8.5) and stored at -20°C for further analysis.

### **SNP Genotyping**

Genotyping of the IL2 -330 G/T (rs2069762), IL4 -589 C/T (rs2243250), IL6 -174 G/C (rs1800795), IL10 -592 C/A (rs1800872), IL10 -1082 A/G (rs1800896), IL17A -197 G/A (rs2275913), IL17A -692 T/C (rs8193036), TNF- $\alpha$  -238 G/A (rs361525) and TNF- $\alpha$  -308 G/A (rs1800629) SNPs was performed by using the minisequencing (single base extension) method with the ABI PRISM SNaPshot Multiplex kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The conditions of the multiplex amplification reaction and the set of oligonucleotide primers used will be described elsewhere [Medeiros et al., in preparation]. Reaction products were electrophoresed on ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer. Genotypes were identified with GeneMapper software version 5.0 (Applied Biosystems).

### **Statistical Analysis**

Categorical variables of epidemiological features were compared using Pearson's  $\chi^2$  test or Fisher's exact test, depending on the case. The quantitative variables were compared using T-test, when applicable. A multicollinearity analysis was performed to detect any correlation between predictor variables. Genotype and allele frequencies were determined by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each locus using Markov chain as implemented in Arlequin software version 3.5 [Excoffier and Lischer, 2010].

Dominant and recessive genetic models were assumed based on previous studies of phenotype effects [Nakayama et al., 2000; Barrett et al., 2003; Christensen et al., 2006; Tayebi and Mohamadkhani, 2012; Li et al., 2014]. Haplotype frequencies were estimated using the MLOCUS computer program [Long et al., 1995]. Linkage disequilibrium  $D'$  was calculated with Haploview software version 4.2 [Barrett et al., 2005], using a cut-off value of 0.8 for positive linkage disequilibrium. Statistical associations between SNPs and outcome of HBV infection were sought by logistic regression models, using the SPSS 20.0 software (IBM, Armonk, NY).  $P$  values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### **Characteristics of the Patients With Chronic and Resolved HBV Infection**

Table I shows demographic, epidemiological and clinical features of the 345 individuals recruited for this study, divided into 196 chronically HBV infected patients and 149 subjects with resolved infection. In both groups, 85-88% were whites (Euro-descendants). However, the proportions of males and cases of vertical transmission were significantly higher among chronic carriers, who showed a mean educational level lower than that observed in the group of subjects with resolved infection. As a multicollinearity analysis (not shown) detected a correlation between educational level and sex ( $P < 0.05$ ), the variables gender and mode of transmission, but not educational level, were included for adjustment in univariate and multivariate analyses.

### **Associations Between Cytokine Gene Polymorphisms and Outcome of HBV Infection**

Nine SNPs, located in the promoters of six cytokine genes (IL2, IL4, IL6, IL10, IL17A and TNF- $\alpha$ ), were studied. In all cases, the distribution of the genotypes was in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown). The frequencies of genotypes and alleles are supplied as supplemental material. Table II summarizes the frequencies of the genotypic profiles of the nine SNPs under study and comparison between patients with chronic HBV infection and those who had spontaneously recovered from acute infection. By univariate

analysis, notable differences of frequencies between the two groups of subjects were observed for three SNPs, namely IL6 -174 G/C (rs1800795), IL10 -592 C/A (rs1800872) and TNF- $\alpha$  -308 G/A (rs1800629), with  $P$  values  $< 0.1$ . Multivariable analysis was thus performed for these three SNPs. However, a unique statistically significant association ( $P = 0.046$ , OR = 1.82, 95%CI 1.01-3.27) was confirmed, between genotypic profile TNF- $\alpha$  -308 AA+GA and HBV chronic infection.

Linkage disequilibrium values were calculated for the three pairs of close polymorphisms IL10 -592 C/A (rs1800872) and -1082 A/G (rs1800896), IL17A -197 G/A (rs2275913) and -692 C/T (rs8193036), and TNF- $\alpha$  -238 G/A (rs361525) and -308 G/A (rs1800629). Results demonstrated that only TNF- $\alpha$  -238 and -308 polymorphisms were in linkage disequilibrium ( $D' = -1$ ). The haplotype formed by the two polymorphisms in the TNF- $\alpha$  gene was then evaluated, but no statistically significant association with chronic HBV infection or viral clearance was found (Table III).

## DISCUSSION

HBV infection can result in a diversity of clinical outcomes, from transient liver disease followed by virus clearance to persistence of the infection leading to chronicity and liver failure. The outcome of infection is thought to depend on viral, environmental and host genetic factors. Due to the key role of cytokine expression levels in the immunoregulatory response against HBV infection, a number of SNPs located in IL2, IL4, IL6, IL10, IL12B, IL16, IL17, IL18, IL21, IL23R, IFN $\gamma$  and TNF- $\alpha$  genes have been investigated in order to evaluate their importance on the balance between host immunity and viral survival strategies [Wang et al., 2004; Gao et al., 2009; Wang et al., 2012; Lu et al., 2014; Romani et al., 2014; Tunçbilek, 2014; Xiang et al., 2014; Zhang et al., 2014; Ferreira et al., 2015; Ren et al., 2015; Sghaier et al., 2015; Wu et al., 2015; Yao et al., 2015].

In this context, the host genetic characteristics associated with ethnicity should be taken into consideration because they may lead to conflicting results when comparing the effects of cytokine gene polymorphisms in populations from different regions of the world [Xia et al., 2011; Tayebi and Mohamadkhani, 2012]. As most studies have been conducted in Asia, it is noteworthy that their conclusions are not necessarily valid for any country, especially those of the Western hemisphere.

The Brazilian people are the result of an intense admixture of European and African descendants, with a limited influence of the native Amerindians. Whites and mulattoes represent about 48% and 43% of the population, respectively [IBGE, 2010]. In the three southern Brazilian States (Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul), however, the proportion of whites is much higher. In



Chapecó, where this work was done, white people are descendant of the European settlers who immigrated in southern Brazil in the late 19th and early 20th centuries, mainly from Italy, Germany and Poland. Thus, a large majority (85-88%) of the participants of this study were whites, due to their European descent.

Another relevant characteristic of the present study was its uniformity in terms of viral genotype. Indeed, it has been previously shown that > 95% of the HBV isolates circulating in Chapecó belonged to the same genotype (D) [Gusatti et al., 2015]. This was a great advantage compared to other studies in which the HBV genotypes involved were not determined or where the patients were infected with different genotypes, which introduced a supplementary variable and might difficult the interpretation of the results.

This study focused on nine SNPs, located in the promoters of six cytokine (IL2, IL4, IL6, IL10, IL17A and TNF- $\alpha$ ) genes. Genotype frequencies were compared between 196 chronic HBV carriers and 149 subjects who had spontaneously recovered from acute infection. As the male:female ratio and the proportion of patients infected by vertical transmission were higher in the first group, regression analysis was adjusted according to gender and mode of HBV transmission.

TNF- $\alpha$ , produced by a variety of cells such as macrophages, monocytes, neutrophils, T-lymphocytes and natural killer cells, is an important stimulatory factor, promoting the secretion of other cytokines and the expression of adhesion molecules on endothelial cells. A positive correlation was found between TNF- $\alpha$  -308 polymorphism and chronic infection: carriers of AA and GA genotypes were 1.8 times more likely to become hepatitis B chronic patients than the others (OR,

1.82; 95% CI, 1.01-3.27;  $P = 0.046$ ). This finding was in agreement with those recently found in Brazil [Ferreira et al., 2015] and North Africa (Tunisia) [Sghaier et al., 2015] where the carriers of the minor allele -308A showed an increased risk of developing chronic hepatitis B. Moreover, two other Brazilian studies [Conde et al., 2013; Teixeira et al., 2013] demonstrated that the -308A allele enhanced the risk of disease severity (progression to cirrhosis and HCC). However, the data obtained here were in opposition to those reported with Asian/Mongoloid populations where the presence of the -308A allele was associated with spontaneous viral clearance [Zheng et al., 2010; Xia et al., 2011; Tayebi and Mohamadkhani, 2012; Xu et al., 2013]. Meanwhile, studies from Germany [Höhler et al., 1998] and Italy [Niro et al., 2005] reported the absence of notable influence of the TNF- $\alpha$  -308 polymorphism. Such discrepancies, which remain largely unexplained, underscore the importance of taking into consideration the ethnic background of the populations under study in the analysis of the effects of cytokine gene polymorphisms on the outcome of HBV infection.

IL10 inhibits the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , IL2, IL3, TNF- $\alpha$  and GM-CSF. In this study, the genotypic profile AA+CA at position -592 in the promoter of the IL10 gene was found to be more frequent in the clearance group than among the chronic hepatitis B patients. This seemed to corroborate previous studies performed in China showing an increased frequency of the AA genotype in subjects with viral clearance [Wang et al., 2012] and an association of the GG genotype to chronicity [Xiang et al., 2014]. However, the difference of genotype frequencies observed here was not statistically significant, and divergent findings have also been reported [Cheong et al., 2006; Sofian et

al., 2013]. The real influence of the IL10 -592 C/A polymorphism on the outcome of HBV infection has to be confirmed.

In a similar manner, the increased frequency of the IL6 -174 CC genotype in the clearance group noted in this study remains doubtful, since the results did not reach statistical significance, pointing out the need for further studies with larger cohorts.

As only small differences of genotype frequencies were observed between chronic patients and the clearance group for the six other polymorphisms under study (IL2 -330 G/T, IL4 -589 C/T, IL10 -1082 A/G, IL17A -197 G/A, IL17A -692 T/C and TNF- $\alpha$  -238 G/A), it is unlikely that those polymorphisms have any influence on the outcome of HBV infection, at least in populations from southern Brazil.

In conclusion, nine SNPs, located in the promoters of six cytokine genes, were tested in this study. Although reasonable differences were noted in the frequencies of genotypes between chronic hepatitis B patients and those with resolved infection, the level of statistical significance was only reached in the case of the TNF- $\alpha$  -308 SNP, for which genetic profile AA+GA was more frequent in the group of chronic patients. Ethnicity is thought to play an important role in the immunoregulatory response against HBV infection. As most studies published until now reported data collected from Asian populations, more investigations in the European, African and American continents are required to apprehend the true influence, if any, of these polymorphisms on the outcome of HBV infection in these populations.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors acknowledge the staff of the Viral Hepatitis Division of the Municipal Health Department of Chapecó for recruitment of patients and collection of blood samples, as well as the patients who kindly agreed to participate of this study. We also thank Dr. Marilene H. Vainstein for helpful scientific contributions. This work was supported by the research funding agencies CAPES, FAPERGS, FEPPS and CNPq, the Brazilian Ministry of Health, and the Post-Graduate Program in Cellular and Molecular Biology of the Federal University of Rio Grande do Sul (Grant numbers PPSUS-FAPERGS/MS/CNPq/SESRS 1257-2551/13-8, PADCT-FEPPS 001817-2069/14-1 and PNPDS 1959/2009).

## REFERENCES

- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265.
- Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. 2003. Polymorphisms in tumour necrosis factor- $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$ , interleukin-10, interleukin-6, interferon- $\gamma$ , and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 71:212–218.
- Bertoletti A, Gehring AJ. 2006. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 87:1439–1449.
- Bertoletti A, Maini MK, Ferrari C. 2010. The host-pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antivir Ther* 15 Suppl 3:15–24.
- Bertoletti A, Naoumov NV. 2003. Translation of immunological knowledge into better treatments of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 39:115–124.
- Chang KM. 2010. Hepatitis B immunology for clinicians. *Clin Liver Dis* 14:409–424.
- Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, Lee JH, Park CS, Lee JE, Hahm KB, Kim JH. 2006. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol* 21:1163–1169.
- Christensen U, Haagerup A, Binderup HG, Vestbo J, Kruse TA, Børghlum AD. 2006. Family based association analysis of the IL2 and IL15 genes in allergic disorders. *Eur J Hum Genet* 14:227–235.
- Conde SR, Feitosa RN, Freitas FB, Hermes RB, Demachki S, Araújo MT, Soares MC, Ishak R, Vallinoto AC. 2013. Association of cytokine gene polymorphisms and serum concentrations with the outcome of chronic hepatitis B. *Cytokine* 61:940–944.
- Excoffier L, Lischer HE. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564–567.
- Ferreira SC, Chachá SG, Souza FF, Teixeira AC, de Carvalho Santana R, Deghaide NH, Rodrigues S, Marano LA, Mendes-Junior CT, Zucoloto S, Donadi EA, Martinelli AL. 2015. IL-18, TNF, and IFN- $\gamma$  alleles and genotypes are associated with susceptibility to chronic hepatitis B infection and severity of liver injury. *J Med Virol* 87:1689–1696.
- Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, Jia M, Wang LM, Wu LH, Wang SY, Tong LX. 2009. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World J Gastroenterol* 15:5610–5619.

- Gusatti CS, Costi C, Halon ML, Grandi T, Medeiros AF, Silva CM, Gomes SA, Silva MS, Niel C, Rossetti ML. 2015. Hepatitis B virus genotype D isolates circulating in Chapecó, southern Brazil, originate from Italy. *PLoS One* 10:e0135816.
- Hejr S, Karimi MH, Yaghobi R, Kamali-Sarvestani E, Geramizadeh B, Roozbeh J. 2013. Association of IL-17, IL-21, and IL-23R gene polymorphisms with HBV infection in kidney transplant patients. *Viral Immunol* 26:201–206.
- Höhler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Büschenefelde KH, Rittner C. 1998. A tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* 111:579–582.
- IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics). População residente, por cor ou raça, segundo o sexo e os grupos de idade – Brasil. 2010. Available from: [http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas\\_da\\_populacao/tabelas\\_pdf/tab3.pdf](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/tabelas_pdf/tab3.pdf) Accessed on September 18, 2015
- Lee MH, Yang HI, Liu J, Batrla-Utermann R, Jen CL, Iloeje UH, Lu SN, You SL, Wang LY, Chen CJ; R.E.V.E.A.L.-HBV Study Group. 2013. Prediction models of long-term cirrhosis and hepatocellular carcinoma risk in chronic hepatitis B patients: risk scores integrating host and virus profiles. *Hepatology* 58:546–554.
- Li N, Zhu Q, Li Z, Han Q, Zhang G, Chen J, Lv Y, Xing F, Chen Y, Zeng X, Liu Z. 2014. IL17A gene polymorphisms, serum IL-17A and IgE levels, and hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Mol Carcinog* 53:447–457.
- Long JC, Williams RC, Urbanek M. 1995. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56:799–810.
- Lu Y, Peng J, Wang C, Zhu Y, Wang F, Sun Z. 2014. IL-6 promoter functional polymorphism -572C/G affects spontaneous clearance of hepatitis B virus infection. *Clin Lab* 60:1903–1907.
- Macedo LC, Isolani AP, Visentainer JE, Moliterno RA. 2010. Association of cytokine genetic polymorphisms with the humoral immune response to recombinant vaccine against HBV in infants. *J Med Virol* 82:929–933.
- Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N, Taguchi H, Hitani A, Kawana-Tachikawa A, Fukushima M, Yamada K, Sugiura W, Oka SI, Ajisawa A, Sato H, Takebe Y, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. 2000. Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J Virol* 74:5452–5459.
- Niro GA, Fontana R, Gioffreda D, Valvano MR, Lacobellis A, Facciorusso D, Andriulli A. 2005. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and clearance or progression of hepatitis B virus infection. *Liver Int* 25:1175–1181.

- Ren H, Zhang TT, Hu WL. 2015. A -819 C/T polymorphism in the interleukin-10 promoter is associated with persistent HBV infection, but -1082 A/G and -592A/C polymorphisms are not: a meta-analysis. *Arch Virol* 160:747–756.
- Romani S, Hosseini SM, Mohebbi SR, Kazemian S, Derakhshani S, Khanyaghma M, Azimzadeh P, Sharifian A, Zali MR. 2014. Interleukin-16 gene polymorphisms are considerable host genetic factors for patients' susceptibility to chronic hepatitis B infection. *Hepat Res Treat* 2014: 790753.
- Sghaier I, Zidi S, Mouelhi L, Dabbech R, Ghazouani E, Brochot E, Stayoussef M, Yacoubi-Loueslati B. 2015. The relationship between TNF alpha gene polymorphisms (-238/-308), TNF RII VNTR (p75) and outcomes of hepatitis B virus infection in Tunisian population. *Gene* 568: 140–145.
- Singh R, Kaul R, Kaul A, Khan K. 2007. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol* 13:1770–1787.
- Sofian M, Kalantar E, Aghakhani A, Hosseini S, Banifazl M, Eslamifar A, Jourabchi A, Farazi AA, Ramezani A. 2013. No correlation between interleukin-10 gene promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection outcome. *Hepat Mon* 13:e8803.
- Sun HQ, Zhang JY, Zhang H, Zou ZS, Wang FS, Jia JH. 2012. Increased Th17 cells contribute to disease progression in patients with HBV-associated liver cirrhosis. *J Viral Hepat* 19:396–403.
- Tayebi S, Mohamadkhani A. 2012. The TNF- $\alpha$  -308 promoter gene polymorphism and chronic HBV infection. *Hepat Res Treat* 2012:493219.
- Teixeira AC, Mendes CT Jr, Marano LA, Deghaide NH, Secaf M, Elias J Jr, MugliaV, Donadi EA, Martinelli AL. 2013. Alleles and genotypes of polymorphisms of IL-18, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  are associated with a higher risk and severity of hepatocellular carcinoma (HCC) in Brazil. *Hum Immunol* 74:1024–1029.
- Thio CL, Thomas DL, Karacki P, Gao X, Marti D, Kaslow RA, Goedert JJ, Hilgartner M, Strathdee SA, Duggal P, O'Brien SJ, Astemborski J, Carrington M. 2003. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 77:12083–12087.
- Tunçbilek S. 2014. Relationship between cytokine gene polymorphisms and chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 20:6226–6235.
- Wang C, Tang J, Song W, Lobashevsky E, Wilson CM, Kaslow RA. 2004. HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination. *Hepatology* 39:978–988.
- Wang C, Zhang X, Zhu B, Hu D, Wu J, Yu R, Zhao W. 2012. Relationships between tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-12B and interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis B in Chinese Han haemodialysis patients. *Nephrology* 17:167–174.

- WHO. Hepatitis B. Fact sheet No 204. Updated 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> Accessed on September 2, 2015.
- Wu JF, Hsu HY, Chiu YC, Chen HL, Ni YH, Chang MH. 2015. The effects of cytokines on spontaneous hepatitis B surface antigen seroconversion in chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 194:690–696.
- Wu W, Li J, Chen F, Zhu H, Peng G, Chen Z. 2010. Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients. *J Gastroenterol Hepatol* 25:750–757.
- Xia Q, Zhou L, Liu D, Chen Z, Chen F. 2011. Relationship between TNF- $\alpha$  gene promoter polymorphisms and outcomes of hepatitis B virus infections: A meta-analysis. *PLoS One* 6:e19606.]
- Xiang Y, Huang SF, Xia JR, Ye DQ, Chen P, Yang SS, Sun S, Lai XF, Zhang LP. 2014. Association of the IFNAR1-17470 and IL-10-592 cytokine variants with susceptibility to chronic hepatitis B viral infections in a Chinese population. *Genet Mol Res* 13:9187–9195.
- Xu J, Zhang S, Zhang Z, Fu L, Zheng Q, Wang J, Lu S, Du J. 2013. TNF-alpha promoter region polymorphisms affect HBV virus clearance in southern Chinese. *Clin Chim Acta* 425: 90–92.
- Xue-Song L, Cheng-Zhong L, Ying Z, Mo-Bin W. 2012. Changes of Treg and Th17 cells balance in the development of acute and chronic hepatitis B virus infection. *BMC Gastroenterol* 12:43.
- Yao JY, Chao K, Li MR, Wu YQ, Zhong BH. 2015. Interleukin-21 gene polymorphisms and chronic hepatitis B infection in a Chinese population. *World J Gastroenterol* 21:4232–4239.
- Zhang TC, Pan FM, Zhang LZ, Gao YF, Zhang ZH, Gao J, Ge R, Mei Y, Shen BB, Duan ZH, Li X. 2011. A meta-analysis of the relation of polymorphism at sites -1082 and -592 of the IL-10 gene promoter with susceptibility and clearance to persistent hepatitis B virus infection in the Chinese population. *Infection* 39:21–27.
- Zhang TC, Zhao YQ, Hu GL, Liu XQ, Huang XK. 2014. The relationship between tumour necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism and susceptibility and clearance of the persistent hepatitis B virus infection in a Chinese population: a meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 20:227–234.
- Zhang JY, Zhang Z, Lin F, Zou ZS, Xu RN, Jin L, Fu JL, Shi F, Shi M, Wang HF, Wang FS. 2010. Interleukin-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 51:81–91.
- Zheng MH, Qiu LX, Xin YN, Pan HF, Shi KQ, Chen YP. 2010. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -308A allele may have a protective effect for chronic hepatitis B virus infection in Mongoloid populations. *Int J Infect Dis* 14: e580–e585.



Zheng MH, Xiao DD, Lin XF, Wu SJ, Peng MM, Yu XY, Liu WY, Li LF, Shi KQ, Fan YC, Chen YP. 2012. The tumour necrosis factor- $\alpha$ -238A allele increases the risk of chronic HBV infection in European populations. *J Viral Hepat* 19:e11–e17.

TABLE I. Demographic, Epidemiological, Serological, Molecular and Biochemical Features of Patients With Chronic and Resolved HBV Infection

Feature	Chronic HBV infection n = 196	Resolved HBV infection n = 149	P value
<i>Male gender</i>	107 (54.6%)	42 (28.2%)	< 0.001
<i>Age, M ± SD (years)</i>	45.8 ± 11.9	46.2 ± 10.7	NS
<i>Age range</i>			
< 30 years	20 (10.2%)	7 (4.4%)	NS
30-39 years	34 (17.3%)	41 (27.2%)	
40-49 years	62 (31.6%)	42 (28.2%)	
≥ 50 years	80 (40.8%)	59 (39.6%)	
<i>Ethnic groups</i>			
Whites	171 (87.2%)	128 (85.9%)	NS
Blacks and mulattos	25 (12.8%)	21 (14.1%)	
<i>Mode of transmission</i>			
Vertical	50 (25.5%)	22 (14.8%)	0.005
Parenteral	30 (15.3%)	21 (14.1%)	
Sexual	19 (9.7%)	32 (21.5%)	
Unknown	97 (49.4%)	74 (49.7%)	
<i>Educational Level</i>			
< 9 years	91 (46.4%)	52 (34.9%)	0.04
9-11 years	62 (31.6%)	66 (44.3%)	
> 11 years	43 (21.9%)	31 (20.8%)	
<i>Hepatitis B familiar history</i>	54 (27.5%)	31 (20.8%)	NS
<i>Serological, molecular and biochemical data</i>			
HBeAg	16 (8.1%)	-	-
anti-HBe	165 (84.1%)	3 (2.0%)	-
anti-HBs	-	113 (75.8%)	-
HBV DNA, M ± SD (log IU/mL)	3.0 ± 1.3	-	-
ALT, M ± SD (IU/L)	58.3 ± 66.2	-	-
AST, M ± SD (IU/L)	46.8 ± 58.8	-	-
Total bilirubin, M ± SD (mg/dL)	1.0 ± 0.6	-	-

NS: Not significant

1

2

TABLE II. Frequencies of the Genotypic Profiles of Nine Cytokine SNPs in Patients With Chronic vs. Resolved HBV Infection

SNP	Model	Genotypic profile	Phenotype <sup>a</sup>	Chronic infection (n = 196)	Resolved infection (n = 149)	Univariate analysis			Multivariate analysis <sup>b</sup>		
						P value	OR	95% CI	P value	OR	95% CI
IL2 -330 G/T	dominant	GG + GT TT	high	109 (55.6%) 87 (44.4%)	73 (49.0%) 76 (51.0%)	> 0.1	1.29	0.82 – 2.02	-	-	-
IL4 -589 C/T	recessive	TT CC + CT	low	8 (4.1%) 187 (95.9%)	7 (4.7%) 142 (95.3%)	> 0.1	0.98	0.33 – 2.91	-	-	-
IL6 -174 G/C	recessive	CC GG + GC	low	18 (9.2%) 178 (90.8%)	22 (14.8%) 127 (85.2%)	0.099	0.55	0.27 – 1.12	0.074	0.52	0.24 – 1.07
IL10 -592 C/A	dominant	AA + CA CC	low	96 (49.7%) 97 (50.3%)	84 (57.1%) 63 (42.9%)	0.077	0.66	0.42 – 1.05	0.063	0.64	0.40 – 1.02
-1082 A/G	dominant	GG + GA AA	high	120 (61.2%) 76 (38.8%)	90 (60.4%) 59 (39.6%)	> 0.1	1.06	0.67 – 1.70	-	-	-
IL17A -197 G/A	dominant	GG + GA AA	high	179 (91.3%) 17 (8.7%)	139 (93.3%) 10 (6.7%)	> 0.1	0.75	0.31 – 1.80	-	-	-
-692 T/C	dominant	CT + TT CC	high	178 (90.8%) 17 (8.7%)	142 (95.3%) 7 (4.7%)	> 0.1	0.48	0.18 – 1.24	-	-	-
TNF- $\alpha$ -238 G/A	dominant	AA + GA GG	high	22 (11.2%) 173 (88.3%)	22 (14.8%) 127 (85.2%)	> 0.1	0.73	0.37 – 1.44	-	-	-
-308 G/A	dominant	AA + GA GG	high	49 (25.1%) 146 (74.9%)	24 (16.1%) 125 (83.9%)	0.027	1.92	1.07 – 3.44	0.046	1.82	1.01 – 3.27

3

4

5

<sup>a</sup>Increased (high) or decreased (low) cytokine synthesis. <sup>b</sup>The logistic regression was adjusted for sex and mode of HBV transmission (see text).

6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

TABLE III. Haplotype Frequencies and Multivariate Analysis of TNF- $\alpha$  Genetic Variant in Patients With Chronic and Resolved HBV Infection

Haplotype TNF- $\alpha$ (rs361525, rs1800629)	Chronic HBV infection (n=195)	Resolved HBV infection (n=149)	Multivariate analysis <sup>a</sup>		
			<i>P</i> value	OR	95% CI
GG	129 (66.2%)	104 (69.8%)	Reference	-	-
GA	44 (22.6%)	23 (15.4%)	0.071	1.75	0.95–3.20
AG	22 (11.3%)	22 (14.8%)	0.576	0.82	0.41–1.64
AA	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-

<sup>a</sup>Logistic regression adjusted for sex and mode of transmission

## 25 Supplemental material. Genotypes and alleles frequencies

Gene	SNP	dbSNP ID	Genotype / allele	Chronic HBV infection (n = 196)	Resolved HBV infection (n = 149)
IL2	-330 G/T	rs2069762	GG	29 (14.8%)	15 (10.1%)
			GT	80 (40.8%)	58 (38.9%)
			TT	87 (44.4%)	76 (51.0%)
			G	138 (35.2%)	88 (29.5%)
			T	254 (64.8%)	210 (70.5%)
IL4	-589 C/T	rs2243250	CC	141 (72.3%)	96 (64.4%)
			CT	46 (23.6%)	46 (30.9%)
			TT	8 (4.1%)	7 (4.7%)
			C	328 (84.1%)	238 (79.9%)
			T	62 (15.9%)	60 (20.1%)
IL6	-174 G/C	rs1800795	GG	101 (51.5%)	71 (47.7%)
			GC	77 (39.3%)	56 (37.7%)
			CC	18 (9.2%)	22 (14.8%)
			G	279 (71.2%)	198 (66.4%)
			C	113 (28.8%)	100 (33.6%)
IL10	-592 C/A	rs1800872	AA	23 (11.9%)	23 (15.6%)
			AC	73 (37.8%)	61 (41.5%)
			CC	97 (50.3%)	63 (42.9%)
			A	119 (30.8%)	107 (36.4%)
			C	267 (69.2%)	187 (63.6%)
	-1082 G/A	rs1800896	GG	17 (8.7%)	22 (14.8%)
			GA	103 (52.6%)	68 (45.6%)
			AA	76 (38.8%)	59 (39.6%)
			G	137 (34.9%)	112 (37.6%)
			A	255 (65.1%)	186 (62.4%)
IL17A	-197 G/A	rs2275913	GG	120 (61.2%)	86 (57.7%)
			GA	59 (30.1%)	53 (35.6%)
			AA	17 (8.7%)	10 (6.7%)
			G	299 (76.3%)	225 (75.5%)
			A	93 (23.7%)	73 (24.5%)
	-692 T/C	rs8193036	CC	17 (8.7%)	7 (4.7%)
			CT	71 (36.4%)	55 (36.9%)
			TT	107 (54.9%)	87 (58.4%)
			C	105 (26.9%)	69 (23.3%)
			T	285 (73.1%)	229 (76.8%)
TNF $\alpha$	-238 G/A	rs361525	GG	173 (88.7%)	127 (85.2%)
			GA	21 (10.8%)	21 (14.1%)
			AA	1 (0.5%)	1 (0.7%)
			G	367 (94.1%)	275 (92.3%)
			A	23 (5.9%)	23 (7.7%)
	-308 G/A	rs1800629	GG	146 (74.9%)	125 (83.9%)
			GA	42 (21.5%)	23 (15.4%)
			AA	7 (3.6%)	1 (0.7%)
			G	334 (85.6%)	273 (91.6%)
			A	56 (14.4%)	25 (8.4%)

26

27

## 5 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A hepatite B é uma doença viral infectocontagiosa mundialmente disseminada. Acredita-se que aproximadamente 240 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas atualmente (WHO, 2015). O desfecho clínico da infecção por sua vez é influenciado tanto por fatores relacionados ao vírus (carga viral, genótipo, mutações, evasão de resposta imune), quanto a características do hospedeiro infectado. A idade, sexo, estado nutricional, bem como o tipo de transmissão são ditos fatores de risco para a progressão à cronicidade, pois influenciam diretamente na resposta imune do hospedeiro (CHANG & LEWIN 2007; CROAGH *et al.*, 2015).

Neste estudo primeiramente abordou-se as variáveis pertinentes ao vírus, com a determinação do genótipo e dos níveis de carga viral (capítulo 1) que possam justificar a atual situação epidemiológica da população estudada. No segundo capítulo, foram analisados potenciais polimorfismos genéticos atuantes no desfecho clínico de infectados pelo vírus da hepatite B, na tentativa de determinar possíveis marcadores moleculares da infecção na população estudada.

No primeiro capítulo da tese, foi realizada uma comparação entre o perfil epidemiológico da população infectada da cidade de Chapecó ao longo de um período de 17 anos (1996 a 2013). Foi observado um aumento na média da idade dos pacientes notificados ao longo do período analisado (29.9 anos em 1996, 34.9 em 2006 e 44.4 em 2011–2013), justificado em grande parte pela política

de prevenção instituída no município, que buscou conscientizar a população sobre a transmissão da doença e vacinar, além de recém-nascidos, crianças e adolescentes em idade escolar na tentativa de diminuir o número de infectados nesta faixa etária (SCARAVELI, 2009).

Fatores virais como a carga viral e o genótipo podem predispor risco à gravidade da hepatite crônica. Há um risco aumentado de doença hepática grave em indivíduos com altas cargas virais (EL-SERAG, 2012). Neste estudo, determinou-se a carga viral em indivíduos infectados pelo HBV e se encontrou uma baixa proporção (15,3%, 31/202) de pacientes com carga viral acima de 2000 UI/mL, concordando com a baixa porcentagem de positividade de HBeAg (8,4%, 17/202). Estes resultados indicaram que nesta população, uma pequena proporção de infectados possui risco aumentado de complicações hepáticas. Pacientes cronicamente infectados em fase de imunotolerância são caracterizados por apresentarem soropositividade HBeAg e por possuírem alta taxa replicativa do vírus, evidenciada por altos níveis de HBV-DNA na corrente sanguínea (BERTOLETTI *et al.*, 2010). O risco para o desenvolvimento de cirrose e hepatocarcinoma aumenta em pacientes que se encontram nesta fase, uma vez que nestes casos, há um intenso recrutamento de células inflamatórias no fígado, o que intensifica o dano hepático, por consequência (BALMASOVA *et al.*, 2014).

Neste estudo também foi possível verificar que 5,6% (9/161) dos indivíduos anti-HBc positivos e HBsAg negativos apresentaram carga viral detectável, indicando uma baixa proporção de infecção oculta na população. Este resultado foi semelhante a proporção de 3,3% (5/150) de infecção oculta encontradas em estudo realizado com doadores de sangue no município de

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (SILVA *et al.*, 2005). As taxas de infecção oculta aumentam em populações onde a prevalência da hepatite B é alta (SAMAL *et al.*, 2012). No presente estudo, a média carga viral encontrada nestes indivíduos foi de  $2,1 \pm 0,3$  log UI/mL, similar aos resultados encontrados por MORESCO *et al.* (2014), que avaliaram a presença da hepatite B oculta na região Amazônica, outra região brasileira considerada de alta prevalência para hepatite B. Embora a média da carga viral encontrada nestes indivíduos esteja abaixo do limite atual para início de tratamento (3,3 log UI/mL), estes pacientes devem ser monitorados, uma vez que podem progredir para a doença ativa e por sua condição, são considerados potenciais transmissores do vírus (RAIMONDO *et al.*, 2010; SQUADRITO *et al.*, 2014).

Os genótipos do HBV estão associados a gravidade da infecção e também à resposta terapêutica a determinados medicamentos. Neste estudo, houve um predomínio de pacientes com o genótipo D (97%, 88/91) e apenas três pacientes infectados com o genótipo A (3%, 3/91). O genótipo D está fortemente associado a inflamação histopatológica e com uma alta sorocorversão de HBeAg, fatores que podem favorecer a resolução espontânea da infecção. Por outro lado, este genótipo também é associado a altas taxas de mutação pré-core e também a uma baixa taxa de resposta terapêutica a interferon- $\alpha$ , fatores associados a um prognóstico desfavorável (COOKSLEY, 2011; CROAGH *et al.*, 2015).

Os genótipos do HBV possuem uma distribuição geográfica heterogênea. Acredita-se que esta distribuição geográfica distinta se deva aos movimentos migratórios ocorridos entre as populações mundiais (KRAMVIS, 2014, LAGO *et al.*, 2014; BISSINGER *et al.*, 2015). No Brasil, estudos mostram que os genótipos do HBV predominantes são o A, D e F (MELLO *et al.*, 2007; BECKER *et al.*,



2010). LAGO *et al.* (2014) discutiram a origem do genótipo A1 e suas análises mostraram que este genótipo provavelmente foi introduzido no país através do tráfico negreiro ocorrido no país durante a segunda metade do século XIX. O genótipo F, por sua vez, é originário do continente Sul-Americano, uma vez que é amplamente encontrado em indígenas desta região (MELLO *et al.*, 2013). Em relação ao genótipo D, existem evidências da sua origem européia, porém estudos publicados até o momento não conseguiram comprovar essa hipótese (BERTOLINI *et al.*, 2012, MELLO *et al.*, 2014)

A genotipagem e análise de subtipo mostraram uma alta prevalência do HBV/D sorotipo (subtipo) *ayw2*. No mundo, este genótipo/subtipo é muito frequente na região mediterrânea da Europa, em especial na Itália (DAL MOLIN *et al.*, 2006, DETERDING *et al.*, 2008, SAGNELI *et al.*, 2014). Na tentativa de comprovar a origem dos isolados de HBV/D presentes na região de estudo, foi realizada uma pesquisa para determinar a ascendência dos portadores crônicos do estudo através da busca pela origem de seus sobrenomes em bancos de dados disponíveis na internet e também da origem geográfica da família (pais e avós). Os resultados obtidos indicam que o predomínio do HBV/D na região sul do Brasil teria origem no processo de imigração de europeus italianos ocorrido durante o final do século XIX a início do século XX (TRENTO, 1989, BERTOLINI *et al.*, 2012). De fato, a região sul do Brasil possui uma miscigenação diferenciada em relação ao restante do país, estudos de ancestralidade genética mostram uma elevada proporção de descendentes europeus (71-79%), seguido de afrodescendentes (11-14%) e indígenas (8-13%) (PENA *et al.*, 2011; MANTA *et al.*, 2013).

O segundo capítulo desta tese abordou os aspectos genéticos humanos que podem influenciar no desfecho clínico da infecção. Para minimizar possíveis vieses, foram retirados desta análise, aqueles indivíduos que apresentaram co-infecção HIV e/ou HCV e os indivíduos que apresentaram infecção oculta. Por isso, os grupos de indivíduos foram reduzidos a 196 pacientes cronicamente infectados e em 149 indivíduos com infecção resolvida.

A etnia também tem sido um importante fator a ser considerado em estudos que avaliam variáveis genéticas em associação ao desfecho clínico da Hepatite B. Polimorfismos de base única (SNPs) em genes de citocinas podem influenciar no tipo de resposta inflamatória desencadeada após a infecção e tendem a ser influenciados por fatores genéticos relacionados à ancestralidade da população em estudo (ZHENG *et al.*, 2012). Por esse motivo, os resultados deste trabalho são mais assemelhados com aqueles realizados em populações de origem europeia do que em outras populações.

Inicialmente foi realizada uma análise comparativa entre os dois grupos de pacientes analisados. Por esta análise foi possível notar diferenças estatísticas em relação ao sexo, transmissão e nível educacional. A prevalência aumentada de homens entre os portadores crônicos é corroborada por Chavéz *et al.* (2003), que realizaram um panorama da hepatite B no Brasil e encontraram uma frequência aumentada de casos de hepatite B entre homens em Santa Catarina. A frequência aumentada de mulheres no grupo de indivíduos com infecção resolvida é justificada pela forma como estes indivíduos foram selecionados, uma vez que uma grande proporção (38, 9% 58/149) foi recrutada entre funcionários de unidades básicas de saúde do município de Chapecó, que são em sua maioria mulheres. Embora exista este viés de seleção, estudos

epidemiológicos indicam uma maior proporção de homens entre os portadores crônicos de hepatite B (CARRILHO *et al.*, 2004; NOORI *et al.*, 2013).

As vias de transmissão também foram estatisticamente diferentes entre os grupos analisados. Enquanto foi observado uma frequência aumentada de transmissão vertical entre os portadores crônicos, a transmissão sexual foi mais frequente entre os indivíduos com infecção resolvida. De fato, a transmissão vertical é um potencial fator de risco para a cronificação, devido a imaturidade do sistema imune de crianças recém-nascidas, o que aumenta a probabilidade do vírus permanecer no organismo humano (BALMASOVA *et al.*, 2014). Da mesma forma, infecções resultantes das vias de transmissão sexual e parenteral tendem a ser resolvidas espontaneamente, uma vez que em sua maioria, acontecem durante a fase adulta, em que o sistema imune é capaz de produzir uma resposta inflamatória adequada para resolução da infecção (REHERMANN & NASCIMBENI, 2005).

O nível educacional por sua vez, influencia indiretamente tanto na cronicidade, quanto na gravidade da doença. Neste estudo, observou-se um baixo nível educacional no grupo dos pacientes crônicos. A falta de informação sobre a doença (sintomas, rotas de transmissão e prevenção), atribuída como consequência de um baixo nível educacional, leva a um retardamento do diagnóstico e baixa adesão aos programas de prevenção, como vacinação compulsória, campanhas de uso de preservativos em relações sexuais, uso de materiais esterilizados em manicures e em procedimentos cirúrgicos e por fim o monitoramento dos doentes (FERREIRA *et al.*, 2009; BRASIL, 2012)

A análise de multicolinearidade foi utilizada para determinar as variáveis de ajustamento da regressão linear que avaliou a associação de SNPs com o desfecho clínico da hepatite B. Por essa análise, sexo e transmissão foram considerados como fatores que influenciam diretamente no desfecho, juntamente com os perfis genéticos dos polimorfismos estudados.

O TNF- $\alpha$  é um potente estimulador da resposta pró-inflamatória. Neste estudo, o alelo A (genótipos AA+ GA) do SNP TNF- $\alpha$  -308 foi associado positivamente com a hepatite B crônica (OR, 1,818; 95% CI, 1,009-3,273; P=0,046). De modo geral, esse resultado está em concordância com estudos que avaliam pacientes etnicamente semelhantes. COSTA *et al.* (2015), encontraram associação positiva entre o alelo A (e o genótipo AA) e a cronicidade da hepatite B, bem como à severidade da doença (fibrose e atividade necroinflamatória severas) em pacientes brasileiros paulistas. O alelo A também foi associado à infecção crônica em tunisianos, assim como o genótipo GG com a diminuição do risco de cronicidade em tunisianos e turcos (BASTURK *et al.*, 2008, SGHAIER *et al.*, 2015). O alelo A tem sido associado a superexpressão do TNF- $\alpha$  e por consequência, a um aumento da atividade pró-inflamatória, justificando desse modo, a maior severidade da doença em pacientes cronicamente infectados (BARRET *et al.*, 2003, CONDE *et al.*, 2013, HU *et al.*, 2014). Em contrapartida, outros estudos conduzidos em populações asiáticas tendem a mostrar uma associação do alelo A (genótipos AA+AG) e a resolução da doença (KIM *et al.*, 2003, XIA *et al.*, 2011, XU, *et al.*, 2013, LIU *et al.*, 2014), reforçando dessa maneira, a importância de fatores étnicos na avaliação de polimorfismos genéticos com o desfecho clínico da hepatite B.

Os demais polimorfismos estudados, TNF- $\alpha$  -238 G/A (rs361525), IL 2 -330 G/T (rs2069762), IL 4 -589 C/T (rs2243250), IL 6 -174 G/C (rs1800795), IL 10 -592 C/A (rs1800872), IL 10 -1082 A/G (rs1800896), IL 17A -692 T/C (rs8193036) e IL 17A -197 G/A (rs2275913), não apresentaram associação estatística com os desfechos clínicos avaliados, apenas foi possível observar uma frequência aumentada dos polimorfismos alélicos nos grupos de estudo. No entanto, a falta de associação estatística não descarta possíveis influências destes SNPs com a cronicidade ou resolução da hepatite B, uma vez que existem evidências já publicadas destas correlações (BARRET *et al.*, 2003, XIA *et al.*, 2011, WANG *et al.*, 2012, ZHENG *et al.*, 2012, LI *et al.*, 2014, SAXENA *et al.*, 2014, TALAAT *et al.*, 2014).

Neste estudo foram abordados potenciais fatores virais e do hospedeiro que atuam no desfecho clínico da infecção por hepatite B. Os resultados indicaram que o SNP TNF- $\alpha$  -308 A/G pode ser considerado um potencial marcador molecular para a cronicidade da hepatite B na população de infectados estudada. No entanto, estes resultados, juntamente com os resultados de estudos já publicados, mostraram que essa associação varia dependendo do grupo étnico em estudo. De fato, a região Sul do Brasil é distinta etnicamente do restante do país e nossos resultados refletem esta realidade.

Para que seja possível avaliar a sociedade brasileira em sua totalidade em relação à hepatite B, é importante ampliar essas análises aos outros grupos étnicos como indígenas e afrodescendentes para que se possa entender o real efeito destes SNPs na resposta imune dos sujeitos infectados. Além disso, ainda como perspectiva, tem-se o intuito de avaliar os alelos HLA e miRNAs no

desfecho clínico e desse modo, ampliar o conhecimento a respeito da epidemiologia e história natural desta doença em pacientes brasileiros.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU CHEKARAOU, M, BRICHLER, S.; MANSOUR, W.; LE GAL, F.; GARBA, A.; DÉNY, P.; GORDIEN, E. A novel hepatitis B virus (HBV) subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains. *J Gen Virol*, 91:1609–20, 2010.

ALVARADO-MORA, M.V.; PINHO, J.R. Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antivir Ther*, 18: 459-465, 2013.

ARABABADI, M. K.; POURFATHOLLAH, A. A.; JAFARZADEH, A.; HASSANSHAHI, G. Serum Levels of IL-10 and IL-17A in Occult HBV infected Shout- East Iranian Patients. *Hepat Mon*, 10:31-35, 2010.

ARAUJO, N. M.; MELLO, F. C.; YOSHIDA, C. F.; NIEL, C.; GOMES, S. A. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of hepatitis B virus. *Arch Virol*, 49: 1383-1395, 2004.

ARAUZ-RUIZ, P.; NORDER, H.; ROBERTSON, B. H.; MAGNIUS, L.O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*, 83:2059–73, 2002.

BALMASOVA, I. P, YUSHCHUK, N. D.; MYNBAEV, O. A.; ALLA, N. R.; MALOVA, E. S.; SHI, Z.; GAO, C-L. Immunopathogenesis of chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*, 20(39):14156, 2014.

BARRETT, J.C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2):263-5, 2005.

BARRETT, S.; COLLINS, M.; KENNY, C.; RYAN, E.; KEANE, C. O.; CROWE, J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol*, 71(2) :212–8, 2003.

BARROS, L. M.; GOMES-GOUVÊA, M.S.; KRAMVIS, A.; MENDES-CORRÊA, M. C.; DOS SANTOS, A.; SOUZA, L. A.; SANTOS, M. D.; CARRILHO, F. J.; DE JESUS DOMICINI, A.; PINHO, J. R.; DE SOUZA PAIVA FERREIRA, A. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. *Infect Genet Evol*, 24: 68–75, 2014.

BASTURK, B.; KARASU, Z.; KILIC, M.; ULUKAYA, S.; BOYACIOGLU, S.; ORAL, B. Association of TNF- $\alpha$  -308 polymorphism with the outcome of hepatitis B virus infection in Turkey. *Infect Genet Evol*, 8(1):20–5, 2008.

BECKER, C.E.; MATTOS, A.A.; BOGO, M.R.; BRANCO, F.; SITNIK, R.; KRETZMANN, N.A. Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil. *Arq Gastroenterol*, 47(1):13-7, 2010.

BERTOLETTI, A.; GEHRING, A. J. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol*, 87(6): 1439–49, 2006.

BERTOLETTI, A.; MAINI, M. K.; FERRARI, C. The host-pathogen interaction during HBV infection: Immunological controversies. *Antivir Ther*, 15(3): 15–24, 2010.

BERTOLINI, D.A.; GOMES-GOUVÊA, M.S.; GUEDES DE CARVALHO-MELLO, I.M.; SARACENI, C.P.; SITNIK, R.; GRAZZIOTIN, F.G.; LAURINO, J.P.; FAGUNDES, N.J.; CARRILHO, F.J.; PINHO, J.R. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect Genet Evol*, 12: 1295-1304, 2012.

BERTOLINI, D.A.; PINHO, J.R.; SARACENI, C.P.; MOREIRA, R.C.; GRANATO, C.F.; CARRILHO, F.J. Prevalence of serological markers of hepatitis B virus in pregnant women from Paraná State, Brazil. *Braz. J Med Biol Res*, 39: 1083-1090, 2006.

BISSINGER, A. L.; FEHRLE, C.; WERNER, C.R.; LAUER, U. M.; MALEK, N. P.; BERG, C.P. Epidemiology and Genotyping of Patients with Chronic Hepatitis B: Genotype Shifting Observed in Patients from Central Europe. *Pol J Microbiol*, 64(1):15-21, 2015.

BONINO, F.; PIRATVISUTH, T.; BRUNETTO, M.R.; LIAW, Y.F. Diagnostic markers of chronic hepatitis B infection and disease. *Antivir Ther*, 15 Suppl 3:35-44, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. 2010.



BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico-Hepatites Virais. Ano III-nº 1, Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Manual de treinamento para teste rápido hepatites B (HBsAg) e C (anti-HCV). Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. ABCDE do diagnóstico para as hepatites virais. Série A, Normas e manuais técnicos, Brasília, 2009.

CAO G-W. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol*,15(46):5761-9., 2009.

CARRILHO, F. J.; MORAES, C. R.; PINHO, J. R.; MELLO, I. M.; BERTOLINI, D. A.; LEMOS, M. F.; MOREIRA, R. C.; BASSIT, L. C.; CARDOSO, R. A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; DA SILVA, L. C. Hepatitis B virus infection in haemodialysis centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health*, 4: 13, 2004.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, CDC Health Information for International Travel- Yellow Book- Infectious Diseases Related to Travel. 2014 Disponível em <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-b>.

CEOM. Centro de Memórias do Oeste de Santa Catarina. A voz de Chapecó- Artigos de Antônio Selistre de Campos-1939 a 1952. Série Documento, nº 4, Ed Argos, 2004.

CHANG, J. J.; LEWIN, S. R. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol*, 85(1):16–23, 2007.

CHANG, K. M. Hepatitis B immunology for clinicians. *Clin Liver Dis*, 14(3):409–24, 2010.

CHAVÉZ, J. H.; CAMPANA, S. G.; HAAS, P. Panorama da hepatite B no Brasil e no Estado de Santa Catarina. *Rev Panam Salud Publica* 14(2):91-96, 2003.

CHEONG, J.Y.; CHO, S. W.; HWANG, I. L.; YOON, S. K.; LEE, J. H.; PARK, C. S.; LEE, J. E.; HAHM, K. B.; KIM, J. H. Association between chronic hepatitis B

virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol*, 21(7): 1163–9, 2006.

CHEVALIEZ, S.; RODRIGUEZ, C.; PAWLLOTSKY, J.M. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology*, 142(6):1303-1313.e1, 2012.

CHRISTENSEN, U.; HAAGERUP, A.; BINDERUP, H. G.; VESTBO, J.; KRUSE, T. A.; BØRGLUM, A. D. Family based association analysis of the IL2 and IL15 genes in allergic disorders. *Eur J Hum Genet*, 14(2):227-35, 2006.

COMPRI, A.P.; MIURA, I.; PORTA, G.; LEMOS, M.F.; SARACENI, C.P.; MOREIRA, R.C. Hepatitis B virus infection in children, adolescents, and their relatives: genotype distribution and precore and core gene mutations. *Rev Soc Bras Med Trop*, 45(3):301-4, 2012.

CONDE, S. R. S.; FEITOSA, R. N. M.; FREITAS, F.B.; HERMES, R. B.; DEMACHKI, S.; ARAÚJO, M. T. F.; SOARES, M. C.; ISHAK, R.; VALLINOTO, A. C. Association of cytokine gene polymorphisms and serum concentrations with the outcome of chronic hepatitis B. *Cytokine*, 61(3):940–4, 2013.

COOKSLEY, G. W. Hepatitis B Genotypes: Role of Testing in Clinical Practice. *Curr Hepat Rep*, 10(2):79–86, 2011.

COSTA, S. F.; CHACHÁ, S. G.; SOUZA, F. F.; TEIXEIRA, A. C.; DE CARVALHO SANTANA, R.; DEGHAIDE, N. H.; RODRIGUES, S.; MARANO, L. A.; MENDES-JUNIOR, C. T.; ZUCOLOTO, S.; DONADI, E. A.; DE LOURDES CANDOLO MARTINELLI, A. IL-18, TNF, and IFN- $\gamma$  alleles and genotypes are associated with susceptibility to chronic hepatitis B infection and severity of liver injury. *J Med Virol*, 87(10):1689-96, 2015.

CROAGH, C. M. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World J Hepatol*, 7(3):289, 2015.

DAL MOLIN, G.; POLI, A.; CROCÈ, L.S.; D'AGARO, P.; BIAGI, C.; COMAR, M, TIRIBELLI, C.; CAMPELLO, C. Hepatitis B virus genotypes, core promoter variants, and precore stop codon variants in patients infected chronically in North-Eastern Italy. *J Med Virol*, 78: 734-740, 2006.

DE MADDALENA, C.; GIAMBELLI, C.; TANZI, E.; COLZANI, D.; SCHIAVINI, M.; MILAZZO, L.; BERNINI, F.; EBRANATI, E.; CARGNEL, A.; BRUNO, R.; GALLI, M.; ZEHENDER, G. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology*, 365: 113-124, 2007.

DÉNY, P.; ZOULIM, F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol Biol (Paris)*, 58(4):245-53, 2010.

DETERDING, K.; CONSTANTINESCU, I.; NEDELCU, F. D.; GERVAIN, J.; NEMECEK, V.; SRTUNECKY, O.; VINCE, A. GRGUREVIC I, BIELAWSKI KP, ZALEWSKA M, BOCK T, AMBROZAITIS A, STANCZAK, J.; TAKÁCS, M.; CHULANOV, V.; SLUSARCZYK, J.; DRAZD'ÁKOVÁ, M.; WIEGAND, J.; CORNBERG, M.; MANNS, M. P.; WEDEMEYER, H. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *J Med Virol*, 80: 1707-1711, 2008.

DEVESA, M.; PUJOL, F.H. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res*, 127:177–84, 2007.

DIVE-PEHV/SC. - GERÊNCIA DE VIGILÂNCIA DAS DST/HIV/AIDS E HEPATITES VIRAIS. As Hepatites Virais Em Santa Catarina, 2011 [http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/gerencia\\_dst\\_aids/noticias/2011/RELEAS\\_E\\_HEPATITES\\_VIRAIS\\_2011.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/gerencia_dst_aids/noticias/2011/RELEAS_E_HEPATITES_VIRAIS_2011.pdf) (acessado em 20/03/2014)

EL-BADAWY, O.; SAYED, D.; BADARY, M. S.; ABD-ALRAHMAN, M. E.; EL-FEKY, M. A.; THABIT, A. G. Relations of regulatory T cells with hepatitis markers in chronic hepatitis B virus infection. *Hum Immunol*, 73(4): 335–41, 2012.

EL-SERAG, H.B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 142(6):1264-1273.e1, 2012.

ERHARDT, A.; BLONDIN, D.; HAUCK, K.; SAGIR, A.; KOHNLE, T.; HEINTGES, T.; HÄUSSINGER, D. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut*, 54: 1009-1013, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, 10(3): 564–567, 2010.

FERREIRA, C.T.; SILVEIRA, T.R da. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol*, 7(4), 473-487, 2004.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J. S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*, 102(7):1369-76, 1998.

GALLEGO, A.; SHELDON, J.; GARCIA-SAMANIEGO, J.; MARGALL, N.; ROMERO, M.; HORNILLOS, P.; SORIANO, V.; ENRÍQUEZ, J. Evaluation of initial virological response to adefovir and development of adefovirresistant mutations in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*, 15:392-398, 2008.

GAO, Q. J.; LIU, D. W.; ZHANG, S. Y.; JIA, M.; WANG, L. M.; WU, L. H.; WANG, S. Y.; TONG, L. X. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World J Gastroenterol*, 15(44): 5610–9, 2009.

GHANY, M.G.; DOO, E.C. Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology*, 49(5 Suppl):S174-84, 2009.

GODKIN, A.; DAVENPORT, M.; HILL, A. V. S. Molecular analysis of HLA class II associations with hepatitis B virus clearance and vaccine nonresponsiveness. *Hepatology*, 41:383-1390, 2005.

GUSATTI, C. S.; COSTI, C.; HALON, M. L.; GRANDI, T.; MEDEIROS, A. F. R.; SILVA, C. M. D.; GOMES, S. A.; SILVA, M. S. N.; NIEL, C.; ROSSETTI, M. L. R. Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapecó, Southern Brazil, Originate from Italy. *PLoS One*, 10(8):e0135816, 2015.

HEJR, S.; KARIMI, M. H.; YAGHOBI, R.; KAMALI-SARVESTANI, E.; GERAMIZADEH, B.; ROOZBEH, J. Association of IL-17, IL-21, and IL-23R gene polymorphisms with HBV infection in kidney transplant patients. *Viral Immunol*, 26(3): 201–6, 2013.

HU, Q.; LOU, G. G.; LIU, Y. C.; QIAN, L.; LV, B. D. The Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -308 and -238 Polymorphisms and Risk of Hepatocellular Carcinoma for Asian Populations: A Meta-Analysis. *Curr Ther Res Clin Exp*, 76:70-5, 2014.

HUY, T. T.; TRINH, T. N.; ABE, K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*, 82: 5657-5663, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro. 2000. Disponível em: <http://cod.ibge.gov.br/20Y51>. Acessado em junho de 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico, 2010. Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br/>. Acessado em julho de 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Chapecó, Santa Catarina, 2015. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=420420&search=|infogr%E1ficos:-informa%E7%F5es-completas>. Acessado em julho de 2015.

JIANG, Y-E.; WANG, Y-M.; LIU, T-H.; LIU, J. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*, 9:2221-2225, 2003.

KAO J-H. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus. *Korean J Intern Med*, 26(3):255-61, 2011.

KARIM, F.; RAHMAN S, KHAN M, ALAM AK, AHMED N, ZAKI K.; AL-MAHTAB, M.; DEBNATH, C. R. Serum Interleukin-10 Level in Patients with Chronic Hepatitis B Infection. *HMJ*, 1 (2): 241-250, 2007.

KEW, M. C. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 26 Suppl 1:144-52. 2011

KIM, Y.J.; LEE, H-S.; YOON, J-H.; KIM, C. Y.; PARK, M. H.; KIM, L. H.; PARK, B. L.; SHIN, H. D. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol Genet*, 12(19):2541-6, 2003.

KITAB, B.; EL FEYDI, A. E.; AFIFI, R.; DERDABI, O.; CHERRADI, Y.; BENAZZOUZ, M.; REBBANI, K.; BRAHIM, I.; SALIH ALJ, H.; ZOULIM, F.; TREPO, C.; CHEMIN, I.; EZZIKOURI, S.; BENJELLOUN, S. Hepatitis B genotypes/subgenotypes and MHR variants among Moroccan chronic carriers. *J Infect*, 63: 66-75, 2011.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 27:485-517, 2009.

KRAMVIS A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology*, 57: 141-150, 2014.

KRAMVIS, A.; ARAKAWA, K.; YU, M. C.; NOGUEIRA, R.; STRAM, D.O.; KEW, M. C. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol*, 80: 27-46, 2008.

KUPEK EJ. Residual transfusion risk for hepatitis B and C in southern Brazil, 1991–1999. *J Viral Hepat*, 8: 78-82, 2001.

LAGO, B. V.; MELLO, F. C.; KRAMVIS, A.; NIEL, C.; GOMES, S. A. Hepatitis B virus subgenotype A1: evolutionary relationships between Brazilian, African and Asian isolates. *PLoS One*, 9:e105317, 2014.

LAVANCHY, D. Viral hepatitis: global goals for vaccination. *J Clin Virol*, 55(4):296-302, 2012.

LEVY, M. S. O papel da migração internacional na evolução da população brasileira (1872 a 1972). *Rev Saude Publica*, 8 (Suppl): 49-90, 1974.

LI, J.; QIU, S. J.; SHE, W. M.; WANG, F. P.; GAO, H.; LI, L.; TU, C. T.; WANG, J. Y.; SHEN, X. Z.; JIANG, W. Significance of the balance between regulatory T (Treg) and T helper 17 (Th17) cells during hepatitis B virus related liver fibrosis. *PLoS One*, 7(6):1–13, 2012.

LI, N.; ZHU, Q.; LI, Z.; HAN, Q.; ZHANG, G.; CHEN, J.; LV, Y.; XING, F.; CHEN, Y.; ZENG, X.; LIU, Z. IL17A gene polymorphisms, serum IL-17A and IgE levels, and hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Mol Carcinog*, 53(6):447-57, 2014.

LIANG, T.J. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*, 49(5 Suppl):S13-21, 2009.

LIU, Y.; GUO, Z.; CHEN, Q.; WANG, S. Association of TNF-alpha-308 polymorphisms with risk of chronic HBV infection in the Chinese population: a meta-analysis. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 35(3):312–316, 2014.

LONG, J. C.; WILLIAMS, R. C.; URBANEK, M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet*, 56(3):799-810, 1995.

MACEDO, L.C.; ISOLANI, A. P.; VISENTAINER, J. E. L.; MOLITERNO, R. A. Association of cytokine genetic polymorphisms with the humoral immune response to recombinant vaccine against HBV in infants. *J Med Virol* 82(6): 929–33, 2010.

MANTA, F. S. N.; PEREIRA, R.; VIANNA, R.; RODOLFO BEUTTENMÜLLER DE ARAÚJO, A.; LEITE GÓES GITAÍ, D.; APARECIDA DA SILVA, D.; DE VARGAS WOLFGRAMM, E.; DA MOTA PONTES, I.; IVAN AGUIAR, J.; OZÓRIO MORAES, M.; FAGUNDES DE CARVALHO, E.; GUSMÃO, L. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PLoS One*, 8(9):e75145, 2013.

MEDEIROS, R. M.; VALVERDE-VILLEGAS, J.M.; JUNQUEIRA, D.M.; GRÄF, T.; LINDENAU, J. D.; MELLO, M. G.; VIANNA, P.; ALMEIDA, S. E. M.; CHIES, J. A. B. Cytokine profile as a marker of rapid and slow disease progression in HIV infection. *AIDS* 2015; submitted in 10/08/2015.

MELLO, F. C.; ARAUJO, O. C.; LAGO, B. V.; MOTTA-CASTRO, A. R.; MORAES, M. T.; GOMES, S. A.; BELLO, G.; ARAUJO, N. M. Phylogeography and evolutionary history of hepatitis B virus genotype F in Brazil. *Virology*, 10:236, 2013.

MELLO, F. C.; SOUTO, F. J.; NABUCO, L. C.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A.; COELHO, H. S.; FRANZ, H. C.; SARAIVA, J. C.; VIRGOLINO, H. A.; MOTTA-CASTRO, A.R.; MELO, M. M.; MARTINS, R. M.; GOMES, S. A. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol*, 7: 103, 2007.

MELLO, F. M.; KUNIYOSHI, A. S.; LOPES, A. F.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; BERTOLINI, D. A. Hepatitis B virus genotypes and mutations in the basal core promoter and pre-core/core in chronically infected patients in southern Brazil: a cross-sectional study of HBV genotypes and mutations in chronic carriers. *Rev Soc Bras Med Trop*, 47: 701-708, 2014.

MENEGOL, D.; SPILKI, F. R. Seroprevalence of hepatitis B and C markers at the population level in the municipality of Caxias do Sul, southern Brazil. *Braz J Microbiol*; 44: 1237-1240, 2013.

MOHEBBI, S. R.; AMINI-BAVIL-OLYAEI, S.; ZALI, N.; DAMAVAND, B.; AZIMZADEH, P.; DERAKHSHAN, F.; SABAHI, F.; ZALI, M. R. Characterization

of hepatitis B virus genome variability in Iranian patients with chronic infection, a nationwide study. *J Med Virol*, 84: 414-423, 2012.

MORESCO, M.N DOS S.; VIRGOLINO, H. DE A.; DE MORAIS, M. P. E.; DA MOTTA-PASSOS, I.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; DE ASSIS, L. M. S.; AGUIAR, K. R.; LOMBARDI, S. C.; MALHEIRO, A.; CAVALHEIRO, N. DE P.; LEVI, J. E.; TORRES, K. L. Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. *Vox Sang*, 107(1):19-25. 2014.

MULYANTO, DEPAMEDE ,S. N.; WAHYONO, A.; JIRINTAI, S.; NAGASHIMA, S.; TAKAHASHI, M.; OKAMOTO, H. Analysis of the full length genomes of novel hepatitis B virus subgenotypes C11 and C12 in Papua, Indonesia. *J Med Virol*, 83(1):54-6, 2011.

MULYANTO, PANCAWARDANI, P.; DEPAMEDE, S. N.; WAHYONO, A.; JIRINTAI, S.; NAGASHIMA, S.; TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H. Identification of four novel subgenotypes (C13-C16) and two inter-genotypic recombinants (C12/G and C13/B3) of hepatitis B virus in Papua Province, Indonesia. *Virus Res*, 163:129–40, 2012.

NAKAYAMA, E. E.; HOSHINO, Y.; XIN, X.; LIU, H.; GOTO, M.; WATANABE, N.; TAGUCHI, H.; HITANI, A.; KAWANA-TACHIKAWA, A.; FUKUSHIMA, M.; YAMADA, K.; SUGIURA, W.; OKA, S. I.; AJISAWA, A.; SATO, H.; TAKEBE, Y.; NAKAMURA, T.; NAGAI, Y.; IWAMOTO, A.; SHIODA, T. Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J Virol*, 74(12):5452-9, 2000.

NAN, Y. M.; ZHANG, Y.G.; KONG, L.B.; ZHENG, H. W.; SUN, D.X.; AN, C. M.; LI, Y.S.; LI, C.Y.; KONG, L.; DAI, E.H.; TONG, L.X.; ZHAO, S.X.; SU, S. S. Relation of IL-17 polymorphisms and serum levels in patients with chronic HCV infection. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 21(6):425-8, 2013.

NATTERMANN, J.; VOGEL, M.; BERG, T.; DANTA, M.; AXEL, B.; MAYR, C.; BRUNO, R.; TURAL, C.; KLAUSEN, G.; CLOTET, B.; LUTZ, T.; GRÜNHAGE, F.; RAUSCH, M.; NISCHALKE, H. D.; SCHEWE, K.; BIENEK, B.; HAERTER, G.; SAUERBRUCH, T.; ROCKSTROH, J. K.; SPENGLER, U.; KOMPETENZNETZ, HIV/AIDS. Effect of the interleukin-6 C174G gene polymorphism on treatment of



acute and chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus coinfecting patients. *Hepatology*, 46(4):1016-25, 2007.

NOORI, S.; GOL-MOHAMADI, A.; SARBAZI, M. R.; SAFAEE, A.; FARSAR, A. R. Epidemiological features of hepatitis B and C infection in a high risk population: results of screening programs. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 6(3):136-40, 2013.

NORDER, H.; COUROUCÉ, A. M.; MAGNIUS, L. O. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol*, 73: 3141-3145, 1992.

NOVA, M. L. Estudo epidemiológico, clínico e molecular do vírus da hepatite B na cidade de Chapecó, Oeste de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado. Sao Paulo University. São Paulo. 2010.

PARK, B. L.; LEE, H.S.; KIM, Y. J.; KIM, J. Y.; JUNG, J. H.; KIM, L. H.; SHIN, H. D. Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progression. *Exp Mol Med*, 35(2):76-82, 2003

PENA, S. D.; DI PIETRO, G.; FUCHSHUBER-MORAES, M.; GENRO, J. P.; HUTZ, M. H.; KEHDY FDE, S.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNO, L. A.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; DE MORAES, M. E.; DE MORAES, M. R.; OJOPI, E. B.; PERINI, J. A.; RACCIOPI, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K.; RIOS-SANTOS, F.; ROMANO-SILVA, M. A.; SORTICA, V. A.; SUAREZ-KURTZ, G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*, 6(2):e17063, 2011.

POURKARIM, M. R.; AMINI-BAVIL-OLYAEI, S.; KURBANOV, F.; VAN RANST, M.; TACKE, F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol*, 20: 7152-7168, 2014.

RAIMONDO, G.; ALLAIN, J. P.; BRUNETTO, M. R.; BUENDIA, M. A.; CHEN, D. S.; COLOMBO, M.; CRAXÌ, A.; DONATO, F.; FERRARI, C.; GAETA, G. B.; GERLICH, W. H.; LEVRERO, M.; LOCARNINI, S.; MICHALAK, T.; MONDELLI, M. U.; PAWLOTSKY, J. M.; POLLICINO, T.; PRATI, D.; PUOTI, M.; SAMUEL, D.; SHOUVAL, D.; SMEDILE, A.; SQUADRITO, G.; TRÉPO, C.; VILLA, E.; WILL,

H.; ZANETTI, A. R.; ZOULIM F. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*,49: 652-657, 2008.

RAIMONDO, G.; POLLICINO, T.; ROMANÒ, L.; ZANETTI, A R. A 2010 update on occult hepatitis B infection. *Pathologie-Biologie*, 58(4), 254–7, 2010.

RAPTI, I.; DIMOU, E.; MITSOULA, P.; HADZIYANNIS, S.J. Adding-on versus switching-to adefovir therapy in lamivudine-resistant HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2007; 45:307-313.

REHERMANN, B, NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 5(3): 215–29, 2005.

REIS, L. M.; SOARES, M. A.; FRANÇA, P.H; SOARES, E. A.; BONVICINO, C. R. Clonal analysis of hepatitis B viruses among blood donors from Joinville, Brazil: evidence of dual infections, intragenotype recombination and markers of risk for hepatocellular carcinoma. *J Med Virol*, 83: 2103-2112, 2011.

RIBEIRO, C. S.; VISENTAINER, J. E.; MOLITERNO, R. A. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(4):435-402007; 2005.

RONCATO, M.; BALLARDIN, P.A.Z.; LUNGE, V.R. Influência dos Genótipos no Tratamento da Hepatite B. *Rev HCPA*, 28:188-193, 2008.

ROSINI, N.; MOUSSE, D.; SPADA, C.; TREITINGER, A. Seroprevalence of HBsAg, Anti-HBc and anti-HCV in Southern Brazil, 1999–2001. *Braz J Infect Dis*, 7: 262-267, 2003.

SAGNELLI, C.; CICOZZI, M.; PISATURO, M.; ZEHENDER, G.; LO PRESTI, A.; ALESSIO, L.; STARACE, M.; LOVERO, D.; SAGNELLI, E.; COPPOLA N. Molecular epidemiology of hepatitis B virus genotypes circulating in acute hepatitis B patients in the Campania region. *J Med Virol*, 86: 1683-1693, 2014.

SAGNELLI, E.; SAGNELLI, C.; PISATURO, M.; MACERA, M.; COPPOLA, N. Epidemiology of acute and chronic hepatitis B and delta over the last 5 decades in Italy. *World J Gastroenterol*, 20: 7635-7643, 2014.

SAMAL, J.; KANDPAL, M.; VIVEKANANDAN, P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*, 25(1):142–63, 2012.

SAXENA, R.; CHAWLA, Y. K.; VERMA, I.; KAUR, J. Effect of IL-12B, IL-2, TGF- $\beta$ 1, and IL-4 polymorphism and expression on hepatitis B progression. *J Interferon. Cytokine Res*, 34(2):117-28, 2014.

SCARAVELI NG. Prevalência dos marcadores das hepatites B e C em adolescentes de Chapecó. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2009.

SCHAEFER, S. Hepatitis B virus: Significance of genotypes. *J Viral Hepat*, 12(2):111-24. 2005.

SCOTT, J.D.; GRETCH, D.R. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA*; 297:724-732, 2007.

SERVANT-DELMAS, A.; MERCIER, M.; EL GHOZZI, M. H.; GIRAULT, A.; BOUCHARDEAU, F.; PILLONEL, J.; LAPERCHE, S. National survey of hepatitis B virus (HBV) polymorphism in asymptomatic HBV blood donors from 1999 to 2007 in France. *Transfusion*, 50: 2607-2618, 2010.

SGHAIER, I.; ZIDI, S.; MOUELHI, L.; DABBECH, R.; GHAZOUANI, E.; BROCHOT, E.; STAYOUSSEF, M.; YACOUBI-LOUESLATI, B. The relationship between TNF alpha gene polymorphisms (-238/-308), TNF RII VNTR (p75) and outcomes of hepatitis B virus infection in Tunisian population. *Gene*, 568(2):140-5, 2015.

SHI, W.; ZHANG, Z.; LING, C.; ZHENG, W.; ZHU, C.; CARR, M. J.; HIGGINS, D. G. Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infect Genet Evol*, 16: 355-361, 2013.

SILVA, C. M.; COSTI, C.; COSTA, C.; MICHELON, C.; ORAVEC, R.; RAMOS, A. B.; NIEL, C.; ROSSETTI, M. L. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. *J Infect*. 2005;51: 24-29.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Hepatites Virais - Casos confirmados notificados no SINAN, 2015. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/hepatitesvirais/bases/hepabrnet.def> . Acessado em julho de 2015.

SINGH, R.; KAUL, R.; KAUL, A.; KHAN, K. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol*, 13(12):1770–87, 2007.

SOFIAN, M.; KALANTAR, E.; AGHAKHANI, A.; HOSSEINI, S.; BANIFAZL, M.; ESLAMIFAR, A.; JOURABCHI, A.; FARAZI, A. A.; RAMEZANI, A. No correlation between interleukin-10 gene promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection outcome. *Hepat Mon*, 13(5):e8803, 2013.

SQUADRITO, G.; SPINELLA, R.; RAIMONDO, G. The clinical significance of occult HBV infection. *Ann Gastroenterol*, 27(1):15–9, 2014.

STRAUSS, E.; SETTE, JR. H.; NOBRE, M. R. C.; BARROS, M. F. A.; PESSÔA M. G.; LOPES, E.; OLIVEIRA, C. P. M. S.; DE MENDONÇA, J. S.; OLIVEIRA, M. B.; GALIZZI FILHO, J.; LOPES, A. C. Hepatite B Crônica: Tratamento- Projeto Diretrizes, 2009. Disponível em: [http://www.projetodiretrizes.org.br/8\\_volume/34-Hepatite.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/8_volume/34-Hepatite.pdf). Acessado em agosto de 2015.

SUGAUCHI, F.; MIZOKAMI, M.; ORITO, E.; OHNO, T.; KATO, H.; SUZUKI, S.; KIMURA, Y.; UEDA, R.; BUTTERWORTH, L. A.; COOKSLEY, W. G. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: complete genome sequence and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*, 82:883–92, 2001.

SUN, H. Q.; ZHANG, J.Y.; ZHANG, H.; ZOU, Z. S.; WANG, F. S.; JIA, J. H. Increased Th17 cells contribute to disease progression in patients with HBV-associated liver cirrhosis. *J Viral Hepat*, 19(6): 396–403, 2012.

SUNBUL, M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol*, 20(18):5427–34, 2014.

TALAAT, R. M.; DONDETI, M. F.; EL-SHENAWY, S. Z.; KHAMISS, O. A. Association between IL-10 gene promoter polymorphism and hepatitis B viral infection in an Egyptian population. *Biochem Genet*, 52(9-10):387-402, 2014.

TALLO, T.; NORDER, H.; TEFANOVA, V.; KRISPIN, T.; PRIIMÄGI, L.; MUKOMOLOV, S.; MIKHAILOV, M.; MAGNIUS, L. O. Hepatitis B virus genotype

D strains from Estonia share sequence similarity with strains from Siberia and may specify ayw4. *J Med Virol*, 74: 221-227, 2004.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725-2729, 2013,

TATEMATSU, K.; TANAKA, Y.; KURBANOV, F.; SUGAUCHI, F.; MANO, S.; MAESHIRO, T.; NAKAYOSHI, T.; WAKUTA, M.; MIYAKAWA, Y.; MIZOKAMI, M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype *J. J Virol*, 83(20):10538-47, 2009.

TAYEBI, S, MOHAMADKHANI, A. The TNF- $\alpha$  -308 Promoter Gene Polymorphism and Chronic HBV Infection. *Hepat Res Treat*, 2012:493219, 2012.

THEDJA, M. D.; MULJONO, D. H.; NURAINY, N.; SUKOWATI, C. H. C.; VERHOEF, J.; MARZUKI, S. Ethnogeographical structure of hepatitis B virus genotype distribution in Indonesia and discovery of a new subgenotype, B9. *Arch Virol*, 156:855–68, 2011.

THIO, C. L.; CARRINGTON, M.; MARTI, D.; O'BRIEN, S. J.; VLAHOV, D.; NELSON, K. E.; ASTEMBORSKI, J.; THOMAS, D.L. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis*, 179(4):1004-6, 1999.

THIO, C. L.; THOMAS, D.L.; KARACKI, P.; GAO, X.; MARTI, D.; KASLOW, R.; GOEDERT, J. J.; HILGARTNER, M.; STRATHDEE, S. A.; DUGGAL, P.; O'BRIEN, S. J.; ASTEMBORSKI, J.; CARRINGTON, M. Comprehensive Analysis of Class I and Class II HLA Antigens and Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J Virol*, 77(22): 12083–7, 2003.

THOMAS, H. C.; LOK, A. S.; LOCARNINI, S. A.; ZUCKERMAN, A. J. Viral Hepatitis. Oxford: Wiley Blackwell, 4 ed, 2014.

TRAN, T. T. H.; TRINH, T. N.; ABE, K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*, 82:5657–63, 2008.

TRENTO A. Do outro lado do Atlântico. Um século de imigração italiana no Brasil. 1989. Ed. Nobel. São Paulo.

TSIANG, M.; ROONEY, J. F.; TOOLE, J. J.; GIBBS, C. S. Biphasic clearance kinetics of hepatitis B virus from patients during adefovirdipivoxil therapy. *Hepatology*, 29:1863-1869, 1999.

VALVERDE-VILLEGAS, J.; MATTE, M. C.; MEDEIROS, R. M.; CHIES, J. A. B. New insights about Treg and Th17 cells in HIV infection and disease progression. *J Immunol Res*. In press, 2015.

VYAS, G. N.; YEN, T. S. B. Hepatitis B Virus: Biology, Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Description, and Diagnosis. In: SPECTER S (Ed). *Viral Hepatitis: Diagnosis, Therapy, and Prevention*. New Jersey: *Humana Press*, p.35-50, 1999.

WANG, B.; WANG, J.; ZHENG, Y.; ZHOU, S.; ZHENG, J.; WANG, F.; MA, X.; ZENG, Z.; HBV STUDY CONSORTIUM. A study of TNF-alpha-238 and -308 polymorphisms with different outcomes of persistent hepatitis B virus infection in China. *Pathology*, 42(7):674-80, 2010.

WANG, C.; TANG, J.; SONG, W.; LOBASHEVSKY, E.; WILSON, C. M.; KASLOW, R. A. HLA and Cytokine Gene Polymorphisms Are independently Associated with Responses to Hepatitis B Vaccination. *Hepatology*, 39(4): 978–88, 2004.

WANG, C.; ZHANG, X.; ZHU, B. E. I.; HU, D.; WU, J.; YU, R.; ZHAO, W. Relationships between tumour necrosis factor-a, interleukin-12B and interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis B in Chinese Han haemodialysis patients. *Nephrology*; 17: 167–74, 2012.

WANG, L.; CHEN, S.; XU, K. IL-17 expression is correlated with hepatitis B-related liver diseases and fibrosis. *Int J Mol Med*, 27(3):385-92, 2011.

WANG, S.; HUANG, D.; SUN, S.; MA, W.; ZHEN, Q. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis B to interferon alfa. *Virology*, 8(28): 1–6, 2011.

WANG, Y.; XU, P.; ZHU, D.; ZHANG, S.; BI, Y.; HU, Y.; ZHOU, Y. H. Association of polymorphisms of cytokine and TLR-2 genes with long-term immunity to hepatitis B in children vaccinated early in life. *Vaccine*, 30(39):5708-13, 2012.

WHO. World Health Organization. HBV vaccines: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*, 84:405-420, 2009.

WHO. World Health Organization. Hepatitis B. 2015, (Fact sheet Number 204). Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> Acessado em julho de 2015.

WIEGAND, J.; HASENCLEVER, D.; TILLMANN, H. L. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir Ther*, 13: 211-220, 2008.

WU, W.; LI, J.; CHEN, F.; ZHU, H.; PENG, G.; CHEN, Z. Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients. *J Gastroenterol Hepatol*, 25(4): 750–7, 2010.

XIA, Q.; ZHOU, L.; LIU, D.; CHEN, Z.; CHEN, F. Relationship between TNF- $\alpha$  gene promoter polymorphisms and outcomes of hepatitis B virus infections: A meta-analysis. *PLoS One*, 6(5): 1–8, 2011.

XIANG, Y.; HUANG, S. F.; XIA, J. R.; YE, D. Q.; CHEN, P.; YANG, S. S.; SUN, S.; LAI, X. F.; ZHANG, L. P. Association of the IFNAR1-17470 and IL-10-592 cytokine variants with susceptibility to chronic hepatitis B viral infections in a Chinese population. *Genet Mol Res* 13(4):9187-95, 2014.

XU, J.; ZHANG, S.; ZHANG, Z.; FU, L.; ZHENG, Q.; WANG, J.; LU, S.; DU, J. TNF- $\alpha$  promoter region polymorphisms affect HBV virus clearance in southern Chinese. *Clin Chim Acta*, 425:90-2, 2013.

XUE-SONG, L.; CHENG-ZHONG, L.; YING, Z.; MO-BIN, W. Changes of Treg and Th17 cells balance in the development of acute and chronic hepatitis B virus infection. *BMC Gastroenterol*, 12:43, 2012.

YE, Y.; XIE, X.; YU, J.; ZHOU, L.; XIE, H.; JIANG, G.; YU, X.; ZHANG, W.; WU, J.; ZHENG, S. Involvement of Th17 and Th1 effector responses in patients with Hepatitis B. *J Clin Immunol*, 30(4):546–55, 2010.

YOUSIF, M.; KRAMVIS, A. Genotype D of hepatitis B virus and its subgenotypes: An update. *Hepatol Res*, 43(4):355-64, 2013.

YUEN, M. F.; SABLON, E.; HUI, C. K.; YUAN, H. J. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology*, 34:785-791, 2001.

ZEHENDER, G.; EBRANATI, E.; GABANELLI, E.; SORRENTINO, C.; LO PRESTI, A.; TANZI, E.; CICCOCCHI, M.; GALLI, M. Enigmatic origin of hepatitis B virus: an ancient travelling companion or a recent encounter? *World J Gastroenterol*, 20: 7622-7634, 2014.

ZHANG, J-Y.; ZHANG, Z.; LIN, F.; ZOU, Z-S.; XU, R-N.; JIN, L.; FU, J. L.; SHI, F.; SHI, M.; WANG, H. F.; WANG, F. S. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 51(1): 81–91, 2010.

ZHANG, T. C.; PAN, F. M.; ZHANG, L. Z.; GAO, Y. F.; ZHANG, Z. H.; GAO, J.; GE, R.; MEI, Y.; SHEN, B. B.; DUAN, Z. H.; LI, X. A meta-analysis of the relation of polymorphism at sites -1082 and -592 of the IL-10 gene promoter with susceptibility and clearance to persistent hepatitis B virus infection in the Chinese population. *Infection*, 9: 21-7, 2011.

ZHANG, Y.; WU, Y.; YE, S.; WANG, T.; ZHAO, R.; CHEN, F.; ABE, K.; JIN, X. The response to interferon is influenced by hepatitis B virus genotype in vitro and in vivo. *Virus Res*, 171: 65-70, 2013.

ZHENG, M. H.; XIAO, D. D.; LIN, X. F.; WU, S. J.; PENG, M. M.; YU, X. Y.; LIU, W. Y.; LI, L.F.; SHI, K. Q.; FAN, Y. C.; CHEN, Y. P. The tumour necrosis factor- $\alpha$ -238A allele increases the risk of chronic HBV infection in European populations. *J Viral Hepat*, 19(2): e11–7, 2012.



## 7 Apêndice

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores e sonda utilizado para amplificação de fragmentos do HBV

Técnica	Iniciador/Sonda (5'-3')	Gene analisado	Tamanho do fragmento gerado	Referência
PCR em tempo Real	F: TTGTCCTGGYTATCGYTGGATGTG	Gene S	72 pb	Este trabalho
	R: GATGAGGCATAGCAGCAGGATG			
	S: 6-FAM-TGCGGCGTTTTATCAT-MGB-NFQ			
Sequenciamento do HBV	F: GTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTC' R: AAGCCANACARTGGGGGAAAGC	Gene S	485pb	Silva et al, 2005

**Tabela 2: Painel de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a genotipagem de SNPs humanos por extensão de base única (SNE)**

Polimorfismo	Alelos	Iniciadores Multiplex (5'-3')	Amplicon multiplex	Iniciadores SNE (5'-3')	Amplicon SNE
TNF $\alpha$ -308 (rs1800629)	G/A			INNER'AGGAAACAGACCACAGACCTGGTCCCCAA AAGAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATG	62 pb
TNF $\alpha$ -238 (rs 361525)	G/A	L'GCCCCTCCCATTCTAGTTC R'AAAGTTGGGGACACACAAGC	230 pb	INNER'AAAAGAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGG GCATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCCTAC ACACAAATCAGTCAGTGGCCCAGAAGACCCCCCT CGGAATC	105 pb
IL 2-330 (rs2069762)	G/T	L'CCATTCTGAAACAGGAAACCA R'AAACCCCAAAGACTGACTG	301 pb	INNER'TTATTCTTTTCATCTGTTTACTCTTGCTCTTG TCCACCACAATATGCTATTCACATGTTTCAGTGTAGT TTTA	72 pb
IL 4-589 (rs2243250)	T/C	L'ACCCAAACTAGGCCTCACCT R'ACAGGTGGCATCTTGAAAC	174 pb	INNER'GATACGACCTGTCCCTTCTCAAAACACCTAA ACTTGGGAGAACATTGT	47 pb
IL 6-174 (rs1800795)	C/G	L'TCGTGCATGACTTCAGCTTT R'GCCTCAGACATCTCCAGTCC	328 pb	INNER'AAAGAAAGTAAAGGAAGAGTGTTCTGCTT CTTAGCGCTAGCCTCAATGACGACCTAAGCTGCAC TTTTCCCCTAGTTGTGTCTTGC	<b>88 pb</b>
IL 10-592 (rs1800872)	A/C	L'GGGGTCATGGTGAGCACTAC R'CAAGCAGCCCTTCCATTTTA	244 pb	INNER'AAATCCAAGACAACACTACTAAGGCTTCTTT GGGA	<b>55 pb</b>
IL 10-1082 (rs1800896)	A/G	L'TTCCCCAGGTAGAGCAACAC R'ATGGAGGCTGGATAGGAGGT	190 pb	INNER'ATCCTAATGAAATCGGGGTAAAGGAGCCTG GAACACATCCTGTGACCCCGCCTGT	37 pb
IL 17A-692 (rs2275913)	A/G	L'GCCAAGGAATCTGTGAGGAA R'TTCAGGGGTGACACCATTTT	328 pb	INNER'GCATAGCAGCTCTGCTCAGCTTCTAACAAG TAAGAATGAAAAGAGGACATGGTCTTTAGGAACAT GAATTTCTGCCCTTCCCATTTTCTTCAGAAG	97 pb
IL 17A-197 (rs8193036)	C/T	L'CCTTCTCTTTCCCCCATC R'TGCATGCTACCAAGCAACTT	158 pb	INNER'CATCACTCTCTACTCCCCCTGCCCCCTT TTCTCCATCT	40 pb

Adaptado de Medeiros et al, 2015.

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa de cunho acadêmico vinculada a FEPPS/CDCT, intitulada: **Hepatite B: Caracterização Genética e Análise dos Genes Envolvidos na Resposta Imune**, que tem como objetivo principal à análise da prevalência de genótipos, quantificação e análise dos polimorfismos nos genes HLA em indivíduos infectados pelo vírus da Hepatite B no Rio Grande do Sul. O tema escolhido se justifica pela importância de ampliar o conhecimento acerca dessa doença. O trabalho está sob responsabilidade da pesquisadora Márcia Susana Nunes Silva e sob a supervisão do Dr. Dimas Alexandre Kliemann. Para alcançar os objetivos do estudo será realizada uma entrevista individual, com duração aproximada de 10 minutos, na qual você irá responder a um questionário padronizado. Os dados obtidos serão utilizados somente para este estudo, sendo os mesmos armazenados pela pesquisadora principal durante cinco anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 196/96). Procedimentos: Após a entrevista, será realizada uma coleta de 10 mL de sangue através de punção venosa com agulha estéril para análises. Riscos e Desconfortos: Os riscos e desconfortos causados serão aqueles associados aos procedimentos da coleta de sangue. A quantidade de sangue coletada é pequena e, por isso, dificilmente causará algum mal-estar geral, no entanto, poderá haver dor no local da coleta e, eventualmente, um pequeno hematoma. Benefícios: Embora este trabalho não possa gerar nenhum benefício imediato aos participantes, este estudo poderá trazer vários benefícios em longo prazo, podendo assim, auxiliar em

novas diretrizes do tratamento e acompanhamento futuro dos pacientes que vivem com hepatite B. Este estudo não fornecerá nenhum auxílio financeiro aos participantes. Alternativa Se o paciente escolher não participar, não haverá nenhuma diferença, quanto ao acompanhamento médico. Custos: Não será cobrado algum pagamento pela participação no estudo. Dúvidas: Alguma dúvida referente ao estudo poderá ser esclarecida pelas pesquisadoras Márcia Susana Nunes Silva ou Cíntia Costi no telefone 3352-0336 ou pelo responsável do projeto no HNSC, Dr. Dimas Kliemann pelo fone 3357-2126. Dúvidas quanto a questões éticas, poderá entrar em contato com o Daniel Demetrio Faustino da Silva, pelo fone 51 3357-2407, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC. Confidencialidade: Todas as informações e os resultados advindos dos procedimentos realizados serão considerados confidenciais e serão conhecidos somente da equipe envolvida. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código criado na entrada do estudo. Este código será a única identificação no banco de dados, sendo utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico. Participação voluntária: Se houver desistência em algum momento do estudo, nenhuma diferença quanto ao acompanhamento e tratamento será observado. Significado de sua assinatura: A sua assinatura abaixo significa que você entendeu as informações que lhe foram fornecidas sobre este estudo e sobre este termo de consentimento. Você receberá cópia deste termo de consentimento. No final do termo devem constar as assinaturas: do voluntário, do entrevistador e do coordenador do estudo.

Nome completo: \_\_\_\_\_

Cidade onde mora: \_\_\_\_\_

Número do telefone: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do entrevistado: \_\_\_\_\_

Nome da Pessoa que obteve o consentimento (entrevistador): \_\_\_\_\_

Assinatura da pesquisadora: \_\_\_\_\_ Número  
de Controle: \_\_\_\_\_

Assinatura do coordenador do estudo \_\_\_\_\_

**Em caso de analfabetismo:**

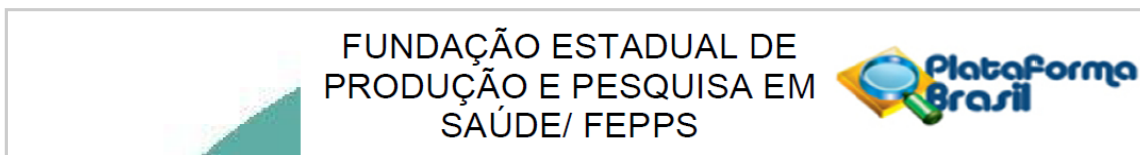
Este formulário foi lido para \_\_\_\_\_

(nome do paciente) em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ pelo \_\_\_\_\_

(nome do pesquisador), enquanto eu estava presente.

## Questionário

1. Identificação: \_\_\_\_\_
2. Data de Nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_
3. Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino
4. Município de Residência: \_\_\_\_\_
5. Estado Civil: ( ) Solteiro ( ) Casado ( ) Acompanhado
6. Etnia (autodeclaração): ( ) Branco ( ) Não-branco
7. Profissão: \_\_\_\_\_ Em atividade: ( ) Sim ( ) Não
8. Escolaridade: \_\_\_\_\_
9. Gestante: ( ) Sim ( ) Não
10. Fumo: ( ) Sim ( ) Não
11. Com qual frequência ingere bebida alcoólica?  
( ) raramente ( ) 1 vez por semana ( ) 3 vezes por semana  
( ) Superior a 4 vezes por semana
12. Uso de drogas: ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual? \_\_\_\_\_
13. Marcadores sorológicos para HBV reagentes:  
( ) HBsAg ( ) HBeAg ( ) anti-HBc total ( ) anti-HBs ( ) anti-HBe  
( ) anti HBc IgM
14. Apresentou algum marcador sorológico para HBV por mais de 6 meses.  
( ) Sim ( ) Não. Se sim, qual o marcador? \_\_\_\_\_
15. Possível forma de transmissão:  
( ) Sexual ( ) Hemodiálise ( ) UDI ( ) Transfusão sanguínea  
( ) Transplante ( ) Transmissão vertical (Materno fetal)  
( ) Acidente com perfuro-cortantes ( ) Outro. Qual? \_\_\_\_\_
16. Comorbidades e Co-infecções:  
( ) Diabetes ( ) Cardiopatia ( ) Renal Crônico ( ) HIV ( ) Hepatite C
17. ( ) HTLV ( ) Tuberculose ( ) Outras DST, qual? \_\_\_\_\_
18. Marcador positivo para Hepatite C: ( ) anti-HCV ( ) PCR
19. Viajou para o exterior: ( ) Sim ( ) Não
20. Continentes:  
( ) África ( ) Europa ( ) Ásia ( ) América do Sul ( ) América do Norte
21. Tem alguma doença crônica ou histórico familiar deste tipo de doença? Se sim, qual? \_\_\_\_\_
22. Tem alguma doença auto-imune ou histórico familiar? Se sim, qual?  
\_\_\_\_\_



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** HEPATITE B: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E ANÁLISE DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE

**Pesquisador:** Márcia Susana Nunes Silva

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 20225713.5.0000.5320

**Instituição Proponente:** Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

**Patrocinador Principal:** Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 671.721

**Data da Relatoria:** 14/05/2014

#### Apresentação do Projeto:

Estudo transversal a ser realizado no período de julho de 2011 a agosto de 2015. Os pacientes participantes do estudo serão provenientes do

Ambulatório de Hepatites do Serviço de Infectologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição de Porto Alegre, pertencente ao Grupo Hospitalar

Conceição (GHC). As informações necessárias ao projeto serão obtidas através da aplicação de um questionário padronizado, análise de

prontuários e exames laboratoriais. Dois grupos serão objeto do presente estudo: Grupo 1, indivíduos com Hepatite B crônica e Grupo 2, indivíduos

que eliminaram o vírus.

#### Objetivo da Pesquisa:

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo analisar geneticamente o vírus da hepatite B e os polimorfismos presentes nos genes HLA-A, HLA-B e HLA-

**Endereço:** Avenida Ipiranga, 5.400

**Bairro:** Jardim Botânico

**CEP:** 90.610-000

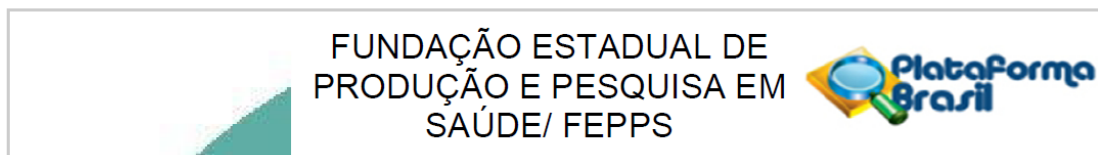
**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3288-4097

**Fax:** (51)3288-4069

**E-mail:** cep\_fepps@fepps.rs.gov.br



Continuação do Parecer: 671.721

DRB1 em indivíduos infectados.

## 2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar diferentes técnicas de extração de DNA do vírus da hepatite B (HBV).
- Investigar os genótipos do HBV.
- Padronizar a técnica de quantificação do HBV.
- Comparar as frequências dos alelos HLA de classe I e II (A, B e DRB1\*) entre portadores crônicos do HBV e indivíduos que eliminaram o HBV.
- Avaliar a associação entre os haplótipos formados entre os polimorfismos dos genes HLA de classe I e II com a ocorrência e a gravidade da hepatite B.
- Auxiliar na implantação da técnica de carga viral para HBV em uma instituição de Saúde Pública

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os riscos e desconfortos causados serão aqueles associados aos procedimentos da coleta de sangue. A quantidade de sangue coletada é pequena e, por isso, dificilmente causará algum mal-estar geral, no entanto, poderá haver dor no local da coleta e, eventualmente, um pequeno hematoma.

Benefícios:

Os benefícios estão relacionados aos resultados obtidos à longo prazo, como o levantamento epidemiológico dos dados de genotipagem do vírus da Hepatite B, da carga viral e susceptibilidade à persistência (cronicidade) do vírus no organismo humano, auxiliando no manejo clínico do tratamento e acompanhamento futuro dos pacientes que vivem com hepatite B.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Este projeto de pesquisa já foi submetido as avaliações dos comitês de ética em pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e da FEPPS(Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde) sendo aprovado pelos mesmos antes da Plataforma Brasil em 2011. O pesquisador anexou adendo, em 2014, para inclusão de novos genes(inclusão de análises genética de citocinas de resposta inflamatória)a serem analisados sem acarretar atraso no cronograma inicialmente previsto.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

todos os termos e documentações, referente ao projeto inicial foram apresentados, inclusive novo cronograma para execução das análises referente ao adendo.

**Endereço:** Avenida Ipiranga, 5.400  
**Bairro:** Jardim Botânico **CEP:** 90.610-000  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3288-4097 **Fax:** (51)3288-4069 **E-mail:** cep\_fepps@fepps.rs.gov.br



FUNDAÇÃO ESTADUAL DE  
PRODUÇÃO E PESQUISA EM  
SAÚDE/ FEPPS



Continuação do Parecer: 671.721

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto aprovado sem restrições ou recomendações.

PORTO ALEGRE, 03 de Junho de 2014

---

**Assinado por:**  
**Regis Domix Leal**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida Ipiranga, 5.400

**Bairro:** Jardim Botânico

**CEP:** 90.610-000

**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3288-4097

**Fax:** (51)3288-4069

**E-mail:** cep\_fepps@fepps.rs.gov.br

## CURRICULUM VITAE Resumido

**Gusatti, C.S.**

### 1. Dados pessoais:

**Nome:** Carolina de Souza Gusatti

**Local e data de nascimento:** Ronda Alta, RS, Brasil, 17 de novembro de 1985

**Endereço profissional:** Av. Ipiranga, 5400, Jardim Botânico, Porto Alegre, RS, Brasil

**Telefone Profissional:** 51 3352-0336/3288-4032

**E-mail:** carolgusatti@gmail.com

### 2. Formação acadêmica/titulação

- 2011-2015**      Doutorado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: HEPATITE B: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E ANÁLISE DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE  
Orientadora: Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti  
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2009 - 2011**      Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Caracterização de isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* sp.: presença de ISAb<sub>1</sub> e diversidade de blaOXA-51-like, Ano de obtenção: 2011  
Orientadora: Dra. Gertrudes Corção  
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2004 - 2008**      Graduação em Biomedicina.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Detecção de Beta-Lactamase de Espectro Estendido e Metallo-Beta-Lactamase em *Acinetobacter* spp. Isolados de Efluente Hospitalar em Porto Alegre, RS  
Orientadora: Dra. Gertrudes Corção  
Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

### 3. Estágios:

#### Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

**2007 - 2008**      Vínculo: Estágio Curricular Obrigatório em Análises Clínicas,  
Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 900h,  
Regime: Dedicção exclusiva

#### Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

**2006 - 2007** Vínculo: Estágio de Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Estagiário Bolsista, Carga horária: 20 semanais, Regime: Parcial  
Orientadora: Dra. Gertrudes Corção  
Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

#### **Atividade de extensão realizada**

**10/2005 -12/2005** Vínculo: Monitoria Acadêmica, Extensão universitária, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde,  
**Disciplina:** Embriologia para Biomedicina (CBS05034), com bolsa PROGRAD fornecida pela Instituição.

### **4. Artigos Completos Publicados**

1. **GUSATTI, C.S.**, COSTI, C., HALON, M. L., GRANDI, T., MEDEIROS, A. F. R., SILVA, C. M. D., GOMES, S. A., SILVA, M. S. N., NIEL, C., ROSSETTI, M.L. R. Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapecó, Southern Brazil, Originate from Italy. Plos One, 10:e0135816, 2015.

2. **GUSATTI, C.S.**, BERTHOLDO, L. M., OTTON, L. M., MARCHETTI, D.P., FERREIRA, A. E., CORÇÃO, G. First occurrence of blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in Southern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 43:243-246, 2012.

3. DETTMER, A., COELHO CAVALHEIRO, J., CAVALLI, E., MISTURINI ROSSI, D., **GUSATTI, C.S.**, ZÁCHIA AYUB, M. A., GUTTERRES, M. Optimization of the Biotechnological Process for Hide Unhairing in Substitution of Toxic Sulfides. Chemical Engineering & Technology, 35: 803-810, 2012.

4. FERREIRA, A. E., MARCHETTI, D.P., DE OLIVEIRA, L. M., **GUSATTI, C. S.**, FUENTEFRIA, D. B., CORÇÃO, G. Presence of OXA-23-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Wastewater from Hospitals in Southern Brazil. Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.), 17:221-227, 2011.

5. **GUSATTI, C. S.**, FERREIRA, A. E., FUENTEFRIA, D. B., CORCAO, G. Resistência a  $\beta$ -lactamases em *Acinetobacter spp* isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42:183-187, 2009.

### **5. Resumos e Trabalhos apresentados em Congressos**

1. BERTHOLDO, L. M., FERREIRA, A. E., OTTON, L. M., **GUSATTI, C. S.**, CORCAO, G. Detecção de Bombas de Efluxo em Isolados Clínicos de *Acinetobacter sp.* na Cidade de Porto Alegre, RS. In, XI Salão de Iniciação Científica da PUCRS, Porto Alegre/Brasil, 2010.

2. FERREIRA, A. E., Marchetti, D., **GUSATTI, C. S.**, CORCAO, G. Detecção de Genes de Resistência e Tipificação Molecular de Isolados de *Acinetobacter sp.* em Amostras Clínicas e de Efluente Hospitalar em Porto Alegre- RS. In, 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Porto de Galinhas/Brasil, 2009.

3. MEYER, D. D., SILVA, K. H., **GUSATTI, C. S.**, VIERO, R., SILVA, K. V. C. L. Os alunos da EJA e os microrganismos: utilizando a microbiologia como ferramenta para fazer ciência na escola. In, 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Porto de Galinhas/Brasil, 2009.

4. VIERO, R., **GUSATTI, C. S.**, MEYER, D. D., SILVA, K. H., SILVA, K. V. C. L. A Microbiologia Aplicada na Escola: Uma Visão do Mundo Microbiológico no Quotidiano de Alunos de EJA. In, 10º Salão de Extensão da UFRGS, 2009.

5. **GUSATTI, C. S.**, FERREIRA, A. E., CORCAO, G. Pesquisa Do Gene *bla*<sub>oxa</sub>-24 em Isolados Clínicos de *Acinetobacter* spp. Resistentes aos Carbapenêmicos, Imipenem e Meropenem, na Cidade de Porto Alegre, RS, In, 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Porto de Galinhas/Brasil, 2009.
6. SILVA, K. H., MEYER, D. D., **GUSATTI, C. S.**, VIERO, R., SILVA, K. V. C. L. Perspectivas de alunos do ensino de jovens e adultos (EJA) sobre o mundo microbiológico. In, 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Porto de Galinhas/Brasil, 2009.
7. VIERO, R., MEYER, D. D., SILVA, K. H., **GUSATTI, C. S.**, SILVA, K. V. C. L. Percepção dos Alunos da EJA em relação aos microorganismos: sempre perigosos à saúde? In, 29ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre/Brasil, 2009.
8. VIERO, R., **GUSATTI, C. S.**, MEYER, D. D., SILVA, K. H., SILVA, K. V. C. L. Percepção dos Alunos da EJA em relação aos microorganismos e processos de decomposição. In, XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre/Brasil 2009.
9. **GUSATTI, C. S.**, FERREIRA, A. E., CORCAO, G. Detecção de Beta-Lactamases de Espectro Estendido e Metallo-Beta-Lactamases em *Acinetobacter* spp. Isolados de Efluente Hospitalar em Porto Alegre, RS. In, XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre/Brasil 2007.
10. **GUSATTI, C. S.**, FERREIRA, A. E., CUNHA, G. R., CORCAO, G. Detecção de Beta-Lactamases em Isolados de *Acinetobacter* spp. de Esgoto Hospitalar em Porto Alegre, RS. In, 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília/Brasil, 2007.
11. **GUSATTI, C. S.**, FUENTEFRIA, D. B., CORCAO, G. Teste de Susceptibilidade e Triagem Fenotípica da Produção de Metallo-Beta-Lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* de Efluente Hospitalar e Amostras de Água Superficial. In, XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS Porto Alegre/Brasil, 2006.
12. FERREIRA, A. E., FUENTEFRIA, D. B., **GUSATTI, C. S.**, CUNHA, G. R., CORCAO, G. Isolamento de *Acinetobacter* spp. de Amostras de Efluente Hospitalar e Perfil de Sensibilidade a Antimicrobianos In, X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, Goiania/Brasil, 2006.
13. FUENTEFRIA, D.B., FERREIRA, A. E., GRAF, T., **GUSATTI, C. S.**, CORCAO, G. Triagem da Produção de Metallo-Beta-Lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* de Efluente Hospitalar e Água Superficial. In, X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, Goiania/Brasil, 2006.