

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de

27/02/2015.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**Programa de Pós-Graduação em
Pesquisa e Desenvolvimento- Biotecnologia Médica**

SARITA FIORELLI DIAS BARRETO

**PERFIL DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA E POLIMORFISMOS
GENÉTICOS EM VARIANTES DO VÍRUS DA HEPATITE B
CIRCULANTES NA REGIÃO DE BOTUCATU**

**BOTUCATU
2014**

SARITA FIORELLI DIAS BARRETO

**PERFIL DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA E POLIMORFISMOS
GENÉTICOS EM VARIANTES DO VÍRUS DA HEPATITE B
CIRCULANTES NA REGIÃO DE BOTUCATU**

Dissertação apresentada ao Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria T. Grotto

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Inês de M. C. Pardini

BOTUCATU

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Barreto, Sarita Fiorelli Dias.

Perfil de mutações de resistência e polimorfismos genéticos em variantes do
vrus da Hepatite B circulantes na região de Botucatu / Sarita Fiorelli Dias Barreto.
- Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina de Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini

Capes: 90400003

1. Hepatite B. 2. Hepatite por vírus. 3. Polimorfismo (Genética). 4. Mutação
(Biologia).

Palavras-chave: Mutações; Polimorfismos; Resistência; Vírus da Hepatite B.

Dedicatória

*Dedico aos meus pais, minha avó e a todos da minha família
aos quais serei eternamente grata pelo apoio incondicional.*

Agradecimientos

Agradeço a Deus por me fortalecer na fé para suportar todos os momentos que passei e por me conduzir sempre no caminho correto.

Agradeço a todos os pacientes que fizeram parte deste estudo, sem eles não seria possível a realização desse trabalho.

Agradeço aos meus Pais por sua presença desde o princípio ao meu lado, me incentivando e apoiando nas diversas situações. Principalmente pelas orações da minha mãe e, pelo esforço do meu pai em me proporcionar sempre o melhor.

Agradeço a minha avó, as minhas tias, aos meus padrinhos, enfim a toda a minha família pelo carinho dedicado e por sempre torcerem por mim.

Agradeço aos verdadeiros amigos que fazem parte da minha vida e que me ajudaram em todos os momentos com palavras de motivação e vibrações positivas.

Agradeço a minha orientadora Dra Rejane que acreditou na realização desse trabalho e pela ajuda em diversos momentos.

Agradeço a minha co-orientadora Dra Maria Inês pela confiança depositada em mim e, pela disponibilização da realização desse trabalho no seu laboratório.

Agradeço ao Dr. Giovanni e ao Dr. Fernando por contribuírem para essa pesquisa e, por estarem sempre prontos a me orientar.

Agradeço a todos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular Rotina e Pesquisa a colaboração necessária para que a realização desse trabalho fosse concluída.

Agradeço aos funcionários do Hemocentro de Botucatu, onde fiz grandes amizades as quais levarei para sempre.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação pelo apoio administrativo.

Agradeço as bibliotecárias pela elaboração da ficha catalográfica.

Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.

Friedrich Nietzsche

Quando me dei por conta estava cursando Biomedicina, descobrindo e me encantando por cada área da minha profissão. No segundo ano de faculdade uma oportunidade de estágio no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu – UNESP me foi oferecida por uma professora.

Comecei no laboratório como PRAT (programa de aprendizagem e treinamento oferecido pela UNESP) com todas as dificuldades para conciliar os estudos na cidade onde eu estudava (Avaré) com as atividades do laboratório, sempre me esforcei para buscar novos conhecimentos e para me tornar uma profissional engajada.

Muitas pessoas foram essenciais nesse trajeto, foram o meu espelho. Ensinaram-me a ser uma profissional de ética, com responsabilidades e sempre pensando no maior compromisso que eu deveria ter – os pacientes.

Com o passar do tempo, as oportunidades foram surgindo e eu assumi a rotina das Hepatites Virais. A cada dia uma surpresa, uma descoberta, um aprendizado.

Hoje não sei se eu faço parte da rotina das Hepatites ou se elas fazem parte de mim!!

Após a adaptação nas minhas atividades diárias, mais uma oportunidade foi oferecida, o ingresso no Mestrado Profissional, a fim de responder questões ligadas ao Ministério da Saúde, do qual o laboratório ao qual eu pertença faz parte.

Sendo assim apresento neste volume o trabalho intitulado, Perfil de mutações de resistência e polimorfismos genéticos em variantes do Vírus da Hepatite B circulantes na região de Botucatu.

Resumo

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) constitui um grave problema de saúde pública mundial, sendo responsável por doenças hepáticas agudas, crônicas, cirrose e hepatocarcinoma. Com o intuito de diminuir a replicação viral e a progressão da infecção pelo VHB, foram aprovadas sete drogas para o tratamento da hepatite B crônica nos últimos 20 anos, sendo que no Brasil, o protocolo de tratamento baseia-se no uso dos fármacos: Interferon-alfa, Inteferon-alfa peguilado, Lamivudina, Tenofovir, Entecavir e Adefovir. No entanto, um obstáculo à utilização das drogas que atuam inibindo enzimas virais é a emergência de variantes resistentes. Desta maneira, sabendo-se que o estudo da variabilidade genética das regiões genômicas do VHB é importante não somente para analisar o perfil de resistência do vírus aos antivirais, mas também para avaliar as variantes virais circulantes no Brasil, a finalidade deste trabalho foi determinar o perfil de mutações de resistência e polimorfismos genéticos em variantes do Vírus da Hepatite B circulantes na região de Botucatu. A região genômica *pol* do VHB foi amplificada e sequenciada a partir de metodologia *in-house*, para avaliar o perfil de mutações de resistência e de polimorfismos genéticos. Dados clínicos e laboratoriais foram coletados do prontuário médico dos pacientes. Os resultados obtidos demonstraram a presença das mutações de resistência rtM204V, rtM204I e rtL180M, que conferem resistência cruzada à Lamivudina e Telbivudina e, podem ocasionar resistência cruzada ao Entecavir quando na presença de mutação adicional. Em relação aos polimorfismos, 37 substituições foram encontradas, das quais várias já foram associadas à resistência primária ou secundária ao tratamento antiviral pelo VHB, sendo que 4 ainda não foram relatadas pela literatura, sendo elas Q262E, Q139H, W79C e W257H, o que demonstra que estas substituições podem ser características das variantes virais do VHB encontradas em nossa região.

Palavras-chave: Mutações, Polimorfismos, Resistência, Vírus da Hepatite B.

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is a serious global public health problem, being responsible for acute and chronic liver diseases, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In order to reduce viral replication and progression of HBV infection, seven drugs for the treatment of chronic hepatitis B have been approved in the past 20 years, and in Brazil, the treatment protocol is based on the use of the drugs: Interferon-alpha, pegylated Interferon-alfa, Lamivudine, Tenofovir, Entecavir and Adefovir. However, an obstacle to the use of drugs that act by inhibiting viral enzymes is the emergence of resistant variants. Therefore, the study of the variability of HBV genome is important not only to assess the resistance profile of the virus to antivirals, but also to evaluate the circulating viral variants in Brazil. Thus, the purpose of this study was to evaluate the profile of resistance mutations and genetic polymorphisms in Hepatitis B virus variants circulating in Botucatu. HBV *pol* genomic region was amplified and sequenced by in-house methodology, to evaluate the profile of resistance mutations and genetic polymorphisms. Additional clinical and laboratory parameters were collected from the medical records of patients. The results showed the presence of rtM204V, rtM204I and rtL180M resistance mutations, which confer cross-resistance to Lamivudine and Telbivudine and, may cause cross-resistance to Entecavir in the presence of additional mutation. Regarding polymorphisms, 37 substitutions were found, including those associated to primary and secondary resistance to HBV treatment, and of these four substitutions have not been reported in the literature, which were Q262E, Q139H, W79C and W257H, demonstrating that these substitutions may be characteristic of HBV viral variants found in our region.

Keywords: Mutations, Polymorphisms, Resistance, Hepatitis B Virus

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) constitui um grave problema de saúde pública mundial, sendo responsável por doenças hepáticas agudas, crônicas, cirrose e hepatocarcinoma (MARGOLIS et al., 1991; MAST et al., 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que dois bilhões de pessoas no mundo já entraram em contato com o VHB, sendo que mais de 350 milhões tornaram-se portadores crônicos do vírus (BRASIL, 2011).

No Brasil, os estudos epidemiológicos ainda são escassos, entretanto, estima-se que ao menos 15% da população entrou em contato com o vírus e que 1% apresenta hepatite crônica associada ao mesmo (BRASIL, 2002), sendo encontradas dentro do país áreas de alta, média e baixa endemicidade para infecção pelo VHB. Essa variabilidade geográfica se relaciona a condições socioeconômicas, culturais e educacionais. São consideradas áreas de endemicidade intermediária as regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste enquanto a região Sul é tida como uma área de baixa endemicidade. São consideradas áreas de alta endemicidade a região da Amazônia Legal, o Espírito Santo e o Oeste do estado de Santa Catarina (CHÁVEZ; CAMPANA; HAAS, 2003).

O vírus da hepatite B (VHB) pertence à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus* e possui tropismo pela célula hepática, é um vírus envelopado de, aproximadamente, 42nm de diâmetro, com nucleocapsídeo icosaédrico de 27nm e genoma circular constituído de DNA de fita dupla incompleta (Figura 1) (DI MARCO et al., 2004).

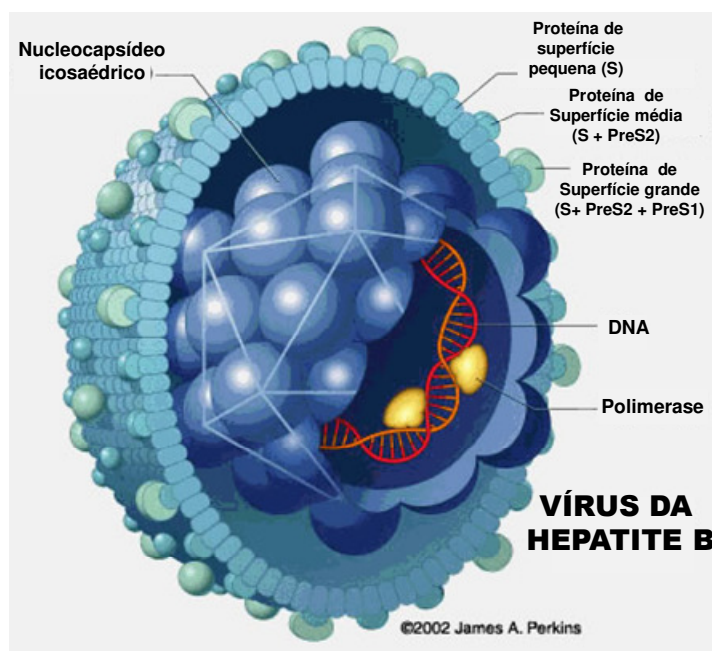


Figura 1: Representação esquemática da partícula viral completa do VHB, evidenciando o material genético viral (DNA), o nucleocapsídeo icosaédrico, as proteínas de superfície e a enzima DNA polimerase/transcriptase reversa (Adaptado de PERKINS, 2002).

O genoma do VHB é constituído por, aproximadamente, 3.200 nucleotídeos, sendo uma das cadeias do DNA curta de polaridade positiva e outra longa de polaridade negativa, apresentando quatro fases de leitura abertas, do inglês, *Open Reading Frame* (ORF) designadas de (1) Pré-S1/Pré-S2/S, que codificam as proteínas que formam o antígeno de superfície (HBsAg), as proteínas L (*large*), M (*middle*) e S (*small*); (2) Pré-Core/Core, responsáveis pela síntese do HBcAg e do HBeAg; (3) P, que codifica a DNA-polimerase (transcriptase reversa, RNase-H e domínios da proteína terminal) e (4) X, responsável pela síntese da proteína X, que segundo Grob (1998) parece exercer funções regulatórias (Figura 2).

entanto, de forma distinta do que ocorre na infecção pela Hepatite C, os genótipos ainda não são considerados para tomada de decisões terapêuticas (SORRELLI et al., 2009).

Até o momento, o mecanismo de entrada viral ainda não foi elucidado. Endocitose e fusão direta do envelope viral com a membrana plasmática são propostas como potenciais vias. Depois do desencapsulamento para o citoplasma e transporte do nucleocapsídeo ao núcleo, a dupla fita do DNA viral relaxado circular (rcDNA) é reparado por enzimas virais e celulares, ou seja, a fita incompleta de polaridade positiva do rcDNA tem sua síntese finalizada pela polimerase viral e, em etapa seguinte do ciclo, a polimerase viral e iniciadores de RNA utilizados para esta síntese são removidos por enzimas celulares (BECK; NASSAL, 2007). Posteriormente o DNA circular é fechado covalentemente (cccDNA), sendo formado pela ligação covalente de ambas fitas de DNA. Há evidências que cada célula infectada contém 1-50 moléculas de cccDNA. Como um replicativo intermediário do ciclo de vida do VHB, o cccDNA é essencial para a persistência da infecção e funciona como molde para síntese de RNA. Todas as variantes de RNA viral são transcritas a partir cccDNA utilizando estruturas transcricionais celulares (GOMES; NIEL, 2008). O cccDNA é transcrito em RNA subgenômico (sgRNA) e RNA pregenômico (pgRNA). No nucleocapsídeo o pgRNA é utilizado como molde para transcrição reversa resultando na fita de DNA de polaridade negativa. O molde de pgRNA é, então, parcialmente degradado pela ação da RNase H. Aproximadamente 15 a 18 oligonucleotídeos na extremidade 5' da fita não são degradados nessa fase e, funcionam como iniciador para a síntese da fita de DNA de polaridade positiva (GRIMM et al., 2013).

No ciclo de vida do VHB, o DNA no nucleocapsídeo pode ser reimportado para o núcleo para formar cccDNA adicionais ou pode ser conduzido ao retículo endoplasmático para serem liberados. Após o brotamento no lúmen do retículo endoplasmático, as proteínas do envelope são secretadas pela célula (Figura 3) (GRIMM et al., 2013).

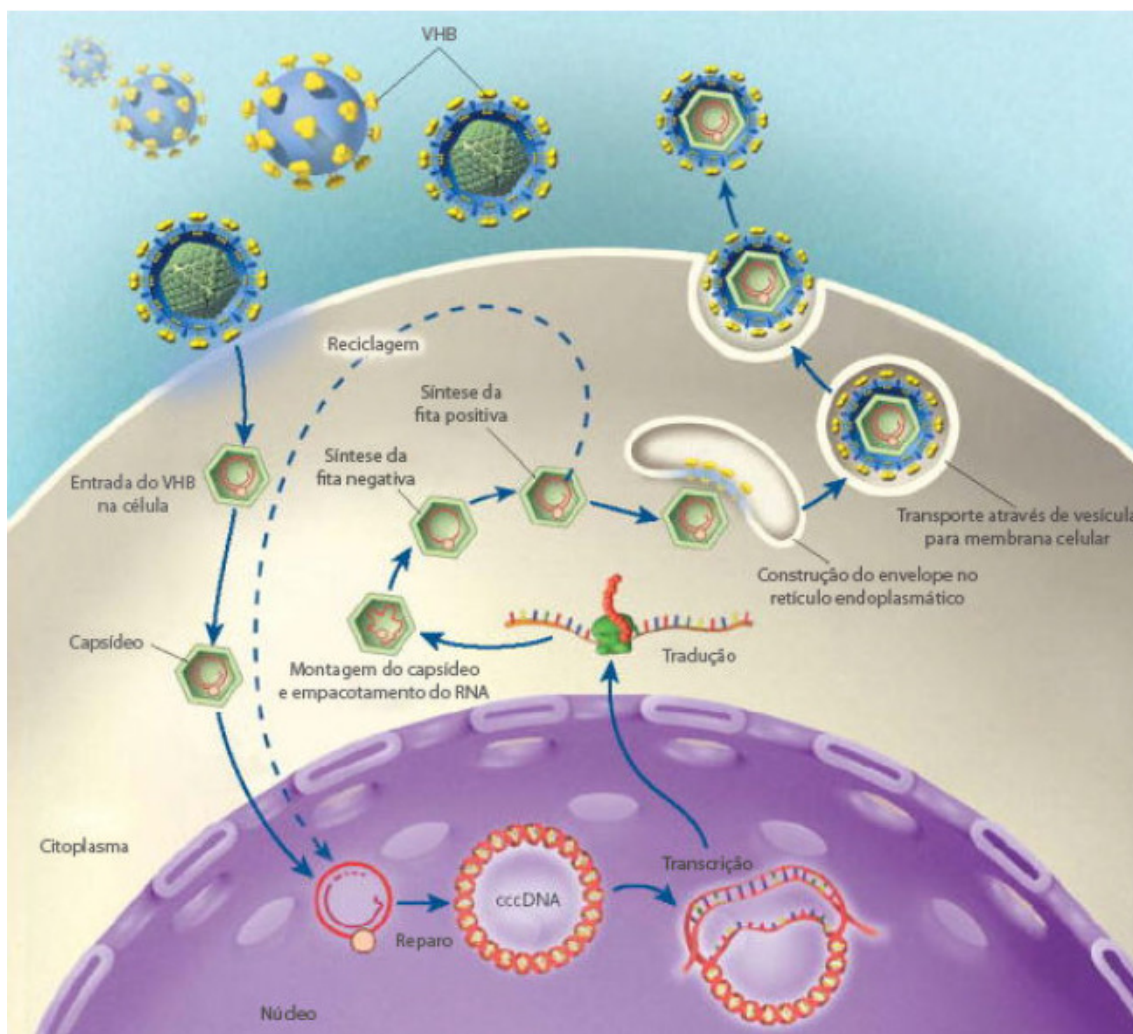


Figura 3: Representação esquemática do ciclo do VHB (Adaptada de GANEM; PRINCE, 2004).

Devido à falta de atividade de reparo da transcriptase reversa, as mutações do genoma viral são freqüentes e resultam na coexistência de espécies genéticas virais distintas em indivíduos infectados (*quasispecies*) (GRIMM et al., 2013).

Estas variantes virais circulantes em um paciente infectado podem ser transmitidas. As principais vias de transmissão constituem a parenteral, sexual e vertical. Os fatores de risco para infecção incluem transfusão de sangue, promiscuidade sexual, compartilhamento ou re-utilização de seringas entre usuários de drogas injetáveis, diálise renal, tatuagem, transmissão ocupacional e, vivência em instituição correcional (LAVANCHY, 2004). Em área de baixa prevalência, a hepatite B é uma doença tipicamente de adultos jovens os quais adquiriram a infecção pelo comportamento de risco e, em regiões de alta

prevalência, a maior parte das infecções ocorre no período perinatal ou durante a primeira infância (LIAW et al., 2009).

O vírus da hepatite B não causa dano celular diretamente, exceto em circunstâncias incomuns. A resposta imune do hospedeiro, tanto celular como humoral, determina o curso da infecção e o grau do dano hepático (CHISARI et al., 1995). O reconhecimento do VHB determinado pelos linfócitos T citotóxicos (células CD8+) leva à destruição de hepatócitos infectados, com o aumento da resposta celular CD4+. Se a resposta imunológica está debilitada, como em pacientes sob tratamento com imunossupressores, o controle da infecção pode ser perdido, a replicação do VHB é exacerbada e um efeito citopático direto é produzido, conduzindo à hepatite colestática fibrosante (YEO et al., 2000). Por outro lado, a hepatite severa é, às vezes, observada na retirada de imunossupressão, provavelmente resultado da estimulação imunológica.

O *clearance* do DNA do VHB é mediado em grande parte (até 90%) por citocinas antivirais produzidas pelas células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo o fator de necrose tumoral alfa, inteferon alfa ou interferon beta (MURRAY et al., 2005). Em indivíduos com hepatite B crônica, a resposta CD4+ e CD8+ específica ao VHB são insuficientes (MAINI et al., 2000) e podem conduzir à resposta inflamatória persistente que é ineficiente para o *clearance* do VHB (MCMAHON et al., 1985).

Vários fatores podem influenciar a resposta imunológica contra o VHB, como por exemplo, a idade do paciente no momento da infecção, fatores genéticos do hospedeiro e a própria variabilidade genética do vírus (BLUM; HAASE; VYAS, 1984). A idade da aquisição da infecção pelo VHB apresenta grande impacto na história natural da hepatite B crônica. Enquanto que 90% dos indivíduos infectados ao nascimento ou na primeira infância desenvolvem a infecção crônica, mais que 95% dos pacientes infectados quando adultos clareiam o vírus (YIM; LOK, 2006).

O curso natural da infecção pelo VHB pode ser dividido em quatro fases na dependência da interação vírus-hospedeiro como tolerância imunológica, *imunoclearance*, portador inativo e reativação (FATTOVICH et al., 2008).

A primeira fase da infecção é caracterizada pela presença do AgHBe, altos níveis séricos de DNA-VHB, mas níveis normais ou minimamente elevados de alanina aminotransferase (ALT) e fígado normal ou somente atividade histológica mínima e fibrose escassa. A segunda fase é caracterizada por uma diminuição flutuante, mas progressiva dos níveis de DNA viral, elevação da ALT e necroinflamação hepática. A terceira fase é caracterizada pela soroconversão do AgHBe para anti-HBe, marcando a transição da terceira fase de replicação baixa ou sem replicação a qual é caracterizada pela negatividade do AgHBe e a positividade para anti-HBe, níveis indetectáveis ou baixo de DNA-VHB, níveis persistentemente normais de ALT e histologia hepática inativa com fibrose mínima. Já na quarta fase, como o DNA viral persiste nos hepatócitos, pode ocorrer a reativação do VHB com o reaparecimento da doença hepática tanto espontaneamente como induzida por atividade imunossupressora. A reativação da replicação viral pode ocorrer devido à reativação do vírus selvagem com uma reversão do estado AgHBe positivo ou, muito mais frequentemente, com a replicação competente de variantes VHB que evitam a expressão do AgHBe. Esta fase é caracterizada pela negatividade do AgHBe com níveis de DNA-VHB séricos detectáveis, elevação da ALT e moderada ou severa necroinflamação com valores distintos de fibrose na biópsia hepática (FATTOVICH et al., 2008).

Com o objetivo de reduzir as taxas de infecção pelo VHB a vacina contra a hepatite B está disponível desde 1982, e apesar de sua eficácia, ainda não há o controle desta infecção, sendo que há relatos na literatura a respeito da existência de variantes virais portadores de mutações genéticas que ocorrem em consequência a pressão seletiva exercida por estas vacinas, denominadas mutantes de escape vacinal. Portanto, devido à existência destes mutantes de escape vacinal, os pacientes permanecem vulneráveis a estas cepas mesmo tomando as três doses da vacina para hepatite B (LEE et al., 2001).

Com o intuito de diminuir a replicação viral e a progressão da infecção pelo VHB, foram aprovadas sete drogas para o tratamento da hepatite B crônica nos últimos 20 anos (YUEN et al., 2009). Interferon alfa-2b e Lamivudina foram aprovadas nos anos 90 e durante a última década cinco drogas adicionais receberam a aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA): adefovir,

entecavir, peginterferon alfa-2a, telbivudina e tenofovir. No Brasil, o protocolo de tratamento baseia-se no uso dos fármacos: Interferon-alfa, Inteferon-alfa peguilado, Lamivudina, Tenofovir, Entecavir e Adefovir (BRASIL, 2011). O inteferon-alfa foi a primeira droga aprovada para o tratamento da infecção crônica pelo VHB. O mecanismo de ação envolve efeitos antivirais, antiproliferativos e imunomoduladores. Os análogos de nucleosídeo ou nucleotídeos (Lamivudina e Entecavir; Tenofovir e Adefovir, respectivamente) têm como alvo a polimerase do VHB e podem agir por inibição direta, através de ligação competitiva com substratos endógenos ou a partir da incorporação ao DNA viral, agindo como cadeias terminadoras (FUNG et al., 2011).

No entanto, um obstáculo à utilização das drogas que atuam inibindo enzimas virais é a emergência de variantes resistentes (KIEFFER et al., 2007).

O desenvolvimento de resistência às drogas antivirais depende de alguns fatores, tais como o *fitness viral* que consiste na capacidade de replicação viral, a pressão seletiva e a potência dos medicamentos incluindo a barreira genética da droga e, a falta da atividade de reparo da polimerase viral (GIRONES; MILLER, 1989; RICHMAN, 1996; RICHMAN, 2000; THIBAUT, 2002; ZHOU; HOLMES, 2007; VILLET ET AL., 2009; TENNEY, 2009). Diferentes variantes virais coexistem no paciente infectado. No entanto, a variante selvagem (*Wild-Type*) é a população majoritária, uma vez que mutações de resistência prejudicam o *fitness viral* consequentemente as variantes resistentes permanecem como populações minoritárias (GAL-TANAMY et al., 2008). Na presença de um agente antiviral, as variantes mutantes, resistentes emergem devido à inibição da replicação dos vírus selvagens. Ao longo do tempo, mutações compensatórias ocorrem e, restauram a capacidade replicativa do vírus mutante (GHANY; DOO, 2009).

Modificações no genoma do VHB que estão associadas à resistência às drogas terapêuticas, podem ocasionar dois tipos de resistência, a resistência primária, que ocorre como consequência da infecção por uma variante já resistente a, pelo menos, algumas das drogas disponíveis e; a resistência secundária, que ocorre devido à seleção de mutações durante o tratamento em

decorrência da supressão viral não ter sido completa (ALLEN et al., 1998; YILDIZ et al., 2011; PASTOR et al., 2009)

O uso de Lamivudina está particularmente associado a mutações de resistência, já que apenas uma única substituição de metionina por valina ou isoleucina na posição 204 na região da transcriptase reversa da polimerase do VHB diminui a susceptibilidade a Lamivudina de maneira muito expressiva, o que a torna uma droga de baixa barreira genética. A Lamivudina é um análogo de citidina e é fosforilada em metabólitos ativos, agindo como um terminador de cadeia após competição para incorporação ao DNA viral. As mutações principais responsáveis pela resistência à Lamivudina como citada anteriormente, incluem M204V e M204I (ALLEN et al., 1998). A primeira ocorre geralmente concomitantemente com a mutação L180M, enquanto que a segunda pode ocorrer sozinha ou juntamente com a L180M. Foi postulado que a L180M pode restaurar a competência da replicação dos mutantes rt204 e aumentar a resistência à droga (CARRILHO; ONO-NITA, 2001). Outra mutação compensatória é a V173L, que ocorre juntamente com a rt204 e rt180, e que pode aumentar a replicação viral. A mutação A181T/V que leva à resistência à Lamivudina também está relacionada com resistência cruzada ao Adefovir (VILLET et al., 2008). Outras mutações compensatórias relacionadas a Lamivudina como L80V/I e T184S podem ser encontradas em outros domínios da RT polimerase do VHB (OGATA et al., 1999; BARTHOLOMEUSZ et al., 2005).

O Adefovir é um análogo de nucleotídeo de adenosina monofosfato, aprovado em 2002 pelo FDA. Uma das propriedades vantajosas desta droga é sua eficiência contra mutantes resistentes à Lamivudina. Vírus carregando as mutações M204I/V permanecem suscetíveis ao Adefovir (LAMPERTICO et al., 2005). No entanto, mutações de resistência foram descritas e as duas principais são a A181V/T e N236T (ANGUS et al., 2003). Uma taxa de resistência genotípica de 29% é observada depois de cinco anos de tratamento com essa droga em pacientes AgHBe negativos. Outra mutação, a I233V, tem sido associada com resistência primária ao Adefovir (SHILDGEN et al., 2006).

O Entecavir é um análogo carboxílico da guanosina que sofre fosforilação intracelular para seu metabólito ativo 5' trifosfato. Este compete com o substrato natural desoxiguanosina trifosfato e inibe a DNA polimerase viral. Estudos *in vitro* mostram que o Entecavir inibe as três fases da replicação do VHB: *priming*, pois apresenta um mecanismo antiviral adicional comparado com outros análogos de nucleotídeos/nucleosídeos, transcrição reversa do RNAm pré-genômico e síntese da fita positiva de DNA do VHB (SEIFER et al., 1998). Diferentemente dos demais análogos de nucleotídeos/nucleosídeos, a fração ativa do Entecavir contém um grupo 3'-hidroxil que permite a adição de poucos nucleotídeos antes do final da cadeia (LANGLEY et al., 2007; TCHESNOKOV et al., 2008). O Entecavir apresenta uma eficiência de 30 a 2200 vezes maior em reduzir a replicação viral *in vitro* do que a Lamivudina (INNAIMO et al., 1997; ONO-NITA et al., 2001) e sua barreira genética é alta. O desenvolvimento de resistência ao Entecavir é rara e, além das mutações M204V e L180M que são responsáveis pela resistência à Lamivudina, mutação adicional I169T, T184G, S202I ou M250V é necessária para que ocorra resistência (BALDICK et al., 2008).

O Tenofovir tem o mesmo princípio dos demais fármacos, e é uma droga de alta barreira genética, agindo como um terminador de cadeia por inibir o substrato natural 5'-trifosfato de deoxiadenosina. O Tenofovir tem mostrado eficiência superior ao Adefovir em termos de supressão do DNA viral, da soroconversão AgHBe e da normalização da ALT (MARCELLIN et al., 2008; HEATHCOTE et al., 2011). Até o presente momento, não foi reportado nenhum caso de resistência primária ao Tenofovir em pacientes monoinfectados com VHB. Estudos *in vitro* demonstraram que as mutações A181T e N236T, associadas com resistência ao Adefovir, estão também associadas com uma diminuição da suscetibilidade ao Tenofovir (QI X et al., 2007; VILLET et al., 2009). No entanto, há a necessidade de elucidar a significância dessas mutações no ambiente clínico. Estudo com pacientes coinfectados HIV-VHB sugeriu uma possível participação da mutação A194T na resistência ao Tenofovir (SHELDON et al., 2005). VHB com a mutação A194T demonstrou suscetibilidade reduzida ao Tenofovir quando combinada com as mutações de resistência à Lamivudina M204V e L180M *in vitro*. O impacto clínico da mutação

A194T precisa ser determinada, uma vez que o Tenofovir mostrou ser efetivo na supressão viral em pacientes com a mutação A194T (FUNG et al., 2011).

Polimorfismos genéticos também podem conferir resistência aos medicamentos, como é o caso do polimorfismo rtL217R que confere resistência natural ao adefovir (ZOULIM; LOCARNINI, 2009; CUESTAS et al. 2010). Alterações polimórficas na região S-pol do VHB podem ser observadas entre os diferentes tipos de genótipos. Estudos já relataram as alterações sT114S, sY161F, sI195M e sM198I na região S-pol em sequências isoladas do genótipo A e, um grande número de alterações nas posições polimórficas S118 e S128 do genótipo D (VERNET G. et al., 2006). Essas alterações podem influenciar no aumento da variabilidade dos genótipos virais, assim como na habilidade do VHB de escape ao sistema imune do hospedeiro (BANERJEE et al., 1999).

Vários métodos têm sido propostos para detecção de mutações e polimorfismos resistentes aos antivirais. Sequenciamento direto pode identificar polimorfismos e mutações conhecidas, novos sítios de mutações e polimorfismos, porém esse método não é suficientemente sensível para detecção de resistentes mutantes emergentes que estão presentes como população minoritária. Estas podem ser identificadas por clonagem em larga escala e protocolos de sequenciamento, no entanto são metodologias que exigem além da capacidade dos laboratórios clínicos. Métodos baseados na hibridização são mais sensíveis e menos trabalhosos, no entanto apresentam desvantagens como, identificação apenas de mutações conhecidas, testes individuais para detectar cada mutação entre outras (VALSAMAKI, 2007).

O estudo da variabilidade genética das regiões genômicas do VHB é importante não somente para avaliação do perfil de resistência do vírus aos antivirais, o que pode ser fundamental para orientar a indicação e/ou modificação do esquema terapêutico utilizado pelo paciente, mas também para avaliar as variantes virais circulantes no Brasil, uma vez que além da circulação de vários genótipos, coinfeções e eventos de recombinação podem ocorrer conduzindo a emergência de variantes híbridas que podem se tornar a variante dominante em diferentes regiões geográficas (CHEKARAOU et al., 2010).

Neste contexto, a finalidade deste estudo foi avaliar o perfil de mutações de resistência e polimorfismos genéticos em variantes do Vírus da Hepatite B circulantes na região de Botucatu.