

# **PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS AO DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA À LAMIVUDINA EM PACIENTES COM HEPATITE B CRÔNICA DO MUNICÍPIO DE BENTO GONÇALVES, RS**

JULIA DO AMARAL GOMES<sup>1</sup>  
MIRELLI GABARDO KLEIN<sup>2</sup>  
JULIANA DE PAOLI<sup>3</sup>  
ANDRÉ CASTAGNA WORTMANN<sup>4</sup>  
VAGNER RICARDO LUNGE<sup>5</sup>  
DANIEL SIMON<sup>6</sup>

## **RESUMO**

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) é um problema de saúde pública mundial. O tratamento com lamivudina em portadores crônicos do HBV está frequentemente associado a altas taxas de resistência viral, relacionadas a mutações no motivo YMDD do gene da transcriptase reversa. O objetivo do presente estudo foi investigar a prevalência de mutações no motivo YMDD em pacientes com hepatite B crônica do município de Bento Gonçalves, RS. Um estudo transversal foi realizado entre julho e dezembro de 2010 incluindo 102 pacientes. O DNA viral foi sequenciado em amostras de 21 portadores ativos do HBV. Foi observada a presença de um HBV mutante portando a variação YMDD (rtM204I) acompanhada da substituição rtL180M. Outras mutações (rtA181V e rtQ215S) foram verificadas em dois pacientes.

**Palavras-chave:** Vírus da hepatite B, lamivudina, tratamento, hepatite B crônica, resistência à lamivudina.

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>3</sup> Bióloga, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>4</sup> Médico, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia/UFRGS

<sup>5</sup> Professor do Curso de Medicina Veterinária e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

<sup>6</sup> Professor-Orientador do Curso de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA (daniel.simon@ulbra.br)

## ABSTRACT

*Hepatitis B virus (HBV) infection is a serious public health issue worldwide. Lamivudine treatment for chronic hepatitis B is often associated with a high incidence of viral resistance and related to mutations in the YMDD motif of the reverse transcriptase gene. This study aimed to estimate the prevalence of YMDD mutations in chronic HBV carriers in Bento Gonçalves, RS. A cross-sectional study was conducted with 102 patients between July and December 2010. HBV DNA from 21 active HBV carriers were sequenced. It was observed one sample with the rtM204I change in the YMDD motif of HBV accompanied by rtL180M. In addition, other mutations (rtA181V and rtQ215S) were present in two patients.*

**Keywords:** Hepatitis B virus, lamivudine, treatment, chronic hepatitis B, lamivudine resistance.

## INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite B (HBV) pertence à família Hepadnaviridae e apresenta genoma circular parcialmente duplicado com aproximadamente 3.200 pares de bases (GANEM; PRINCE, 2004). A infecção pelo HBV é um problema de saúde pública mundial, sendo a principal causa de cirrose e carcinoma hepatocelular. Estima-se que cerca de 240 milhões de pessoas sejam portadores crônicos do HBV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Nos indivíduos adultos expostos exclusivamente ao HBV, a cura espontânea ocorre em cerca de 90% dos casos. A evolução para formas crônicas ocorre em aproximadamente 5 a 10% dos casos em adultos. A cronificação da infecção é definida pela persistência do vírus, ou seja, a presença do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) por mais de seis meses (BRASIL, 2011).

O tratamento de indivíduos portadores do HBV visa reduzir o risco de progressão da doença hepática e seus desfechos primários, especificamente cirrose, carcinoma hepatocelular e, conseqüentemente, o óbito. Enzimas hepáticas, marcadores sorológicos e carga viral são utilizados como parâmetros para inferir a probabilidade de benefícios da terapia a longo prazo (BRASIL, 2011).

Para o tratamento da hepatite B crônica, duas classes de agentes terapêuticos estão aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): o interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ , convencional ou peguilado) e os antivirais orais análogos de núcleos(t)ídeos: lamivudina (3TC), adefovir (ADV), entecavir (ETV), tenofovir (TDF) e telbivudina (LdT) (PROJETO DIRETRIZES, 2009; BRASIL, 2011). As drogas orais baseadas em análogos de nucleos(t)ídeos têm sido preferidas no Brasil devido ao seu baixo custo e efeitos colaterais mínimos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, 2005).

O antiviral mais comumente usado em portadores crônicos do HBV é a lamivudina. Este medicamento foi o primeiro a ser licenciado para o tratamento de hepatite B

crônica (SHAMLIYAN et al., 2011), sendo um potente inibidor de replicação do HBV, que proporciona resposta terapêutica na maioria dos pacientes e soroconversão HBeAg para anti-HBe em parte deles (BRASIL, 2011). Entretanto, o tratamento com lamivudina está associado com altas taxas de resistência viral relacionadas a mutações no gene da polimerase do HBV. Estudos mostram que o desenvolvimento de mutações de resistência atinge cerca de 14-32% dos pacientes após um ano de tratamento, aumentando progressivamente a cada ano, chegando a 65-80% após cinco anos de uso da droga (LOK et al., 2002; 2003; WRIGHT, 2004; LIAW, 2005; ZOULIM; LOCARNINI, 2009).

A resistência à lamivudina geralmente ocorre devido à substituição de aminoácidos no motivo YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato) do domínio da transcriptase reversa (rt) da polimerase do HBV (BOTTECCHIA et al., 2008). O domínio rt é um dos quatro domínios que compõe a polimerase do HBV, contendo regiões conservadas de A a F. As espécies mutantes de HBV contêm substituições de aminoácidos no motivo rtYMDD na posição rt 204 (rtM204V/I na região conservada C), associadas ou não à substituição na posição rt 180 (rtL180M na região conservada B) (STUYVER et al., 2001).

A pesar do estado do Rio Grande do Sul não apresentar alto índice do HBV, dados do município de Bento Gonçalves, localizado na região serrana do estado, revelam uma incidência 44,9 casos de HBV por 100 mil habitantes, sendo muito superior às médias nacional e estadual (BENTO GONÇALVES, 2010). Segundo Bertolini et al. (2012), a alta prevalência do HBV em algumas áreas da região sul do Brasil podem ser explicadas pela chegada de imigrantes europeus no século XIX e XX em determinadas localidades.

O presente estudo teve por objetivo investigar a prevalência de mutações no motivo YMDD em pacientes com hepatite B crônica do município de Bento Gonçalves, RS.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## Pacientes

Foi realizado um estudo transversal com pacientes maiores de 18 anos que foram recrutados em serviços terciários especializados no atendimento de hepatites virais na cidade de Bento Gonçalves no período de julho a dezembro de 2010. Todos os indivíduos eram portadores de hepatite B crônica, ou seja, tinham pelo menos um exame de HBsAg positivo há mais de 6 meses, além do realizado como triagem para a inclusão no estudo. Todos os pacientes responderam a um questionário epidemiológico e foi coletada uma amostra de 12 mL de sangue para a realização de exames. Os pacientes foram submetidos a testes bioquímicos e avaliações clínicas, incluindo dosagens de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), creatinina, albumina, tempo de protrombina (TP), ascite e biópsias hepáticas. As biópsias hepáticas foram avaliadas pelo sistema de pontuação METAVIR (estágio de fibrose numa escala de cinco pontos, sendo F0 = sem fibrose, F1 = fibrose portal e periportal sem septações, F2 = fibrose portal e periportal com raras septações, F3 = fibrose portal e periportal com muitas septações, F4 = cirrose, e atividade necroinflamatória estimando o grau das lesões inflamatórias portais e a necrose hepatocelular em uma escala de quatro pontos, A0 = sem atividade, A1 = leve, A2 = moderada, A3 = grave) (POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocolo n° 100025), da Universidade Luterana do Brasil (protocolo n° 419H/2010) e do Hospital Tacchini de Bento Gonçalves (protocolo n° 14/2010). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os pacientes.

## Análises sorológicas

As análises sorológicas foram realizadas utilizando ensaios comerciais. A pesquisa de HBsAg foi realizada utilizando o ensaio ETI-MAK-4 (DiaSorin, Saluggia, Itália) e a dosagem de anticorpos anti-HBc foi realizada utilizando o ensaio ETI-AB-COREK PLUS (DiaSorin, Saluggia, Itália).

## Análises moleculares

A extração de DNA das amostras foi realizada através da metodologia descrita por Boom et al. (1990). A detecção e determinação da carga viral foram realizadas por metodologia descrita por Welzel et al. (2006). Os

DNAs extraídos das amostras dos portadores ativos (>2.000 UI/mL) foram submetidos à amplificação por *nested* PCR, tendo como alvo o gene da polimerase viral, para a avaliação do perfil de resistência. A primeira amplificação foi realizada utilizando reação de 50µL contendo 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05mM dNTPs, 0,25µM dos iniciadores GHBV-1F e GHBV-2R (delimitando um fragmento de 1.225 pb), 1U *Taq* DNA polimerase e 2µL do material extraído. As reações foram realizadas em um termociclador ABI Prism 9700 (Applied Biosystems) com as seguintes condições: desnaturação inicial à 94°C por 3 min, 25 ciclos de 94°C por 15s, 55°C por 30s e 72°C por 120s e extensão final de 72°C por 5 min. A partir destes amplicons foi realizada a amplificação de região interna (*nested* PCR) utilizando iniciadores GHBV-10F e GHBV-11R (delimitando um fragmento de 590 pb). As reações de *nested* PCR apresentavam volume final de 25µL e continham 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05mM dNTPs, 0,5µM de cada iniciador, 1U *Taq* DNA polimerase, e 1µL do material da primeira amplificação. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial à 94°C por 3 min, 40 ciclos de 94°C por 15s, 60°C por 30s e 72°C por 120s e extensão final de 72°C por 5 min. A tabela 1 descreve a sequência dos iniciadores utilizados. Os fragmentos da 2ª amplificação foram sequenciados utilizando o sequenciador automático ABI 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Foram realizadas duas reações de sequenciamento para cada amplicon, utilizando os iniciadores senso e antisense. Os dados do sequenciamento foram coletados utilizando o programa Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) e a análise dos eletroferogramas foi realizada pelo software Sequencing Analysis v.5.3.1 (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos do mesmo amplicon (iniciadores senso e antisense) foram editadas e montadas no programa SeqMan (DNASar, Madison, Wisconsin, USA). As sequências obtidas em cada montagem foram comparadas estabelecendo a sequência final de cada amostra que foram então alinhadas no Programa Megalign (DNASar, Madison, Wisconsin, USA). As mutações que conferem resistência à lamivudina foram identificadas pontualmente nos alinhamentos das sequências de aminoácidos. Foram procuradas as principais alterações de aminoácidos descritas em diferentes estudos recentes (BOTTECCHIA et al., 2008; BHATTACHARYA; THIO, 2010; SCHILDGEN et al., 2010).

**Tabela 1.** Nomes e sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados nas amplificações por *nested* PCR.

| Iniciadores | Sequências                             |
|-------------|--|
| GHBV-1F     | 5' - CASTCATCCWCAGGCMATGCGAGTGGGA - 3' |
| GHBV-2R     | 5' - GGGTTGCGTCAGCAAACTTGGC - 3'       |
| GHBV- 10F   | 5' - CATCCTGCTGCTATGCCATCTTC - 3'      |
| GHBV- 11R   | 5' - ATDCKTTGACADACTTCCARTCAAT - 3'    |

## RESULTADOS

Dos 102 pacientes analisados em nosso estudo, 55 (53,9%) pertenciam ao sexo masculino. A média de idade dos pacientes foi de  $44,9 \pm 12,2$  anos. As características dos sujeitos do estudo são descritas na Tabela 2. Os pacientes apresentaram um tempo médio de diagnóstico de  $6,5 \pm 5,8$  anos. Quanto ao tratamento para o HBV, 25 (24,5%) pacientes estavam fazendo uso de alguma medicação, dentre as quais lamivudina, tenofovir, interferon- $\alpha$  ou lamivudina combinada com adefovir.

**Tabela 2.** Características dos indivíduos com infecção crônica pelo HBV.

| Variável   | Total (n=102)   |
|--|-----------------|
| Idade (média $\pm$ DP)                               | 44,9 $\pm$ 12,2 |
| Sexo masculino                                       | 55 (53,9)       |
| Escolaridade   |                 |
| Até ensino fundamental completo                      | 55 (53,9)       |
| Ensino médio ou superior                             | 47 (46,1)       |
| Tempo de diagnóstico em anos (média $\pm$ DP)        | 6,5 $\pm$ 5,8   |
| Tratamento para o HBV                                | 25 (24,5)       |
| Possível forma de infecção <sup>a</sup>              |                 |
| Sexo   | 16 (15,7)       |
| Transfusão sanguínea                                 | 11 (10,8)       |
| Objetos cortantes                                    | 20 (19,6)       |
| Compartilhamento de seringa                          | 8 (7,8)         |
| Nascimento (transmissão vertical)                    | 16 (15,7)       |
| Outras formas <sup>b</sup>                           | 30 (28,0)       |
| Carga viral (média log <sub>10</sub> UI/mL $\pm$ DP) | 3,0 $\pm$ 1,7   |

Os dados são mostrados como número de pacientes (percentual) ou média  $\pm$  desvio padrão).

HBV: vírus da hepatite B; <sup>a</sup>Resposta múltipla. <sup>b</sup>Outras formas referidas pelos pacientes: dentista, cirurgia, manicure, água e alimentos contaminados.

Do total de pacientes do estudo, 21 eram portadores ativos do HBV ( $>2000$  UI/mL). A partir da amplificação do DNA do HBV obtido do plasma dos pacientes foi realizado o sequenciamento. As características destes pacientes são descritas na Tabela 3. Observou-se que 6 (29%) pacientes estavam em tratamento, fazendo uso de lamivudina, interferon- $\alpha$  ou adefovir. Nenhum dos pacientes apresentou ascite. Dos 21 pacientes portadores ativos, 13 tinham realizado biópsia hepática, dentre estes, 7 (53%) pacientes obtiveram pontuação METAVIR indicativa de ausência de fibrose, 5 pacientes tinham fibrose e 1 paciente tinha cirrose. Com relação

à pontuação METAVIR indicativa de atividade necroinflamatória e necrose hepatocelular, 7 (54%) pacientes apresentaram atividade leve, 4 pacientes apresentaram atividade moderada e 2 pacientes apresentaram atividade grave.

**Tabela 3.** Características dos indivíduos portadores ativos do HBV.

| Variável                  | Total (n=21)       |
|---------------------------|--------------------|
| Idade (média $\pm$ DP)    | 40,9 $\pm$ 13,0    |
| Sexo masculino            | 13 (62%)           |
| Tratamento para o HBV     |                    |
| LAM                       | 2 (10%)            |
| INF- $\alpha$             | 3 (14%)            |
| ADF                       | 1 (5%)             |
| AST (U/L)                 | 35,6 (18 - 71)     |
| ALT (U/L)                 | 59,7 (16 - 167)    |
| Albumina (g/dL)           | 3,96 (2,3 - 4,5)   |
| Creatinina (mg/dL)        | 0,99 (0,6 - 1,6)   |
| TP (INR)                  | 1,01 (0,92 - 1,14) |
| Fibrose (n=13)            |                    |
| 0                         | 7 (53%)            |
| 1                         | 3 (23%)            |
| 2                         | 1 (8%)             |
| 3                         | 1 (8%)             |
| 4                         | 1 (8%)             |
| Atividade hepática (n=13) |                    |
| A0                        | -                  |
| A1                        | 7 (54%)            |
| A2                        | 4 (31%)            |
| A3                        | 2 (15%)            |

Os dados são mostrados como número de pacientes (percentual), média  $\pm$  desvio padrão) ou média (amplitude).

HBV: vírus da hepatite B; LAM: lamivudina; INF- $\alpha$ : interferon alfa; ADF: adefovir; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; TP: tempo de protrombina.

A partir das sequências de aminoácidos obtidas, procurou-se detectar as mutações associadas ao desenvolvimento de resistência à lamivudina (Figura 1). Apenas uma das amostras apresentou a variação no motivo YMDD (M204I). Foi observada substituição na posição do aminoácido 180 (L180M) em duas amostras, sendo uma delas na sequência portadora da mutação no motivo YMDD. Foram observadas outras 28 trocas de aminoácidos em diferentes posições destas sequências, sendo estas variações consideradas neutras, pois não conferem resistência a nenhum medicamento. Um total de 7 pacientes não apresentou nenhuma substituição de aminoácidos em sua sequência.



a resistência à droga (THAI et al., 2012). Nove grandes padrões de mutações associadas com a resistência à lamivudina têm sido relatados: (i) rtM204I; (ii) rtM204I/V + rtL180M, (iii) rtV173L + rtL180M + rtM204V; (iv) rtL80I + rtM204I; (v) rtQ215S + rtM204I/V ± rtL180M; (vi) rt169T + rtV173L + rtL180M + rtM204V; (vii) rtA181T; (viii) rtT184S + rtM204I/V ± rtL180M, e (ix) rtM204S + rtL180M (SAYAN; AKHAN; SENTURK, 2011).

A substituição de aminoácidos no motivo YMDD é geralmente a principal causa de resistência à lamivudina. O motivo YMDD é um domínio conservado de todas as transcriptases reversas (RT), sendo esta enzima necessária para a atividade de síntese (ALLEN et al., 1998). A principal substituição é de uma metionina na posição rt204 por uma valina (rtM204V) ou isoleucina (rtM204I), acompanhado ou não por substituições na posição rt180 e rt173 (BOTTECCHIA et al., 2008).

Em nosso estudo, após análise das sequências de aminoácidos dos HBV obtidos a partir dos 21 pacientes portadores ativos, foi verificada a presença de substituições de aminoácidos relacionadas à resistência aos fármacos utilizados no tratamento da hepatite B. Dentre os pacientes que estavam em tratamento, um paciente (BG-96) do sexo masculino que estava em tratamento apenas com lamivudina desde 2005, apresentou a mutação no motivo YMDD onde houve a substituição do aminoácido metionina pelo aminoácido isoleucina (M204I) acompanhada da substituição do aminoácido leucina pelo aminoácido metionina na posição 180 (L180M). Segundo Bottecchia *et al.* (2008), a presença da mutação rtL180M tem sido associada com o tratamento prolongado com a lamivudina, podendo atuar como uma mutação compensatória que repõe parcialmente a aptidão de replicação do vírus. A mutação acessória L180M também foi verificada na sequência de HBV proveniente do plasma de outro paciente (BG-18) que fazia tratamento, desde 2004, apenas com lamivudina.

A seleção de variantes resistentes à lamivudina pode resultar em maior probabilidade de resistência cruzada com outras drogas (THAI et al., 2012). Segundo Santantonio et al. (2009), o tratamento prévio com lamivudina parece predispor a um desenvolvimento mais rápido da resistência ao adefovir selecionando mutações adicionais na região RT. Em nosso estudo, foi observado que um paciente (BG-43) apresentou mudança de tratamento, utilizando lamivudina de out/2002 a mar/2006, seguido pelo tratamento de lamivudina combinada com adefovir de mai/2006 a

set/2006 e, por fim, tratamento apenas com adefovir. O surgimento de HBV mutante resistente ao adefovir foi observado neste indivíduo, sendo detectada a substituição do aminoácido alanina por valina na posição 181 (A181V). A mutação rtA181V no domínio B do RT está associada com a resistência à lamivudina e ao adefovir (LOCARNINI; MASON, 2006; VILLET et al., 2006; SANTANTONIO et al., 2009).

Segundo Thai et al. (2012), estima-se que devido a elevada taxa de mutações no genoma do HBV, as mutações de resistência aos medicamentos podem estar presentes em pacientes infectados mesmo sem a pressão seletiva das drogas antivirais. Dentre os pacientes de nosso estudo que não estavam em tratamento, foi verificada a substituição do aminoácido glutamina por histidina na posição 215 (Q215H) em um paciente (BG-35) e substituição do aminoácido glutamina por serina na mesma posição (Q215S), em outro paciente (BG107). A mutação Q215S, quando combinada às substituições M204I/V e L180M, geralmente está relacionada à resistência a lamivudina (SAYAN; AKHAN; SENTURK, 2011), além disso, tem sido associada à resistência ao adefovir (SANTANTONIO et al., 2009).

## CONCLUSÃO

As mutações do HBV que desempenham um papel importante na resistência à lamivudina, geralmente localizam-se na posição 204 do gene da polimerase. Essas mutações em conjunto com outras, também conferem resistência a outros análogos de núcleos(t) ídeos. Os dados obtidos a partir deste estudo mostram o surgimento de HBV resistentes com mutações nas posições 204 (M204I), 180 (L180M), 181 (A181V) e 215 (Q215H/S), sendo estas mutações relacionadas com a resistência não só ao tratamento com lamivudina, mas também com a resistência ao adefovir.

Neste sentido, concluímos que monitorar o acúmulo de mutações no genoma do HBV, torna-se de extrema importância para avaliar e guiar o futuro da terapia antiviral nos portadores crônicos do HBV, impedindo o surgimento de resistência às drogas.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 559598/2009-2).

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. I. et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. **Hepatology**, v. 27, n. 6, p. 1670–1677, 1998.
- ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA; CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Hepatite B Crônica: Tratamento. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2009. **Projetos e Diretrizes**, v. 8, n. 34, 2009. Disponível em: <[http://www.projetodiretrizes.org.br/8\\_volume/34-Hepatite.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/8_volume/34-Hepatite.pdf)>. Acesso em: 27 jul. 2012.
- BENTOGONÇALVES. Secretaria Municipal de Saúde. **Relatório Epidemiológico: Hepatites Virais 1998-2009**. 2010. Disponível em: <<http://www.bentogoncalves.rs.gov.br/005/00502001.asp?ttCDCHAVE=37050>>. Acesso em: 01 maio 2011.
- BERTOLINI, D. A. et al. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1295-1304, 2012.
- BHATTACHARYA, D.; THIO, C. L. Review of Hepatitis B Therapeutics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 10, p. 1201–1208, 2010.
- BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BOTTECCHIA, M. et al. Lamivudine resistance and other mutations in the polymerase and surface antigen genes of hepatitis B virus associated with a fatal hepatic failure case. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. 1, p. 67-72, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfeccões**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B virus infection – natural history and clinical consequences. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 11, p. 1118-1129, 2004.
- LIAW, Y. F. The current management of HBV drug resistance. **Journal of Clinical Virology**, v. 34, p. 143-146, 2005.
- LOCARNINI, S.; MASON, W. S. Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 2, p. 422–431, 2006.
- LOK, A. S. et al. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO-
- LiPA HBV DR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3729–3734, 2002.
- \_\_\_\_\_. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterology**, v. 125, n. 6, p. 1714-1722, 2003.
- \_\_\_\_\_. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 254-265, 2007.
- POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and OSIVIRC groups. **Lancet**, v. 349, p. 825-32, 1997.
- SANTANTONIO, T. et al. Adefovir dipivoxil resistance patterns in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. **Antiviral Therapy**, v. 14, n. 4, p. 557-565, 2009.
- SAYAN, M.; AKHAN, S. C.; SENTURK, O. Frequency and mutation patterns of resistance in patients with chronic hepatitis B infection treated with nucleos(t)ide analogs in add-on and switch strategies. **Hepatitis Monthly**, v. 11, n.10, p. 835-842, 2011.
- SCHILDGEN, V. et al. Novel mutation in YMDD motif and direct neighbourhood in a child with chronic HBV-infection and clinical lamivudine and adefovir resistance - a scholarly case. **Virology Journal**, v. 21, n. 7, p. 167, 2010.
- SHAMLIYAN, T. A. et al. Systematic review of the literature on comparative effectiveness of antiviral treatments for chronic hepatitis B infection. **Journal of General Internal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 326–339, 2011.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Consenso sobre condutas nas hepatites virais B e C. **Gastroenterologia e endoscopia digestiva**, v. 24, p. 1-16, 2005.
- STUYVER, L. J. et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. **Hepatology**, v. 33, n. 3, p. 751-757, 2001.
- THAI, H. et al. Convergence and coevolution of hepatitis B virus drug resistance. **Nature Communications**, v. 3, n. 789, p. 1-7, 2012.

VILLET, S. et al. Selection of a multiple drug resistant hepatitis B virus strain in a liver transplanted patient. *Gastroenterology*, v. 131, n. 4, p. 1253-1261, 2006.

WELZEL, T. M. et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 9, p. 3325-3333, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis B**. Fact Sheet n° 204. 2012. Disponível em: <[\[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en\]\(http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en\)>. Acesso em: 03 ago. 2012.](http://</a></p></div><div data-bbox=)

WRIGHT, T. L. Clinical trial results and treatment resistance with lamivudine in hepatitis B. *Seminars in Liver Disease*, v. 24, p. 31-36, 2004.

ZOULIM, F; LOCARNINI, S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*, v. 137, n. 5, p. 1593-1608, 2009.