



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

JESSICA SABRINA CORDEIRO PARENTE

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO NA REGIÃO
PROMOTORA DE *TNF-308 (G>A)* (RS1800629) COM MARCADORES
HEPÁTICOS EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO
VÍRUS DA HEPATITE B (VHB).**

BELÉM
2017

JESSICA SABRINA CORDEIRO PARENTE

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO NA REGIÃO
PROMOTORA DE *TNF-308 (G>A)* (RS1800629) COM MARCADORES
HEPÁTICOS EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO
VÍRUS DA HEPATITE B (VHB).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador(a): Msc. Bárbara Brasil Santana

BELÉM

2017

JESSICA SABRINA CORDEIRO PARENTE

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO NA REGIÃO
PROMOTORA DE *TNF-308 (G>A)* (RS1800629) COM MARCADORES
HEPÁTICOS EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO
VÍRUS DA HEPATITE B (VHB).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, aprovado com o conceito EXCELENTE.

Belém (PA), 10 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:

Msc. Bárbara Brasil Santana (Orientadora) - UFPA

Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto (Co-orientador) - UFPA

Dra. Maria Alice Freitas Queroz (membro) - UFPA

Dra. Ednelza da Silva Graças Amoras (membro) - UFPA

Msc. Samara Tatielle Monteiro Gomes (suplente) – UFPA

À minha família, meu alicerce

Agradecimentos

A Deus, pela luz, força e coragem concedidas durante a jornada.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto, por ter me aceito de braços abertos em seu laboratório, pelo apoio e inspiração para a pesquisa e para a virologia.

A minha orientadora Bárbara Brasil Santana, pela correção minuciosa do trabalho, pela sua disponibilidade, orientação, dedicação, confiança e amizade. Espero um dia ser uma profissional como você.

Aos parceiros e amigos do Laboratório de Virologia, em especial à Angélica Menezes, fundamental na concretização deste trabalho, Lorena Lima, por ter me apresentando este campo da pesquisa tão incrível, e a todos os outros igualmente especiais, pelo conhecimento compartilhado, companheirismo e amizade.

Aos amigos da faculdade, pelos longos anos de convívio, por todos os momentos compartilhados, por estarem presentes e me fazer estar presente, longe ou perto. Pelos risos, pelas lágrimas, pelo apoio, muito obrigada.

Aos meus avós, Francisco e Beatriz, por me ensinarem a ter fé, e nunca desistir. Por estarem do meu lado em cada momento, pelo amor incondicional, pelo apoio e motivação diária.

A minha mãe, Cleuma Cordeiro, e minhas irmãs Raissa e Maria Luiza, por todo o amor, compreensão e cuidado, por recarregarem minhas energias, e por acreditarem que seria possível.

A todos que ajudaram a traçar esta caminhada.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS DA HEPATITE.....	1
1.1.1 Genoma doVHB.....	2
1.1.2 Replicação do VHB	3
1.1.3 Patologia da infecção pelo VHB	4
1.1.4 Diagnóstico laboratorial do VHB	5
1.1.5 Epidemiologia do VHB	5
1.2 RESPOSTA IMUNE AO VHB	6
1.2.1 Fator De Necrose Tumoral (TNF-α)	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	93.
ARTIGO ANEXADO	10
4. REFERÊNCIAS	19
5. NORMAS DA REVISTA	28

RESUMO

A hepatite B crônica é caracterizada por uma intensa inflamação hepática, com manifestações clínicas, que podem variar entre seus portadores, como resultado de diversos fatores que influenciam o curso da infecção, tais como polimorfismos nos genes de citocinas. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) tem um papel fundamental no processo inflamatório que ocorre em quadros infecciosos. Quando presente em altos níveis está relacionado com a gravidade de inflamação hepática. O presente trabalho investigou a associação do polimorfismo rs1800629 (G>A) no gene do *TNF- α* na infecção crônica pelo *Vírus da hepatite B* (VHB). Foram selecionados 73 casos de hepatite crônica, sendo divididos em portadores ativos (41 casos) e portadores inativos (32 casos). Como grupo controle, selecionaram-se 300 amostras de doadores voluntários de sangue do HEMOPA (Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará), soronegativos para o VHB. O DNA extraído a partir de células do sangue total periférico de cada amostra, foi submetido a técnica de PCR em tempo (qPCR), para identificação do perfil genético. Não foi observada diferença significativa nas frequências genotípicas e alélicas entre os grupos infectados e controle. A análise de associação do polimorfismo com os marcadores bioquímicos apresentou significância nos níveis de ALT, AST em portadores ativos com o genótipo GG, quando comparado com portadores inativos. No que diz respeito a viremia, os portadores ativos quando segmentados em dois grupos, genótipo GG e GG+GA, ambos os grupos apresentaram carga viral mais elevada quando comparado com portadores inativos. Neste estudo, não foi possível evidenciar a influência do polimorfismo estudado, nos diferentes quadros clínicos da infecção crônica pelo VHB. Estudos adicionais com enfoque na inflamação, podem contribuir para uma melhor compreensão da influência do polimorfismo genético de citocinas na infecção pelo VHB.

Palavras-chave: VHB, TNF- α , polimorfismo, rs1800629.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

As hepatites virais constituem um grave problema de saúde pública da atualidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS – estima-se que haja cerca de 350 milhões de portadores crônicos do *Vírus da hepatite B* (Lavanchy, 2004; Alter, 2003).

A evolução para a infecção crônica está ligada às interações vírus – hospedeiro, gerando uma importante resposta imunitária causada pelas proteínas virais expressas pelos hepatócitos infectados e, em menor grau, pelos efeitos citopáticos do vírus, sendo possível determinar através dessa resposta os diferentes padrões de manifestações e sintomas das infecções (Pungpapong *et al.*, 2007).

1.1 CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS DA HEPATITE B

O VHB é um membro da família *Hepadnaviridae*. A separação da família ocorre em dois gêneros: *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus*, representando os vírus que infectam os mamíferos e as aves, respectivamente (ICTV, 2014; Ganem & Schneider, 2001).

A partícula viral completa (Figura 1) apresenta-se como uma partícula esférica com 42 nm de diâmetro, possui um envelope lipoprotéico, o qual compreende o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), formado pelas glicoproteínas denominadas Grande (L), Média (M) e Pequena (S) e uma estrutura interna de formato icosaédrico, dita core ou nucleocapsídeo, contendo o antígeno nuclear da hepatite B (HBcAg) e o antígeno E (HBeAg), além da proteína DNA polimerase, e o genoma viral (Seeger & Mason, 2000; Summers *et al.*, 1975).

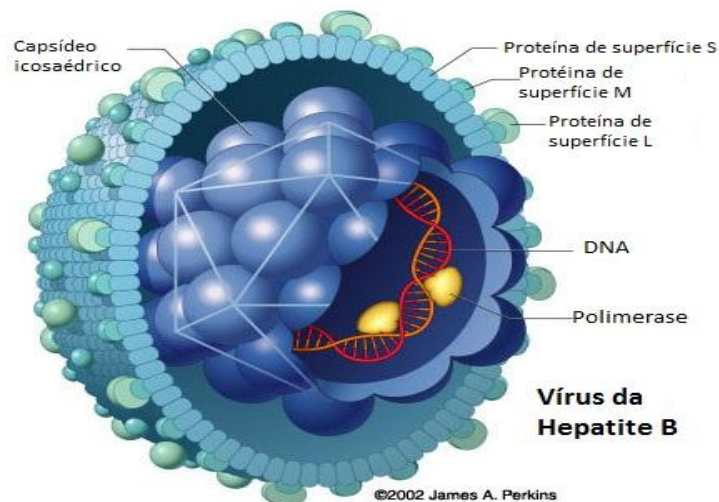


Figura 1. Partícula completa do VHB (Fonte: Perkins, 2002).

1.1.2. Patologia da infecção pelo VHB

A infecção aguda do VHB caracteriza-se pela detecção do DNA, e do HBsAg no soro, esses marcadores iniciais aparecem de 4 a 6 semanas depois da infecção e de 1 a 6 semanas antes das manifestações clínicas, os anticorpos IgM contra o antígeno do core (anti-HBc) aparecem em seguida (Ganem & Prince, 2004).

Em pacientes que conseguiram eliminar o vírus, os anticorpos livres anti-HBs e anti-HBe são detectáveis na circulação, seguida do desaparecimento dos antígenos virais HBsAg e HBeAg, caracterizando a resolução da infecção. Os componentes da resposta imune celular e humoral são necessários para que ocorra a eliminação (McMahon, 2009).

O paciente passa a ser considerado um portador crônico quando os antígenos virais permanecem por mais de seis meses, sem normalização dos testes bioquímicos hepáticos. O curso natural da hepatite B crônica é distinto em três fases resultantes da interação entre o vírus e o hospedeiro. A fase de imunotolerância ao vírus ocorre principalmente, após o período de transmissão perinatal, sendo caracterizado pela detecção de HbsAg e do HBeAg, além de altos níveis de carga viral, e níveis normais de transaminases como a alanino aminotransferase (ALT) (McMahon, 2009).

A fase imunoativa é marcada pela resposta imune do hospedeiro contra os antígenos virais em uma tentativa de eliminar a infecção. Com uma intensa resposta inflamatória e dano hepático, os níveis de ALT e carga viral aumentam, juntamente com a presença de HBeAg no soro. A soroconversão do HBeAg à anti-Hbe é o que identifica a fase de portador inativo, onde há supressão da replicação e redução da carga viral com normalização das transaminases, esses portadores apresentam um baixo risco de evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular. Alguns indivíduos permanecem como portador ativo, com persistência do HBeAg e constante dano hepático, e outros, que evoluíram para a fase inativa, podem apresentar retorno da positividade do HBeAg ou anti-HBe com quadros inflamatórios, e replicação viral (Hsu *et al.*, 2002).

1.1.3. Resposta imune ao VHB

A resposta imune aos antígenos do VHB, é controlada tanto pela sistema inato quanto pelo adaptativo. A montagem das primeiras respostas é realizada pela produção de interferon (INF) tipo 1, α / β , pelas células infectadas, e a ativação de células *natural killers* (NK), e células T *natural killers* (NKT) (Bertoletti & Gerhing, 2006). O reconhecimento dos vírus por receptores específicos, ativa essa primeira linha de defesa, produzindo importantes citocinas envolvidas no estado antiviral, como o interferon do tipo 1 (IFN α/β), que possui importante

papel na apresentação de antígenos às células efectoras. As células NK e NKT estão envolvidas na inibição e expressão da replicação viral, juntamente com $\text{INF-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$ realizando um efeito antiviral, sem destruição do hepatócito (Guidotti *et al.*, 1999).

Após o controle da infecção realizado pela resposta inata, o vírus deve ser eliminado, para evitar a propagação da infecção. A eliminação da infecção inicia-se com a ativação da resposta imune adaptativa, através do recrutamento dos linfócitos T CD4+ (LTCD4+), que em seguida irão ativar os linfócitos T CD8+ (LTCD8+) e linfócitos B (Guidotti *et al.*, 1999).

Os LTCD8+ quando ativados, atuam na eliminação viral, diminuindo os níveis de vírus circulantes, por vias citolíticas e não citolíticas, ativando a via citolítica para a apoptose dos hepatócitos e eliminação do restante da população viral (Guidotti *et al.*, 1999; Baumert *et al.*, 2007).

1.2. FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF-A)

O fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) é considerado uma das principais citocinas pro-inflamatórias da imunidade inata. Executa as funções do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de atuar sobre as células do endotélio vascular e leucócitos, promovendo um processo inflamatório local para o combate a quadros infecciosos. (Abbas *et al.*, 2008). Durante a hepatite B, esta citocina participa no clareamento viral na fase aguda, já na infecção crônica, a deficiência imunológica do hospedeiro juntamente com os mecanismos de escape viral, altera a produção e ação do $\text{TNF-}\alpha$ nesta patologia. (Larrubia *et al.*, 2009)

O TNF é secretado por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos. O gene do $\text{TNF-}\alpha$ localiza-se no cromossomo 6, na região 6p21.3, dentro da região de classe III do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Esta é uma região altamente polimórfica, e o próprio $\text{TNF-}\alpha$ possui um grande número de polimorfismos (Posch *et al.*, 2003).

A mutação na posição -308 G>A (rs1800629) da região promotora, que resulta no mutante heterozigoto GA ou homozigoto AA, é uma das mais investigadas (Kroeger *et al.*, 1997). A cronicidade da hepatite B, assim como à severidade da doença, já foram associadas ao genótipo GA deste polimorfismo, assim como à expressão elevada do $\text{TNF-}\alpha$, e um consequente aumento da atividade pró-inflamatória (Costa *et al.*, 2015; Conde *et al.*, 2013). Outros autores, relataram uma alta frequência do genótipo GG em pacientes com infecção crônica, associado com a positividade do HBeAg (Kim *et al.*, 2003).

Revista: Viruses

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DE *TNF-308*
(G>A)(rs1800629) COM MARCADORES HEPÁTICOS EM PACIENTES COM INFECÇÃO
CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE B (VHB).**

Jessica Sabrina Cordeiro Parente^{1,*}, Angélica Menezes Santiago¹, Ednelza da Silva Graças Amoras¹,
Antônio Carlos Rosário Vallinoto ¹, Bárbara Brasil Santana¹.

¹ *Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Virologia, 66075-900 Belém,*

PA, Brasil

* Correspondência: sabrinacparent@gmail.com; Tel.: +55 91 980958244

Resumo

A hepatite B crônica possui manifestações clínicas, que variam entre seus portadores, como resultado de diversos fatores que influenciam o curso da infecção, tais como polimorfismos no genes de citocinas. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) tem um papel fundamental no processo inflamatório de quadros infecciosos. O presente trabalho investigou a associação do polimorfismo rs1800629 (G>A) no gene do TNF- α na infecção crônica pelo vírus da hepatite B (VHB). Foram selecionados 73 casos de hepatite crônica, divididos em portadores ativos (41 casos) e inativos (32 casos). Como grupo controle, selecionaram-se 300 amostras de doadores de sangue, soronegativos para o VHB. O DNA extraído a partir de células do sangue total periférico, foi submetido a técnica de PCR em tempo (qPCR), para identificação do perfil genético. Não foi observada diferença significativa nas frequências genotípicas e alélicas entre o grupo infectado e controle. Nos marcadores bioquímicos, os níveis de ALT e AST apresentaram significância em portadores ativos com o genótipo GG. No que diz respeito a viremia, os portadores ativos com genótipo GG e GG+GA, apresentaram carga viral mais elevada comparado à portadores inativos. Neste estudo, não foi possível evidenciar a influência do polimorfismo estudado, nos diferentes quadros clínicos da infecção crônica pelo VHB. Estudos adicionais com enfoque na inflamação, podem contribuir para uma melhor compreensão da influência do polimorfismo genético de citocinas na infecção pelo VHB.

Palavras-chave: VHB; TNF- α ; polimorfismo; rs1800629.

1. Introdução

A infecção pelo *Vírus da hepatite B* (VHB) constitui um problema de saúde pública, com aproximadamente 350 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. As diversas formas em que esta infecção apresenta-se variam desde uma doença aguda autolimitada até uma forma grave, com um quadro de hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma celular. Diferenças genéticas e imunológicas nos indivíduos portadores contribuem para a diversidade nas respostas e eliminação dos vírus [1,2]

Fatores do hospedeiro como a idade, sexo e coinfeção com HIV, influenciam na progressão para hepatite crônica na infecção pelo VHB, juntamente com fatores ambientais e relacionados ao vírus. Uma resposta imune adequada é um dos principais fatores envolvidos no controle e resolução da infecção [3]

A resposta imune é acompanhada de elevados níveis de ALT e carga viral, além da presença de HBeAg, caracterizando um estado de portador ativo da infecção crônica por VHB. Outros pacientes apresentam a diminuição da carga viral, com níveis normais de ALT e presença do anti-HBe, categorizados como portadores inativos. A resposta que o paciente apresenta, pode levar a resolução ou persistência viral [4]

Células da imunidade inata são responsáveis pela produção de citocinas antivirais, no início da resposta imunológica. O aumento dos níveis do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), uma das principais citocinas pró-inflamatórias, é reconhecido como componente da primeira linha de defesa mediada pelas próprias células infectadas. Quando o controle da infecção é realizado com sucesso, linfócitos T são recrutados para eliminação do vírus e resolução da doença [6,7]

Altos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , está correlacionado com a gravidade da inflamação hepática, fibrose, lesão tecidual, indicando um estado de portador crônico [8]. Já foi demonstrado que fatores genéticos influenciam a produção de citocinas por células do sistema imune [9]. A variabilidade genética na região promotora de genes das citocinas, com enfoque na identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's), vem sendo extensamente estudado [10]. Estes polimorfismos vêm sendo associados à gravidade da doença hepática em pacientes com hepatite viral. Estudos sugerem uma ligação entre o clareamento ou suscetibilidade da infecção crônica por VHB e a mutação na posição -308 G>A (rs1800629) da região promotora de TNF- α [11,12]. Para avaliar a associação entre o polimorfismo rs1800629 (G>A) e a infecção por VHB, este estudo objetivou investigar a prevalência desse polimorfismo em portadores crônicos e em controles sorologicamente negativos para esta infecção residentes na cidade de Belém, capital do estado do Pará, no norte do Brasil.

2. Material e Métodos

2.1. Caracterização das amostras

Amostras de sangue foram coletadas de 73 portadores crônicos de VHB no ambulatório de doenças hepáticas do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), de junho de 2012 a outubro de 2012. Indivíduos de ambos os gêneros, com idade igual ou superior a 18 anos, portadores de HBsAg por mais de 6 meses e VHB-RNA positivo, persistência de alaminotransferases elevadas ou não, participaram do estudo.

Foram excluídos do estudo os indivíduos que não satisfaziam esses critérios e / ou estavam coinfectados com o Vírus da hepatite D (VHD) e / ou o Vírus da imunodeficiência humana (HIV) e os pacientes que utilizaram ou estavam usando terapia antiviral específica contra o VHB. Os pacientes também foram submetidos à investigação complementar com exames clínicos e laboratoriais, incluindo bioquímicos, sorológicos, virológicos, ultrassonográficos e endoscópicos, de biópsia hepática. Todos os participantes foram orientados dos objetivos do estudo, e aqueles que concordaram em participar voluntariamente assinaram um Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Pará e da Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCMPA), sob o número 902. 537.

Para a genotipagem, um grupo de 300 indivíduos composto por amostras de sangue de doadores voluntários da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA) que foram soronegativos para VHB, foram utilizados como controle.

2.2. Coleta de Amostra e Análise Genética

As amostras de sangue foram coletadas em tubos a vácuo com ácido anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA), o plasma foi separado da massa celular por centrifugação e foram realizados exames bioquímicos e sorológicos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital João de Barros Barreto (HUJBB).

O DNA foi extraído a partir de células da massa celular das amostras, de acordo com o protocolo de Cigliero, et al. (2011). O procedimento incluiu a lise celular, precipitação de proteínas, precipitação do DNA e hidratação do DNA. O DNA extraído foi submetido a ensaios quantitativos de reação em cadeia mediada pela polimerase em tempo real (qPCR), utilizando o equipamento StepOne PLUS Sequence Detector (Thermofisher, Foster City, CA, E.U.A.). O ensaio utilizado para o polimorfismo rs1800629 (G>A) do gene TNF- α incluiu um par de iniciadores e um de sondas, o mesmo foi pré-desenhado pela empresa Thermofisher, com a identificação C_7514879_10. O alelo A foi marcado com VIC e o alelo G com FAM. Cada reação incluiu 7,0 μ L de H₂O, 10 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix [2X], 1,0 μ L de TaqMan® Assay [20X], e 2 μ L de DNA em um volume final de 20 μ L. As seguintes ciclagens de temperatura foram utilizadas: 60 °C por 30 segundos, seguido de 95 °C por 10 minutos, e 50 ciclos das de 92 °C por 30 segundos e 60 °C por 1 minuto e 30 segundos.

2.3. Análise Estatística

As análises comparativas das frequências genotípicas e alélicas entre as amostras foram realizadas através do teste G.O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado. Na análise comparativa dos marcadores bioquímicos e virológicos com os grupos utilizados, utilizamos o Teste-T de Student. As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism v7.0, adotando como nível significativo $p < 0,05$.

3. Resultados

O grupo de estudo com 73 portadores crônicos de VHB, foi composto de 45 homens e 28 mulheres com idade média de 48 anos. Outro grupo com 300 indivíduos doadores voluntários de sangue, utilizados como controles, foi composto de 150 homens e 150 mulheres, com idade média de 40 anos.

A partir do grupo de portadores crônicos, 32 foram diagnosticados como portadores inativos e 41 como portadores ativos. Exames de transaminases, carga viral e detecção de HBeAg, e AntiHBe foram utilizados para realizar a distinção entre os dois grupos.

Não houve diferença entre o grupo de portadores crônicos do VHB e o grupo controle no que diz respeito à distribuição do polimorfismo rs1800629 (G>A) (Tabela 1), assim como entre os portadores ativos e inativos (Tabela 2)

Tabela 1 - Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -308 (G>A) rs1800629 do gene *TNF- α* , nas amostras de pacientes infectados com Hepatite B crônica e Grupo Controle.

Perfil Genético	VHB	GC	<i>p</i>
	(n=73) n (%)	(n=300) n (%)	
Genótipos			
GG	57 (78,1)	222 (74,0)	
GA	15 (20,5)	69 (23,0)	0,6155*
AA	1 (1,4)	9 (3,0)	
Alelos			
G	0,8836	0,8550	0,3716
*A	0,1164	0,1450	

VHB: Portadores de Hepatite B crônica; GC: Grupo Controle; * alelos analisados. *Teste de Qui-quadrado.

Tabela 2 – Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -308 (G>A) rs1800629 do gene *TNF- α* , nas amostras de pacientes infectados com Hepatite B crônica divididos em portadores ativos e inativos.

Perfil Alélico e Genotípico	VHB		<i>p</i>
	P.A.	P.I.	
	n (%)	n (%)	
TNF-α rs1800629 (G>A)			
GG	20 (73,2)	27 (84,4)	
GA	11 (26,8)	4 (12,5)	0,0546*
AA	0 (00,0)	1 (3,1)	
*G	0,8659	0,9063	
A	0,1341	0,0938	0,6046

VHB: Portadores de Hepatite B crônica; P.A.: Portadores ativos; P.I.: Portadores inativos; *p*: P.A. vs P.I.; *: alelos analisados; *:Teste de Qui-Quadrado.

As quantificações dos marcadores bioquímicos ALT, AST e GGT e carga viral presentes nos portadores ativos e inativos de VHB, estão resumidas nas figuras 1A-D, respectivamente. Estes marcadores foram, do ponto de vista estatístico, significativamente maiores no grupo de portadores ativos, do que em portadores inativos.

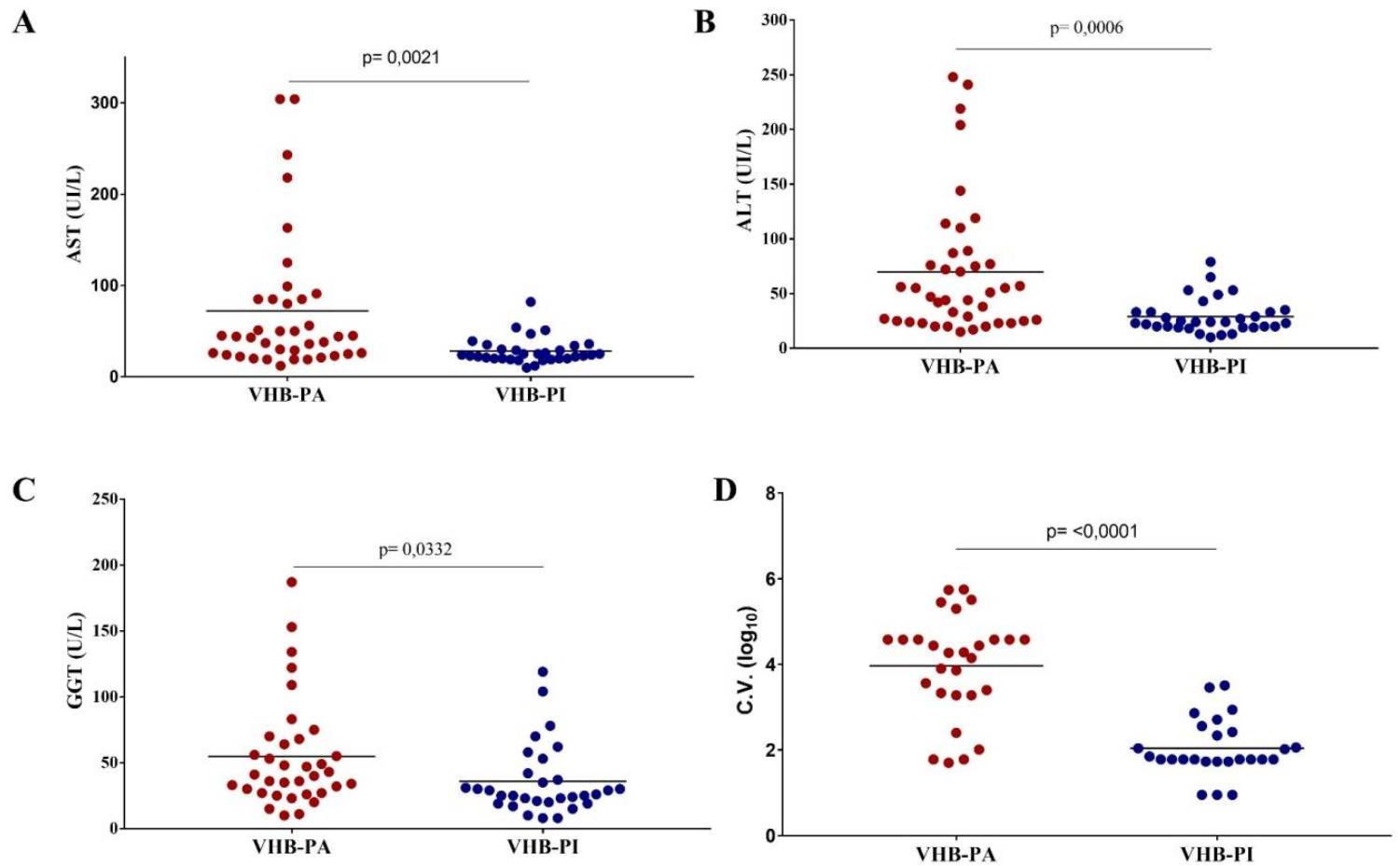


Figura 1. A. Níveis de ALT; B. AST; C.GG, D. Carga Viral (C.V) em portadores ativos e inativos de VHB. VHB: Portadores de Hepatite B crônica; P.A.: Portadores ativos; P.I.: Portadores inativos; p: P.A. vs P.I.; ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. GGT: gama glutamil. Teste T de Student.

A análise da associação dos resultados de testes bioquímicos, da viremia com os genótipos do $\text{TNF-}\alpha$ -308G>A, estão representados na Figura 2.A-D. Os níveis de AST e ALT nos portadores ativos com genótipo GG, foram significativamente maiores que nos portadores inativos com genótipo GG. A carga viral apresentou níveis significativamente maiores em portadores ativos com genótipo GG do que portadores inativos com o mesmo genótipo e o mesmo foi observado no que diz respeito aos alelos GA+AA. O resultado de GGT, não apresentou significância

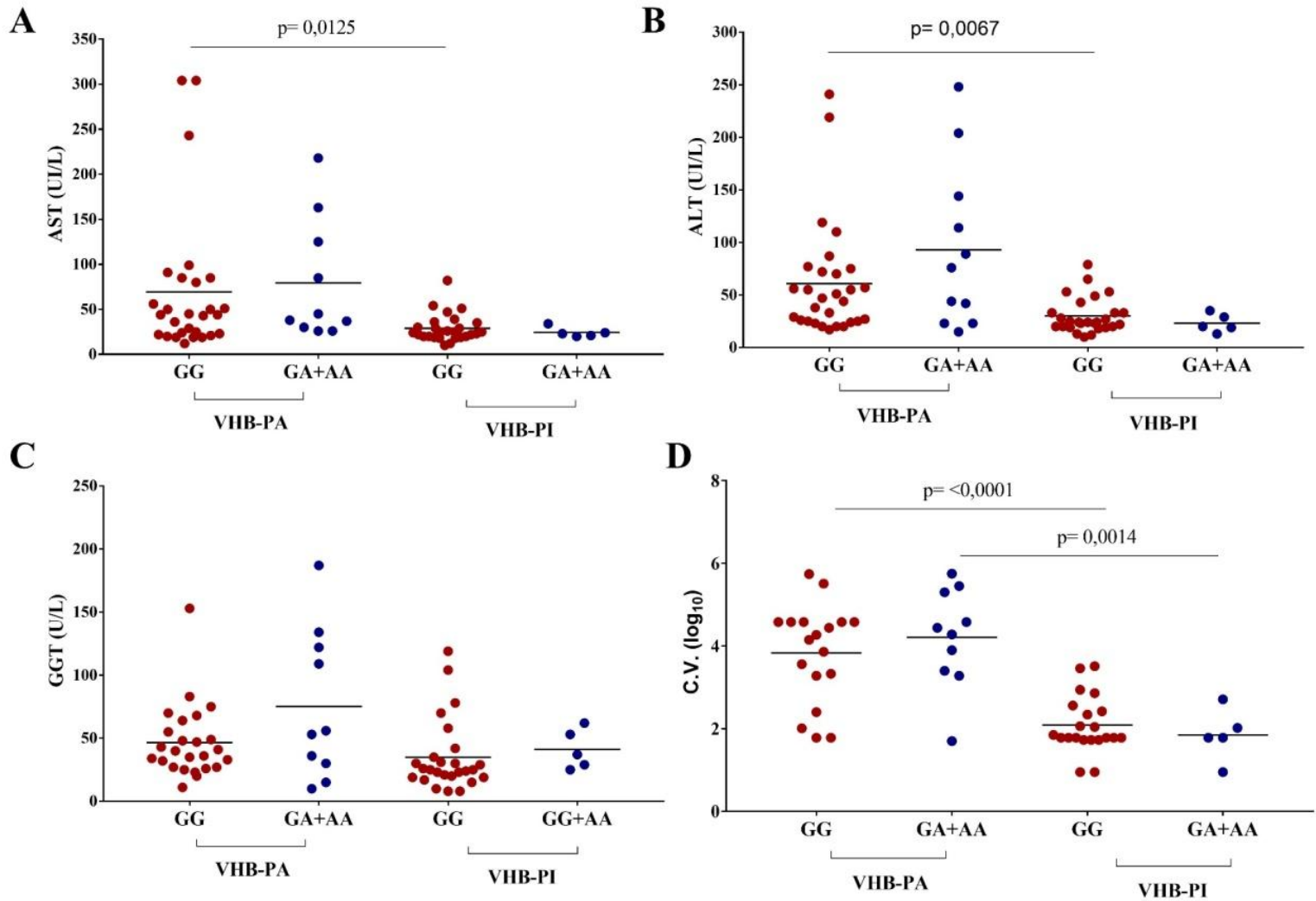


Figura 2. A. Correlação de ALT; B. AST; C.GG, D. Carga Viral (C.V) com os genótipos de portadores ativos e inativos de VHB. VHB: Portadores de Hepatite B crônica; P.A.: Portadores ativos; P.I.: Portadores inativos; p: P.A. vs P.I.; ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. GGT: gama glutamil. Teste T de Student.

4. Discussão

A progressão da infecção por VHB para um estado crônico depende de fatores relacionados ao hospedeiro e ao vírus. As transaminases são indicadores de dano hepático no paciente, e auxiliam no monitoramento da hepatite B, e sua evolução para a forma crônica da doença [12, 13]. No que diz respeito ao vírus, determinantes como, o nível de DNA viral circulante, seu genótipo, e possíveis mutações, estão relacionados não só a cronicidade, mas também ao desenvolvimento de hepatocarcinoma celular e cirrose [14, 15].

Os critérios para o reconhecimento de um estado ativo ou inativo da infecção, já são bem estabelecidos pela literatura, e possuem extrema importância para a definição de intervenções e tratamentos. A fase imunológica ativa inicia-se a partir do reconhecimento do vírus como um corpo estranho, sendo caracterizada por altos níveis de transaminases e carga viral [16]. A dosagem da carga viral é um exame essencial para esta distinção, além de ser utilizado na avaliação de eficácia do tratamento, utilizado nos pacientes infectados por VHB [17]. Nossos dados iniciais corroboram com dados já apresentados na literatura, com portadores ativos apresentando elevações nos exames bioquímicos e viremia [16, 18]. Pesquisas relatam, a elevação de níveis de ALT e DNA do VHB em concomitância com achados de doença hepática ativa em biópsia. Daina C., ao analisar os valores séricos de AST e ALT em pacientes com hepatite B e C crônicas, encontrou níveis significativamente mais elevados em relação ao grau de fibrose, sugerindo um papel para os marcadores bioquímicos, no monitoramento do tratamento da infecção pelo VHB [19].

Citocinas participam ativamente na infecção crônica pelo VHB, inibindo a replicação viral [20]. O TNF- α é uma das principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas neste processo. Sua produção na hepatite B, está relacionada com o clearance viral [21]. Estudos *in vivo* demonstram que o TNF- α , pode limitar a infecção crônica através da desestabilização dos nucleocapsídeos de VHB [22].

Polimorfismos na região promotora do gene de TNF- α estão relacionados a alteração dos níveis de produção desta citocina. O polimorfismo do gene do TNF na posição -308 G>A é um dos mais estudados [23]. Na hepatite B, este polimorfismo já foi descrito como um possível fator de risco para a persistência da infecção e o desenvolvimento de um estado crônico. Autores relatam que este polimorfismo é um fator de risco para o hepatocarcinoma celular, associado com fibrose e dano hepático severo [24].

O presente estudo não encontrou aumento significativo na avaliação da distribuição genotípica e alélica do polimorfismo TNF- α -308 G>A entre pacientes crônicos pelo VHB e controles, e entre portadores ativos e inativos. Conde et. al observou uma distribuição semelhante do polimorfismo entre pacientes portadores de hepatite B crônica e controles [25]. Na população iraniana, o polimorfismo foi comumente encontrado, mas não associado com a infecção crônica por VHB [26]. Saxena et. al, ao comparar os genótipos de diferentes grupos não encontrou diferença significativa entre portadores ativos e inativos, em concordância com nossos resultados [27].

Na correlação dos marcadores bioquímicos com os genótipos, nossos resultados indicaram que o TNF- α 308 G>G pode estar associado a níveis elevados de ALT e AST em portadores ativos. A viremia apresentou níveis elevados nos portadores ativos, independente do genótipo, quando comparado com portadores inativos.

A elevação da viremia e transaminases são marcadores de dano hepático, e característico do estágio imunoativo na infecção por VHB, elucidando desta forma, o resultado significativo apenas em portadores ativos [28]. A associação entre os genótipos e níveis de transaminases em portadores

crônicos de VHB, apresenta resultados escassos na literatura. Jeng observou níveis significativos de ALT, em uma população do Taiwan, apenas na presença do alelo A [24]. Por outro lado, pesquisas em diferentes regiões geográficas do mundo, associaram a frequência do genótipo GG com infecção crônica persistente e desenvolvimento de doença hepática terminal [29, 30, 31].

Neste estudo, não foi possível evidenciar a influência do polimorfismo estudado, nos diferentes quadros clínicos da infecção crônica pelo VHB. Uma avaliação do quadro inflamatório, com possíveis alterações histológicas em um número satisfatório de pacientes crônicos, pode permitir uma definição mais precisa da influência do polimorfismo genético na evolução da infecção.

Agradecimentos: A todos os indivíduos envolvidos no estudo. Este trabalho foi apoiado por doações do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflitos de Interesse: “Os autores declaram não haver conflitos de interesse.”

5. Referências

1. Lavanchy, D. Chronic Viral Hepatitis As A Public Health Issue In The World. *Gastroenterol.* 2008. 22(6):991-1008.
2. Alter, M. J. Epidemiology And Prevention Of Hepatitis B Virus Infections. *Seminars In Liver Disease.* 2003. 23(1): 39-46.
3. Pungpapong, S.; Kim, R.W.; Poterucha, J.J. Natural History Of Hepatitis B Virus Infection: An Update For Clinicians. *Mayo Clinic Proceedings.* 2007. 82 (8): 967-975.
4. Ganem, D.; Prince, A. M. Mechanisms Of Disease: Hepatitis B Virus Infection – Natural History And Clinical Consequences. *The New England Journal Of Medicine.* 2004. V.350, N.11, P.1118-1129.
5. Thimme, R; Wieland, S; Steiger, C; Ghayeb, J; Reimann, K.A; Pucell, R.H; Chisari, F.V. Cd8+ T Cells Mediate Viral Clearance And Disease Pathogenesis During Acute Hepatitis B Virus Infection. *Journal Of Virology.* 2003. V.77, N.1, P.68-76.
6. Guidotti, L.G; Rochford, R; Chung, J; Shapiro, M; Purcell, R; Chisari, F.V. Viral Clearance Without Destruction Of Infected Cells During Acute Vhb Infection. *Science.* 1999. V.284, P.825-829.
7. Baumert, T.F; Thimme, R.; Weizsäcker, F. Pathogenesis Of Hepatitis B Virus Infection. *World Journal Of Gastroenterology.* 2007. V.13, N.1, P.82-90.
8. Larrubia Jr, Benito-Martínez S, Miquel-Plaza J, Sanz-De-Villalobos E, González-Mateos F, Parra T. Cytokines – Their Pathogenic And Therapeutic Role In Chronic Viral Hepatitis. *Revista Española De Enfermedades Digestivas.* 2009. 101(5):343-51.
9. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour Necrosis Factor (Tnf) Gene Polymorphism Influences Tnf-Alpha Production In Lipopolysaccharide (Lps)-Stimulated Whole Blood Cell Culture In Healthy Humans. *Clin Exp Immunol.* 1998. 113(3):401-6.
10. Kroeger, K. M.; Carville, K. S.; Abraham, L. J. The -308 Tumor Necrosis Factor Alpha Promoter Polymorphism Effects Transcription. *Molecular Immunology.* 1997. V.34, P.391- 399.
11. 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 Inf-Y Alleles And Genotypes Are Associated With Susceptibility To Chronic Hepatitis B Infection And Severity Of Liver Injury. *J Med Virol.* 2015. 87 (10): 1689-96.
12. Wroblewski, F. The Clinical Significance Of Transaminase Activities Of Serum. *Am J Med.* 1959. 27:911-23.
13. Lai, M.; Hyatt, B.J.; Nasser, I.; Curry, M.; Afdhal N. The Clinical Significance Of Persistently Normal Alt In Chronic Hepatitis B Infection. *J Hepatol.* 2007 Dec;47(6):760-7.
14. Mommeja-Marin, H.; Mondou, E.; Robert B.M.; Rousseau, F. Serum Hbv Dna As A Marker Of Efficacy During Therapy For Chronic Hbv Infection: Analysis And Review Of The Literature. *Hepatology.* 2003.37:1309-1319.
15. Lindh, M.; Horal, P.; Dhillon, A. P.; Norkrans, G. Hepatitis B Virus Dna Levels, Precore Mutations, Genotypes And Histological Activity In Chronic Hepatitis B. *Journal Of Viral Hepatitis.* 2000. 7, 258–267.
16. McMahon, B. J. The Natural History Of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology.* 2009. 49: 45–55.
17. Alberti, A. Can Serum Hbv-Dna Be Used As A Primary End Point To Assess Efficacy Of New Treatments For Chronic Hepatitis B? *Hepatology.* 2003. 38:18-20.
18. Shi, Y. H.; Shi C. H. Molecular Characteristics And Stages Of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *World J Gastroenterol.* 2009. 5(25):3099-105.
19. C. Daina. Correlation Between The Serum Levels Of Transaminases And The Fibrose Stage Of The Liver In Chronic Hepatitis. *Acta Medica Transilvanica.* 2010. 2(3)247-249.
20. Guidotti, L.G; Rochford, R; Chung, J; Shapiro, M; Purcell, R; Chisari, F.V. Viral Clearance Without Destruction Of Infected Cells During Acute Vhb Infection. *Science.* 1999. V.284, P.825-829.
21. Koziel, M. J. Cytokines In Viral Hepatitis. *Semin Liver Dis.* 1999. 19(2):157-69.
22. Puro, R.; Schneider, R. J. Tumor Necrosis Factor Activates A Conserved Innate Antiviral Response To Hepatitis B Virus That Destabilizes Nucleocapsids And Reduces Nuclear Viral Dna. *J Virol.* 2007. 81(14):7351-62.

23. Kroeger, K. M.; Carville, K. S.; Abraham, L. J. The -308 Tumor Necrosis Fator Alpha Promoter Polymorphism Effects Transcription. *Molecular Immunology*. 1997. V.34, P.391- 399.
24. Chien-Jen, C.; Hwai-I, Y.; Jun, S.; Chin-Lan, J.; San-Lin, Y.; Sheng-Nan, L.; Guan-Tarn H.; Uchenna H. I. Risk Of Hepatocellular Carcinoma Across A Biological Gradient Of Serum Hepatitis B Virus Dna Level. *Jama*. 2006. 295:65-73.
25. Conde S.R.; Feitosa R.N. Association Of Cytokine Gene Polymorphisms And Sérum Concentrations With The Outcome Of Chronic Hepatitis B. *Cytokine*. 2013. 61(3):940-4.
26. Somi, M. H.; Najafi, L.; Noori, B. N.; Alizadeh, A. H.; Aghah, M. R.; Shavakhi, A.; Ehsani, M. J.; Aghazadeh, R.; Masoodi, M.; Amini, S.; Baladast, M.; Zali, M. R. Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Promoter Polymorphism In Iranian Patients With Chronic Hepatitis B. *Indian J Gastroenterol*. 2006. 25(1):14-5.
27. Saxena, R.; Chawla, Y.; K, Verma.; I, Kaur, J.; Ifn- Γ (+874) And Not Tnf-A (-308) Is Associated With Hbv-Hcc Risk In India. *Mol Cell Biochem*. 2014. 385(1-2):297-307.
28. Pan, C. Q.; Zhang, J. X. Natural History And Clinical Consequences Of Hepatitis B Virus Infection. *International Journal Of Medical Sciences*. 2005. 2: 36–40.
29. 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*. 2008. 8(1):20-5.
30. 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*. 2006. 21(7):1163-9.
31. Niro, G. A.; Fontana, R.; Gioffreda, D.; Valvano, R.; Iacobellis, A.; Facciorusso, D.; Andriulli, A. Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms And Clearance Or Progression Of Hepatitis B Virus Infection. *Liver International*. 2005.25: 1175–1181.

2. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 570p.
- ALTER, M. J. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infections. **Seminars in Liver Disease**, **23**(1): 39-46, 2003.
- BAUMERT, T.F; THIMME, R.; von WEIZSÄCKER, F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.1, p.82-90, 2007.
- BERTOLETTI, A; GEHRING, A.J. The immune response during hepatitis B virus infection. **Journal of General Virology**, v.87, p.1439–1449, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais, 2015. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2015/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2015>. Acessado em: 3 fev.2017.
- BRUSS, V. Hepatitis B virus morphogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.1,p.65-73, 2007.
- CONDE S.R.; FEITOSA R.N. [Association of cytokine gene polymorphisms and serum concentrations with the outcome of chronic hepatitis B](#). **Cytokine**.61(3):940-4.2013.
- 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 INF- γ 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.
- GANEM, D & SCHNEIDER, R.J. Hepadnaviridae: the vírus and their replication. In: **Fields Virology**.
- GANEM, D.; PRINCE, A. M. Mechanisms of disease: hepatitis B virus infection – natural history and clinical consequences. **The New England Journal of Medicine**, v.350, n.11, p.1118-1129, 2004.
- GISH R.G.; GIVEN B.D. [Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities](#). **Antiviral Res.** Sep;121:47-58.2015.
- GUIDOTTI, L.G; ROCHFORD, R; CHUNG, J; SHAPIRO, M; PURCELL, R; CHISARI, F.V. Viral clearance without destruction of infected cells during acute VHB infection. **Science**,v.284, p.825-829, 1999.
- HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. TNF- α Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications. **Microscopy Research and Technique**, v.50, p.216-228, 2000.
- HATZAKIS, A.; MAGIORKINIS, E.; HAIDA, C. HBV virological assessment. **Journal of Hepatology**, **44**: 71–76. 2006.

HSU, Y. S. et al. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. **Hepatology**, **35**: 1522–1527. 2002.

ICTV (**I**nternational **C**ommittee on **T**axonomy of **V**iruses), 2015. Disponível em: http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=19995970&taxa_name=Hepatitis%20B%20virus Acessado em: 02/02/2017

KAO, J. H. Role of viral factors in the natural course and therapy of chronic hepatitis B. **Hepatology international**, **1**: 415–430. 2007.

KEW, M. C. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. **PatholBiol**, **v.58**, n.4, p.273-277, 2010.

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- α promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. **Hum Mol Genet**, **12**(19):2541-6, 2003.

KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. The -308 tumor necrosis factor α promoter polymorphism effects transcription. **Molecular Immunology**, **v.34**, p.391-399, 1997.

LARRUBIA JR, BENITO-MARTÍNEZ S, MIQUEL-PLAZA J, SANZ-DE-VILLALOBOS E, GONZÁLES-MATEOS F, PARRA T. Cytokines – their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, **101**(5):343-51, 2009.

LAVANCHY, D. Chronic viral hepatitis as a public health issue in the world. **Gastroenterol**, **22**(6):991-1008, 2008.

MAHONEY, F. J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. **Clinical microbiology reviews**, **12**: 351–366. 1999.

MCMAHON, B. J. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. **Hepatology**, **49**: 45–55. 2009.

PAN, C. Q.; ZHANG, J. X. Natural history and clinical consequences of hepatitis B virus infection. **International Journal of Medical Sciences**, **2**: 36–40. 2005.

POSCH, P.E.; CRUZ, I.; BRADSHAW, D.; MEDHEKAR, B.A. Novel polymorphisms and the definition of promoter “alleles” of the tumor necrosis factor and lymphotoxin α loci: inclusion in HLA haplotypes. **Genes and Immunity**, **4**: 547-558, 2003.

PUNGPAPONG, S.; KIM, R.W.; POTERUCHA, J.J. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. **Mayo Clinic Proceedings**, **82** (8): 967-975, 2007.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature Immunology**, **5**: 215–229. 2005.

SEEGER, C.; MASON, W. Hepatitis B virus biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. **64**, n. 1, p. 51-68, 2000.

SOUTO, F. J. D. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *Gastroenterologia Endoscopia Digestiva*, 18 (4): 143-159, 1999.

SUMMERS, J; MASON, W.S. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, v.**29**, n.2, p.403 – 415, 1982.

TANG, H. et al. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Science*, **97**: 977–983. 2006.

THIMME, R; WIELAND, S; STEIGER, C; GHAYEB, J; REIMANN, K.A; PUCELL, R.H; CHISARI, F.V. CD8+ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *Journal of Virology*, v.**77**, n.1, p.68-76, 2003.

WANG, G. H.; SEEGER, C. Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *Journal of virology*, **67**: 6507–6512. 1993.

3. NORMAS DA REVISTA

Preparation of a Manuscript

General Considerations

Research manuscripts should comprise:

Front matter: Title, Author list, Affiliations, Abstract, Keywords

Research manuscript sections: Introduction, Results, Discussion, Materials and Methods, Conclusions (optional).

Back matter: Supplementary Materials, Acknowledgments, Author Contributions, Conflicts of Interest, References.

Abstract graphic: Authors are encouraged to provide a graphical abstract as a self-explanatory image to appear alongside with the text abstract in the Table of Contents. Figures should be a high quality image in any common image format. Note that images displayed online will be up to 11 by 9 cm on screen and the figure should be clear at this size.

Abbreviations should be defined in parentheses the first time they appear in the abstract, main text, and in figure or table captions.

SI Units (International System of Units) should be used. Imperial, US customary and other units should be converted to SI units whenever possible

Virus nomenclature: Please read [here](#) the instructions concerning viruses nomenclature.

Accession numbers of RNA, DNA and protein sequences used in the manuscript should be provided in the Materials and Methods section. Please also see the section on Deposition of Sequences and of Expression Data.

Equations: If you are using Word, please use either the Microsoft Equation Editor or the MathType add-on. Equations should be editable by the editorial office and not appear in a picture format.

Research Data and supplementary materials: Note that publication of your manuscript implies that you must make all materials, data, and protocols associated with the publication available to readers. Please disclose at the submission stage any restrictions on the availability of materials or information. Read the information about Supplementary Materials and Data Deposit for additional guidelines.

Front Matter

These sections should appear in all manuscript types

Title: The title of your manuscript should be concise, specific and relevant. It should identify if the study reports (human or animal) trial data, or is a systematic review, meta-analysis or replication study. When gene or protein names are included, the abbreviated name rather than full name should be used.

Author List and Affiliations: Authors' full first and last names must be provided. The initials of any middle names can be added. The PubMed/MEDLINE standard format is used for affiliations: complete address information including city, zip code, state/province, country, and all email addresses. At least one author should be designated as corresponding author, and his or her email address and other details should be included at the end of the affiliation section. Please read the [criteria to qualify for authorship](#).

Abstract: The abstract should be a total of about 200 words maximum. The abstract should be a single paragraph and should follow the style of structured abstracts, but without headings: 1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; 2) Methods: Describe briefly the main methods or treatments applied. Include any relevant preregistration numbers, and species and strains of any animals used. 3) Results: Summarize the article's main findings; and 4) Conclusion: Indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article: it must not contain results which are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.

Keywords: Three to ten pertinent keywords need to be added after the abstract. We recommend that the keywords are specific to the article, yet reasonably common within the subject discipline.

Research Manuscript Sections

Introduction: The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance, including specific hypotheses being tested. The current state of the research field should be reviewed carefully and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work and highlight the main conclusions. As far as possible, please keep the introduction comprehensible to scientists working outside the topic of the paper.

Results: Provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation as well as the experimental conclusions that can be drawn.

Discussion: Authors should discuss the results and how they can be interpreted in perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible and limitations of the work highlighted. Future research directions may also be mentioned. This section may be combined with Results.

Materials and Methods: They should be described with sufficient detail to allow others to replicate and build on published results. New methods and protocols should be described in

detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited. Give the name and version of any software used and make clear whether computer code used is available. Include any pre-registration codes.

Conclusions: This section is not mandatory, but can be added to the manuscript if the discussion is unusually long or complex.

Back Matter

Supplementary Materials: Describe any supplementary material published online alongside the manuscript (figure, tables, video, spreadsheets, etc.). Please indicate the name and title of each element as follows Figure S1: title, Table S1: title, etc.

Acknowledgments: All sources of funding of the study should be disclosed. Clearly indicate grants that you have received in support of your research work and if you received funds to cover publication costs. Note that some funders will not refund article processing charges (APC) if the funder and grant number are not clearly and correctly identified in the paper. Funding information can be entered separately into the submission system by the authors during submission of their manuscript. Such funding information, if available, will be deposited to FundRef if the manuscript is finally published.

Author Contributions: For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "X and Y conceived and designed the experiments; X performed the experiments; Y analyzed the data; W contributed reagents/materials/analysis tools; Y wrote the paper." **Authorship must include and be limited to those who have contributed substantially to the work. Please read the section concerning the criteria to qualify for authorship carefully.**

Conflicts of Interest: Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research results. If there is no conflict of interest, please state "The authors declare no conflict of interest." Any role of the funding sponsors in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results must be declared in this section. If there is no role, please state "The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results".

References: References must be numbered in order of appearance in the text (including table captions and figure legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as EndNote, ReferenceManager or Zotero to avoid typing mistakes and duplicated references. We encourage citations to data, computer code and other citable research material. If available online, you may use reference style 9. below.

Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the main text and in the reference list.

In the text, reference numbers should be placed in square brackets [], and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10). or [6] (pp. 101–105).

Preparing Figures, Schemes and Tables

File for Figures and schemes must be provided during submission in a single zip archive and at a sufficiently high resolution (minimum 1000 pixels width/height, or a resolution of 300 dpi or higher). Common formats are accepted, however, TIFF, JPEG, EPS and PDF are preferred.

Viruses can publish multimedia files in articles or as supplementary materials. Please contact the editorial office for further information.

All Figures, Schemes and Tables should be inserted into the main text close to their first citation and must be numbered following their number of appearance (Figure 1, Scheme I, Figure 2, Scheme II, Table 1, *etc.*).

All Figures, Schemes and Tables should have a short explanatory title and caption.

All table columns should have an explanatory heading. To facilitate the copy-editing of larger tables, smaller fonts may be used, but no less than 8 pt. in size. Authors should use the Table option of Microsoft Word to create tables.

Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color (RGB at 8-bit per channel). There is no additional cost for publishing full color graphics.

Research Ethics

Research Involving Human Subjects

When reporting on research that involves human subjects, human material, human tissues or human data, authors must declare that the investigations were carried out following the rules of the Declaration of Helsinki of 1975 (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>), revised in 2008. According to point 23 of this declaration, an approval from an ethics committee should have been obtained before undertaking the research. As a minimum, a statement including the project identification code, date of approval and name of the ethics committee or institutional review board should be cited in the Methods Section of the article. Data relating to individual participants must be described in detail, but private information identifying participants need not be included unless the identifiable materials are of relevance to the research (for example, photographs of participants' faces that show a particular symptom). A written informed consent for publication must be obtained from participating patients in this case. Editors reserve the rights to reject any submission that does not meet these requirements.

Example of Ethical Statements:

All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of XXX (Project identification code).