ALEX JUNIOR SOUZA DE SOUZA

Deteccção e quantificação do vírus da hepatite E (HEV) por RT-PCR em tempo real e estudo experimental em primatas neotropicais (*Aotus azarai infulatus*) infectados pelo genótipo 3 do HEV

SÃO PAULO,

2017

ALEX JUNIOR SOUZA DE SOUZA

Deteccção e quantificação do vírus da hepatite E (HEV) por RT-PCR em tempo real e estudo experimental em primatas neotropicais (*Aotus azarai infulatus*) infectados pelo genótipo 3 do HEV

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá

SÃO PAULO,

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3470
FMVZ

Souza, Alex Junior Souza de
Detecção e quantificação do vírus da hepatite E (HEV) por RT-PCR em tempo real e estudo experimental em primatas neotropicais (*Aotus azarai infulatus*) infectados pelo genótipo 3 do HEV / Alex Junior Souza de Souza. -- 2017.
152 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá.

1. Hepatite E. 2. Diagnóstico molecular. 3. Experimentação. 4. Macacos-da-noite.
5. Zoonose. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção e quantificação do vírus da hepatite e (HEV) por RT-PCR em tempo real e estudo experimental em primatas neotropicais (*Aotus azarai infulatus*) infectados pelo genótipo 3 do HEV", protocolado sob o nº 2945/2013, utilizando 8 (oito) macacos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Detection and quantification of hepatitis e virus (HEV) by real time RT-PCR and experimental study in neotropical primates (*Aotus azarai infulatus*) infected by HEV genotype 3", protocol number 2945/2013, utilizing 8 (eight) primates, under the responsibility Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DE SOUZA, Alex Junior Souza

Título: Detecção e quantificação do vírus da hepatite E (HEV) por RT-PCR em tempo real e estudo experimental em primatas neotropicais (*Aotus azarai infulatus*) infectados pelo genótipo 3 do HEV

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Ao Dr. Manoel do Carmo Pereira Soares por sempre motivar o nosso aprendizado,
crescimento profissional e pessoal por meio de um dos mais nobres incentivos: o estímulo ao
pensar.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais Francisco e Ana Maria (*in memoriam*), minha irmã Alessandra “Alê”, minha avó Raimunda, “mãe mundica”, minha tia Ana Cristina, “Cris” e minha afilhada Júlia, “Juju”. Peço desculpas pelas inúmeras circunstâncias em que precisei estar ausente/longe/ocupado, mas queria registrar de todo coração o meu profundo agradecimento a todos. Sem o apoio e incentivo de vocês, eu certamente não teria concluído mais essa etapa. Amo muito vocês, saibam que vocês são meu porto-seguro e minha maior motivação para ser um profissional e ser humano melhor.

À professora e amiga Lílían Rose Marques de Sá. A minha “cara-de-pau” e sua boa-vontade fizeram com que você aceitasse a orientação sem nem mesmo me conhecer e hoje, quatro anos após “os macacos” terem unido nossas linhas de pesquisa, tenho certeza absoluta que não poderia ter feito escolha melhor de orientadora! Obrigado por ter aceitado esse desafio de orientar um projeto conduzido a uma distância continental e, conseqüentemente, pelos inúmeros votos de confiança depositados no meu trabalho e nos colegas do Instituto Evandro Chagas e Centro Nacional de Primatas durante o desenvolvimento não só deste, mas também dos nossos outros projetos. Seu apoio e incentivo nos momentos de calmaria e, principalmente, naqueles períodos mais difíceis e desafiadores, foram fundamentais para que chegássemos aqui. Sinto-me muito honrado e feliz por levar “na bagagem” deste doutorado inúmeros aprendizados técnicos e científicos, que em grande parte vieram da sua admirável competência, e, além disso, por levar comigo o exemplo da sua inspiradora dedicação e amor pela Medicina Veterinária, pela ciência e vida acadêmica! Espero poder contar com sua parceria de trabalho e amizade por longos anos. Muito obrigado.

Ao Insituto Evandro Chagas (IEC/SV/MS) que deu suporte financeiro, estrutural e tecnológico que viabilizaram a execução do projeto e aos amigos da Seção de Hepatologia do Instituto não só pelo apoio técnico durante a execução deste projeto, mas também pelos anos de companheirismo e amizade. Agradeço a todos da SAHEP que direta e indiretamente colaboraram e, em especial, aos amigos da equipe do Laboratório de Biologia Molecular (Andreza Pinheiro Malheiros, André Antônio Corrêa das Chagas, Andrea Lima Silva e Pedro Eduardo Bonfim Freitas) e do Laboratório de Sorologia (Vânia Pinto Sarmento, Dickson Brito, Kemere Barbosa e Max Moreira Alves) que foram fundamentais durante diversas etapas deste projeto. Vocês são como uma família para mim, muito obrigado!

Ao Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS/MS) pelo suporte técnico, financeiro e estrutural que possibilitaram o desenvolvimento da etapa de experimentação do estudo. Em

particular gostaria de agradecer à equipe do Setor de Medicina Veterinária (Aline Amaral Imbeloni, Manoela Vaz, Mika Aihara e Liliane Almeida Carneiro), do Setor de Laboratório (Wellington Bandeira Silva e seu Osvaldo) e Setor de Ecologia e Manejo (Paulo Gomes Castro, Ananda Krishna de Moraes Ramos, Sheila e Obadias, “Oba”). Esta minha primeira experiência com experimentação em primatas não-humanos só pode ser concluída graças à colaboração e empenho de cada um de vocês. Há bastante tempo eu estava afastado da prática clínica na Medicina Veterinária e vocês, com toda compreensão e paciência, me conduziram para que eu desempenhasse um conjunto complexo de atividades da melhor forma possível. Muito obrigado, esta experiência foi extremamente gratificante.

À Universidade Federal Rural da Amazônia por ceder o equipamento de ultrassonografia utilizado no experimento e pelo apoio do prof. Dr. Lenadro Nassar Coutinho durante o desenvolvimento das avaliações ultrassonográficas e de biópsias hepáticas. Além deste agradecimento formal, gostaria de agradecer adicionalmente ao Leandro também por ser este grande amigo que tenho a honra de conhecer há mais de duas décadas. Muito obrigado, meu irmão.

À Seção de Patologia do Instituto Evandro Chagas que disponibilizou os reagentes e equipamento de bioquímica sérica e à servidora Pollyanna de Lucena Ferreira Silva que auxiliou no processamento das amostras.

Aos colegas pós-graduandos, funcionários e professores do Departamento de Patologia da FMVZ-USP e, em particular, aos amigos do Laboratório de Gastroenterologia Comparada e Patologia Ambiental Vera Lisa Generosa, Thiago Luis, Debora Romero e Liura Lauri. Apesar dos breves períodos de convivência, obrigado pela amizade e experiências compartilhadas. Ao professor Stefano Carlo Filippo Hagen pela amizade, auxílio acadêmico e também por todas as conversas/*brainstorms* extremamente motivadoras.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de doutorado durante período parcial de desenvolvimento do projeto.

Aos amigos de Belém e São Paulo que participaram direta e indiretamente e me incentivaram e contribuíram nesta jornada.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

RESUMO

DE SOUZA, A. J. S. **Deteção e quantificação do vírus da hepatite E (HEV) por RT-PCR em tempo real e estudo experimental em primatas neotropicais (*Aotus azarai infulatus*) infectados pelo genótipo 3 do HEV.** [Detection and quantification of hepatitis E virus (HEV) by real time RT-PCR and experimental study in neotropical monkeys (*Aotus azarai infulatus*) infected by HEV genotype 3. 2017. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O vírus da hepatite E (HEV) é um patógeno emergente de distribuição global, causador de hepatite aguda e crônica em humanos e infecções assintomáticas em animais. No Brasil a prevalência de infecção por HEV em humanos e animais ainda é pouco compreendida, assim como as características de virulência, patogenicidade e de infecção inter-espécies de isolados do genótipo 3, zoonótico, circulantes no país também são desconhecidas. O estudo foi dividido em duas etapas, com os objetivos de 1) contribuir no diagnóstico laboratorial molecular do HEV a partir do desenvolvimento de um protocolo de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) para pesquisa do HEV em amostras biológicas, e 2) contribuir com a compreensão das características moleculares, sorológicas, clínico-laboratoriais, ultrassonográficas e histopatológicas associadas à infecção experimental em macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) por um isolado do genótipo 3 suíno do HEV previamente detectado na Amazônia oriental brasileira. O protocolo de RT-qPCR foi desenvolvido com a caracterização da curva de detecção e aplicado em concomitância com testes sorológicos para avaliação diagnóstica retrospectiva de 318 ($n = 318$) amostras de soros humanos suspeitos de hepatite E. O HEV-RNA não foi detectado em nenhuma das amostras humanas testadas, mas foi determinada soroprevalência de 3,4% e 5,9% de anti-HEV IgM e IgG, respectivamente, o que indicou baixa prevalência de infecção por HEV, mesmo entre pacientes com suspeita clínica e/ou laboratorial de hepatite E na Amazônia brasileira. O estudo experimental em macacos-da-noite foi desenvolvido durante 12 semanas e os animais infectados, por via intravenosa ($n=3$) e oral ($n=3$) (e dois controles), foram avaliados semanalmente para determinação dos parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos, sorológicos (pesquisa de anti-HEV IgM e IgG por ensaio imunoenzimático) e moleculares (HEV-RNA soro e fezes por RT-qPCR). Adicionalmente, os animais também foram submetidos a avaliação hepática mensal por ultrassonografia, histopatologia e pesquisa hepática de antígenos do HEV por imunohistoquímica. Os seis macacos-da-noite infectados apresentaram o HEV-RNA em amostras de soro e/ou fezes, e alguns apresentaram evidências de soroconversão, detecção hepática do antígeno viral por imunohistoquímica associada a alterações clínicas e

laboratoriais de hepatite aguda oligossintomática. Assim, o protocolo RT-qPCR demonstrou ser aplicável na pesquisa molecular do HEV em amostras de humanos e animais, representando uma importante ferramenta de diagnóstico laboratorial. O estudo experimental permitiu a primeira validação de um primata neotropical como modelo experimental para estudos de infecção com o genótipo 3 do HEV.

Palavras-chave: Hepatite E. Diagnóstico molecular. Experimentação. Macacos-da-noite. Zoonose.

ABSTRACT

DE SOUZA, A. J. S. **Detection and quantification of hepatitis E virus (HEV) by real time RT-PCR and experimental study in neotropical monkeys (*Aotus azarai infulatus*) infected by HEV genotype 3.** [Detecção e quantificação do vírus da hepatite E (HEV) por RT-PCR em tempo real e estudo experimental em primatas neotropicais (*Aotus azarai infulatus*) infectados pelo genótipo 3 do HEV]. 2017. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Hepatitis E virus (HEV) is an emerging pathogen with global distribution that causes acute and chronic hepatitis in humans and asymptomatic infections in animals. In Brazil, the prevalence of HEV infection in humans and animals is still poorly understood, and the characteristics of virulence, pathogenicity and inter-species infection of the genotype 3 isolates circulating in the country are unknown. The study was divided in two stages that aimed to 1) contribute to the molecular diagnosis of HEV infection by the development of a real-time RT-PCR protocol (RT-qPCR) for HEV-RNA research in biological samples, and 2) to contribute to understanding of molecular, serological, clinical-laboratory, ultrasonographic and histopathological features of HEV genotype 3 in owl monkeys (*Aotus azari infulatus*) experimental infected with isolate of swine HEV genotype 3 previously detected in the Eastern Brazilian Amazon. The RT-qPCR protocol was developed with characterization of a quantification standard curve and later applied concurrently with serological tests in the retrospective evaluation of 318 ($n = 318$) human serum samples of hepatitis E suspected cases. HEV-RNA was not detected in any of human tested samples, but seroprevalence of 3.4% and 5.9% was determined for anti-HEV IgM and IgG, respectively, that indicated a low prevalence of HEV infection, even among patients with clinical and/or laboratory suspicion of hepatitis E in the Brazilian Amazon. The experimental study in owl monkeys was developed during 12 weeks and the animals were infected by intravenous ($n = 3$) and oral ($n = 3$) routes (and two negative controls) were evaluated for determination of clinical, biochemical, hematological, serological (anti-HEV IgM and IgG by enzyme immunoassay) and molecular (HEV-RNA serum and stool by RT-qPCR) parameters weekly. Additionally, the animals were also evaluated by hepatic ultrasonography, histopathology and immunohistochemistry research of HEV antigens in liver monthly. The six infected owl monkeys presented HEV-RNA in serum and/or stool, and some monkeys presented with evidence of seroconversion, liver detection of HEV antigens by immunohistochemistry associated with clinical and/or laboratory findings of oligosymptomatic acute hepatitis. Thus, the RT-qPCR protocol demonstrated to be applicable in the molecular investigation of HEV infection in human and

animal samples, and it also represented an important laboratory diagnostic tool. The experimental study allowed the validation of the first neotropical primate model for HEV genotype 3 infection studies.

Keywords: Hepatitis E. Molecular diagnosis. Experimentation. Owl monkey. Zoonosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	VÍRUS DA HEPATITE E: ASPECTOS HISTÓRICOS, CARACTERÍSTICAS GERAIS, CURSO CLÍNICO DE INFECÇÃO E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	18
2.2	HEV EM ANIMAIS: ASPECTOS ZOONÓTICOS, TRANSMISSÃO INTER-ESPÉCIES E MODELOS EXPERIMENTAIS	28
3	OBJETIVOS	41
3.1	GERAL.....	41
3.2	ESPECÍFICOS.....	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	ETAPA 1 - DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE RT-qPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HEV-RNA E APLICAÇÃO NA ANÁLISE RETROSPECTIVA DE CASOS SUSPEITOS DE HEPATITE E EM HUMANOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL BRASILEIRA.....	42
4.1.1	Montagem da curva padrão e desenvolvimento de ensaios de RT-qPCR para pesquisa do HEV-RNA.....	43
4.1.2	Casuística.....	44
4.1.3	Deteção sorológica do HEV	44
4.1.4	Pesquisa de HEV-RNA em amostras de soro humanas suspeitas de hepatite E	45
4.1.5	Análise estatística.....	45
4.2	ETAPA 2: ESTUDO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR GENÓTIPO 3 SUÍNO DE HEV EM MACACOS-DA-NOITE	46
4.2.1	Inóculo	46
4.2.2	Critérios de seleção e manejo geral dos animais.....	47
4.2.3	Delineamento experimental e acompanhamento pós-infecção	49
4.2.4	Exame físico e coleta de amostras	50
4.2.5	Pesquisa de HEV-RNA por RT-qPCR	51
4.2.6	Pesquisa sorológica de anticorpos anti-HEV IgM e IgG.....	53
4.2.7	Exames bioquímicos séricos e hematológicos.....	54
4.2.8	Avaliação ultrassonográfica e procedimentos de biópsias hepáticas	54
4.2.9	Avaliação histopatológica hepática	55

4.2.10	Pesquisa imunohistoquímica de antígenos de HEV.....	58
4.2.11	Análise estatística.....	59
5	RESULTADOS	60
5.1	ETAPA 1 - DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE RT-qPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HEV-RNA E APLICAÇÃO NA ANÁLISE RETROSPECTIVA DE CASOS SUSPEITOS DE HEPATITE E EM HUMANOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL BRASILEIRA.....	60
5.1.1	Padronização de ensaio do RT-qPCR pada detecção do HEV-RNA em amostras biológicas.....	60
5.1.2	Pesquisa sorológica e molecular de infecção por HEV em casos humanos suspeitos de hepatite E	62
5.2	ETAPA 2 - ESTUDO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR GENÓTIPO 3 SUÍNO DE HEV EM MACACOS-DA-NOITE	64
5.2.1	Detecção do HEV-RNA em amostras de soro e fezes de macacos-da-noite experimentalmente infectados por HEV	64
5.2.2	Detecção sorológica de anti-HEV IgM e IgG em macacos-da-noite experimentalmente infectados por HEV	69
5.2.3	Alterações clínicas em macacos-da-noite experimentalmente infectados por HEV.....	69
5.2.4	Alterações laboratoriais em macacos-da-noite experimentalmente infectados por genótipo 3 suíno do HEV.....	77
5.2.4.1	<i>Resultados das determinações bioquímicas séricas.....</i>	<i>77</i>
5.2.4.2	<i>Resultados hematológico.....</i>	<i>87</i>
5.2.4	Alterações ultrassonográficas em macacos-da-noite experimentalmente infectados por HEV	92
5.2.5	Avaliação histopatológica e imunohistoquímica hepática em macacos-da-noite experimentalmente infectados por HEV	94
5.2.6	Alterações clínicas, laboratoriais bioquímicas e hematológicas, ultrassonográficas e histopatológicas em relação a detecção de HEV-RNA em macacos-da-noite infectados pelo genótipo 3 suíno do HEV	103
6	DISCUSSÃO	111
6.1	ETAPA 1 - DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE RT-qPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HEV-RNA E APLICAÇÃO NA	

	ANÁLISE RETROSPECTIVA DE CASOS SUSPEITOS DE HEPATITE E EM HUMANOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL BRASILEIRA	111
6.2	ETAPA 2 - ESTUDO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR GENÓTIPO 3 SUÍNO DE HEV EM MACACOS-DA-NOITE	115
7	CONCLUSÕES.....	131
	REFERÊNCIAS.....	133

1 INTRODUÇÃO GERAL

No mundo inteiro, constantes mudanças ecológicas e/ou sócio-econômicas causadas por fatores antropogênicos relacionados à expansão demográfica, degradação de ecossistemas naturais e crescente aumento no fluxo global de pessoas têm promovido a emergência ou re-emergência de doenças infecciosas (WOOLHOUSE, 2002; WEISS; MCMICHAEL, 2004; MORSE et al., 2012) causadas, em grande maioria, por patógenos zoonóticos (MESLIN, 1997; TAYLOR et al., 2001; JONES et al., 2008).

A transmissão destes patógenos de animais domésticos e/ou selvagens para humanos pode ocorrer por transmissão direta, indireta, vetorial ou por múltiplas vias (TAYLOR et al., 2001). Jones et al. (2008) demonstraram que entre 335 eventos de emergência de doenças infecciosas ocorridos ao redor do mundo entre 1940 a 2004, mais da metade (60,3%) foram causados por patógenos zoonóticos ou de origem animal.

Taylor et al. (2001) indicaram que entre 1415 agentes infecciosos causadores de doença em seres humanos, 868 (61,3%) são zoonóticos e 19% correspondem a vírus ou príons. Em particular, vírus RNA apresentam relevância por serem mais relacionados a doenças zoonóticas do que vírus do tipo DNA (WOOLHOUSE, 2002).

Dentro do contexto, o vírus da hepatite E (do inglês *Hepatitis E virus* – HEV) é um dos vírus tipo RNA considerado como um patógeno zoonótico emergente, uma vez que os genótipos 3 e 4 do HEV, detectados em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, estão relacionado a casos autóctones de hepatite aguda autolimitada e hepatite crônica em indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos, respectivamente, além de infecções oligo/assintomáticas em animais (TAYLOR et al., 2001; PURCELL; EMERSON, 2008; MENG, 2010; SMITH et al., 2014; MENG, 2016).

A transmissão do HEV se dá predominantemente por via fecal-oral, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados e apesar de isolados de hepevirus terem sido descritos em uma grande variedade de reservatórios animais, suínos são as principais fontes de infecção pelos genótipos 3 e 4 do HEV para humanos (MENG et al., 2010; 2016).

O genótipo 4 apresenta distribuição geográfica em regiões da Ásia, já o genótipo 3 do HEV está amplamente distribuído ao redor do mundo. A infecção por ambos os genótipos pode causar manifestações clínicas diversas que podem variar desde infecções assintomáticas ou até mesmo com quadros graves, como hepatite fulminante ou hepatite crônica com rápida evolução para cirrose hepática (AGGARWAL et al., 2011; KRAIN et al., 2014).

Mesmo com os recentes avanços relacionados ao diagnóstico, terapêutica e profilaxia, as hepatites virais ainda representam um sério problema de saúde pública ao redor do mundo e houve um relevante aumento global na mortalidade causada pelos vírus das hepatites A, B, C, Delta e/ou E que, quando avaliadas em conjunto, avançaram da décima posição no *ranking* de principais causas de mortalidade ao redor do mundo em 1990 para a sétima posição no ano de 2013 (STANAWAY et al., 2016).

No presente, um número até então limitado de publicações tem indicado a ocorrência somente de isolados do genótipo 3 do HEV no Brasil em seres humanos (DOS SANTOS et al., 2010; PASSOS et al., 2013; PASSOS-CASTILHO et al., 2014), e suínos (PAIVA et al., 2007, DOS SANTOS et al., 2009; 2011; DE SOUZA et al., 2012; GARDINALI et al., 2012; LANA et al., 2014), portanto o desenvolvimento e aplicação de técnicas laboratoriais de diagnóstico de infecção por HEV são de fundamental importância para melhor caracterização da prevalência e impacto em saúde pública da circulação do vírus no país, devido ao fato do genótipo 3 do HEV ter caráter zoonótico, o que pode representar que populações possam estar em contato com fontes de infecções devido à exposição e/ou consumo de suínos ou outros reservatórios, sem a devida notificação ou vigilância epidemiológica para avaliação do potencial/caráter emergente da zoonose no país.

Adicionalmente, as características biológicas de patogenicidade, virulência e potencial de infecção interespecies de isolados suínos do genótipo 3 do HEV circulantes no Brasil ainda permanecem pouco caracterizadas e, frente ao exposto, o presente projeto se justifica pela necessidade de desenvolvimento e aplicação de testes moleculares para aprimoramento do diagnóstico laboratorial da infecção por HEV humanos e animais e pela necessidade de melhor compreensão e caracterização do significado clínico-laboratorial da infecção pelo genótipo 3 suíno do HEV em humanos, utilizando, por analogia, um modelo de infecção experimental em primata neotropical.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VÍRUS DA HEPATITE E: ASPECTOS HISTÓRICOS, CARACTERÍSTICAS GERAIS, CURSO CLÍNICO DE INFECÇÃO E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O HEV, atualmente classificado na Família *Hepeviridae*, Gênero *Orthohepevirus*, Espécie *Orthohepevirus A*, é um agente causador de hepatite aguda autolimitada e hepatite crônica em humanos, e também hepatite aguda sem sinais clínicos em animais (SMITH et al., 2014). A transmissão do vírus se dá principalmente por via fecal-oral, sendo veiculado por água e alimentos contaminados, o que faz com que a infecção por HEV seja um potencial problema em regiões alagadiças e com baixas condições sanitárias, como Ásia e África, onde é endêmico (KHUROO, 2011).

Historicamente, surtos de hepatite causados por HEV foram descritos originalmente desde os anos 1950 no subcontinente indiano, período em que o agente, até então desconhecido, estava potencialmente associado à veiculação hídrica (DENNIS; WOLMAN, 1959). A Figura 1 resume os eventos históricos relevantes relacionados aos quadros de hepatite viral e HEV desde 1950. Destaca-se a epidemia de hepatite aguda no fim dos anos 1970 que ocorreu no vale da Caxemira na Índia e se caracterizou por veiculação hídrica de um agente infeccioso de transmissão fecal-oral denominado, naquele momento, por “hepatite entericamente transmissível não-A, não-B” (*enterically transmitted non-A, non-B Hepatitis – ET-NANBH*), que hoje se sabe que se tratava de surto de hepatite infecciosa causada por HEV (KHUROO, 2011).

Epidemias de ET-NANBH no subcontinente indiano tiveram como particularidade a ocorrência de casos de hepatite fulminante entre grávidas em maior frequência, chegando a acometer 44,4% das mulheres grávidas no terceiro trimestre de gestação (KHUROO, 2011). Estima-se que a taxa de letalidade da hepatite E em grávidas possa chegar a 20% em regiões endêmicas (KUMAR et al., 2004; AGGARWAL, 2011; 2013).

A existência de um novo agente viral associado a ET-NANBH foi confirmada após a primeira reprodução experimental da doença em um voluntário humano inoculado com um *pool* de suspensões fecais de casos presumidamente agudos de ET-NANBH do Afeganistão e após segunda passagem de suspensão fecal em macacos *cynomolgus*. Tanto o voluntário humano, quanto os primatas não humanos (PNH), inoculados com suspensões fecais

reproduziram o quadro clínico-laboratorial de hepatite aguda autolimitada, com soroconversão e excreção de partículas vírus-like (VLP) detectadas por imunoeletromicroscopia (IEM) (BALAYAN et al., 1983).

Devido às características morfológicas das VLPs do HEV serem similares as de calicivírus, durante os anos de 1988-1998, o HEV foi classificado na Família *Caliciviridae*. Entretanto, como a clonagem e sequenciamento do genoma completo do vírus não deram suporte à esta primeira classificação (TAM et al., 1991) e não havia um consenso sobre a mesma, durante os anos de 1998-2002 o vírus foi reclassificado como “*Hepatitis E like-virus*” e, posteriormente, agrupado na Família *Hepeviridae* pelo Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*) (SMITH et al., 2014).

Figura 1 – Linha do tempo apresentando o resumo de eventos históricos relevantes na descoberta e caracterização etiológica do HEV

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: ICTV = Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*).

As partículas do HEV são não-envelopadas, com tamanho de 27-34 nm e apresentam simetria icosaédrica (BRADLEY et al., 1987). O genoma viral é tipo RNA, fita simples, com polaridade positiva e tamanho ~ 7,2 kb, no qual são identificadas três fases abertas de leitura

Atualmente, cinco genótipos da espécie *Orthohepevirus A*, identificados numericamente por 1, 2, 3, 4 e 7, são reconhecidos como causadores de hepatite E em humanos (PAVIO et al., 2015; LEE et al., 2016). Os genótipos 1 e 2 apresentam circulação exclusiva em humanos e as manifestações clínicas de infecção por estes genótipos ocorrem sob a forma de hepatite aguda em epidemias em regiões endêmicas como Índia, África Central, América Latina, Oriente Médio e Repúblicas independentes da ex-União Soviética (Figura 3) (KHUROO, 2011).

Os genótipos 3 e 4 da espécie *Orthohepevirus A*, zoonóticos, foram isolados de humanos e animais, como suínos, javalis, veados, coelhos e mangustos (MENG, 2016). Estes genótipos apresentam grande proximidade filogenética e de organização genômica, e estão associados a casos esporádicos de hepatite E em humanos em países industrializados e em desenvolvimento, onde suínos são considerados os principais reservatórios e fontes de infecção do genótipo 3 para os seres humanos (CLEMENTE-CASARES et al., 2003; TURNER et al., 2010; PAVIO et al., 2015). A Figura 3 apresenta a distribuição geográfica dos genótipos 1 a 4 do HEV. Até o presente, somente um caso de hepatite E causada pelo genótipo 7 do HEV, originalmente identificado em camelídeos, foi detectado em um indivíduo com hepatite E crônica com histórico de consumo de leite e carne de dromedário nos Emirados Árabes Unidos (LEE et al., 2016).

Figura 3 – Distribuição geográfica dos quatro principais genótipos do HEV que infectam humanos

Fonte: (Adaptado de EMERSON e PURCELL, 2013, por DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Além dos genótipos anteriormente citados da espécie *Orthohepevirus A*, isolados de hepevirus detectados em reservatórios animais também foram recentemente incluídos na classificação oficial da família *Hepeviridae* proposta pelo ICTV (Tabela 1) (SMITH et al., 2014). Destaca-se que o potencial zoonótico e/ou de transmissão interespecíes de muitos destes isolados ainda permanecem desconhecidos (SMITH et al., 2014; PAVIO et al., 2015).

Tabela 1 – Classificação taxonômica oficial segundo ICTV para a família *Hepeviridae*, 2015

Gêneros	Espécies	Principais hospedeiros	Genótipos
<i>Orthohepevirus</i>	<i>Orthohepevirus A</i>	Humanos	HEV-1
		Humanos	HEV-2
		Humanos, suínos, coelhos, veados e mangustos	HEV-3
		Humanos, suínos	HEV-4
		Javalis	HEV-5
		Javalis	HEV-6
		Camelos	HEV-7
	<i>Orthohepevirus B</i>	Frangos	
	<i>Orthohepevirus C</i>	Ratos	HEV-C1
		Furões	HEV-C2
	<i>Orthohepevirus D</i>	Morcegos	
<i>Piscihepevirus</i>	<i>Piscihepevirus A</i>	Peixes (trutas)	

Fonte: (Adaptado de SMITH et al., 2014; PAVIO et al., 2015, por DE SOUZA, A. J. S., 2017).

De modo geral, a prevalência para o HEV varia de 1 a 10% entre populações urbanas e rurais na América Latina e, desta forma, os autores apontam uma baixa endemicidade para o vírus nestes países (ECHEVARRÍA et al., 2013). Na América do Sul, as evidências iniciais de circulação autóctone do HEV foram determinadas a partir da detecção de anticorpos anti-HEV entre populações rurais e ameríndias na Venezuela (PUJOL et al., 1994). Posteriormente, foram identificados isolados do HEV genótipo 3 em amostras de pacientes com hepatite aguda e suínos na Argentina (SCHLAUDER et al., 2000; MUNNÉ et al., 2006). Apesar de estudos soropidemiológicos indicarem uma baixa prevalência do HEV em humanos na América Latina, os dados a respeito da prevalência, genótipos e características epidemiológicas do vírus ainda são escassos em alguns países, populações e regiões geográficas (ECHEVARRÍA et al., 2013).

A primeira evidência de circulação do HEV no Brasil foi atribuída à detecção de anticorpos anti-HEV IgG entre 6,1% de trabalhadores de mineração saudáveis na bacia amazônica do Estado do Mato Grosso (PANG et al., 1995), mas casos humanos de hepatite E confirmados a partir da detecção molecular, sequenciamento nucleotídico e análise filogenética do HEV, até o momento, indicaram apenas a ocorrência do genótipo 3 do vírus em cinco casos: em um paciente com hepatite aguda autóctone no Estado do Rio de Janeiro (DOS SANTOS et al., 2010); e em quatro casos crônicos no Estado de São Paulo, sendo três

pacientes transplantados receptores de rins (PASSOS et al., 2013) e uma paciente receptora de fígado (PASSOS-CASTILHO et al., 2014).

Em contrapartida, isolados suínos e ambientais do genótipo 3 do vírus têm sido descritos em diversas regiões geográficas do Brasil (PAIVA et al., 2007, DOS SANTOS et al., 2009; 2011; DE SOUZA et al., 2012; GARDINALI et al., 2012; LANA et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2015; HELDT et al., 2016). Suínos são a principal fonte de infecção de HEV genótipo 3 e 4 para humanos (MENG, 2010) e apesar de já terem sido identificados isolados suínos do genótipo 3 na Amazônia Oriental brasileira (DE SOUZA et al., 2012), nenhum caso humano de hepatite E na região foi confirmado a partir da detecção do HEV-RNA até o momento (PANG et al., 1995; DE PAULA et al., 2001; ASSIS et al., 2002; VITRAL et al., 2014; NUNES et al., 2016).

No presente, somente estudos soroepidemiológicos foram desenvolvidos na Amazônia brasileira para pesquisa de infecção por HEV em seres humanos e inquéritos sorológicos têm sugerido que a região Amazônica brasileira apresenta uma baixa soroprevalência para HEV (PANG et al., 1995; DE PAULA et al., 2001; TRINTA et al., 2001; ASSIS et al., 2002; NUNES et al., 2016). Anticorpos anti-HEV IgG foram detectados em 4% de 349 indivíduos assintomáticos moradores em comunidades ribeirinhas na Amazônia Ocidental brasileira (DE PAULA et al., 2001) e em 4,5% de crianças de 2 a 9 anos na Amazônia matogrossense (ASSIS et al., 2002).

Recentemente, um estudo transversal de soroprevalência em uma comunidade rural assintomática na Amazônia ocidental brasileira detectou 12,9% de anticorpos anti-HEV IgM e 16,3% de anticorpos anti-HEV IgG (VITRAL et al., 2014). Esta variação de soroprevalência entre diferentes áreas da Amazônia brasileira pode estar relacionada às técnicas de diagnóstico utilizadas e às particularidades epidemiológicas regionais (KRAIN et al., 2014).

O curso clínico clássico da hepatite E em indivíduos imunocompetentes é compatível com quadro de hepatite aguda autolimitada, ou seja, após um período de incubação de 3-6 semanas, o HEV-RNA pode ser detectado no soro e fezes e há um aumento de enzimas hepáticas (alanina aminotransferase – ALT; gama glutamiltransferase – GGT) e bilirrubinas, concomitante à observação de manifestação clínica que inclui principalmente incluir icterícia, febre, vômitos, hipo/acolia fecal e dores abdominais (Figura 4) (PANDA et al., 2007; WEDEMEYER et al., 2012).

A apresentação clínica da hepatite E aguda em humanos é indistinguível de outras hepatites virais, mas a pesquisa laboratorial do HEV não está inserida na rotina diagnóstica

em muitas regiões geográficas do mundo, nem mesmo no diagnóstico diferencial entre casos de hepatites agudas ou crônicas de etiologias indeterminadas (KAMAR et al., 2008; 2014).

A viremia do HEV pode ser detectada desde o período de incubação até a fase inicial das manifestações clínicas e desaparece após a soroconversão, quando há o aumento dos anticorpos anti-HEV IgM na etapa aguda e IgG já no início da fase convalescente (AGGARWAL, 2014; KAMAR et al., 2014; KRAIN et al., 2014). Nesta fase há normalização dos níveis séricos de enzimas hepática, resolução das alterações clínicas e clareamento viral (AGGARWAL, 2014; KAMAR et al., 2014; KRAIN et al., 2014). A excreção do HEV nas fezes, porém pode ser observada por um período maior, podendo durar de 2-4 semanas após o pico de transaminases e das manifestações clínicas (Figura 4) (KAMAR et al., 2012, 2014; KRAIN et al., 2014).

Figura 4 – Representação esquemática do curso clínico agudo da hepatite E em humanos em relação ao tempo de exposição e achados laboratoriais

Fonte: (Adaptado de KRAIN et al., 2014, por DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Evidências experimentais indicam que a infecção pelo HEV tem caráter dose-dependente e que a carga viral infectante pode influenciar na manifestação clínica da doença, na resposta imune e nas lesões hepatocelulares resultantes da replicação do vírus em humanos e em animais (TSAREV et al., 1994a; AGGARWALL et al., 2011). Neste sentido, infecções assintomáticas podem ser frequentemente observadas em indivíduos tanto em regiões

endêmicas, quanto não-endêmicas para o vírus (PURDY; KHUDYAKOV, 2011; KABA et al., 2013; PANDA; VARMA, 2013).

A hipótese de ocorrência de infecção crônica por HEV foi levantada após a descrição de casos de hepatite E entre transplantados receptores de órgãos sólidos (fígado, rins e pâncreas) na França (GÉROLAMI et al., 2008; KAMAR et al., 2008). Nesta situação, oito entre 14 pacientes com hepatite E aguda evoluíram para forma crônica de infecção, em que o HEV-RNA permaneceu detectável em amostras de soro e fezes destes pacientes por período médio de 15 meses (KAMAR et al., 2008). Esta evidência de infecção crônica foi associada ao aumento persistente de níveis de transaminases e às alterações histopatológicas de hepatite crônica (KAMAR et al., 2008).

Estudos subsequentes confirmaram a ocorrência de hepatite E crônica entre receptores de outros órgãos sólidos como coração (PISCHKE et al., 2012) e pulmões (RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2013). Até o momento, exceto pelo relato de um caso de hepatite E crônica causada por um isolado do genótipo 7 (LEE et al., 2016), infecções causadas pelo genótipo 3 do HEV têm sido associadas ao quadro crônico de hepatite E (WEDEMEYER et al., 2012; DALTON et al., 2014). Outras condições de imunossupressão, como a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), também têm sido associadas à cronicidade da infecção por HEV (DALTON et al., 2009; KABA et al., 2011). Desta forma, em imunossuprimidos, a infecção crônica por HEV representa um problema em potencial, pois nestes indivíduos o curso da doença pode progredir rapidamente de hepatite crônica para cirrose (GÉROLAMI et al., 2008; DALTON et al., 2009; FUJIWARA et al., 2014).

Na rotina laboratorial, o diagnóstico da hepatite E pode ser realizado pela detecção de anticorpos anti-HEV IgM e/ou IgG no soro e/ou pela detecção molecular do HEV-RNA no soro ou fezes de pacientes suspeitos (HUANG et al., 2010; GARSON et al., 2012; AGGARWAL, 2013; KAMAR et al., 2014).

Kits comerciais de sorologia estão disponíveis para diagnóstico da hepatite E, mas não existe um consenso sobre a utilização de um teste sorológico “padrão-ouro” e, somado a isso, inconsistências de sensibilidade e especificidade desses testes podem comprometer a determinação da prevalência de HEV e seu real impacto em saúde pública em diversas regiões do mundo (MENG, 2010; KRAIN et al., 2014).

A sensibilidade dos testes sorológicos comerciais disponíveis para HEV é bastante variável (KRAIN et al., 2014; AVELLON et al., 2015; NORDER et al., 2016). Estudo comparativo de sensibilidade entre seis kits comerciais demonstrou que a sensibilidade de detecção de anticorpos anti-HEV IgM pode variar de 59,6 a 80,8% e para anti-HEV IgG de

57,5 a 77,5% (AVELLON et al., 2015). Já em outro estudo comparativo com cinco kits comerciais, a sensibilidade variou para detecção entre 42 a 96% tanto para IgM, como IgG (NORDER et al., 2016).

A aplicação da biologia molecular como método diagnóstico para agentes virais representa um avanço e melhoria na especificidade e sensibilidade do diagnóstico (TANG et al., 1997). Neste contexto, o diagnóstico direto do vírus pode ser alcançado a partir da detecção do HEV-RNA por técnicas moleculares convencionais qualitativas de amplificação do ácido nucleico viral (RT-PCR, *nested* PCR), porém, estas também podem apresentar variáveis taxas de sensibilidade e especificidade de acordo com os métodos utilizados (JOTHIKUMAR et al., 2006; GARSON et al., 2012; BAYLIS et al., 2013). Por outro lado, técnicas de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) para detecção e quantificação do HEV-RNA apresentam rapidez de execução, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade superiores quando comparadas às técnicas moleculares convencionais (JOTHIKUMAR et al., 2006; GARSON et al., 2012; MOKHTARI et al., 2013).

Atualmente, três kits de primeira geração estão comercialmente disponíveis para detecção e quantificação do HEV por RT-qPCR: *HepatitisE@ceeram*[®] *Tools kit* (Ceeram, França); *RealStar HEV*[®] *RT-PCR kit*, v.1.0 (Altona Diagnostics, França); e *Primerdesign Genesig*[®] *Kit for Hepatitis E virus (HEV)* (Genesig, Reino Unido), dos quais os dois primeiros apresentam como alvo de amplificação a região ORF3 do genoma viral e o último amplifica parcialmente a região ORF2 (ABRAVANEL et al., 2012; 2013).

Protocolos de RT-qPCR com *primers* e sondas que amplificam sequências alvo na região ORF3 do HEV apresentaram maior eficiência de amplificação de isolados do genótipo 3, quando comparados a protocolos de amplificação da região ORF2 (ABRAVANEL et al., 2012). Em estudo comparativo entre os kits RT-qPCR da Ceeram e Altona, os autores indicaram que apesar do kit do último fabricante possuir sensibilidade superior, ambos apresentam boa sensibilidade e alta reprodutibilidade de amplificação do genótipo 3 do HEV (ABRAVANEL et al., 2013).

Dados a respeito da aplicação de kits comerciais de RT-qPCR para quantificação de amostras humanas dos genótipos 1, 2 e 4 do HEV ainda são desconhecidos, mas como a região ORF3 é extremamente conservada entre os genótipos do vírus, acredita-se que os testes de RT-qPCR que amplificam esta região sejam também eficazes para outros genótipos do HEV (JOTHIKUMAR et al., 2006; GARSON et al., 2012; ABRAVANEL et al., 2013; MOKHTARI et al., 2013).

Em virtude das diferenças de sensibilidade e especificidade de métodos de detecção do HEV-RNA por técnicas baseadas na amplificação do ácido nucléico (*Nucleic acid amplification techniques* – NAT) viral, a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* – WHO) estabeleceu um padrão internacional contendo 250.000 UI/ mL de um isolado do genótipo 3a do HEV para ser utilizado em NAT por laboratórios ao redor do mundo desde 2009 (BAYLIS et al., 2013). A disponibilidade de um padrão internacional do vírus permite a utilização desta ferramenta de controle de qualidade para aprimoramento, padronização e uniformização do diagnóstico molecular do HEV (BAYLIS et al., 2013).

Além das diferenças metodológicas, a detecção do HEV-RNA em amostras de soro também pode ser limitada em virtude da fase ou curso da infecção. Em quadros agudos autolimitados de hepatite E em indivíduos imunocompetentes, o HEV-RNA pode ser detectado no soro por um período curto de viremia de três a quatro semanas após o início dos sintomas (KAMAR et al., 2014; KRAIN et al., 2014). Já em imunossuprimidos com hepatite E crônica, a viremia pode persistir por períodos superiores a três meses (KAMAR et al., 2013; 2015).

A técnica molecular é também de fundamental importância para diagnóstico entre indivíduos imunossuprimidos, pois permite a melhor caracterização do quadro crônico de infecção e monitoramento da carga viral para auxiliar no manejo clínico-terapêutico da infecção por HEV (DALTON et al., 2009; BAYLIS et al., 2013; BLASCO-PERRI et al., 2016). Acrescenta-se ainda que a pesquisa do HEV-RNA é importante para a confirmação diagnóstica em pacientes positivos para anti-HEV IgM provenientes de regiões geográficas de baixa endemicidade (AGGARWAL, 2013).

Neste sentido, o uso combinado de testes sorológicos e moleculares tem sido recentemente preconizado para auxiliar na confirmação diagnóstica e interpretação correta do curso da infecção pelo vírus (HUANG et al., 2010; KAMAR et al., 2015).

Manifestações clínicas extra-hepáticas incluindo distúrbios neurológicos, hematológicos e renais também têm sido associadas à infecção aguda e crônica por HEV, entretanto a ocorrência, as estratégias de diagnóstico laboratorial e a compreensão das vias de desenvolvimento destes distúrbios ainda não são completamente compreendidos (AGGARWAL et al., 2011; DALTON et al., 2014). Desta forma, é indicada a pesquisa laboratorial do HEV em pacientes que manifestam síndromes clínicas neurológicas e renais, concomitante ao aumento de transaminases de etiologia indeterminada (AGGARWAL, 2011; FUJIWARA et al., 2014; DALTON et al., 2014; KAMAR et al., 2015).

A hepatite E aguda não requer tratamento específico, exceto terapia de suporte, mas no caso de hepatite E crônica, para qual não há protocolo terapêutico específico, sugere-se que o monitoramento da carga viral seja acompanhado e utilizada para o ajuste/diminuição da terapia imunossupressora, em especial nos casos de pacientes transplantados, ou em quadros mais graves de manifestação da doença hepática, em que antivirais precisem ser utilizados (SCOBIE et al., 2013; FUJIWARA et al., 2014; DALTON et al., 2014).

As principais medidas de profilaxia do HEV estão relacionadas às principais vias de transmissão de vírus (MUSHAHWAR, 2008). Assim, a adoção de medidas higiênico-sanitárias a partir do tratamento adequado de água e esgoto para inibir a transmissão fecal-oral do vírus, preparo adequado de alimentos, evitando a ingestão de carne e/ou alimentos derivados de animais domésticos (principalmente suínos) e selvagens, e, imunoprofilaxia (MUSHAHWAR, 2008).

Atualmente, a vacinação apresenta distribuição geográfica restrita à China, onde desde 2012 uma vacina comercial recombinante derivada do genótipo 1 do HEV (Hecolin® - Xiamen Innovax Biotech) tem sido utilizada em seres humanos e apresenta segurança e eficácia de até 87% na imunização contra o HEV por um período de pelo menos 4,5 anos (ZHANG et al., 2015).

Estudos adicionais sobre vacina anti-HEV ainda são necessários para verificação da proteção contra outros genótipos que acometem humanos e isolados potencialmente zoonóticos detectados em reservatórios animais, bem como a duração da imunogenicidade vacinal. Porém, a vacinação pode ser uma importante medida de prevenção para populações de alto risco, como pacientes imunossuprimidos e provenientes de regiões de alta endemicidade (KAMAR et al., 2012; FUJIWARA et al., 2014; MENG, 2016).

2.2 HEV EM ANIMAIS: ASPECTOS ZOONÓTICOS, TRANSMISSÃO INTER-ESPÉCIES E MODELOS EXPERIMENTAIS

Os ensaios experimentais envolvendo PNH, e mesmo em voluntários humanos (BALAYAN et al., 1983; CHAUHAN et al., 1993), foram fundamentais para a caracterização do HEV como patógeno causador de hepatopatia à semelhança de outros vírus hepatotrópicos, tais como os vírus das hepatites A (HAV), hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV) (VITRAL et al., 1998; PURCELL; EMERSON, 2001).

Durante as décadas de 1980 e 1990 foram desenvolvidos os primeiros estudos experimentais com inóculos obtidos de amostras biológicas de humanos com ET-NANBH de áreas endêmicas (posteriormente classificados nos genótipos 1 e 2 do HEV) (VITRAL et al., 1998; YUGO et al., 2014). Primordialmente PNHs do velho mundo foram utilizados como modelos, e entre as espécies mais utilizadas e que se destacaram foram macacos rhesus (*Macaca mulatta*) e cynomolgus (*Macaca fascicularis*). A Tabela 2 apresenta os primeiros estudos de HEV utilizando PNH como modelo experimental.

De modo geral, estes estudos experimentais iniciais em PNHs fundamentaram o conhecimento das características biológicas clássicas do HEV, pois a partir de inóculos obtidos de suspensões fecais de pacientes com ET-NANBH foi possível reproduzir, na maioria dos modelos animais, o quadro clínico de hepatite aguda, similar ao observado em humanos de áreas endêmicas, ou seja, elevação de transaminases, lesões histopatológicas de hepatite aguda, viremia, excreção fecal de VLPs morfologicamente compatíveis com ET-NANBH e soroconversão específica (BALAYAN et al., 1983; SARTHOU et al., 1986; PURCELL; EMERSON, 2001).

Nas fases iniciais de caracterização da doença, a utilização de modelos experimentais correspondeu a uma tentativa de verificar a transmissão de isolados dos genótipos 1 e 2 do HEV humanos a suínos (BALAYAN et al., 1990), ratos (MANEERAT et al., 1996) e ovelhas (USMANOV et al., 1994), porém estes ensaios apresentaram resultados controversos e a eficácia destes modelos e/ou seus resultados não foram reprodutíveis em estudos posteriores (YUGO et al., 2014).

Após o sequenciamento do genoma completo do HEV (TAM et al., 1991) e caracterização de epítomos imunodominantes do capsídeo viral, testes sorológicos mais sensíveis e específicos para pesquisa do HEV puderam ser desenvolvidos (PURCELL; EMERSON, 2001). O advento de novas técnicas sorológicas de diagnóstico, possibilitaram a detecção de anticorpos anti-HEV em animais (PNH, cães, frangos e roedores) em áreas endêmicas para o vírus e com isso apontaram para a hipótese de circulação do HEV e/ou de vírus relacionados em animais (PURCELL; EMERSON, 2001; YUGO et al., 2014). A existência de isolados animais e de reservatórios e/ou hospedeiros silvestres e/ou domésticos do vírus ainda permaneceu desconhecida durante um longo período até a primeira caracterização de isolados suínos do vírus (PURCELL; EMERSON, 2001; YUGO et al., 2014).

Tabela 2 – Resumo de estudos iniciais de infecção experimental pelos genótipos 1 e 2 do HEV utilizando-se primatas não humano (PNH), durante os anos de 1980 e 1990, segundo espécie de PNH utilizada como modelo, inóculo e via de inoculação, achados clínico-laboratoriais e referências bibliográficas

(continua)

PNH utilizado como modelo experimental (espécie, n^1)	Inóculo ² (via)	Achados clínico-laboratoriais ³	Referências
Cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i> , 2)	SF 10% de voluntário humano experimentalmente com ET-NANBH (oral)	↑ transaminases, excreção de VLPs associadas à ET-NANBH, lesões histopatológicas hepáticas e anticorpos anti-ET-NANBH	Balayan et al., 1983
Macaco-verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i> , 2) e macaco patas (<i>Erythrocebus patas</i> , 1)	SF 10% de 10 pacientes com ET-NANBH da Costa do Marfim (oral)	Anticorpos anti-ET-NANBH	Sarthou et al., 1986
Cynomolgus (<i>M. fascicularis</i> , 14) e sagui-de-bigode (<i>Saguinus mystax</i> , 6)	SF 10% de 2 paciente com ET-NANBH do Paquistão e Burma; três passagens (IV)	↑ transaminases, excreção fecal de VLPs associadas à ET-NANBH, detecção de antígenos associados à ET-NANBH, lesões histopatológicas hepáticas e anticorpos anti-ET-NANBH	Bradley et al., 1987
Chimpanzé (<i>Pan troglodytes</i> , 2)	SF 10% e 8% de 2 paciente com ET-NANBH da Índia (IV)	↑ transaminases, excreção fecal de VLPs associadas à ET-NANBH, lesões histopatológicas hepáticas e anticorpos anti-ET-NANBH	Arankalle et al., 1988
Cynomolgus (<i>M. fascicularis</i> , 14)	SF 10% de 10 pacientes com ET-NANBH de Burma; três passagens (IV)	↑ transaminases, excreção fecal de VLPs associadas à ET-NANBH, lesões histopatológicas hepáticas	Soe et al., 1989
Cynomolgus (<i>M. fascicularis</i> , 29)	SF 10% de 10 pacientes com ET-NANBH de Burma e Paquistão; cinco passagens (IV)	↑ transaminases, lesões histopatológicas hepáticas, antígeno do HEV no tecido hepático, anticorpos anti-ET-NANBH	Krawczynski e Bradley, 1989
Rhesus (<i>M. mulatta</i> , 5)	SF 10% de 10 pacientes com ET-	↑ transaminases, lesões histopatológicas	Gupta et al., 1990

(continuação)

	NANBH da Índia (IV – portal)	hepáticas, excreção fecal de VLPs associadas à ET-NANBH	
Rhesus (<i>M. mulatta</i>, 16)	SF 20% de pacientes com ET-NANBH da Índia (IV)	↑ transaminases, Detecção HEV-RNA na bile e fígado, lesões histopatológicas hepáticas, excreção fecal de VLPs associadas à ET-NANBH	Jameel et al., 1992
Cynomolgus (<i>M. fascicularis</i>, 6)	SF 10% de um paciente com ET-NANBH do Paquistão (IV)	↑ transaminases, Detecção HEV-RNA no soro e fezes, anticorpos anti-HEV, excreção fecal de VLPs	Tsarev et al., 1992
Cynomolgus (<i>M. fascicularis</i>, 5) e macaco-da-noite (<i>Aotus trivirgatus</i>, 6)	SF 2% de um paciente com ET-NANBH do México, duas passagens (IV)	↑ transaminases, lesões histopatológicas hepáticas, anticorpos anti-HEV, detecção de antígeno do HEV na bile e fígado, excreção fecal de VLPs	Ticehurst et al., 1992
Rhesus (<i>M. mulatta</i>, 13)	SF 10% de um paciente com ET-NANBH do México (IV – portal)	↑ transaminases, excreção fecal de VLPs associadas à ET-NANBH, VLPs em lisados de fígado, lesões histopatológicas hepáticas	Gupta et al., 1993
Chimpanzé (<i>P. troglodytes</i>, 2), cynomolgus (<i>M. fascicularis</i>, 2), rhesus (<i>M. mulatta</i>, 2), macaco rabo-de-porco (<i>M. nemestrina</i>, 2), Macaco-verde africano (<i>C. aethiops</i>, 2), sagui-de-bigode (<i>S. mystax</i>, 2), macaco-de-cheiro (<i>Saimiri sciureus</i>, 2) e macaco-da-noite (<i>A. Trivirgatus</i>, 2)	SF 10% de pacientes com ET-NANBH do Paquistão e do México (IV)	↑ transaminases, anti-HEV IgG, excreção fecal de VLPs do HEV	Tsarev et al., 1993a
Cynomolgus (<i>M. fascicularis</i>, 6)	SF 5% de cynomolgus inoculado com isolado do México (IV)	↑ transaminases, detecção de antígeno do HEV no fígado e bile, lesões histopatológicas hepáticas e anticorpos anti-HEV	Longer et al., 1993
Cynomolgus (<i>M. fascicularis</i>, 18)	SF 10% de um paciente com ET-	↑ transaminases, detecção HEV-RNA nas fezes,	Tsarev et al.,

(conclusão)

	NANBH do Paquistão (IV e oral)	anticorpos anti-HEV	1994a
Cynomolgus (<i>M. fascicularis</i>, 10)	SF 10% de pacientes de 5 localidades da Índia (IV)	↑ transaminases, detecção de HEV-RNA na bile, anticorpos anti-HEV	Arankalle et al., 1995
Cynomolgus (<i>M. fascicularis</i>, 4)	SF 10% de um paciente com hepatite E do Chade (IV)	↑ transaminases, detecção de HEV-RNA na bile e fezes, lesões histopatológicas hepáticas anticorpos anti-HEV	van Cuyck-Gandré et al., 1998
Cynomolgus (<i>M. fascicularis</i>, 4)	Soro de dois pacientes com hepatite E dos EUA (IV)	↑ transaminases, detecção do HEV-RNA no soro e fezes e anticorpos anti-HEV	Erker et al., 1999

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: ¹n = número de animais utilizado no estudo; ²SF = suspensão fecal; IV = intravenosa; ³ ↑ = aumento.

Evidências sorológicas e moleculares, como resultados positivos de PCR para o vírus, haviam sugerido a infecção natural por HEV entre suínos de uma região endêmica no Nepal (CLAYSON et al., 1995), entretanto a descoberta dos primeiros isolados animais do HEV só foi confirmada após o sequenciamento e análise filogenética de isolados do HEV detectados em porcos de granjas comerciais no Estado de Illinois, nos Estados Unidos da América (EUA) (MENG et al., 1997).

Os primeiros isolados descobertos de HEV suíno - que posteriormente foram classificados no genótipo 3 do vírus - apresentaram identidade nucleotídica e de aminoácidos na região ORF2 variando de 79–80% e 90–92%, respectivamente, com isolados humanos (MENG et al., 1997). Devido ao fato da proximidade filogenética, grande similaridade na organização genômica e a alta prevalência de anticorpos anti-HEV entre os animais avaliados, foi levantada a hipótese de ocorrência de infecções zoonóticas e do papel de suínos como reservatórios do HEV em regiões não-endêmicas para o vírus (MENG et al., 1997).

Estudo subsequente demonstrou a transmissão experimental bem-sucedida do HEV suíno a suínos livres de patógeno específico (SPF - *specific pathogen free*) (MENG et al., 1998a). Neste experimento foi observado que os animais inoculados apresentaram viremia, excreção viral fecal e soroconversão, mesmo na ausência de aumento de transaminases ou alterações clínicas durante o acompanhamento de 10 semanas (MENG et al., 1998a).

Meng et al. (1998a) também determinaram que suínos *naïve* foram capazes de se infectar após exposição por contato direto com animais infectados no mesmo ambiente experimental, confirmando, assim, a possibilidade de manutenção da circulação do HEV em criatórios suínos por transmissão fecal-oral na ausência de sinais clínicos.

Estudos subsequentes corroboraram que a infecção em suínos ocorre de modo assintomático e que a excreção de partículas virais viáveis nas fezes de animais infectados representa a mais importante via de transmissão do vírus (HALBUR et al. 2001; LEBLANC et al. 2007; BOUWKNEGT et al. 2008).

A possibilidade de transmissão interespecíes do genótipo 3 do HEV foi confirmada após estudo experimental em que foram infectados dois macacos rhesus e um chimpanzé (em segunda passagem) com HEV suíno (MENG et al., 1998b). Todos os três símios apresentaram viremia, excreção fecal do HEV, detectada por RT-PCR, aumento de transaminases, soroconversão e lesões microscópicas de hepatite aguda (MENG et al., 1998b).

Adicionalmente, o estudo também avaliou a hipótese de infecção de suínos SPF com suspensões fecais de um macaco rhesus infectado por um isolado humano do genótipo 3 do HEV (isolado HEV-US2), detectado no soro de um paciente com hepatite E aguda nos EUA

(MENG et al., 1998b). Os suínos SPF reproduziram o quadro de infecção pelo vírus, evidenciando pela primeira vez experimentalmente a possibilidade de transmissão interespecies e de possíveis ocorrências de infecções zoonóticas pelo genótipo 3 do HEV (MENG et al., 1998b).

O caráter zoonótico dos genótipos 3 e 4 do HEV foi confirmado a partir da descrição de casos humanos de hepatite E associados ao consumo de fígados e derivados de suínos, javalis e cervos causadas por isolados filogeneticamente relacionados, detectados nos pacientes com hepatite E aguda e nas respectivas fontes de infecção animais (MATSUDA et al., 2003; TEI et al., 2003; SONODA et al., 2004; COLSON et al., 2010; MENG, 2010).

A partir da descoberta do HEV suíno, houve relevante e notória expansão na detecção e caracterização de isolados geneticamente relacionados ao HEV entre animais (MENG, 2010; 2016). Assim, além de suínos domésticos, hepevírus também foram detectados em javalis (TAKAHASHI et al., 2004; KABA et al., 2010), cervos (TAKAHASHI et al., 2004), mangustos (NAKAMURA et al., 2006), ratos (JOHNE et al., 2010), coelhos (ZHAO et al., 2009), furões (RAJ et al., 2012), morcegos (DREXLER et al., 2012), aves (HUANG et al., 2004; PERALTA et al., 2009) e peixes (BATTS et al., 2011). Porém, os suínos domésticos ainda são considerados como as principais fontes de infecção para humanos em regiões não-endêmicas e em países desenvolvidos/em desenvolvimento (HALBUR et al., 2001; DALTON et al., 2008; MENG, 2010).

A detecção de anticorpos anti-HEV em indivíduos de países industrializados e em desenvolvimento sugere que determinadas populações podem estar em contato com fontes zoonóticas de infecção desconhecida (MENG, 2010; 2016; ECHEVARRIA et al., 2013). Neste sentido, além da pesquisa de HEV entre as já descritas espécies animais, outros potenciais reservatórios domésticos e selvagens também necessitam de investigação (YOO et al., 2001; DALTON et al., 2007; HERREMANS et al., 2007).

Estudos sorológicos no Brasil indicam que populações humanas urbanas e rurais podem apresentar evidências sorológicas de exposição ao vírus (PANG et al., 1995; PARANÁ et al., 1997; GONÇALES et al., 2000; TRINTA et al., 2001; SANTOS et al., 2002) e somado ao fato de que até o momento somente isolados do genótipo 3 do HEV foram detectados em humanos, suínos e em amostras ambientais no país, sugere-se que assim como em outras regiões geográficas não endêmicas no mundo, os casos de infecção por HEV no Brasil podem estar associados à exposição a fontes zoonóticas do vírus (CLEMENTE-CASARES et al., 2003; ECHEVARRÍA et al., 2013; PAVIO et al., 2015).

Na Amazônia oriental brasileira, a circulação de isolados suínos do genótipo 3 do HEV foi confirmada em suínos abatidos para consumo humano na região metropolitana de Belém, no Estado do Pará (DE SOUZA et al., 2012). Entretanto, assim como outros estudos desenvolvidos no país e no mundo, a detecção do HEV em suínos foi baseada, predominantemente, em técnicas de sorologia e biologia molecular (PAIVA et al., 2007, DOS SANTOS et al., 2009; 2011; GARDINALI et al., 2012; LANA et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2015; HELDT et al., 2016).

Neste sentido, estudos experimentais utilizando-se PNH podem ser aplicáveis para a demonstração da infecção interespécies e potencial zoonótico de isolados HEV e também podem contribuir para o entendimento do ciclo de infecção, replicação viral, patogenia, desenvolvimento e avaliação de vacinas contra o vírus (MENG et al., 1998a, 1998b; AGGARWAL et al., 2001; PURCELL; EMMERSON, 2001; HUANG et al., 2008; YUGO et al., 2014; MENG et al., 2016). A Tabela 3 apresenta modelos experimentais aplicáveis aos estudos envolvendo isolados humanos e animais do HEV.

Estudos experimentais em fêmeas de macacos rhesus (TSAREV et al., 1995) e matrizes suínas (KASORNDORKBUA et al., 2003) prenhas falharam em reproduzir o quadro clínico de hepatite E fulminante durante a gestação, fazendo com que outros modelos experimentais aplicáveis à compreensão dos fatores envolvidos nesse quadro fulminante em grávidas precisem ser pesquisados e caracterizados (YUGO et al., 2014). Adicionalmente, modelos animais que auxiliem no entendimento dos fatores biológicos associados à patogenia, desenvolvimento e progressão da hepatite E crônica em indivíduos imunossuprimidos também precisam ser validados (YUGO et al., 2014).

Tabela 3 – Modelos animais de infecção experimental por HEV previamente descritos, segundo a susceptibilidade a isolados humanos e animais do HEV

(continua)

Modelos animais			Genótipo do HEV: fonte (Inóculo/isolado)	Suscetível?	Referências
Macacos <i>cynomolgus</i> (<i>M. fascicularis</i>)		(M.	HEV gt 1: humano (Burma, Paquistão, Sar-55)	Sim	Bradley et al., 1987; Krawczynski; Bradley, 1989; Aggarwal et al., 2001; Tsarev et al., 1993a, 1993b
			HEV gt 2: humano (Telixtac-14)	Sim	Ticehurst et al., 1992; Longer et al., 1993
			HEV gt3: suíno (Br-swine, D-swine); humano (Br-human, Ar-human, US-1, US-2); HEV de coelho (CHN-BJ-R14)	Sim	Erker et al., 1999; Carvalho et al., 2013; Liu et al., 2013
			HEV gt4: humano e suíno	Sim	Meng, 2010
			HEV de furão (F4351)	Não	Li et al., 2015
Macacos rhesus (<i>M. mulatta</i>)			HEV gt1: humano (Sar-55)	Sim	Huang et al., 2008; Tsarev et al., 1993a, 1995
			HEV gt 2: humano	Sim	Meng et al., 2010; Yugo et al., 2014
			HEV gt 3: humano e suíno (Meng)	Sim	Meng et al., 1998b; Meng et al., 2010
			HEV gt 4: humano e suíno (swGX32, wGX40)	Sim	Ji et al., 2008; Huang et al., 2008; Arankalle et al., 2006
			HEV de rato	Não	Purcell et al., 2011
			HEV aviário	Não	Huang et al., 2004
Chimpanzés (<i>Pan troglodytes</i>)			HEV gt 1: humano (SAR-55, Ahm-84, Kol-81, CH 1089, CH1128)	Sim	Tsarev et al., 1993a; Arankalle et al., 1988; McCaustland et al., 2000; Yu et al., 2010
			HEV gt 2: humano (Mex 14; Mexico 86)	Sim	Tsarev et al., 1993a; McCaustland et al., 2000
			HEV gt 3: suíno (Meng)	Sim	Meng et al., 1998b
			HEV gt 4: humano e suíno	Sim	Purcell; Emerson, 2001; Yugo et al., 2014
Macaco-verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>)			HEV gt 1: Humano (SAR-55)	Sim	Tsarev et al., 1993a
Macaco rabo-de-porco (<i>Macaca nemestrina</i>)			HEV gt 1: humano (Sar-55)	Sim	Tsarev et al., 1993a; Purcell; Emerson, 2001

(continuação)

Macacos-da-noite (<i>Aotus trivirgatus</i>)	HEV gt 1: humano (Sar-55)	Sim	Tsarev et al., 1993a
	HEV gt 2: humano (Telixtac-14)	Sim	Ticehurst et al., 1992;
Macacos-de-cheiro (<i>Saimiri sciureus</i>)	HEV gt1: humano (Sar-55)	Sim	Tsarev et al., 1993a; Yugo et al., 2014
Sagui-de-bigode (<i>Saguinus mystax</i>)	HEV gt 1: humano (Burma)	Sim	Bradley et al., 1987; Yugo et al., 2014
Suínos (<i>Sus scrofa domestica</i>)	HEV gt 1: humano	Não	Meng et al., 1998a
	HEV gt 2: humano	Não	Meng et al., 1998a
	HEV gt3: suíno (Meng), humano (US-2) e HEV de javali	Sim	Meng et al., 1998b; Halbur et al., 2001; Kasorndorkbua et al., 2003; Feagins et al., 2008; Schlosser et al., 2015; Thiry et al., 2017
	HEV gt 4: humano (TW6196E) e suíno	Sim	Feagins et al., 2008; Meng, 2010
	HEV de coelho (RC39 e USRab-14)	Sim	Cossaboom et al., 2012
	HEV de rato	Não	Cossaboom et al., 2012
	HEV aviário	Não	Yugo et al., 2014
Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>)	HEV gt 1: humano (Sar 55, Akluj-90, Kashi-87),	Não	Purcell et al., 2011
	HEV gt 2: humano (Mex14)	Não	Purcell et al., 2011
	HEV gt 3: suíno (Meng)	Não	Purcell et al., 2011
	HEV de rato	Sim	Purcell et al., 2011;
	HEV de furão (F4351)	Não	Li et al., 2015
Gerbil da Mongólia (<i>Meriones unguiculatus</i>)	HEV gt 1: humano	Sim	Hong et al., 2015
	HEV gt 4: suíno	Sim	Li et al., 2009; Yang et al., 2015
Furões (<i>Mustela putorius furo</i>)	HEV de furão (F4351)	Sim	Li et al., 2015; 2016
Coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	HEV gt1: humano (RH1)	Não	Ma et al., 2010
	HEV gt 4: humano (RH4)	Sim	Ma et al., 2010
	HEV gt 3: coelho (CHN-BJ-R14, (GDC54-18)	Sim	Ma et al., 2010; Liu et al., 2013; Xia et al., 2015
Musaranhos (<i>Tupaia belangeri</i>)	HEV suíno gt 4 (KM01)	Sim	Yu et al., 2016

(conclusão)

<i>chinensis</i>)			
Frangos (<i>Gallus domesticus</i>)	HEV gt1: human	Não	Yugo et al., 2014
	HEV gt3: suíno	Não	Yugo et al., 2014
	HEV aviário	Sim	Billam et al., 2005
Perus (<i>Meleagris gallopavo</i>)	HEV aviário	Sim	Sun et al., 2004

Fonte: (DE SOUZA, 2017).

Legenda: gt = genótipo.

Entre as alternativas aos modelos animais, a utilização de cultivos celulares tem sido aplicada em estudos virológicos (OKAMOTO, 2011). A replicação *in vitro* do HEV, assim como outros vírus hepatotrópicos, é restrita a um pequeno número de sistemas de cultura celular (OKAMOTO, 2011; 2013). Tanaka et al. (2007) avaliaram 21 linhagens de células e obtiveram replicação efetiva de um isolado humano do genótipo 3 HEV somente em células humanas PLC/PRF/5 derivadas de carcinoma hepatocelular e células A549 derivadas de câncer pulmonar. Posteriormente, foi demonstrada a replicação eficaz de um isolado humano do genótipo 4 (TANAKA et al., 2009) e isolados de suínos e javalis dos genótipos 3 e 4 nos dois sistemas de cultura celular anteriormente citados (OKAMOTO, 2013).

Assim como em modelos *in vivo*, o sucesso na replicação *in vitro* do HEV, além de depender da especificidade dos sistemas de cultura celular, está relacionada também à carga viral do inóculo e a disponibilidade e aplicação destas ferramentas (OKAMOTO, 2011; 2013; MENG, 2016). Atualmente, ainda é restrito o número de pesquisas que avaliem, principalmente, mecanismos de replicação viral em cultivos celulares (OKAMOTO, 2011; 2013; MENG, 2016). Por outro lado, adicionalmente, a descoberta de isolados animais de hepevírus com potencial zoonótico e de transmissão interespecíes ampliam a necessidade de desenvolvimento e caracterização de novos modelos animais experimentais aplicáveis às pesquisas envolvendo HEV (MENG, 2016; DOCEUL et al., 2016).

Desta forma, a caracterização de novos modelos experimentais pode, potencialmente, ter aplicação em pesquisas subsequentes relacionados à infecção inter-espécies, patogenicidade, virulência, patogenicidade, replicação e avaliação clínico-laboratorial associados a infecções por isolados humanos e animais do HEV (YUGO et al., 2014).

Primatas neotropicais (PN) do gênero *Aotus*, popularmente conhecidos como “macacos-da-noite”, têm sido utilizados em estudos experimentais de reprodução, pesquisas oftalmológicas e também como modelo de doenças infecciosas, como malária e leishmaniose (BRODERSON et al., 1986; COLLINS, 1994). Os macacos-da-noite são os únicos PN com hábitos noturnos e apresentam ampla distribuição geográfica na América Latina, do Panamá até o norte da Argentina (WRIGHT, 1994; MENEZES et al., 2010).

Avaliações taxonômicas clássicas indicam que primatas do gênero *Aotus* possuam pelo menos 11 cariótipos (identificados numericamente de I-XI) e podem ser divididas, fenotipicamente, em dois grandes grupos de acordo com características de pelagem: macacos-da-noite “grey neck” e “red neck” (BAER et al., 1994). Não há um consenso sobre o número de espécies no gênero, entretanto avaliações moleculares recentes indicam a existência de pelo menos 11 espécies e a sugeriram a reclassificação da espécie *A. azarai infulatus* (KHUL,

1820) como *A. infulatus* (MENEZES et al., 2010). No nosso estudo optamos por manter a classificação da espécie como *A. azari infulatus*.

Historicamente, o gênero *Aotus* também foi utilizado em diversos estudos de caracterização de infecção experimental pelo vírus da hepatite A (LEDUC et al., 1983; KEENAN et al., 1984; ASHER et al., 1995).

A espécie *Aotus azarai infulatus* é comumente utilizada como modelo em pesquisas biomédicas no Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS/MS) (MONTEIRO et al., 2009; COUTINHO et al., 2011; TAKESHITA et al., 2011; LINS et al., 2012; MAYOR et al., 2015) e a utilização da espécie no presente estudo foi baseada no registro prévio da susceptibilidade de infecção por isolado humano do genótipo 2 do HEV em macacos-da-noite da espécie *A. trivirgatus* (TICEHURST et al., 1992). Adicionalmente, autores indicaram o uso do macaco-da-noite como modelo adequado para aplicação em estudos de transmissão interespecies do HEV (YUGO et al., 2014) baseados em estudos prévios com esta espécie que reproduziram com sucesso a infecção experimental por HEV (TICEHURST et al., 1992; TSAREV et al., 1993a).

Até o momento, PN foram utilizados somente em estudos experimentais de infecção por HEV por isolados humanos (genótipos 1 e 2) e apesar de macacos-da-noite (*A. trivirgatus*) e macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) demonstrarem susceptibilidade experimental (TICEHURST et al., 1992; TSAREV et al., 1993a), modelos com PN relacionados à infecção por isolados de genótipos 3 e 4 do HEV ainda não foram caracterizados. Neste sentido, a presente pesquisa avaliou pela primeira vez a susceptibilidade de macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) a um isolado suíno do genótipo 3 do HEV com a finalidade de avaliar o potencial de utilização da espécie como modelo de infecção experimental para o HEV.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Contribuir com o diagnóstico laboratorial de infecção pelo HEV a partir do desenvolvimento e aplicação de um protocolo de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) para pesquisa molecular do vírus e contribuir com a compreensão da infecção interespecies do genótipo 3 suíno do HEV avaliando a utilização de primata neotropical como modelo experimental e diferentes vias de infecção.

3.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver um protocolo de RT-qPCR que possa ser aplicado na detecção e quantificação do HEV em amostras biológicas;
- Aplicar o protocolo de RT-qPCR para determinação da prevalência de HEV em casos humanos suspeitos de hepatite E da Amazônia oriental brasileira por meio da pesquisa retrospectiva de HEV-RNA em amostras de soro, em associação com a determinação sorológica de anticorpos anti-HEV IgM e IgG;
- Reproduzir experimentalmente a infecção pelo genótipo 3 suíno do HEV por via intravenosa e oral em macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*);
- Caracterizar e comparar a detecção do HEV-RNA e dinâmica de infecção em amostras biológicas de soro e fezes em macacos-da-noite nas condições experimentais;
- Pesquisar e comparar a detecção de anticorpos anti-HEV IgM e IgG em macacos-da-noite nas condições experimentais;
- Descrever e comparar as alterações clínicas, bioquímicas, hematológicas, ultrassonográficas, histopatológicas hepáticas de macacos-da-noite nas condições experimentais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seção de Materiais e Métodos foi subdividida de acordo com as duas etapas do estudo:

- 1) Desenvolvimento de protocolo de RT-qPCR para pesquisa do HEV-RNA em amostras biológicas e aplicação no diagnóstico molecular em associação a detecção de anticorpos anti-HEV IgM e IgG em casos humanos suspeitos de hepatite E; e
- 2) Estudo experimental em macacos-da-noite com isolado do genótipo 3 suíno do HEV.

4.1 ETAPA 1 - DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE RT-qPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HEV-RNA E APLICAÇÃO NA ANÁLISE RETROSPECTIVA DE CASOS SUSPEITOS DE HEPATITE E EM HUMANOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL BRASILEIRA

O diagnóstico de HEV em amostras biológicas de pacientes suspeitos ou em caso de pesquisa de novos hospedeiros requer o uso de ferramentas diagnósticas sorológicas ou moleculares disponíveis no mercado ou desenvolvidas no próprio laboratório (*in house*) que precisam ser padronizados e/ou utilizadas em associação para obtenção de melhor sensibilidade e especificidade diagnóstica.

Neste sentido, a padronização e aplicação de método RT-qPCR para detecção e quantificação de HEV-RNA associada a método sorológico foi objeto de estudo. Após a validação do protocolo de RT-qPCR, este foi aplicado na detecção HEV-RNA em amostras de soros e também no estudo experimental correspondente a etapa 2.

A etapa 1 foi desenvolvida junto a Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS), Bélem, PA.

4.1.1 Montagem da curva padrão e desenvolvimento de ensaios de RT-qPCR para pesquisa do HEV-RNA

A pesquisa quantitativa do HEV-RNA foi desenvolvida por RT-qPCR e as reações foram desenvolvidas utilizando-se QuantiFast® Pathogen RT-PCR + IC kit (QIAGEN), segundo as orientações do fabricante, em volume de reação de 25 µL, contendo 2 µL de RNA das amostras, *primers* e sonda do tipo TaqMan® descritos por Garson et al. (2012) nas concentrações finais de 0,4 µM e 0,2 µM, respectivamente (Tabela 4). A detecção de fluorescência de amplificação do HEV-RNA foi desenvolvida pelo canal verde do termociclador. O controle interno de RNA do kit foi incluído nos ensaios como controle da etapa de transcrição reversa, com detecção pelo canal amarelo de fluorescência do termociclador.

Tabela 4 – *Primers* e sonda utilizados na clonagem e amplificação do HEV-RNA por RT-qPCR

Identificação dos <i>primers</i> e sonda	Sequência (5'- 3')
JHEV-F (<i>Forward</i>)	GGTGGTTTCTGGGGTGAC
JHEV-R (<i>Reverse</i>)	AGGGGTTGGTTGGATGAA
JHEV-P (<i>Probe</i>)	FAM – TGATTCTCAGCCCTTTGC –BHQ

Fonte: (GARSON et al., 2012, adaptado por DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Os ensaios de RT-qPCR foram desenvolvidos em termociclador Rotor-gene Q (QIAGEN) de acordo com o programa: 20 min a 50°C (etapa de RT); 5 min a 95°C (ativação de PCR); e 45 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95°C e anelamento/extensão por 30 segundos a 60°C.

A montagem da curva padrão foi desenvolvida a partir da clonagem de uma amostra de fezes suína, previamente testada e positiva para o genótipo 3 do HEV (DE SOUZA et al., 2012) que o laboratório detinha e disponibilizou para utilização. Os kits TOPO® TA Cloning (Thermo Fisher scientific) e TOPO® One ShotTOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher scientific) foram empregados na etapa de clonagem.

4.1.2 Casuística

Foram avaliadas amostras de soro de 318 pacientes ($n = 318$), coletadas de outubro de 1993 a agosto de 2014, atendidos pela Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas (SAHEP/IEC/SVS/MS), laboratório de referência regional em hepatites no norte do Brasil, localizado na cidade de Belém, Pará, Brasil. As informações demográficas dos pacientes foram obtidas do sistema de banco de dados utilizados na SAHEP/IEC. As amostras foram armazenadas a -20°C desde a coleta. O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (CAAE: 141414.3.0000.0019).

Dados referentes aos exames sorológicos e moleculares para diagnóstico de hepatites virais A (HAV), B (HBV), C (HCV), Delta (HDV) e E dos pacientes foram obtidos no banco de dados do serviço. Os critérios de seleção das amostras foram: 1) resultados positivos ou inconclusivos para hepatite E em testes sorológicos prévios ($n = 158$); 2) pacientes com hepatite aguda clínica e/ou laboratorial de etiologia indeterminada ou negativos para as hepatites A, B, C e Delta ($n = 114$); 3) pacientes com demanda específica para o diagnóstico laboratorial de hepatite E ($n = 46$).

4.1.3 Detecção sorológica do HEV

Todas as amostras de soro foram submetidas à testes sorológicos de detecção de anticorpos anti-HEV IgM e IgG por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se os kits *RecomWell*[®] HEV IgM (Mikrogen) e *RecomWell*[®] HEV IgG (Mikrogen) e, posteriormente, amostras com resultados positivos nestes foram submetidas a confirmação pelo teste immunoblot recombinante (RIBT) com o kit comercial *RecomLine*[®] HEV IgM/IgG (Mikrogen).

Os kits foram utilizados de acordo com as orientações dos fabricantes e esses contêm antígenos recombinantes da região ORF2 dos genótipos 1 e 3 do HEV (*RecomWell*[®] HEV para IgM e para IgG) e antígenos recombinantes da ORF2 e ORF3 dos genótipos 1 e 3 (*RecomLine* HEV IgM/IgG).

4.1.4 Pesquisa de HEV-RNA em amostras de soro humanas suspeitas de hepatite E

As 318 amostras de soro foram submetidas individualmente à extração de RNA total pelo método fenol/clorofórmio/isotiocianato de guanidina a partir de um volume de 250 µL de soro com a utilização do reagente Trizol LS (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído permaneceu congelado (-70 °C) até subsequente utilização nos testes moleculares descritos no item 4.1.1.

Os ensaios foram desenvolvidos com a aplicação da curva padrão (10^9 - 10^0) em duplicata, para quantificação absoluta das amostras testadas, além da adição de uma amostra *no template control* (NTC), para verificação de contaminantes dos reagentes, controle negativo (CN), para certificação da especificidade, e de um controle positivo - CP (HEV suíno), para verificação da eficácia da reação.

Adicionalmente, durante os ensaios também foram incluídos nos testes o *1st World Health Organization International Standard (WHO IS) for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT) - Based Assays* (Paul-Ehrlich Institut, Germany) contendo 250,000 UI/mL do HEV-RNA (genótipo 3a), submetido à extração por método automatizado utilizando o kit EZ1® virus mini kit v2.0 (QIAGEN), no equipamento automatizado EZ1 após reconstituição em água livre de nuclease e em quatro diluições seriadas (1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000).

4.1.5 Análise estatística

Os dados descritivos demográficos e das análises foram apresentados segundo média e desvio padrão em tabelas. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® 6.07 utilizando-se o teste de X^2 com correção de Yates e regressão linear. Foi adotado um intervalo de confiança de 95% ($p < 0.05$).

4.2 ETAPA 2 - ESTUDO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR GENÓTIPO 3 SUÍNO DE HEV EM MACACOS-DA-NOITE

Modelos experimentais em PNH apresentam relevância para compreensão de características virológicas e moleculares do agente, além dos achados clínico-laboratoriais e histopatológicos associados à infecção pelo vírus, mas, no presente, não há um modelo estabelecido com PN para estudos envolvendo os genótipos 3 e 4 do HEV.

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade da utilização da espécie *Aotus azarai infulatus* como modelo experimental aplicável a estudos com HEV e, desta forma, reproduzir a infecção por diferentes vias de inoculação e avaliar e comparar os achados clínicos, hematológicos, bioquímicos séricos, ultrassonográficos e histopatológicos hepáticos associados à infecção.

A execução do projeto de pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo nº 2945/2013), conforme prevê a Lei nº 11.794 de oito de outubro de 2008, bem como pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, do Ministério do Meio Ambiente (parecer nº 37718-1). O estudo de experimentação foi desenvolvido no Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS/MS) localizado em Ananindeua, Pará entre os dias 23 de novembro de 2015 a 2 de março de 2016.

4.2.1 Inóculo

O inóculo de HEV utilizado foi obtido de amostra de fezes de suíno infectado naturalmente pelo genótipo 3 do vírus, previamente descrita no Estado do Pará (DE SOUZA et al., 2012). A amostra consistiu no isolado AS8098 – código de acesso no GenBank JN983198 - que estava armazenada a -70°C e foi utilizada para obtenção de solução a 10% (peso/volume) a partir de diluição em PBS, pH 7,4 (REYES et al., 1990; MENG et al., 1998a, 1998b; AGGARWAL et al., 2001; JI et al., 2008; LI et al., 2009). Após homogeneização em vórtex, a suspensão foi clarificada por centrifugação durante 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C, posteriormente o sobrenadante foi retirado e as alíquotas de 1 mL foram armazenadas a –

70°C até utilização. A quantificação do inóculo por RT-qPCR indicou que o mesmo apresentava carga de 1×10^3 cópias/mL. Os controles negativos foram inoculados com 1mL da mesma solução de PBS, pH 7,4.

4.2.2 Critérios de seleção e manejo geral dos animais

Os critérios de seleção dos macacos-da-noite foram: 1) machos adultos, nascidos e criados no CENP; 2) ausência de alterações clínicas e com parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos dentro da faixa de normalidade (BAER, 1994; TAKESHITA et al., 2011); 3) fígado com aspecto normal por avaliação ultrassonográfica, segundo parâmetros caracterizados de estudo prévio desenvolvido na colônia (TAKESHITA et al., 2011); 4) os animais apresentaram negatividade para endoparasitas por exames coproparasitológicos em duas amostras sequenciais, por métodos de rotina utilizados no CENP (MONTEIRO et al., 2009); 5) sorologia negativa para anti-HEV IgM e IgG por ELISA; 6) negatividade para HEV-RNA em amostras de soro e fezes por RT-qPCR pesquisados em duplicata; 7) negatividade molecular para outros vírus presumidamente hepatotrópicos relacionados ao vírus da hepatite A (*Hepatovirus A*) (DREXLER et al., 2015), B (*Orthohepadnavirus*) (DREXLER et al., 2013) e C (*Hepacivirus*) e *Pegivirus* (KAPOOR et al., 2013) por técnicas de nested RT-PCR/nested PCR.

Os oito *Aotus* ($n = 8$) selecionados foram aleatoriamente divididos em dois grupos, segundo a via de inoculação: grupo 1, via intravenosa e grupo 2, via oral. A distribuição dos animais segundo a identificação e grupos está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição e identificação de macacos-da-noite infectados experimentalmente por genótipo 3 suíno do HEV, de acordo com dados de peso, idade e grupos de experimentação

Identificação Animal	Idade (anos)	Peso inicial (kg)	Grupo
BBO	8	1,30	1 (intravenoso)
BCP	5	1,25	
AH-06/10	5	1,11	
BBF	10	1,03	
BCJ	6	1,03	2 (oral)
AKC	15	1,9	
BAZ	10	1,72	
AH-05/13	2	0,96	
Média e desvio padrão	$7,6 \pm 3,7$	$1,19 \pm 0,24$	

Fonte: (DE SOUZA A. J. S., 2017).

Os animais selecionados foram ambientados no galpão de experimentação do CENP por período de três semanas antes do início do experimento. Neste galpão os animais foram mantidos em gaiolas de contenção individuais de aço inoxidável medindo 80x90x80 cm (Figura 5) com fundo retrátil, ornamentadas com galhos e caixa para ninho e em condições de temperatura, ventilação e umidade naturais, ou seja, fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura média de 25°C (mínima de 22°C e máxima 32°C) e umidade relativa do ar de aproximadamente 85% (MONTEIRO et al., 2009).

As diretrizes de trabalho obedeceram aos critérios e procedimentos de biossegurança da legislação vigente (BRASIL, 2010a). Todas as atividades de experimentação e análises laboratoriais foram desenvolvidas no nível de biossegurança 2, pois o HEV é um agente biológico de classe de risco 2 (BRASIL, 2010b). Foram adotadas medidas de desinfecção e diretrizes operacionais utilizadas para agentes biológicos desta classe de risco, que incluem os procedimentos de desinfecção utilizados para outras hepatites virais (BRASIL, 2010a).

O acesso aos animais foi restrito aos tratadores e membros da equipe do projeto. As fezes e os resíduos coletados das bandejas retráteis das gaiolas individuais foram descartados após desinfecção química com solução de hipoclorito de sódio (>5000 ppm) diariamente (MBITHI et al., 1990).

O manejo alimentar utilizado seguiu o preconizado e adotado no CENP, no qual os animais são alimentados diariamente com *mix* de frutas, legumes e verduras (incluindo itens como abacate, abacaxi, alface, banana prata, batata doce, beterraba, laranja, manga, mamão, maracujá, mastruz, melão, uva, semente de girassol, feijão verde e ovos de codorna cozidos) e ração para primatas neotropicais contendo 18% de proteína bruta (Cebidae P18[®] - Megazoo), suplementos vitamínicos e minerais em água *ad libitum* (TAKESHITA et al., 2011).

Figura 5 – Gaiolas individuais no interior do galpão de experimentação do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS/MS), Ananindeua, Brasil

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

4.2.3 Delineamento experimental e acompanhamento pós-infecção

O delineamento experimental foi apresentado na Figura 6. Os oito espécimes de macacos-da-noite, após ambientação e formação dos grupos e inoculação, foram acompanhados por 12 semanas. Seis animais foram inoculados com a solução obtida da amostra positiva para HEV: três pela via intravenosa (grupo 1) e três por via oral (grupo 2). Os dois macacos-da-noite controles negativos foram inoculados com 1mL de solução PBS, pH 7,4, sendo um por via oral e um por via intravenosa.

Durante as 12 semanas de experimentação os oito animais foram avaliados semanalmente, submetidos a exame físico e coleta de amostras biológicas (sangue e fezes) para exames bioquímicos séricos, hematológicos, sorológicos anti-HEV IgM e IgG e detecção molecular de HEV-RNA por RT-qPCR. Na semana 0 (S0) e a cada quatro semanas (semanas S4, S8 e S12), além da avaliação anteriormente citada, os animais foram também submetidos a exames ultrassonográficos e procedimentos de biópsia percutânea ecoguiada para coleta de fragmentos hepáticos que, posteriormente, foram utilizados para avaliação histopatológica e imunohistoquímica de pesquisa do antígeno viral.

Figura 6 – Delineamento experimental de infecção em macacos-da-noite por genótipo 3 suíno do HEV

Fonte: (Adaptado de <http://www.planet-mammiferes.org/> por DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: S = semana; • = Exame físico, bioquímica sérica e hematologia, sorologia anti-HEV IgM e IgG, RT-qPCR HEV no soro e fezes; ‡ = Exame físico, bioquímica sérica e hematologia, sorologia anti-HEV IgM e IgG, RT-qPCR HEV no soro e fezes, ultrassonografia e biópsia hepática percutânea ecoguiada.

4.2.4 Exame físico e coleta de amostras

Semanalmente, os animais foram examinados fisicamente sob contenção química obtida com associação de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam (Zoletil[®], Virbac) na dose de 0,15 mL/kg/IM. O exame físico avaliou parâmetros de temperatura retal, aspectos das fezes, turgor cutâneo (avaliado com os escores 1 = desidratação até 5%; 2 = desidratação discreta, 5-6%; 3 = desidratação moderada, 6-8%; 4 = desidratação intensa = 10-12%), peso, palpação abdominal, avaliação de coloração de mucosas e auscultação cardiorrespiratória. Os resultados de cada parâmetro foram comparados quanto a frequência de ocorrência intra e intergrupos 1 e 2 em relação às semanas S0 e S12.

As amostras de sangue foram coletadas por meio da punção da veia femoral (Figura 7) após exame o exame físico de cada animal.

Figura 7 – Coleta de sangue por punção da veia femoral Macaco-da-noite (*Aotus inflatus*)

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Cada amostra de sangue com volume aproximado de 3 – 4 mL foi dividida em duas alíquotas: sangue total, armazenado em tubos contendo EDTA (cerca de 1 mL), que foi utilizado para realização de hemograma; e o restante, transferido para tubo com gel ativador para centrifugação e obtenção de soro, que foi posteriormente utilizado nos testes bioquímicos séricos (cerca de 500 µL), sorológicos (aproximadamente 600 µL) e de biologia molecular (aproximadamente de 600 µL). As alíquotas para sorologia e biologia molecular permaneceram armazenadas em -70°C até análise. As amostras de fezes frescas foram colhidas semanalmente do fundo das gaiolas de cada animal e foram armazenadas em frascos coletores universais e acondicionadas em -70°C até as análises.

4.2.5 Pesquisa de HEV-RNA por RT-qPCR

O RNA total de cada amostra de soro foi extraído com auxílio do kit QIAamp Viral RNA[®] mini kit (QIAGEN), utilizando-se um volume de 140 µL por amostra. Os procedimentos seguiram as recomendações dos fabricantes e o RNA foi eluído em volume final de 60 µL.

Para extração do RNA viral das amostras de fezes, primeiramente essas foram diluídas em suspensão a 10% (peso/volume) em água livre de nucleases e incubadas *overnight* de 5 a 8°C (DE SOUZA et al., 2012). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para extração de RNA utilizando o kit RNeasy® mini kit (QIAGEN) e eluído em volume final de 30 µL. Tanto o RNA das amostras de soro, quanto de fezes, permaneceram armazenados a -70°C até utilização nos testes moleculares.

O RNA de todas as amostras de soro e fezes foram testados individualmente, em duplicata, por protocolo de *one-step* RT-qPCR para detecção e quantificação da carga viral das amostras utilizando-se os *primers* e sonda do tipo TaqMan® previamente descritos como por Garson et al. (2012) (Tabela 2).

As reações de RT-qPCR foram desenvolvidas com auxílio do QuantiFast® Pathogen RT-PCR + IC kit (QIAGEN) em volume de reação de 25 µL/amostra: 5X QuantiFast Pathogen Master Mix 5 µL; 100x QuantiFastPathogen RT Mix 0,25; JHEV-F (8 µM) 1 µL; JHEV-R (8 µM) 1 µL; JHEV-P (4 µM) 0,5 µL; 10x *Internal control assay*; 10x *Internal control RNA*; H₂O 10,25 µL; 2 µL de RNA da amostra, curva padrão e controles.

As reações de termociclagem foram desenvolvidas no Rotor-gene® Q (QIAGEN) e submetidas ao seguinte programa de termociclagem: 20 min a 50°C (etapa de RT); 5 min a 95°C (Ativação de PCR); e 45 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95°C e anelamento/extensão por 30 segundos a 60°C.

Em todos os ensaios foi incluída uma curva padrão (10^9 - 10^0 cópias/mL), aplicada em duplicata, para quantificação das amostras testadas, além da adição de uma amostra *no template control* (NTC), para verificação de contaminantes dos reagentes, controle negativo (CN), para certificação da especificidade, e controle positivo HEV suíno – (CP), para verificação da eficácia da reação. O controle da etapa de transcrição reversa foi avaliado a partir da amplificação do RNA controle interno proveniente do kit de RT-qPCR.

Os resultados das reações de amplificação para o HEV foram analisados no *software* Rotor Gene Q® 2.3 a partir de quantificação absoluta nas amostras positivas, que apresentaram curvas de amplificação com aspecto sigmoide. As análises do *software* também determinaram os coeficientes de eficiência e reprodutibilidade das reações, que apresentaram valores adequados nos ensaios, portanto validando os testes.

O critério definidor de infecção foi a detecção do HEV-RNA em pelo menos uma amostra de soro e/ou fezes em duplicata. Os valores individuais de carga viral das amostras foram apresentados em média entre as duplicatas. Os resultados de frequência de detecção viral e a carga viral foram comparados intra e intergrupos 1 e 2, segundo as semanas do

experimento e também foram analisados em relação aos parâmetros clínicos, laboratoriais, ultrassonográficos e histopatológicos.

4.2.6 Pesquisa sorológica de anticorpos anti-HEV IgM e IgG

As amostras de soro obtidas durante o período de experimentação foram testadas individualmente por kits comercial *RecomWell*[®] HEV IgM (Mikrogen) e *RecomWell*[®] HEV IgG (Mikrogen) para a pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG (ZHANG et al., 2003; LIU et al., 2013). Estes kits são baseados no princípio de ELISA indireto com antígenos recombinantes da ORF2 e dos genótipos 1 e 3 do HEV e os ensaios foram desenvolvidos e os resultados foram interpretados segundo as orientações do fabricante.

Alíquotas de 10 µL de cada amostra, do controle positivo, do controle negativo e do controle *cut-off* foi diluído em 1 mL de tampão de diluição. Cem microlitros das amostras e controles diluídos foram transferidos para os poços da microplaca de ELISA, a qual foi incubada em câmara úmida a 37°C por uma hora. Após esta etapa, a placa foi lavada adicionando-se 300 µL por poço com solução de lavagem pronta para uso. Posteriormente, foi adicionado a cada poço 100 µL de conjugado com peroxidase e a placa foi novamente incubada por 30 minutos a 37°C. Após novo procedimento de lavagem, foram adicionados 100 µL de solução de substrato em cada poço e a placa ficou a temperatura ambiente por 30 minutos. Para interromper a reação, 100 µL de solução de bloqueio foram adicionados. A placa de ELISA foi lida em espectrofotômetro utilizando filtro de 450 nm e 630 nm de referência.

As amostras que apresentaram valores de densidade óptica acima da média do valor de *cut-off* foram consideradas positivas e aquelas que apresentaram valores abaixo deste valor médio foram consideradas negativas. Amostras com valores de densidade em uma faixa de 20% acima do valor de *cut-off* foram consideradas como inconclusivas. Os resultados foram analisados descritivamente entre e intra grupos 1 e 2 em relação as semanas S0 e S12.

4.2.7 Exames bioquímicos séricos e hematológicos

A avaliação bioquímica sérica em equipamento automatizado COBAS Integra 400 Plus® (Roche) e as análises hematológicas (contagem de hemácias, leucócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas, determinação de hematócrito e níveis de hemoglobina) foram realizadas em sistema automatizado CellDyn Rubi® (Abbott). Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamilttransferase (GGT), bilirrubina total (BT) e bilirrubina direta (BD), proteínas totais (PT), albumina, globulina, colesterol, triglicerídeos, ureia e creatinina. Para avaliação, foram adotados valores de referência previamente descritos para macacos-da-noite (BAER et al., 1994; TAKESHITA et al., 2011) e os valores basais de cada animal obtidos na S0. Os resultados quanto a frequência de ocorrência (0 = sem alteração; 1 = com alteração) de desvio dos valores basais e/ou dos valores obtidos nos controles e valores de normalidade foram comparados entre e intra os grupos 1 e 2 em relação as semanas.

4.2.8 Avaliação ultrassonográfica e procedimentos de biópsias hepáticas

As avaliações ultrassonográficas abdominais dos macacos-da-noite foram realizadas com o equipamento MyLab30Vet® (Esaote) utilizando transdutor linear 10-18 MHz. Adicionalmente, a ultrassonografia foi utilizada para guiar o procedimento de biópsia percutânea, ambos procedimentos foram realizados no ambiente cirúrgico da clínica veterinária do CENP.

Para a avaliação ultrassonográfica, os animais foram submetidos a jejum prévio mínimo de 12 horas e submetidos à contenção química com a associação de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam (Zoletil®, Virbac) na dose de 0,2 mL/kg/IM e, posteriormente, encaminhados ao centro cirúrgico do Setor de Clínica Veterinária do CENP, onde foram submetidos à anestesia geral inalatória com isoflurano em sistema aberto com auxílio de máscara.

Sob anestesia geral, os macacos-da-noite foram submetidos a tricotomia ampla da região abdominal e antissepsia da região com álcool iodado (10%). O exame

ultrassonográfico permitiu a avaliação qualitativa de parênquima e volume do fígado quanto: às alterações do padrão de ecogenicidade (0 = parênquima sem alteração; 1 = parênquima hiperoecogênico; 2= parênquima hipoecogênico), ao volume (0 = fígado com tamanho normal; 1 = fígado aumentado; 2 = fígado reduzido), a observação de lesão nodular focal (~ 2mm) no parênquima (0 = ausência; 1 = presença). A vascularização do parênquima e da vesícula biliar também foram avaliadas (0 = normal; 1 = diminuída; 2 = distendida). Os resultados foram comparados entre e intra os grupos 1 e 2 em relação aos períodos S0, S4, S8 e S12.

Após avaliação ultrassonográfica foi realizada biópsia de fragmento hepático com a utilização de cânulas tipo tru-cut (18G) acopladas à pistola semiautomática modelo PROMAG 2.2 (Figura 8). Os animais foram monitorados por um período mínimo de 6 horas em gaiolas de observação para verificar intercorrências relacionadas à anestesia e ao procedimento. Durante o monitoramento, os animais receberam medicação analgésica com cloridrato de tramadol (Tramal[®]) na dose 1 mg/kg/IM em uma única aplicação.

Figura 8 – Procedimento de biópsia hepática percutânea ecoguiada em exemplar de macaco-da-noite em ambiente cirúrgico

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

4.2.9 Avaliação histopatológica hepática

A avaliação histopatológica foi realizada nas amostras de fígado obtidas nas semanas S0, S4, S8 e S12 após inoculação (PI). Os fragmentos hepáticos foram fixados em solução de formalina a 10% tamponada por, no mínimo, de 24 h. Foi utilizada técnica padrão de processamento de amostras de tecido para análises microscópicas com inclusão em parafina e cortes em 5 µm que foram corados por hematoxilina-eosina, Perls e picrossírios. O exame

histopatológico das lâminas foi realizado por dois observadores que desconheciam a identificação de cada animal/grupo e foi realizada em microscopia de luz, no microscópio Eclipse Ni-U (Nikon, Japão) nos aumentos de 40, 100, 200 e 400x. As alterações foram fotodocumentadas utilizando câmera digital DS3 acoplada ao microscópio (Nikon, Japão).

O fragmento de fígado foi tido como adequado quando apresetou 0-4 espaços-porta e 2 a 3 campos por microscópio no aumento de 10x. Os parâmetros histopatológicos analisados foram a ocorrência de esteatose, balonização, inflamação (lobular, portal, interface, em ductos biliares e siderogranulomas), hemossiderose, necrose (focal lobular ou em saca bocado) e fibrose. A avaliação microscópica foi semiquantitativa na escala de 0 a 3 segundo as definições consideradas no Quadro 1. A somatória dos escores por lesões definiu o grau de lesão histopatológica de cada animal nas semanas S0, S4, S8 e S12. O grau de lesão histopatológico foi comparado entre e intra os grupos 1 e 2 nas semanas e, para tanto, quando a somatória foi ≤ 2 o grau histopatológico foi considerado 0 (zero) – sem alterações, 3-5, 1 – alterações mínimas; 6-8, 2 alterações discretas e ≥ 9 , 3 alterações moderadas.

Quadro 1 – Parâmetros e escores de avaliação histopatológica de lesões hepáticas em macacos-da-noite experimentalmente infectados pelo genótipo 3 suíno do HEV

(continua)

Parâmetro	Definição	Escore
Esteatose	Avaliação em aumento pequeno e médio do parênquima	
Graduação	<5%	0
	5-33%	1
	>33-66%	2
	>66%	3
Localização	Padrão de distribuição predominante	
	Zona 3	0
	Zona 1	1
	sem zoneamento	2
	panacinar	3
esteatose microvesicular	Padrão contínuo	
	Ausência	0
	Presença	1
Balonização	Avaliação em aumento pequeno e médio do parênquima	
Graduação	<5%	0
	5-33%	1
	>33-66%	2
	>66%	3
localização	Padrão de distribuição predominante	
	Zona 3	0
	Zona 1	1
	Sem zoneamento	2
	panacinar	3
Hemossiderina	Ausência a < 5%	0
	5-33%	1
	>33-66%	2
	>66%	3
Inflamação		
lobular (focos de inflamação predominantemente lobular)	Ausência	0
	<2 focos por objetiva de 10x	1
	2-4 focos por objetiva de 10x	2
	>4 focos por objetiva de 10x	3
portal (linfócitos, plasmócitos, histiócitos e neutrófilos)	Ausência	0
	Discreta, em alguns ou todos os espaços porta	1
	Moderada, em alguns ou todos os espaços porta	2
	Marcante, em todos os espaços porta	3
hepatite de interface (necrose <i>piecemeal</i>)	Ausência	0
	Discreta, em alguns ou todos os espaços porta	1
	Moderada, em alguns ou todos os espaços porta	2
	Marcante, em todos os espaços porta	3
Colangite	Ausência	0
	Discreta em alguns ductos	1
	Moderada em alguns ou todos os ductos	2
	Marcante em todos os ductos	3
siderogranulomas (agregados de histiócitos associados a pigmentos de	Ausência	0
	<2 focos por objetiva de 10x	1
	2-4 focos por objetiva de 10x	2
	>4 focos por objetiva de 10x	3

(conclusão)

hemossiderina)		
Necrose		
Focal lobular	Ausência	0
	<2 focos por objetiva de 10x	1
	2-4 focos por objetiva de 10x	2
	>4 focos por objetiva de 10x	3
Interface/em Saca bocado	Ausência	0
	Discreta, em alguns ou todos os espaços porta	1
	Moderada, em alguns ou todos os espaços porta	2
	Marcante, em todos os espaços porta	3
Fibrose		
	Ausência	0
	Perisinusoidal ou periportal	1
	Discreta em zona 3, perisinusoidal	1 A
	Moderada em zona 3, perisinusoidal	1 B
	Portal/ periportal	1 C
	Perisinusoidal e periportal/ portal	2
	Fibrose em ponte	3

Fonte: (Adaptado de ISHAK et al., 1995 e KLEINER et al., 2005, por DE SOUZA, A. J. S, 2017).

4.2.10 Pesquisa imunohistoquímica de antígenos de HEV

Os cortes histológicos hepáticos de 5µm em lâminas silanizadas (adesive slides®, Knitell) foram desparafinados em dois banhos de xilol a temperatura ambiente durante 30 e 20 minutos, respectivamente. Posteriormente, foram hidratados em sequência decrescentes de etanol e lavados com água corrente por 10 minutos e PBS (pH 7,4) por 5 minutos, seguida por incubação em hidróxido de amônia 25% e lavadas em água corrente por 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena em câmara escura foi realizado com duas incubações em peróxido de hidrogênio 3% por 15 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas com água corrente por 5 a 10 minutos e PBS (pH 7,4) por 5 minutos.

A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato 10 mmol, pH 6,0, pré-aquecido em banho-maria a 95°C por 20 minutos. Em seguida, foram feitas lavagens em água corrente, água destilada e mantidas em PBS até etapa subsequente. O bloqueio de sítios de proteína inespecíficos utilizou leite desnatado 10% (leite Molico™, Nestlé) a temperatura ambiente. A incubação dos fragmentos com o anticorpo primário, em câmara úmida, *overnight*, usou o anticorpo *polyclonal rabbit Anti-Hepatitis E Virus ORF3* (bs-0212R, BIOSS, EUA), obedecendo uma diluição de 1:60 em albumina sérica bovina (BSA) 1%.

No dia seguinte, a incubação do anticorpo secundário e do terciário do kit NovoLink polymer (Novolink™ Detection Systems, Leica, United Kingdom), foram realizadas nas etapas subsequentes por 30 minutos a 37°C cada. A reação imune foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina 0,03% (DAB, 3,3' – diaminobenzidine, Sigma-Aldrich, USA) acrescida de 1,2 mL de peróxido de hidrogênio 3%. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados e montados com resina histológica neutra.

Os controles positivos das reações foram cortes histológicos de fígado de suínos positivos para HEV por *nested* RT-PCR (DE SOUZA et al., 2012) e como controle negativo os mesmos cortes de fígado de suínos sem a etapa de incubação com o anticorpo primário.

As lâminas foram avaliadas em microscopia de luz com aumentos de 40, 100, 200 e 400x quanto a imunomarcção positiva ou não. A imunomarcção positiva se caracterizou por aspecto granular e coloração castanho-dourado no citoplasma de hepatócitos ou células de Kupffer.

4.2.11 Análise estatística

A homocedasticidade dos dados foi verificada pelo teste estatístico de *D'Agostino & Pearson* e *Bartlett*. Os resultados não paramétricos foram submetidos ao teste de *Mann-Whitney* para comparação entre dois grupos e ao teste *Kruskal-Wallis* para comparação entre três grupos seguido da comparação entre os grupos entre si pelo teste de *Dunn*. Dados de frequência foram analisados entre os grupos 1 e 2 pelo Teste Exato de *Fisher*, dada a relativa frequência de caselas com valores menores de dois. O teste de *Friedman* para amostras pareadas dependentes foi aplicado e as correlações entre as variáveis foram avaliadas segundo o coeficiente de correlação de *Spearman*. Todos os testes foram feitos utilizando análise bicaudal pelo programa GraphPad Prism® versão 6.07 para Windows. Em todos os testes, os resultados foram considerados estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados foram apresentados segundo cada etapa.

5.1 ETAPA 1 - DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE RT-qPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HEV-RNA E APLICAÇÃO NA ANÁLISE RETROSPECTIVA DE CASOS SUSPEITOS DE HEPATITE E EM HUMANOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL BRASILEIRA

5.1.1 Padronização de ensaio do RT-qPCR pada detecção do HEV-RNA em amostras biológicas

O limite de detecção da curva padrão obtida por clonagem foi de 10^2 cópias/mL (Figura 9) e o limite de detecção utilizando as diluições seriadas de 10x do IS, permitiu a amplificação do HEV-RNA até a diluição de 1:1000, ou seja, contendo 250 UI/ mL.

Figura 9 –Análise de fluorescência de ensaio de RT-qPCR para HEV RNA apresentando diluições seriadas (10^9 - 10^2) da curva padrão e controle positivo

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: CP = controle positivo; CN = nontrole negativo; NTC = *no template control*.

Em todos os ensaios foi observada amplificação do CP, e resultado negativo de amplificação dos controles negativos e NTC. O controle de eficiência da etapa de RT foi avaliado a partir da reação de amplificação do controle interno de RNA do kit de RT-qPCR e todas as amostras testadas apresentaram eficiência de reação de RT (Figura 10).

Figura 10 – Análise de fluorescência em ensaio de RT-qPCR de HEV-RNA. As curvas apresentam a amplificação do controle interno de RNA utilizado para avaliação da etapa de RT

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Amostras de soro positivas para RNA de HAV, HCV e HDV e para o DNA do HBV foram testadas para amplificação pelo protocolo de RT-qPCR utilizado para detecção e quantificação do HEV (dados não mostrados), que demonstrou especificidade de amplificação somente para HEV-RNA, uma vez que não apresentou resultados de amplificação para nenhuma das outras hepatites virais testadas.

Análises do software determinaram que os coeficientes de eficiência e reprodutibilidade dos ensaios foram superiores a 90%, baseadas na amplificação das curvas padrão e controle obtidas durante os ensaios de RT-qPCR estando, portanto, com valores adequados, e desta forma os testes foram validados (Figura 11).

Figura 11 – Coeficientes de análise da curva padrão de amplificação do HEV obtida a partir de clonagem de isolado do genótipo 3 do vírus

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

5.1.2 Pesquisa sorológica e molecular de infecção por HEV em casos humanos suspeitos de hepatite E

Os dados demográficos dos pacientes com suspeita de hepatite E indicaram que 51% (162/318) pertenciam ao sexo feminino e que a média de idade observada foi de 30,5 anos (intervalo $\pm$ desvio padrão; 0–84 $\pm$ 20,21).

Os resultados de ELISA indicaram que a soroprevalência global para anticorpos anti-HEV IgM e IgG foi de 5,0% (16/318) e 9,1% (29/318), respectivamente. A distribuição de soroprevalência entre as faixas etárias está na Tabela 6. Indivíduos de 16 a 30 anos apresentaram maior soroprevalência para anticorpos anti-HEV IgM, enquanto indivíduos entre 31-45 anos maior soroprevalência para anti-HEV IgG. Não houve diferença significativa entre os grupos etários em relação à soroprevalência.

Tabela 6 - Distribuição etária da soroprevalência de anti-HEV IgM e IgG, por ELISA, entre indivíduos com suspeita de hepatite E na Amazônia oriental brasileira, 1993-2014

Idade (anos)	Amostras testadas	IgM (%)	p*	IgG (%)	p*
0-15	92	3 (0,9)	0,08	5 (1,5)	0,74
16-30	73	5 (1,5)		1 (0,3)	
31-45	78	4 (1,2)		12 (3,7)	
46-60	42	2 (0,6)		4 (1,2)	
60-75	28	2 (0,6)		6 (1,8)	
>76	5	0 (0)		1 (0,3)	
Total	318	16 (5,0)		29 (9,1)	

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: *Regressão linear. Valor significante P <0,05.

O RIBT confirmou a soroprevalência de anti-HEV IgM em 3,4% (11/318) e anti-HEV IgG em 5,9% (19/318). Não foi observada em nenhuma amostra com positividade concomitante para anti-HEV IgM e IgG, assim como não houve diferença estatística de soroprevalência relacionada ao sexo (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição da soroprevalência de anticorpos anti-HEV IgM e IgG, por ELISA e RIBT segundo sexo dos pacientes com suspeita de hepatite E na Amazônia oriental brasileira, 1993-2014

Sexo	Amostras testadas (%)	ELISA				RIBT			
		IgM (%)	p*	IgG (%)	p*	IgM (%)	p*	IgG (%)	p*
Masculino	156 (49)	8 (2,5)	0,938	16 (5,0)	0,619	6 (1,8)	0,949	10 (3,1)	0,932
Feminino	162 (51)	8 (2,5)		13 (4,1)		5 (1,5)		9 (2,8)	
Total	318 (100)	16 (5,0)		29 (9,1)		11 (3,4)		19 (5,9)	

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: *Qui-quadrado com correção Yates. Valor significante P <0,05.

Os resultados confirmaram três casos positivos para anticorpos anti-HEV IgM e IgG entre indígenas da etnia Parakanã de uma comunidade rural isolada no Estado do Pará (Tabela 8), sugerindo exposição aguda e pregressa ao vírus.

Nenhuma das 318 amostras testadas dos casos suspeitos de hepatite E foi positiva para pesquisa de HEV-RNA por RT-qPCR.

Tabela 8 – Resumo dos achados epidemiológicos e laboratoriais entre três indígenas da etnia Parakanã positivos para anticorpos anti-HEV

CrITÉrios de inclusão	Ano de coleta	Sexo*	Idade (anos)	Positividade anti-HEV confirmada	Achados clínico-laboratoriais adicionais
Anti-HEVIgM inconclusivo	1995	F	55	IgM	Positivo para anti-HCV em amostras coletadas entre 1993-2003
Anti-HEVIgM inconclusivo	1995	M	45	IgM	Sorologia inconclusiva para hidatidose em 1995
Hepatite aguda	1993	F	39	IgG	Positividade para anti-HEV total em amostras coletadas em 1995 e 1996

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: *F = feminino; M = masculino.

5.2 ETAPA 2 - ESTUDO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR GENÓTIPO 3 SUÍNO DE HEV EM MACACOS-DA-NOITE

5.2.1 Detecção do HEV-RNA em amostras de soro e fezes de macacos-da-noite experimentalmente infectados por HEV

Todos os seis animais inoculados dos dois grupos experimentais apresentaram pelo menos uma amostra de soro e/ou fezes positiva durante o período pós-inoculação, indicando que todos os animais testes foram infectados com a amostra de genótipo 3 suíno do HEV, independente da via utilizada, nas condições experimentais.

O HEV-RNA não foi detectado em nenhum dos animais controle. O controle interno de RNA do kit, incluído nos ensaios para avaliação de eficiência da etapa de RT apresentou amplificação positiva em todas as amostras analisadas.

A detecção do HEV-RNA no soro e/ou fezes dos animais do grupo 1 ocorreu em 10 vezes e sete vezes no grupo 2. A frequência de detecção de HEV-RNA no soro e nas fezes por grupo variou, mas a diferença entre os grupos não foi significativa ($p = 1,000$, Teste Mann-Whitney). A frequência de detecção no soro foi maior no grupo 2, no qual três animais exibiram positividade (BAZ, AKC e AH-05/13), enquanto no grupo 1, em que dois tiveram positividade (BCP e BBF). Por outro lado, a detecção nas fezes foi maior no grupo 1 em que dois tiveram positividade (BCP e AH-06/10), enquanto no grupo 2 foi detectado em apenas

um (BAZ). O HEV-RNA foi detectado em baixas cargas (< 100 cópias/ μ L), principalmente nas amostras de soro (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico de análise de ensaio RT-qPCR para detecção do HEV-RNA em amostras de macacos-da-noite inoculados com genótipo 3 suíno do HEV

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017)

Legenda: CP = controle positivo; CN = controle negativo; NTC = *no template control*.

O período de detecção molecular do HEV RNA variou entre os dois grupos. No grupo 1, o HEV-RNA foi detectado entre as semanas S4 e S5 no soro e, entre S2 e S8 nas fezes. No grupo 2, a detecção molecular do vírus foi observada entre S2 e S7 no soro e, nas fezes, em apenas um momento e em um animal na semana S5. Estes resultados constam na Tabela 9.

Tabela 9 – Carga viral média e período de detecção do HEV-RNA em amostras de soro e fezes de oito macacos-da-noite infectados experimentalmente com o genótipo 3 suíno do HEV

Amostra	Carga viral média (cópias/mL) $\pm$ DP		Período detecção (semanas PI)	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Soro	$3,53 \times 10^1 \pm 1,38$	$4,35 \times 10^1 \pm 1,06$	4-5	2-7
Fezes	$21,65 \times 10^1 \pm 21,52$	$1,26 \times 10^{2\text{¥}}$	2-8	5 [¥]

Fonte (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: DP = desvio padrão; [¥] Não foi desenvolvido cálculo de média $\pm$ DP por ser amostra única

A carga viral média detectada no soro e nas fezes de cada grupo está na Tabela 9. No soro dos animais do grupo 1 foi detectada carga viral média e desvio padrão de $3,53 \times 10^1 \pm 1,38$ cópias/ μ L e nos animais do grupo 2, $4,35 \times 10^1 \pm 1,06$ cópias/ μ L, enquanto nas fezes, nas quais a detecção foi maior em comparação a carga no soro, dos animais do grupo 1 foi detectado $21,65 \times 10^1 \pm 21,52$ cópias/ μ L e, no grupo 2, $1,26 \times 10^2$ cópias/ μ L em uma única

amostra. Não houve diferença estatística entre os grupos em relação a carga viral em amostras de soro ($p = 0,2381$, Teste Mann-Whitney).

Assim, os macacos-da-noite inoculados com uma dose única de suspensão de genótipo 3 suíno do HEV, tanto por via intravenosa como oral, apresentaram infecção por HEV nas condições experimentais, sendo que três animais apresentaram somente viremia (BBF do grupo 1, AKC e AH-05/13 do grupo 2); dois animais apresentaram viremia e excreção fecal do HEV (BCP, do grupo 1 e BAZ do grupo 2); e um animal apresentou somente excreção fecal (AH-06/10 – grupo 1). O HEV-RNA foi detectado até a semana 8 no grupo 1 e até a semana 7 no grupo 2. As Figuras 13 e 14 apresentam a detecção de HEV-RNA nas amostras de soro e fezes para cada animal do grupo 1 e 2, respectivamente, segundo as semanas de experimentação.

Figura 13 – Detecção e carga viral do HEV em amostras de soro e fezes de quatro macacos-da-noite do grupo 1 experimentalmente infectados com o genótipo 3 suíno do HEV, segundo as semanas de experimentação e níveis de ALT

Fonte (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: A) animal BBO (controle negativo); B-D) animais BCP, AH-06/10 e BBF experimentais

Figura 14 – Detecção e carga viral do HEV em amostras de soro e fezes de quatro macacos-da-noite do grupo 2 experimentalmente infectados com o genótipo 3 suíno do HEV, segundo as semanas de experimentação e níveis de ALT

Fonte (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: A) animal BCJ (controle negativo); B-D) animais AKC, BAZ e AH-05/13 experimentais

5.2.2 Detecção sorológica de anti-HEV IgM e IgG em macacos-da-noite experimentalmente infectados por HEV

Não foram observados resultados positivos para detecção de anticorpos anti-HEV IgM e IgG, entretanto resultados inconclusivos (20% acima do valor densidade óptica de *cut-off*) foram observados nos animais BCP, AH-06/10 e BBF, do grupo 1. O animal AH-06/10 apresentou resultados inconclusivos para anti-HEV IgM nas semanas 8, 9, 10 e 12 e anti-HEV IgG inconclusivo na semana 14 (dado não mostrado), o animal BCP apresentou resultado de IgM inconclusivo na semana 10 e o animal BBF apresentou anti-HEV IgG inconclusivo na semana 10.

5.2.3 Alterações clínicas em macacos-da-noite experimentalmente infectados por HEV

Todos os animais apresentaram bom estado geral e as alterações clínicas observadas foram consideradas brandas e transitórias. Não foram realizadas intervenções médico-cirúrgicas durante o período experimental. A Tabela 10 apresenta as alterações clínicas, a frequência e semana de ocorrência em cada grupo. O cálculo de frequência de ocorrência das alterações clínicas foi baseado no número de observações da alteração/(número de mensurações x número de animais).

A temperatura média e desvio padrão na S0 foi $38,15 \pm 0,63^{\circ}\text{C}$ para os animais controles, $38,83 \pm 0,46^{\circ}\text{C}$ para o grupo 1 e, $37,93 \pm 0,83^{\circ}\text{C}$ para o grupo 2. Não houve diferença estatística entre os grupos na S0 ($p = 0,2821$, Teste de Kruskal-Wallis). Os picos de elevação da temperatura, ou seja, acima de 39°C , ocorreram somente nos grupos inoculados a exceção de uma mensuração do controle BCJ (grupo 2) que apresentou $39,1^{\circ}\text{C}$ na S3. Houve diferença estatística significativa na frequência de ocorrência de episódios de hipertermia, temperatura acima de 39°C , entre os grupos ($p = 0,0287$, Teste exato de Fisher), sendo que o grupo 2 apresentou maior número de episódios de hipertermia. A Figura 15 apresenta a distribuição das frequências de ocorrências de episódios de hipertermias entre os grupos 1 e 2.

Figura 15 – Distribuição do número de episódios de hipertermia segundo os grupos experimentais 1 (G1) e grupo 2 (G2)

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

O grupo 1 apresentou variação da temperatura intragrupo durante as 12 semanas com diferença estatística significativa ($p = 0,0045$, Teste Friedman), enquanto no grupo 2 a variação de temperatura não foi estatisticamente significativa ($p = 0,0876$, Teste Friedman). A Figura 16 apresenta os gráficos de distribuição das temperaturas médias nos dois grupos.

Figura 16 – Distribuição da temperatura média ($\pm$ desvio padrão) de seis macacos-da-noite infectados experimentalmente pelo genótipo 3 suíno do HEV

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: A) grupo 1; B) grupo 2.

A análise do parâmetro temperatura nas semanas S1 a S12 mostrou diferença estatística (Teste de Kruskal-Wallis) entre a temperatura basal (S0), temperatura dos animais controles e as temperaturas dos animais dos grupos experimentais nas semanas S1 ($p = 0,0174$), S8 ($p = 0,0335$) e S11 ($p = 0,0382$), nas quais não houve diferença na análise de múltiplas comparações pelo Teste de Dunn. A Figura 18 apresenta os gráficos de distribuição das temperaturas em cada semana experimental. Na S1 houve elevação da temperatura, sendo considerada hipertermia e a média no grupo 1 foi $39,13 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$ e no grupo 2, $39,00 \pm 0,70^{\circ}\text{C}$. A hipertermia ocorreu no grupo 1 em dois animais (2/3, 66,6%), animais BCP e BBF, e no grupo 2 em um animal (1/3, 33,3%), animal BAZ. Na S8, dois macacos-da-noite do grupo 2 (BAZ, AH-05/13) exibiram hipertermia, cuja média e desvio padrão para o grupo foi $39,07 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$. Na S11, dois animais do grupo 2 (AKC, BAZ) exibiram hipertermia, cuja média e desvio padrão foi $39,23 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$.

Por outro lado, diferentes animais de ambos os grupos exibiram elevação da temperatura acima de 39°C em diferentes semanas, que foram consideradas picos de hipertermia, mas sem diferença estatística. No grupo 1, o macaco-da-noite BCP apresentou (4x) hipertermia em quatro semanas (S1, S2, S5 e S6). No grupo 2, o animal BAZ (8x) e AKC (5x) exibiram picos de hipertermia durante o experimento (S1, S2, S4, S5, S6, S8, S9, S10 e S11). Na semana S7, um dos controles (BCJ) apresentou temperatura de 39°C , mas os animais BBF, AH-06/10 (grupo1) e AKC, BAZ e AH-05/13 (grupo 2) exibiram elevações acima de $39,2^{\circ}\text{C}$ e foram tidas como picos de hipertermia. Independente da via de inoculação, os animais infectados exibiram picos de hipertermia, que variou de $39,1$ a $39,9^{\circ}\text{C}$, da S1 a S7 de forma esporádica e não homogênea entre os animais por grupo. Nas semanas S8 a S12, foram observados picos de hipertermia, $39,1$ a $39,6^{\circ}\text{C}$, apenas no grupo 2.

Tabela 10 – Distribuição das alterações clínicas observadas em macacos-da-noite infectados por genótipo 3 suíno do HEV segundo o grupo de estudo, a frequência e semana de ocorrência

Alteração clínica	Frequência de ocorrência (%) [‡]		Valor de <i>p</i> [*]	Semanas de ocorrência	
	Grupo 1 (n=3)	Grupo 2 (n=3)		Grupo 1	Grupo 2
Hipertermia	9/36 (25,0)	17/36 (47,2)	0,0287	S1, S2, S3, S5, S6, S7	S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11
Diarreia	8/36 (22,2)	6/36 (16,6)	0,7668	S1, S5, S6, S7, S9	S1, S4, S5, S8
Desidratação	6/36 (16,6)	7/36 (19,4)	1,0000	S1, S3, S4, S7, S8, S11	S1, S3, S4, S8, S9, S10, S11
Perda de peso	Nenhum	24/36 (66,6)	<0,0001	nenhuma	todas
Ganho de peso	6/36 (16,6)	nenhum	0,0249	S1, S6, S7, S9, S10, S11	nenhuma

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S. 2017).

Legenda: [‡]Frequência = número de observações da alteração/(número de mensurações x número de animais); ^{*}Teste exato de Fisher, significância $p < 0,05$.

Os parâmetros de coloração de mucosas e palpação abdominal não foram alterados, exceto por um evento em que o animal BAZ (grupo 2) apresentou discreta distensão abdominal por gases na S4. Os parâmetros de auscultação cardiorádica e frequências cardíacas e respiratórias foram utilizados para avaliação clínica geral e monitoramento dos animais durante os procedimentos de contenção química, porém não foram analisados estatisticamente.

Episódios esporádicos de diarreia volumosas, de consistência pastosa à aquosa, sem alterações de coloração, sem muco e em baixa frequência ocorreram nos animais infectados. A frequência de observação de diarreia foi 8/36 (22,2%) e 6/36 (16,6%) nos grupos 1 e 2, respectivamente. Não houve diferença estatística em relação a frequência de ocorrência de diarreia entre os grupos ($p = 0,7668$, Teste exato de Fisher). Não ocorreram episódios de diarreia nos animais controles.

Os primeiros episódios de diarreia aconteceram na S1, no animal AH-06/10, grupo 1, e AKC, grupo 2. A S9 foi a última semana em que foi observada diarreia nos grupos experimentais. Os animais do grupo 1 foi observada ocorrência de diarreia nas semanas S1, S5, S6 (2x), S7(2x) e S9 (2x): os animais BCP e BBF, apresentaram três episódios e o AH-06/10, dois episódios. No grupo 2, diarreia ocorreu nas semanas S1, S4 (2x), S5 (2x) e S8, sendo que o animal AKC exibiu quatro episódios, enquanto os animais BAZ e AH-05/13 um episódio cada. Na S1 e S5 os episódios ocorreram em ambos os grupos.

A avaliação do turgor cutâneo foi um parâmetro de baixa consistência uma vez que a avaliação da desidratação foi leve (até 5%) na maioria dos animais e também foi observada nos controles negativos em algumas semanas, assim esse parâmetro quando atribuído escore 1 foi tido como dentro da normalidade. O escore computado na análise foi o escore 2, que representa desidratação 5-6 %. Assim, no grupo 1, a desidratação foi observada em seis avaliações (6/36, 16,6%) no animal BBF, e no grupo 2 em sete (7/36, 19,4%), animal BAZ. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 1,0000$, Teste exato de Fisher). Ambos os grupos exibiram animais com desidratação nas semanas S1, S3, S4, S8 e S11.

Os pesos dos animais na semana S0 foi considerado o basal de cada indivíduo e estão apresentados na Tabela 11. Não houve diferença estatística significativa entre o peso basal dos animais controles e experimentais ($p = 0,7750$, Teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 11 – Distribuição de pesos médios (g) ($\pm$ desvio padrão) dos animais controles e dos grupos 1 e 2 na semana S0

Identificação	Peso médio $\pm$ DP	Valor p^*
Controles (n=2)	1165 $\pm$ 190,9	0,7750
Grupo 1 (n=3)	1130 $\pm$ 111,4	
Grupo 2 (n=3)	1528 $\pm$ 497,2	

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: DP = desvio padrão; *Teste de Kruskal-Wallis, significância $p < 0,05$.

A análise da variação dos pesos nas semanas S1 a S12 não mostrou diferença significativa dos pesos semanais entre os grupos em relação ao peso médio basal (S0) ($p = 0,9813$, Teste Kruskal-Wallis). No grupo 1 a variação de peso foi significativa em relação ao peso basal do grupo ($p = 0,0337$, Teste de Friedman para amostras pareadas e Teste de Dunn para múltiplas comparações) e para o grupo 2 também houve diferença estatística significativa ($p = 0,0054$) pelo mesmo teste estatístico.

O peso variou significativamente em relação a frequência de perda de peso ($p < 0,0001$, Teste exato de Fisher) ou de ganho ($p = 0,0249$, Teste exato de Fisher) entre os grupos 1 e 2. A distribuição da frequência de perda e ganho de peso para cada grupo e as semanas em que foram observados esses parâmetros estão descritos na Tabela 12. A Figura 17 apresenta a distribuição dos pesos médios de cada grupo e as Figuras 18 e 19, os pesos individuais dos animais por grupos segundo a detecção do HEV-RNA e ocorrência de diarreia.

Figura 17 – Distribuição dos pesos semanais médios ($\pm$ desvio padrão) de seis macacos-da-noite infectados experimentalmente pelo genótipo 3 suíno do HEV

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S. 2017).

Legenda: A) grupo 1; B) grupo 2.

Figura 18 – Distribuição dos pesos individuais de macacos-da-noite do grupo 1 em relação a detecção do HEV-RNA no soro e fezes e ocorrência de diarreia durante 12 semanas de experimentação

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S. 2017).

Legenda: D = diarreia.

Figura 19– Distribuição dos pesos individuais de macacos-da-noite do grupo 2 em relação a detecção do HEV-RNA no soro e fezes e ocorrência de diarreia durante 12 semanas de experimentação

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S. 2017).

Legenda: D = diarreia.

5.2.4 Alterações laboratoriais em macacos-da-noite experimentalmente infectados por genótipo 3 suíno do HEV

Os valores obtidos nas mensurações dos parâmetros laboratoriais em S0 foram considerados os basais para os animais controles e os experimentais.

5.2.4.1 Resultados das determinações bioquímicas séricas

A Tabela 12 apresenta os valores bioquímicos basais de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total (BT), bilirrubina indireta (BI) e direta (BD), proteína total (PT), albumina, globulina, triglicérides, colesterol, ureia e creatinina. Os parâmetros foram considerados elevados quando esses foram superiores ao valor máximo basal e o foram tidos com redução quando esses estiveram abaixo do valor mínimo basal, mesmo que dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie.

Em relação a frequência de valores elevados de AST, não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,4290$, Teste exato de Fisher), sendo que no grupo 1 foram detectadas 5/36 (13,8%) aumentos dos valores de AST e para o grupo 2, 2/36 (5,5%). Os valores de AST entre os animais do grupo 1 não apresentaram diferença estatística significativa no período experimental ($p = 0,0835$, Teste de Friedman para amostras pareadas e Teste de Dunn para múltiplas comparações) e os valores máximos observados foram nas semanas S1 (130,8 U/L, animal BCP), S3 (130,3 U/L, animal BCP), S4 (130,2 U/L, animal AH-06/10) e S12 (134,8 U/L animal BCP e 137,6 U/L animal AH-06/10). No grupo 2, os valores de AST apresentaram diferença estatística ($p = 0,0138$, Teste de Friedman para amostras pareadas e Teste de Dunn para múltiplas comparações) e os valores máximo foram encontrados na semana S1 (133,2 U/L, animal BAZ) e S4 (179,4 U/L, animal BAZ). Não houve diferença estatística entre os grupos 1 e 2 quanto aos valores de AST comparados entre si em relação as semanas ($p = 0,1718$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 20).

Níveis elevados de ALT foram observados somente uma vez no grupo 1 (1/36; 2,7% - 45,8 U/L, animal BBF na S6) e em oito vezes (8/36, 22,2%) no grupo 2, nos animais AKC e BAZ nas semanas S1, S3, S4, S6, S9, S10, S11 e S12. Houve diferença estatística significativa

entre os grupos em relação a frequência de vezes em que ocorreu elevação de ALT ($p = 0,0278$, Teste Exato de Fisher). Não houve diferença significativa nos valores de ALT nas 12 semanas para os animais do grupo 1 ($p = 0,4386$, Teste de Friedman para amostras pareadas e Teste de Dunn para múltiplas comparações) e nem para os do grupo 2 ($p = 0,3228$, Teste de Friedman para amostras pareadas e Teste de Dunn para múltiplas comparações). O maior valor determinado no grupo 1 foi 45,80 U/L e no grupo 2 o maior valor foi 66,50 U/L. Não ocorreu diferença estatística significativa na comparação dos níveis de ALT entre os dois grupos entre si em relação ao período experimental ($p = 0,3101$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 20).

O aumento de GGT foi observado quatro vezes no grupo 1 (4/36, 11,1%) e em três vezes no grupo 2 (4/36, 8,3%), sem diferenças estatísticas significantes em relação a frequência de ocorrência de elevação de GGT ($p = 1,0000$, Teste Exato de Fisher) e comparação entre os níveis de GGT nos dois grupos ($p = 0,8940$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 20). Houve diferença significativa nos valores de GGT nas 12 semanas para os animais do grupo 1 ($p = 0,0370$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações) e não houve para os animais do grupo 2 ($p = 0,1775$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações). O animal controle BBO exibiu elevação de GGT nas semanas S5, S6 e S7 com valor máximo em 31,4 U/L na S6. O valor mais alto observado no grupo 1 foi 18,6 U/L (animal BBF, S5) e no grupo 2 foi 37,5 U/L (animal BAZ, S5).

O valor elevado de FA foi observado duas vezes no grupo 1 (2/36, 5,5%) e em três vezes no grupo 2 (3/36, 8,3%). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação a frequência de vezes em que ocorreu elevação de FA ($p = 1,0000$, Teste Exato de Fisher), porém houve diferença significativa na comparação dos níveis médios de FA entre os dois grupos em relação ao período experimental ($p = 0,0108$, Teste de Kruskal-Wallis). Diferença significativa nos valores de FA nas 12 semanas também foram observados para os animais do grupo 1 ($p = 0,0079$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações) e para os o grupo 2 ($p = 0,0290$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações). O maior valor determinado no grupo 1 foi 266,8 U/L e no grupo 2 o maior valor foi 268,5 U/L. As curvas de valores médios de AST, ALT, GGT e FA segundo as 12 semanas de experimentação encontram-se na Figura 20.

Figura 20 – Distribuição dos níveis séricos de AST, ALT, GGT e FA de seis macacos-da-noite experimentalmente infectados pelo genótipo 3 do HEV em relação ao tempo de estudo. Os valores estão expressos em média e $\pm$ desvio padrão, segundo os dos dois grupos experimentais

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

O valor de BT foi superior ao valor máximo basal em quatro circunstâncias (4/36, 11,1%) entre os animais do grupo 1 e em três vezes (3/36, 8,3%) no grupo 2. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação a frequência de vezes em que ocorreu elevação de BT ($p = 1,0000$, Teste Exato de Fisher). Houve diferença estatística significativa na comparação dos níveis médios de BT entre os dois grupos no período de estudo ($p = 0,0058$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 21). Não houve diferença significativa nos valores de BT nas 12 semanas para os animais do grupo 1 ($p = 0,0555$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações) e houve diferença para os animais do grupo 2 ($p = 0,0136$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações). Os maiores níveis de BT foram observados na S4 tanto no grupo 1 foi 0,67 mg/dL, animal BCP e no grupo 2 foi 0,53mg/dL, animal AH-05/13.

Valores elevados de BI foram observados duas vezes em cada grupo (2/36, 5,5%), sem diferença estatística em relação a frequência de ocorrência de aumento ($p = 1,0000$, Teste exato de Fisher). Houve diferença estatística significativa na comparação entre os níveis médios de BI entre os dois grupos ($p = 0,0077$, Teste de Kruskal-Wallis). As curvas médias de BI dos dois grupos estão na Figuras 21. Os níveis médios de BI nas 12 semanas para os animais do grupo 1 não apresentaram diferenças significantes ($p = 0,0529$, Teste de Friedman

e Teste de Dunn para múltiplas comparações), mas houve para os animais do grupo 2 ($p = 0,0137$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações). Os maiores valores individuais de BI forma observados na semana S4 no grupo 1 foi 0,55 mg/dL, animal BCP e no grupo 2, 0,41mg/dL, animal AH-05/13.

A elevação de BD foi verificada em três vezes no grupo 1 (3/36, 8,3%) e apenas uma vez no grupo 2 (1/36, 2,7%), sem diferença estatística em relação a frequência de ocorrência entre os grupos ($p = 0,6142$, Teste Exato de Fisher). Não houve diferença estatística significativa na comparação entre os níveis médios de BD entre os dois grupos ($p = 0,1124$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 21). Não houve diferença significativa nos valores de BD nas 12 semanas para os animais do grupo 1 ($p = 0,6636$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações) e nem para o grupo 2 ($p = 0,0526$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações). Os maiores níveis de BD determinados foram de 0,15 mg/dL (animal AH06/10, S4) e 0,17 mg/dL (animal BBF, S12) no grupo 1 e no grupo 2 foi 0,18 mg/dL (animal AKC, na S12).

Figura 21 – Distribuição dos níveis séricos de bilirrubina total, bilirrubina indireta e bilirrubina direta de seis macacos-da-noite experimentalmente infectados pelo genótipo 3 do HEV em relação ao tempo de estudo. Os valores estão expressos em média e $\pm$ desvio padrão, segundo os dos dois grupos experimentais

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

A elevação de PT não foi verificada nos animais experimentais do grupo 1, mas ocorreu em sete vezes no grupo 2 (7/36, 19,4%), e foi observada diferença estatística de frequência desta alteração entre os grupos ($p = 0,0113$, Teste exato de Fisher). Quanto a variação dos valores de PT no grupo 1, houve diferença significativa nos valores nas 12 semanas ($p = 0,0229$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações) e para o grupo 2 ($p = 0,0263$, Teste de Friedman e Teste de Dunn para múltiplas comparações). Os maiores valores determinados no grupo 1 foi observado no controle BBO com 7,36 g/dL na S2. No grupo 2, nível sérico de 8,24 g/dL foi observado no animal AKC na S6, que exibiu valores elevados também nas semanas S4, S7, S10, S11 e S12. Houve diferença estatística significativa na comparação entre os dois grupos ($p = 0,0425$, Teste de Kruskal-Wallis). As curvas de valores médios de PT nos dois grupos estão ilustradas na Figura 21. A redução dos valores de PT foi observada em dois casos de cada grupo (2/36, 5,55%) e sem diferença estatística ($p = 1,0000$, Teste exato de Fisher). Os menores valores determinados foram observados na S2 no grupo 1 (5,48 g/dL, animal BCP) e no grupo 2 (4,58 g/dL, animal BAZ).

Tabela 12 – Distribuição dos valores basais médios ($\pm$ desvio padrão) de parâmetros bioquímicos por cada grupo, comparados aos valores médios ($\pm$ desvio padrão) e intervalos determinados por estudo prévio desenvolvido em macacos-da-noite adultos machos do CENP

Parâmetros	Controle (n=2)	Grupo 1 (n=3)	Grupo 2 (n=3)	Valor p^*	Takeshita et al. (2011)	
					Média $\pm$ DP	Intervalo
AST (U/L)	101,8 $\pm$ 15,20	104,6 $\pm$ 5,34	110,9 $\pm$ 13,28	0,9464	209,85 $\pm$ 171,15	94,0 – 808,0
ALT (U/L)	32,30 $\pm$ 1,55	33,47 $\pm$ 6,40	40,17 $\pm$ 2,66	0,2000	67,19 $\pm$ 47,98	3,9 – 209,0
GGT (U/L)	10,00 $\pm$ 7,78	6,9 $\pm$ 4,5	6,3 $\pm$ 2,3	0,6036	40,20 $\pm$ 28,78	4,0 – 80
FA (U/L)	136,4 $\pm$ 15,56	220,5 $\pm$ 36,18	210,0 $\pm$ 56,13	0,2857	ND	ND
BT (mg/dL)	0,23 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,02	0,9464	ND	ND
BI (mg/dL)	0,14 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,02	0,9679	ND	ND
BD (mg/dL)	0,08 $\pm$ 0,007	0,09 $\pm$ 0,015	0,1 $\pm$ 0,02	0,7321	ND	ND
PT (g/dL)	7,21 $\pm$ 0,10	6,46 $\pm$ 0,31	6,73 $\pm$ 0,46	0,2000	4,40 $\pm$ 2,77	1,9 – 7,9
Albumina (g/dL)	4,25 $\pm$ 0,22	3,72 $\pm$ 0,23	4,13 $\pm$ 0,41	0,2000	ND	ND
Globulina (g/dL)	2,96 $\pm$ 0,33	2,73 $\pm$ 0,28	2,60 $\pm$ 0,32	0,5107	ND	ND
Triglicérides (mg/dL)	128,4 $\pm$ 92,87	211,5 $\pm$ 26,13	78,23 $\pm$ 30,47	0,1286	ND	ND
Colesterol (mg/dL)	107,5 $\pm$ 3,22	142,1 $\pm$ 39,32	126,1 $\pm$ 7,50	0,5107	ND	ND
Ureia (mg/dL)	14,71 $\pm$ 1,42	13,68 $\pm$ 6,75	21,02 $\pm$ 7,79	0,5393	30,23 $\pm$ 16,91	8,0 – 66,0
Creatinina (mg/dL)	0,66 $\pm$ 0,25	0,79 $\pm$ 0,10	0,53 $\pm$ 0,05	0,2857	0,68 $\pm$ 0,12	0,5 – 1,0

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S. 2017).

Legenda: ND = não determinado; AST= aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase; GGT = gama glutamiltransferase; FA = fosfatase alcalina; BT = bilirrubina total; BI = bilirrubina indireta; BD = bilirrubina direta; PT = proteína total; * Teste Kruskal Wallis, comparação entre controle, grupo 1 e 2, significância $p < 0,05$.

Os valores médios de albumina foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos ($p = 0,0488$, Teste de Kruskal-Wallis) e também foram diferentes no grupo 1 ($p = 0,0110$, Teste de Friedman) e no grupo 2 ($p = 0,0055$, Teste de Friedman). Os maiores valores determinados foram de 5,19 g/dL (animal BCP) no grupo 1 e 5,38 g/dL (animal BAZ) no grupo 2, ambos na S6. Os menores valores obtidos no grupo 1 foi 3,2 g/dL (animal BBF) e 3,01 g/dL (animal BAZ) no grupo 2, ambos na S2. No entanto, também foi verificada ocorrência de elevação de albumina no controle BBO e BCJ na S6 com valores 4,84 g/dL e 5,52 g/dL, respectivamente. A frequência de elevação de albumina no grupo 1 foi 3/36 (8,3%) e 7/36 (19,4%) no grupo 2, sem diferença significativa ($p = 0,3070$, Teste exato de Fisher). Em relação a frequência de redução de albumina, esta não apresentou diferença significativa entre os grupos igual ($p = 1,0000$, Teste exato de Fisher), uma vez que foi observada nos dois grupos em dois eventos (2/36; 5,5%). As curvas médias de albumina estão apresentadas na Figura 22.

A redução de globulina foi observada em duas vezes em cada grupo (2/36, 5,5%), sem diferença estatística ($p = 1,0000$, Teste exato de Fisher). Não houve diferença significativa nos valores de globulina nas 12 semanas em nenhum dos grupos (grupo 1 $p = 0,1022$ e grupo 2 $p = 0,4475$, Teste de Friedman) e nem na comparação entre os níveis médios dos dois grupos ($p = 0,9372$, Teste de Kruskal-Wallis). Os menores valores determinados no grupo 1 foram 1,90 g/dL (animal BCP, S2) e 1,95 g/dL (animal BCP, S7), já no grupo 2 foram 1,15mg/dL (animal BAZ, S10) e 1,57 g/dL (animal BAZ, S2). As curvas médias de globulina estão ilustradas na Figuras 22.

Valores elevados de triglicérides ocorreu em uma vez em cada grupo (1/36, 2,7%) e sem diferença estatística entre os grupos ($p = 1,0000$, Teste exato de Fisher). Não houve diferença significativa nos valores de triglicérides nas 12 semanas para os animais do grupo 1 ($p = 0,1912$, Teste de Friedman), mas houve para os animais do grupo 2 ($p = 0,0340$, Teste de Friedman). O maior valor determinado no grupo 1 foi 517,5 mg/dL (animal BBF) e no grupo 2 foi 246,6 mg/dL (animal BAZ), ambos na S4. Houve diferença estatística significativa na comparação entre os dois grupos ($p = 0,0140$, Teste de Kruskal-Wallis). As curvas de valores médios de triglicérides nos dois grupos estão ilustradas na Figura 22.

Figura 22 – Distribuição dos níveis séricos de globulina, albumina, triglicérides e colesterol de seis macacos-da-noite experimentalmente infectados pelo genótipo 3 do HEV em relação ao tempo de estudo. Os valores estão expressos em média e desvio padrão dos dois grupos experimentais

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

A análise dos valores de colesterol mostrou elevação em dois episódios em cada grupo (2/36, 5,5%) e assim sem diferença estatística ($p = 1,0000$, Teste exato de Fisher). O maior valor determinado foi 189,85 mg/dL (animal BCP, S1) no grupo 1 e 149,4 mg/dL (animal BAZ, S1) no grupo 2. Não houve variação nos valores de triglicérides entre os animais do grupo 1 ($p = 0,2593$, Teste de Friedman) e houve diferença entre os animais do grupo 2 ($p = 0,0294$, Teste de Friedman). A comparação entre os níveis médios de colesterol entre os grupos não foi estatisticamente diferente ($p = 0,5333$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 22).

Os maiores níveis determinados de ureia nos animais nos dois grupos experimentais foram menores do que os observados nos animais controles. No grupo 1 não houve variação entre os animais ($p = 0,2233$, Teste de Friedman) e no grupo 2 houve variação ($p = 0,0246$, Teste de Friedman), devido a valores abaixo do limite mínimo basal nos animais BAZ (S3 e S6) e no AH-05/13 (S10). A comparação entre os níveis médios de ureia entre os grupos não mostrou diferença estatística ($p = 0,0624$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 23).

Os valores de creatinina dos dois grupos foram todos abaixo do limite máximo basal no grupo 1 e foi maior em seis episódios (6/36, 16,6%) no grupo 2, resultando em diferença significativa de frequência de elevação de creatinina entre os dois grupos ($p = 0,0249$, Teste exato de Fisher). Houve variação nas 12 semanas entre os animais do grupo 1 ($p = 0,0226$,

Teste de Friedman) e grupo 2 ($p=0,0495$, Teste de Friedman), porém não houve diferença estatística entre os níveis médios de creatinina entre os dois grupos experimentais ($p = 0,4639$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 23).

Figura 23 – Distribuição dos níveis séricos de ureia e creatinina de seis macacos-da-noite experimentalmente infectados pelo genótipo 3 do HEV em relação ao tempo de estudo. Os valores estão expressos em média e desvio padrão dos dois grupos experimentais

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

A Tabela 13 apresenta os resultados das frequências e semanas de ocorrência das alterações bioquímicas observadas nos grupos experimentais inoculados com o genótipo 3 suíno do HEV.

Tabela 13 – Distribuição dos parâmetros bioquímicos em macacos-da infectados experimentalmente pelo genótipo 3 suíno do HEV, segundo o tipo de alteração observada, frequência e semanas de ocorrência durante as 12 semanas experimentais

Parâmetros	Alteração	Frequência de ocorrência (%)		Valor de p^*	Semanas de ocorrência	
		Grupo 1 (n=3)	Grupo 2 (n=3)		Grupo 1	Grupo 2
AST (U/L)	Elevação	5/36 (13,8)	2/36 (5,5)	0,4290	S3 e S4	S1 e S4
ALT (U/L)	Elevação	1/36 (2,7)	8/36 (22,2)	0,0278	S6	S1, S3, S4, S6, S9, S10, S11, S12
GGT (U/L)	Elevação	4/36 (11,1)	3/36 (8,3)	1,0	S1, S5, S6, S9	S5, S6, S9
FA (U/L)	Elevação	2/36 (5,5)	3/36 (8,3)	1,0	S1 e S3	S8, S11, S12
BT (mg/dL)	Elevação	4/36 (11,1)	3/36 (8,3)	1,0	S6, S8, S12	S4, S12
BI (mg/dL)	Elevação	2/36 (5,5)	2/36 (5,5)	1,0	S4, S12	S4, S12
BD (mg/dL)	Elevação	3/36 (8,3)	1/36 (2,7)	0,6142	S4, S8, S12	S12
PT (g/dL)	Elevação	Nenhum	7/36 (19,0)	0,0113	nenhuma	S1, S4, S6, S7, S10, S11, S12
PT (g/dL)	Redução	2/36 (5,5)	2/36 (5,5)	1,0	S2, S5	S2
Albumina (g/dL)	Elevação	3/36 (8,3)	7/36 (19,4)	0,3070	S6, S7, S10	S1, S6, S7, S10
Albumina (g/dL)	Redução	2/36 (5,5)	2/36 (5,5)	1,0	S2, S4	S2, S12
Globulina (g/dL)	Redução	2/36 (5,5)	2/36 (5,5)	1,0	S2, S7	S2, S10
Triglicérides (mg/dL)	Elevação	1/36 (2,7)	1/36 (2,7)	1,0	S5	S5
Colesterol (mg/dL)	Elevação	2/36 (5,5)	2/36 (5,5)	1,0	S1, S4	S1, S4
Ureia (mg/dL)	Redução	4/36 (11,1)	3/36 (8,3)	1,0	S2, S3, S6	S3, S6, S10
Creatinina (mg/dL)	Elevação	Nenhum	6/36 (16,6)	0,0249	nenhuma	S1, S3, S5, S8

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: AST= aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase; GGT = gama glutamiltransferase; FA = fosfatase alcalina; BT = bilirrubina total; BI = bilirrubina indireta; BD = bilirrubina direta; PT = proteína total**Elevação = valor maior que o valor máximo basal; redução = valor menor que o valor mínimo basal; * Teste exato de Fisher, significância, compração entre grupos 1 e 2, $p < 0,05$.

5.2.4.2 Resultados hematológicos

A Tabela 14 apresenta os valores basais dos parâmetros hematológicos. Os parâmetros foram considerados elevados quando esses foram superiores ao valor máximo basal e o foram tidos com redução quando esses estiveram abaixo do valor mínimo basal, mesmo que dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie.

O número de hemácias não apresentou variação em relação aos basais, exceto pela diminuição para o animal BBF na S9, cujo valor foi $4,88 \times 10^6/\text{mm}^3$. Não houve variação para esse parâmetro entre os animais de cada grupo (grupo 1 $p = 0,8391$ e grupo 2 $p = 0,0517$, Teste de Friedman). O animal BAZ exibiu aumento do número de hemácias nas S1 e S2. A comparação entre os grupos não mostrou diferença estatística ($p = 0,2273$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 24).

Quanto aos valores de hemoglobina, estes foram abaixo do mínimo para todos os animais do grupo 1 e 2 em S1, exceto para o BAZ que exibiu elevação do valor (17,4 g/dL). No grupo 1 não houve diferença entre os animais ($p = 0,4836$, Teste de Friedman), mas foram em dois episódios determinados abaixo do mínimo basal no animal BBF (12,9 g/dL na S5 e 12,8 g/dL na S9). Houve diferença nos níveis de hemoglobina ($p = 0,0174$, Teste de Friedman) entre os animais do grupo 2 durante as 12 semanas, e em cinco episódios foram determinados valores menores nas S5 e S9 para AKC e AH-05/13, e na S12, quando o menor valor obtido foi 10,9 g/dL no animal AH-05/13. Não houve diferença estatística entre as frequências de redução de hemoglobina entre os grupos ($p = 0,4290$, Teste exato de Fisher). Na comparação entre os níveis de hemoglobina durante todo período entre os dois grupos também não houve diferença estatística ($p = 0,2335$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 24).

A avaliação do hematócrito mostrou que este variou principalmente em redução abaixo do basal em ambos os grupos. Os valores basais foram mais elevados do que as semanas experimentais em ambos os grupos. Na S1, em dois animais de cada grupo exibiram redução do hematócrito que persistiu até o final, sendo que a maior redução foi no animal BCP que iniciou com 48,5 % e chegou a 39% em S9. A partir de S2 a S12 apenas o animal BBF exibiu elevação maior do que o basal. No grupo 2, na S12 todos exibiram hematócrito menor do que o basal. Não houve diferença estatística entre os animais do grupo 1 ($p = 0,4743$, Teste de Friedman) e entre os grupos ($p = 0,1248$, Teste de Kruskal-Wallis) (Figura 24) (Figura 24). Os animais do grupo 2 exibiram variação nos valores de hematócrito nas 12 semanas ($p = 0,0222$, Teste de Friedman).

Tabela 14 – Distribuição dos valores basais médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros hematológicos para cada grupo, comparados aos valores médios ($\pm$ desvio padrão) e intervalos determinados por estudo prévio desenvolvido em macacos-da-noite adultos machos do CENP

Parâmetros	Controles (n=2)	Grupo 1 (n=3)	Grupo 2 (n=3)	Valor de p^*	Takeshita et al. (2011) ($n = 26$)	
					Média $\pm$ DP	Intervalo
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	6,11 $\pm$ 0,95	5,87 $\pm$ 0,21	6,31 $\pm$ 0,53	0,7000	6,09 $\pm$ 0,47	5,05 – 7,06
Hemoglobina (g/dL)	17,3 $\pm$ 2,1	15,4 $\pm$ 2,0	16,3 $\pm$ 0,3	0,9464	16,03 $\pm$ 1,24	14,5 – 19,4
Hematócrito (%)	51,0 $\pm$ 7,4	46,4 $\pm$ 6,0	50,2 $\pm$ 0,6	0,8071	46,41 $\pm$ 3,47	39,0 – 53,6
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	8,05 $\pm$ 5,16	9,80 $\pm$ 4,79	7,23 $\pm$ 1,75	0,8071	11,53 $\pm$ 2,99	5,67 – 17,66
Linfócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	2,60 $\pm$ 1,44	2,40 $\pm$ 3,93	3,92 $\pm$ 6,87	0,1786	6,89 $\pm$ 2,14	3,24 – 10,6
Monócitos (mm^3)	278,0 $\pm$ 268,7	496,3 $\pm$ 138,8	307,7 $\pm$ 176,9	0,4464	77,15 $\pm$ 98,13	0 – 302
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	260,5 $\pm$ 14,4	240,3 $\pm$ 39,3	392,3 $\pm$ 68,7	0,1786	131,0 $\pm$ 62,21	37,0 – 245,0

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: *Teste de Kruskal-Wallis, significância $p < 0,05$

Figura 24 – Distribuição dos valores de número de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito de macacos-da-noite experimentalmente infectados pelo genótipo 3 do HEV em relação ao tempo de estudo. Os valores estão expressos em média e desvio padrão dos dois grupos experimentais

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Na avaliação do número dos leucócitos totais, que exibiu variação tanto nos controles como nos grupos experimentais, não houve diferença estatística entre os animais do grupo 1 ($p = 0,4457$, Teste de Friedman), mas houve no grupo 2 ($p = 0,0153$, Teste de Friedman). A comparação entre os grupos também não teve diferença estatística ($p = 0,3887$, Teste de Kruskal-Wallis). O animal AH-05/13 apresentou valor abaixo de 3000 leucócitos na S12 (Figura 25).

Na avaliação do número dos linfócitos totais, que exibiu variação tanto nos controles como nos grupos experimentais, não houve diferença estatística entre os animais do grupo 1 ($p = 0,2233$, Teste de Friedman) e nem no grupo 2 ($p = 0,0577$, Teste de Friedman) (Figura 25). A comparação entre os grupos também não teve diferença estatística ($p = 0,0641$, Teste de Kruskal-Wallis). A menor contagem de linfócitos ocorreu com o animal AH-06/10 na S2 (grupo 1) e com o animal BAZ na S1 (grupo 2).

O número de monócitos foi variável em ambos os grupos e não houve diferença estatística na comparação entre os grupos ($p = 0,5297$, Teste de Kruskal-Wallis), e nem entre os animais do grupo 1 ($p = 0,1933$, Teste de Friedman) e do grupo 2 ($p = 0,4707$, Teste de Friedman) (Figura 25). As maiores contagens foram obtidas no animal BBO, controle grupo 1, em S4 (805) e S12 (700). Enquanto, no grupo 2, a maior contagem foi na S7 (768), no animal AH-05/13. A contagem das plaquetas também foi bastante variável e sem diferença estatística entre os grupos ($p = 0,0520$, Teste de Kruskal-Wallis) e nem entre os animais do mesmo grupo (grupo 1 $p = 0,8865$ e grupo 2 $p = 0,6179$, Teste de Friedman). O menor valor contado foi em S5 (103.000 células/mm³) para o animal AH 06/10.

Figura 25 – Distribuição dos valores de leucócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas de seis macacos-da-noite experimentalmente infectados pelo genótipo 3 do HEV em relação ao tempo de estudo. Os valores estão expressos em média e desvio padrão dos dois grupos experimentais

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

5.2.5 Alterações ultrassonográficas em macacos-da-noite experimentalmente infectados por HEV

Foram realizadas 32 avaliações ultrassonográficas hepáticas nos animais e, destas, 34,4% (11/32) apresentaram alterações de ecogenicidade, volume e/ou lesões no parênquima hepático e 65,6% (21/32) não apresentaram alterações. Na S0 os fígados de todos os animais estavam dentro dos parâmetros de normalidade. Não houve diferença estatística quanto a frequência de ocorrência dessas alterações em cada semana de avaliação entre os grupos 1 e 2. A Tabela 15 apresenta a frequência e semana de ocorrência das alterações ultrassonográficas para os grupos experimentais. A análise da frequência de ocorrência para cada grupo em relação a cada parâmetro no período experimental mostrou que para o grupo 1 a hiperecogenicidade ocorreu três vezes (3/24, 12,5%), nenhum animal apresentou aumento do volume e nem lesões focais hiperecogênicas. Enquanto, para o grupo 2 a observação de hiperecogenicidade ocorreu uma vez (1/24, 4,1%), aumento de volume uma vez (1/24, 4,1%) e lesões focais hiperecogênicas, cinco vezes (5/24, 20,8%). A frequência de observação de lesões focais hiperecogênicas foi estatisticamente diferente entre os grupos ($p = 0,0496$, Teste exato de Fisher).

Tabela 15 – Alterações ultrassonográficas hepáticas em seis macacos-da-noite infectados experimentalmente pelo genótipo 3 suíno do HEV distribuídas segundo a frequência e semanas de ocorrência

Parâmetros	Frequência (%)		Valor de p^*	Semanas de ocorrência	
	Grupo 1 (n=3)	Grupo 2 (n=3)		Grupo 1	Grupo 2
Hiperecogenicidade	3/24 (12,5)	1/24 (4,1)	0,6085	S4, S8, S12	S8
Aumento de volume hepático	1/24 (4,1)	1/24 (4,1)	1,0000	S4	S4
Lesão focal hiperecogênica	nenhum	5/24 (20,8)	0,0496	nenhuma	S4, S8, S12

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: *Teste exato de Fisher, significância $p < 0,05$.

Na S4, a observação de hiperecogenicidade e aumento de volume foi observado em um animal do grupo 1 (BBF) e aumento de volume isolado, sem alteração de ecogenicidade, em um animal do grupo 2 (AKC). Nesta mesma semana, foi observada lesão focal hiperecogênica ~2 mm em dois animais (BAZ e AH-05/13) do grupo 2. Na S8, hiperecogenicidade foi verificada no AH-06/10 (grupo 1) e no AKC (grupo 2) e as alterações focais hiperecogênicas foram observadas nos animais BAZ e AH-05/13 do grupo 2. Na S12, foi verificada hiperecogenicidade no BBF, grupo 1 e lesão focal hiperecogênica no BAZ,

grupo 2. Nos controles, somente foi observado hipoeogenicidade no BCJ, grupo 2, na S4. A Figura 26 exemplifica os aspectos ultrassonográficos descritos.

Figura 26 – Aspecto ultrassonográfico de fígados de macacos-da-noite infectados experimentalmente pelo genótipo 3 do HEV:

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: VB = vesícula biliar; A) Fígado com ecogenicidade e tamanhos dentro dos parâmetros de normalidade (BBF, semana 8); B) parênquima hepático hiperecogênico e discreto aumento de tamanho (BBF, semana 4); C) Parênquima hepático exibindo lesão focal hiperecogênica (+ marcações de diâmetro da lesão) com tamanho de 2,4mm

5.2.6 Avaliação histopatológica e imunohistoquímica hepática em macacos-da-noite experimentalmente infectados por HEV

As principais alterações histopatológicas observadas em cada grupo na S0 estão na Tabela 16. A comparação dos escores de lesão histopatológica na S0 não mostrou diferença significativa ($p = 0,4964$, Teste de Kruskal-Wallis) entre os controles e os grupos experimentais. Os escores de lesões histopatológicas individuais na S0 obtidos para os controles variou de 3 a 11 (o maior o escore 11 foi detectado no animal BBO em S0), no grupo 1 os escores variaram de 2 a 4 e no grupo 2 de 2 a 7.

As alterações consideradas de fundo ou basais (S0) foram alterações degenerativas de balonização e esteatose, com distribuição focal a multifocal e em grau leve, focos de inflamação lobular discreta, caracterizada por infiltrado mononuclear (linfócitos e histiócitos) e, em menor frequência, neutrófilos, de distribuição focal a multifocal, acúmulo de hemossiderina em hepatócitos, células de Kupffer, macrófagos portais, focos de siderogranulomas, de intensidade discreta a marcante, e fibrose perisinusoidal focal. Os focos de siderogranulomas foram caracterizados por áreas de acúmulo de pigmento de hemossiderina circundados por infiltrado linfohistiocítico, que foram diferenciados dos focos de atividade lobular necroinflamatória, uma vez que estas não apresentaram acúmulo de pigmento. Alterações de congestão e hemorragia não foram observados em ácinos hepáticos. Hepatite portal e de interface não foram observadas e não foram observadas alterações de trato biliar referentes a proliferação ductular, colestase, colangite e/ou ductopenia. A Figura 27 exemplifica as principais alterações hepáticas basais (S0) identificadas nos macacos-da-noite.

Figura 27 – Lesões microscópicas hepáticas basais (S0) diagnosticadas em macaco-da-noites experimentalmente infectado pelo genótipo 3 suíno do HEV

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: A) Esteatose microgoticular de intensidade moderada (BCP – S0). HE, 40x, barra = 25 μM; B) fibrose perissinusoidal discreta (BBO – S0). Picrossírios, 40x, barra = 25 μM. C) acúmulo de hemossiderina com intensidade marcante em hepatócitos, células de Kupffer e no interior de siderogranulomas (BBO – S0). HE, 40x, barra = 25 μM; D) Acúmulo de hemossiderina com intensidade marcante em hepatócitos, células de Kupffer e no interior de siderogranulomas (BBO – S0). Perls, 40x, barra = 25 μM.

Tabela 16 – Distribuição das frequências de ocorrências de alterações histopatológicas basais (S0) de macacos-da-noite infectados experimentalmente pelo genótipo 3 suíno do HEV

Lesão histopatológica	Frequência de ocorrência de lesão			
	Controles (%) (n=2)	Grupo 1 (%) (n=3)	Grupo 2 (%) (n=3)	Valor de p^*
Esteatose	1 (50)	2 (66,6)	2 (66,6)	1,0000
Balonização	1 (50)	2 (66,6)	0	1,0000
Inflamação lobular	2 (100)	1 (33,3)	2 (66,6)	0,4643
Inflamação portal	0	0	0	–
Inflamação de interface	0	0	0	–
Siderogranulomas	1 (50)	0	1 (33,3)	0,4643
Hemossiderina	2 (100)	3 (100)	3 (100)	1,0000
Fibrose focal	1 (50)	0	0	0,2500
Variação de escores lesão histopatológica	3-11	2-4	2-7	0,4964 [‡]

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2016).

Legenda: *Teste exato de Fisher, sendo avaliada a frequência de ocorrência nos controles e nos grupos experimentais em conjunto, significância para $p < 0,05$; [‡]Teste de Kruskal Wallis, significância $p < 0,05$.

Nas avaliações de S4, S8 e S12, nos três animais do grupo 1 foi observada esteatose de discreta a marcante , balonização de discreta a moderada , acúmulo de hemossiderina de discreto a moderado, siderogranulomas de discreto a moderado, inflamação lobular de discreta a moderada, inflamação portal discreta. No grupo 2 foi observada ocorrência de esteatose de discreta (S4 e S8) a moderada (S4 e S12), balonização discreta (S4), hemossiderina discreta (S4, S8 e S12), siderogranulomas de intensidade discreta a moderada (S4, S8 e S12), inflamação lobular moderada A Tabela 17 apresenta os escores individuais para cada animal segundo o padrão de lesão, escore de lesão histopatológica e o grau de lesões histopatológicas.

Tabela 17 – Distribuição dos escores individuais da análise histopatológica e respectivos graus de lesões segundo animal, grupo e semanas

(continua)

ID Animal	Grupo	Semana	Esteatose	Balonização	Inflamação lobular	Hemossiderina	Siderogranulomas	Inflamação portal	Fibrose	ELH ¹	EGA ²
BBO	controle	0	0	1	3	3	3		1	11	3
BCJ	controle	0	1	0	1	1	0	0	0	3	1
BBF	1	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0
BCP	1	0	2	1	0	1	0	0	0	4	1
AH-06/10	1	0	1	1	0	1	0	0	0	3	1
BAZ	2	0	2	0	1	2	2	0	0	7	2
AKC	2	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0
AH-05/13	2	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0
BBO	controle	4	1	0	2	3	3	2	1	12	3
BCJ	controle	4	2	0	0	1	0		0	3	1
BBF	1	4	0	1	0	1	0	0	0	2	0
BCP	1	4	3	0	1	2	2	1	0	9	3
AH-06/10	1	4	0	1	1	2	3	0	0	7	2
BAZ	2	4	2	0	1	2	2	0	0	7	2
AKC	2	4	0	0	0	2	0		0	2	0
AH-05/13	2	4	1	1	0	1	0	0	0	3	1
BBO	controle	8	1	1	1	3	3	0	0	9	3
BCJ	controle	8	1	1	1	1	1	0	0	5	1
BBF	1	8	1	0	1	2	0	0	0	4	1
BCP	1	8	1	2	1	2	0	0	0	6	2
AH-06/10	1	8	0	1	1	2	3	0	0	7	2
BAZ	2	8	1	0	1	2	3		0	7	2
AKC	2	8	1	0	0	1	0	0	0	2	0
AH-05/13	2	8	1	0	0	1	0	0	0	2	0
BBO	controle	12	1	0	2	3	3	2	1	12	3
BCJ	controle	12	3	0	1	1	0	0	0	5	1
BBF	1	12	1	0	0	2	0	0	0	3	1

											(conclusão)
BCP	1	12	2	0	2	2	3	1	0	10	3
AH-06/10	1	12	1	0	2	1	3	0	0	7	2
BAZ	2	12	2	0	1	2	3	0	0	8	2
AKC	2	12	2	0	1	1	0	0	0	4	1
AH-05/13	2	12	1	0	0	0	0	0	0	1	0

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: ¹ELH= escore de lesão histopatológica (soma dos escores individuais de lesões); ²EGA= escore grau de análise atribuído quando ELH foi ≤ 2 o grau histopatológico foi considerado 0 (zero) – sem alterações, 3-5, 1 – alterações mínimas; 6-8, 2 alterações discretas e ≥ 9 , 3 alterações moderadas.

Não foram observadas alterações decorrentes da realização de quatro biópsias hepáticas nos dois animais controle com intervalos de quatro semanas ($p = 0,8333$, Teste de Friedman para amostras pareadas) e nem foram observadas alterações nos escores das avaliações histopatológicas nas amostras de cada animal no grupo 1 ($p = 0,1250$) e no grupo 2 ($p = 0,7500$) (Teste de Friedman para amostras pareadas). A Figura 28 mostra os gráficos dos escores (máximo e mínimo) atribuídos a cada animal em cada grupo em relação as semanas 0, 4, 8 e 12 de experimentação.

Figura 28 – Distribuição dos escores mínimo a máximo das lesões histopatológicas hepáticas em macaco-da-noites experimentalmente infectado pelo genótipo 3 suíno do HEV segundo as semanas 0, 4, 8 e 12

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

A avaliação do efeito de inoculação por via intravenosa ou oral em relação aos controles nas semanas 4, 8 e 12 não evidenciou diferença estatística significativa e os valores de p foram $p = 0,7648$, $p = 0,3257$ e $p = 0,5393$, respectivamente para cada semana (teste de Kruskal-Wallis). A Tabela 18 exibe a distribuição da frequência - nº de vezes/(nº mensurações x nº animais - e semanas de ocorrência para cada lesão diagnosticada nos dois grupos experimentais.

A comparação entre os grupos experimentais quanto ao escore de lesão histopatológico nas semanas S4, S8 e S12 também não demonstrou diferença estatística significativa, na semana S4 ($p = 0,8000$), S8 ($p = 0,6000$) e S12 ($p = 0,7000$) utilizando o teste Mann-Whitney. O animal BCP e AH-06/10, do grupo 1, foram os animais que exibiram aumento do escore de lesão histopatológico e variação no grau de lesão nas S4, S8 e S12 em comparação a S0.

A imunomarcagem de antígenos da proteína ORF3 (pORF3) foi positiva em um animal do grupo 1 (BCP) na S4. A imunomarcagem positiva foi caracterizada por aspecto granular e coloração castanho-dourado em grupos de hepatócitos íntegros, com intensidade discreta e

distribuição focal, diferindo na intensidade e distribuição multifocal no caso suíno controle positivo. O controle positivo de reação apresentou marcação positiva em todas as reações realizadas. A Figura 29 exemplifica lesão inflamatória e imunomarcação positiva no controle de reação e no caso experimental de macaco-da-noite e reação negativa.

Tabela 18 – Distribuição das frequência e semanas de ocorrências das lesões histopatológicas diagnosticadas nos macacos-da-noite infectados experimentalmente pelo genótipo 3 suíno do HEV em relação as quatro semanas de avaliação

Lesões histopatológicas	Frequência de ocorrência (%)		Semanas de ocorrência	
	Grupo 1 (n=3)	Grupo 2 (n=3)	Grupo 1	Grupo 2
Esteatose	8/12 (66,6)	10/12 (83,3)	S0, S4, S8 e S12	S0, S4, S8 e S12
Balonização	6/12 (50)	1/12 (8,3)	S0, S4 e S8	S4
Inflamação lobular	8/12 (66,6)	6/12 (50)	S0, S4, S8 e S12	S0, S4, S8 e S12
Inflamação portal	2/12 (16,6)	0	S4, S12	Nenhuma
Hemossiderina	12/12 (100)	11/12 (91,6)	S0, S4, S8 e S12	S0, S4, S8 e S12
Siderogranulomas	5/12 (41,6)	4/12 (33,3)	S4, S8 e S12	S0, S4, S8 e S12

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Figura 29 – Lesão inflamatória lobular e detecção imunohistoquímica em macaco-da-noites experimentalmente infectados pelo genótipo 3 suíno do HEV

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: A) focos de atividade inflamatória lobular de intensidade discreta (AH-06/10 - S12). HE, 400x, barra = 25 μ M; B) imunomarcção positiva de antígenos do HEV (pORF3) em fígado de suíno, controle positivo. Observe a marcação de aspecto granular e coloração castanho-dourado em grupos de hepatócitos e células de Kupffer, contraste com hematoxilina de Harris, 400x, barra = 25 μ M; C) imunomarcção negativa em fígado de macaco-da-noite (AH-05/13 - S8), contraste com hematoxilina de Harris, 40x, barra = 25 μ M; D) imunomarcção positiva discreta em grupos de hepatócitos de macaco-da-noite (BCP, grupo 1, - S4), contraste com hematoxilina de Harris, 400x, barra = 25 μ M.

5.2.7 Alterações clínicas, laboratoriais bioquímicas e hematológicas, ultrassonográficas e histopatológicas em relação a detecção de HEV-RNA em macacos-da-noite infectados pelo genótipo 3 suíno do HEV

As tabelas 19 e 20 resumem os achados individuais relacionados às alterações clínicas, laboratoriais (hematológicos e bioquímicos), ultrassonográficas e histopatológicas hepáticas em relação à detecção molecular do HEV nos seis macacos-da-noite dos grupos experimentais 1 e 2, respectivamente.

Analisando a hipótese de que animais que apresentaram hipertermia também tiveram detecção de HEV-RNA (no soro e/ou fezes) na mesma semana, constatou-se que os eventos foram concomitantes em duas vezes no grupo 1 (animal BCP, em S5 e S6) e no grupo 2, em dois animais (AKC e BAZ), por cinco vezes (S2, S3, S5, S6 e S7). Os eventos ocorreram em ambos os grupos em S5. Não houve diferença significativa entre os grupos para a ocorrência na mesma semana (período de S1 a S7) de hipertermia e detecção de HEV-RNA ($p = 1,0000$, Teste exato do Fisher). Com base no Teste de Correlação de Spearman, não houve correlação entre hipertermia e detecção do HEV-RNA em nenhum dos dois grupos (grupo 1 $R = -0,3$ e $p = 0,1437$; grupo 2 $R = 0,4719$ e $p = 0,0308$).

A ocorrência de hipertermia e diarreia foi detectada na mesma semana em um caso no grupo 1 no animal BBF na S7 e em nenhum no grupo 2. Apenas dois animais apresentaram diarreia, hipertermia e detecção de HEV-RNA na mesma semana: animal BCP (grupo 1) na S6 e BAZ (grupo 2) na S5. A observação de diarreia e a detecção de HEV-RNA no soro e/ou fezes ocorreu em três casos no grupo 1: BCP nas semanas S7 e S9 e no animal AH-06/10, na S6. No grupo 2, o HEV-RNA foi detectado em animal com diarreia em apenas um caso, AH-05/13 na S4. A ocorrência de diarreia segundo a positividade para o HEV-RNA nas amostras de soro e/ou fezes e variação do peso dos animais es indicada nas Figuras 21 e 22.

O animal BBF, do grupo 1, apresentou desidratação e hipertermia em S1, desidratação, diarreia e hipertermia em S7, desidratação como um evento isolado em três semanas (S3, S8 e S11) e diarreia isolada em S9. No grupo 2, desidratação foi observada no animal BAZ, que apresentou desidratação e hipertermia (S1, S4, S8, S9 e S11), diarreia e hipertermia em S5 e desidratação isolada em S3 e S10.

Tabela 19 – Resumo das alterações clínicas, bioquímicas, hematológicas, ultrassonográficas e histopatológicas hepáticas observadas em macacos-da-noite do grupo 1 infectados pelo genótipo 3 suíno do HEV segundo as semanas de experimentação e detecção do HEV-RNA

Semana	Clínica	Bioquímica	Hematologia	Ultrassonografia	Histopatologia*	HEV-RNA [‡]
1	Hipertermia, diarreia e desidratação	↑ AST, ↑ GGT, ↑ FA, ↑ colesterol,	↓ HT	NR	NR	- [‡]
2	Hipertermia	↓ PT, ↓ globulina	↓ HT	NR	NR	+ fezes
3	Hipertermia e desidratação	↑ AST, ↑ FA	↓ HT	NR	NR	+ fezes
4	Desidratação	↑ AST, ↑ BT, ↑ BD, ↑ BI, ↓ triglicérides, ↑ colesterol	↓ HT	Hipercogenidade e ↑ volume hepático	2-9	+ soro e fezes
5	Hipertermia e diarreia	↑ GGT, ↓ PT, ↑ triglicérides	↓ HB, ↓ HT e ↓ plaquetas	NR	NR	+ soro
6	Hipertermia e diarreia	↑ ALT, ↑ GGT, ↑ BT, ↓ triglicérides	↓ HT	NR	NR	+ fezes
7	Hipertermia, diarreia, desidratação, ganho e perda de peso	↓ globulina	↓ HT	NR	NR	+ fezes
8	Desidratação	↑ BT, ↑ BD	↓ HT	Hipercogenidade	4-7	+ fezes
9	Diarreia, ganho de peso	↑ GGT	↓ HE, ↓ HB e ↓ HT	NR	NR	-
10	Ganho de peso	Ausentes	↓ HT	NR	NR	-
11	Desidratação, ganho de peso	Ausentes	Ausentes	NR	NR	-
12	Ausentes	↑ AST, ↑ BT, ↑ BD, ↑ BI	Ausentes	Hipercogenidade	3-10	-

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: *Variação de escore de lesões histopatológicas por grupo, sendo o escore de lesão histopatológico = a somatória de escores de padrão de lesão histopatológica; [‡]Resultado de detecção no soro e/ou fezes; [‡]- = HEV-RNA não detectado; AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase; GGT gama glutamiltransferase; FA = fosfatase alcalina; PT = proteína total; BT = bilirrubina total; BD = bilirrubina direta; BI = bilirrubina indireta; HT = hematócrito; HB = hemoglobina; HE = hemácias; NR = não realizada.

Tabela 20 – Resumo das alterações clínicas, bioquímicas, hematológicas, ultrassonográficas e histopatológicas hepáticas observadas em macacos-da-noite do grupo 2 infectados pelo genótipo 3 suíno do HEV segundo as semanas de experimentação e detecção do HEV-RNA

Semana	Clínica	Bioquímica	Hematologia	Ultrassonografia	Histopatologia*	HEV-RNA [‡]
1	Hipertermia, diarreia, desidratação e perda de peso	↑AST, ↑ALT ↑ PT, ↑ colesterol, ↑ creatinina	↓ HB e ↓ HT	NR	NR	- [‡]
2	Hipertermia e perda de peso	↓ PT	Ausentes	NR	NR	+ soro
3	Hipertermia, desidratação e perda de peso	↑ ALT, ↑ triglicérides, ↑ creatinina	↓ HT	NR	NR	+ soro
4	Hipertermia, diarreia, desidratação e perda de peso	↑AST, ↑ALT, ↑ BT, ↑ BD, ↑ BI, ↑ colesterol	Ausentes	↑ volume hepático e LNFH	3-7	+ soro
5	Hipertermia, desidratação e perda de peso	↑ GGT, ↑ triglicérides, ↑ creatinina	↓ HE, ↓ HB e ↓ HT	NR	NR	+ fezes
6	Hipertermia e perda de peso	↑ALT, ↑ GGT, ↑ PT	↓ HT	NR	NR	+ soro
7	Hipertermia e perda de peso	↑ PT	↑ monócitos	NR	NR	+ soro
8	Hipertermia, diarreia e desidratação	↑ FA, ↑ creatinina	Ausentes	Hiperecogenicidade e LNFH	2-7	-
9	Hipertermia, desidratação e perda de peso	↑ ALT	↓ HB e ↓ HT	NR	NR	-
10	Hipertermia, desidratação e perda de peso	↑ALT, ↑ PT, ↓ globulina	Ausentes	NR	NR	-
11	Hipertermia, desidratação e perda de peso	↑ALT		NR	NR	-
12	Perda de peso	↑ALT, ↑FA, ↑BT, ↑ BD, ↑ BI	↓, HE, ↓ HB, ↓ HT, ↓ leucócitos	LNFH	1-8	-

Fonte: (DE SOUZA, A. J. S., 2017).

Legenda: *Variação de escore de lesões histopatológicas por grupo, sendo o escore de lesão histopatológico = a somatória de escores de padrão de lesão histopatológica; [‡]Resultado de detecção no soro e/ou fezes; [‡]- = HEV-RNA não detectado; AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase; GGT gama glutamiltransferase; FA = fosfatase alcalina; PT = proteína total; BT = bilirrubina total; BD = bilirrubina direta; BI = bilirrubina indireta; HT = hematócrito; HB = hemoglobina; HE = hemácias; LNFH = lesão nodular focal hiperecogênica ~ 2 mm; NR = não realizada.

Os eventos desidratação e detecção de HEV-RNA no soro/fezes foram observados em um episódio em cada grupo nos animais BBF e no BAZ, ambos em S4. No animal BAZ a ocorrência de desidratação e detecção do HEV-RNA também foram concomitantes ao pico de hipertermia.

Em relação às variações no peso, nos macacos-da-noite do grupo 1 os pesos foram menores nas semanas S4, S8 e S12, que são as semanas de procedimento anestésico e de biópsia, o que pode ter relação com o período de jejum prolongado. As seis primeiras semanas (S1-S6) houve ganho de peso acima de 10% em relação ao peso basal pelo animal BBF (S1) e AH-06/10 (S6), nas demais semanas ocorreu pequena variação (<10%) do peso e nesse período foram observados picos de hipertermia (S1 e S2 animais BCP e BBF), episódios de diarreia (S1, S5, S6 para os animais AH-06/10, BBF e BCP, respectivamente) e desidratação leve no animal BBF nas semanas S1, S3 e S4. No período de S7 a S12, houve redução discreta (<10%) do peso no animal BCP e BBF associado a episódios de diarreia nas semanas S7 e S9 e, no caso do BBF, desidratação nas semanas S7, S8 e S11. Enquanto o animal AH-06/10 apresentou ganho de peso nas semanas S7, S9, S10 e S11 em relação ao peso basal.

No grupo 2, os animais AKC e BAZ reduziram significativamente os pesos nas 12 semanas, sendo que o animal AKC apresentou redução de 38,1% em S4 em relação ao peso basal, 36,26% na S8 e 34,84% na S12, O animal BAZ o peso em 39,2% na S4, 39,6% na S8 e 35,87% na S12 em relação ao peso basal (S0). Assim, as maiores diferenças relacionadas ao peso inicial foram observadas entre as semanas S0 e S4, em que os animais apresentaram expressivas perdas de peso como o animal AKC, que apresentou peso inicial de 1900 g (S0) e ficou com 1175 g na S4; o animal BAZ, que exibiu 1720 g na S0 e 1046 g na S4; e o AH-05/13 que diminuiu de 963 g para 906 g. As semanas S4, S8 e S12, à semelhança do grupo 1, foram as semanas de procedimento anestésico e de biópsia. Em relação aos demais parâmetros clínicos, o animal AKC e BAZ foram os que apresentaram maior número de picos de hipertermia (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10 e S11), além de maior número de episódios de diarreia (S1, S4, S5 e S8) e desidratação, no caso de BAZ (S1, S3, S4, S8, S9, S10 e S11).

A detecção de HEV-RNA no soro e/ou fezes e ganho de peso (>10%) ocorreu no animal AH-06/10 do grupo 1 na S6, na qual também foi observado diarreia. No grupo 2 o evento detecção de HEV-RNA no soro e/ou fezes e perda de peso foi observado em seis vezes (S2, S3, S4 e S5). Nesses episódios também foram observados picos de hipertermia nos animais em S2 (BAZ), S3 (AKC) e S4, S6 e S7 (BAZ). A ocorrência de detecção do HEV-RNA, hipertermia e diarreia foi observada em S4 (AKC) e S5 (BAZ).

No grupo 1, a elevação de AST, mesmo que inferior a 2x o valor basal considerado, foi coincidente à hipertermia no animal BCP em S1 e antecedeu a detecção de HEV-RNA no soro e coincidiu com a detecção molecular nas fezes do animal BCP e AH-06/10 em S4, respectivamente. Os valores máximos de AST do animal BAZ, grupo 2, em S1 (133,2 U/L) e S4 (179,4 U/L) antecederam a detecção de HEV-RNA no soro (S2 e S6) e nas fezes (S5).

A elevação de ALT no grupo 1 ocorreu após a detecção de HEV-RNA no soro (S4) do animal BBF. Por outro lado, no grupo 2 houve discreta elevação da ALT na semana S3 e S4 que coincidiu com a detecção de HEV-RNA no soro (S3) e presença de diarreia e desidratação na S4. As elevações da enzima nas S9, S10, S11 foram concomitantes a hipertermia. O animal BAZ, grupo 2, exibiu elevação da ALT em S1, S3 e S4 que antecederam as detecções no soro e fezes, mas coincidiram com picos de hipertermia. No caso do AH-05/13 houve elevação da ALT na S4 na mesma semana da detecção molecular no soro e presença de diarreia. As figuras 13, 14, 19 e 20 apresentam a detecção molecular e a relação com ALT, episódios de diarreia e variação do peso.

A elevação de GGT no grupo 1, no animal BBF, ocorreu em S5 concomitante a observação de diarreia no animal, após a detecção de HEV-RNA no soro (S4) e hipertermia (S1). No grupo 2, a elevação observada no animal BAZ em S5 e S6 coincidiu com detecção de HEV-RNA nas fezes (S5) e no soro (S6), episódios de hipertermia (S5 e S6) e diarreia (S5).

A elevação de FA no animal 06/10, do grupo 1, ocorreu em S1, concomitante à observação de diarreia e temperatura de 39 °C, antes da detecção de HEV-RNA nas fezes do animal AH-06/10 em S2. O animal BBF exibiu em S3 além da elevação de FA e desidratação antecedendo a detecção de HEV-RNA no soro (S4). No grupo 2, a elevação de FA ocorreu concomitante à hipertermia em S8 (animal 05/13). As demais determinações de elevação de FA ocorridas não foram relacionadas temporalmente com nenhum outro parâmetro avaliado.

A elevação de BT no grupo 1 ocorreu concomitante com detecção de HEV-RNA no animal BCP na S4, que também exibiu elevação da ALT e em S6 também foi concomitante a detecção molecular nas fezes e ocorrência de hipertermia e diarreia. No grupo 2 a elevação de BT na S4 para o animal AH-05/13 e AKC foi concomitante com detecção molecular no soro, elevação de ALT e episódio de diarreia.

A elevação de BI no grupo 1 ocorreu concomitante com detecção de HEV-RNA no animal BCP na S4, que também exibiu elevação de BT e ALT. No grupo 2, a elevação de BI na S4 para o animal AH-05/13 foi concomitante a detecção molecular no soro, elevação de BT, ALT e diarreia.

A elevação de BD no grupo 1 ocorreu concomitante com detecção de HEV-RNA nas fezes e elevação de AST no animal AH-06/10 em S4. Enquanto no grupo 2 o animal AKC exibiu na S12 também elevação de ALT, BT e BI e redução do peso.

A elevação de PT no grupo 2 ocorreu concomitante com detecção de HEV-RNA no soro para o animal AKC na S4. As demais elevações de PT foram relacionadas a episódio de hipertermia no mesmo animal nas semanas S7, S10 e S11. Já a redução de PT em S2 foi relacionada temporalmente com a detecção molecular no soro de HEV-RNA do animal BAZ e a episódio de hipertermia. No grupo 1 a redução de PT foi relacionada a hipertermia (S2, animal BCP) e a diarreia e elevação de GGT na S5, no animal BBF.

No grupo 1, a redução de albumina em S2 no animal BBF precedeu a detecção do HEV-RNA no soro (S4), similar ao animal 05/13 em que a redução de albumina e viremia ocorreram em S2 e S4, respectivamente. A redução de globulinas no grupo 1 foi relacionada com a detecção de HEV-RNA nas fezes do animal BCP na S7, que também relacionada com diarreia. No grupo 2, foi relacionada com a detecção no soro no animal BAZ (S2) em concomitância com observação de hipertermia e perda de peso.

A elevação de triglicérides no grupo 1 ocorreu após a detecção no soro de HEV-RNA no animal BBF, que também exibiu elevação de GGT, diarreia e desidratação. No grupo 2 coincidiu com a detecção nas fezes de HEV-RNA, elevação de GGT, ALT, hipertermia e diarreia.

A redução de triglicérides no grupo foi coincidente a detecção de HEV-RNA nas fezes, no animal AH-06/10 na S4 e com hipertermia no animal BCP em S6. No grupo 2, a elevação de colesterol foi relacionada com hipertermia e diarreia, desidratação, redução do peso e elevação de ALT no animal BAZ na S1 e com a detecção de HEV-RNA no soro associada a diarreia e elevação de ALT para o animal AH05/13 na S4.

A relação de elevação de ureia e detecção de HEV-RNA foi observada na S6 no animal BCP, em que exibiu o maior valor de ureia nas 12 semanas analisadas para este animal, também houve detecção de HEV-RNA nas fezes, elevação de ALT, diarreia e hipertermia. Os valores abaixo do mínimo não foram relacionados com os demais parâmetros.

A relação entre elevação de creatinina foi observada especificamente em dois animais (AKC e BAZ) do grupo 2 em relação aos valores basais e coincidiu com a detecção de HEV-RNA nas S3 e S5, respectivamente para cada animal. As demais elevações observadas foram relacionadas na S1 com diarreia, perda de peso (AKC) e hipertermia, elevação de ALT e desidratação (BAZ) e na S8 com diarreia e hipertermia (AKC) e hipertermia e elevação de ALT (BAZ).

Com relação a detecção de HEV-RNA na S4 o animal BBF (grupo 1) apresentou detecção molecular no soro e alterações ultrassonográficas de aumento de ecogenicidade do parênquima e aumento de volume no fígado. No grupo 2, na S4 o animal AKC apresentou detecção no soro, episódio de diarreia, desidratação e elevação da ALT com aumento de volume hepático, enquanto os animais BAZ e AH05/13 exibiram elevação da ALT, hipertermia, lesões nodulares focais hiperecogênicas e diarreia, e detecção molecular de HEV-RNA. Na S8, os três animais do grupo 2 com alterações ultrassonográficas (hiperecogenicidade e lesões nodulares hiperecogênicas focais) foram observados no mesmo período de tempo animais apresentando diarreia, hipertermia e perda de peso.

A análise dos escores de lesão histopatológica em relação a detecção de HEV-RNA e demais parâmetros por semana mostrou que o maior escore foi 10 atribuído a biópsia do animal BCP, grupo 1 na S12, mas sem relação com outros parâmetros clínico-laboratoriais avaliados. Porém, o segundo maior escore (9), foi observado em S4 neste mesmo animal, em que também foi observada detecção de HEV-RNA no soro, elevação da ALT e no fígado foi observada esteatose marcante, inflamação lobular e portal discreta, moderada hemossiderose e presença de siderogranulomas e imunomarcagem positiva para proteína ORF3 na imunohistoquímica. O animal BAZ apresentou escore 7 durante praticamente todo o experimento exibiu em concomitância hipertermia, elevação de ALT na S4 e S8.

A análise em conjunto dos parâmetros clínicos, laboratoriais, ultrassonográficos, histopatológicos em relação a detecção de HEV-RNA mostrou que os macacos-da-noite apresentaram alterações clínicas de hepatite aguda oligossintomática na S1 com elevação de AST e de colesterol e queda do hematócrito. Com diferença entre os grupos em relação a presença de perda de peso e elevação de ALT no grupo 2. A detecção de HEV/RNA se iniciou na S2, mas com detecção nas fezes no grupo 1 o que indicou viremia curta em menos de uma semana e não detectada neste grupo. Na S4 foram observadas alterações histopatológicas de hepatite aguda e detecção imuno-histoquímica de antígeno viral no grupo 1. A detecção viral ocorreu até S7/S8 para o grupo 1 e 2, respectivamente, mas as alterações clínicas e laboratoriais foram observadas até a S9 para o grupo 1 e S12, grupo 2. Destaca-se que no grupo 1, na S12 foram observadas alterações laboratoriais indicativas de hepatite como elevação da AST e de bilirrubinas, e lesão histopatológica de hepatite aguda sem detecção viral no soro/fezes.

6 DISCUSSÃO

A discussão foi subdividida segundo as etapas 1 e 2 do estudo de forma a manter a objetividade e clareza do texto

6.1 ETAPA 1 - DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE RT-qPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HEV-RNA E APLICAÇÃO NA ANÁLISE RETROSPECTIVA DE CASOS SUSPEITOS DE HEPATITE E EM HUMANOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL BRASILEIRA

O estudo tinha por objetivo o aprimoramento do diagnóstico laboratorial da hepatite E, e assim um protocolo de RT-qPCR foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas (protocolo *in house*), aplicável a pesquisa molecular do HEV em amostras biológicas de humanos e de animais, como ferramenta diagnóstica rápida, precisa e reprodutível de infecção por HEV. Protocolos de diagnóstico baseados na amplificação de ácidos nucleicos virais, de modo geral, apresentam sensibilidade e especificidade superiores, quando comparados a testes sorológicos (JOTHIKUMAR et al., 2006; GARSON et al., 2012; ABRAVANEL et al., 2012; MOKHTARI et al., 2013), o que reforça a importância do protocolo de RT-qPCR.

A detecção e quantificação da curva padrão obtida por clonagem da amostra suína foi reprodutível entre os ensaios e apresentou valores analíticos (coeficientes de eficiência e reprodutibilidade) adequados. Deste modo, a obtenção de uma curva padrão a partir do DNA plasmidial de um isolado suíno do genótipo 3 do HEV demonstrou ser uma alternativa eficaz para utilização em protocolo de quantificação absoluta do HEV-RNA. Considerando que a infecção pelo vírus da hepatite E em humanos pode cursar como hepatopatia aguda ou crônica e devido a inconsistências nos kits comerciais disponíveis para o diagnóstico sorológico da hepatite E, o desenvolvimento e aplicação de técnicas de diagnóstico molecular são importantes para aplicação no diagnóstico laboratorial da infecção e, quando necessário, manejo terapêutico dos pacientes (DALTON et al., 2009; BAYLIS et al., 2013). Mostrando que o proposto no estudo tem aplicabilidade e importância no diagnóstico de infecção por HEV no nosso meio em outros centros de diagnóstico.

Adicionalmente, a aplicação do protocolo de RT-qPCR para quantificação da curva padrão obtida por diluições seriadas do WHO IS demonstrou sensibilidade de detecção similar a outros testes *in house* e kits comerciais utilizados para detecção e quantificação em

amostras humanas (MOKHTARI et al., 2013) e, neste sentido, o protocolo de RT-qPCR demonstrou ser válido para uso em diagnóstico laboratorial da hepatite E.

O HEV-RNA não foi detectado em nenhuma das 318 amostras de soro humano de casos suspeitos de hepatite E (mesmo entre casos IgM positivos confirmados), entretanto não detecção do HEV-RNA no presente estudo não foi associada a falha na técnica molecular aplicada, que utilizou controles restritos nos ensaios de RT-qPCR e amplificou de modo efetivo e reprodutível tanto os controles positivos quanto as curvas padrão obtidas por clonagem e diluição seriadas do WHO IS.

Apesar de não termos identificado nenhum caso RNA-positivo, estudos prévios demonstraram uma baixa prevalência molecular do HEV no Brasil: um caso entre 64 pacientes com hepatite aguda não-A, não-B e não-C no Estado do Rio de Janeiro (DOS SANTOS et al., 2010); um caso entre 2.271 amostras de um laboratório de referência do Estado de São Paulo (PASSOS-CASTILHO et al., 2015); e três positivas entre 96 amostras de receptores de rins também no Estado de São Paulo (PASSOS et al., 2013).

Acreditamos que o fato de não termos detectado molecularmente o HEV entre as amostras analisadas pode ter, por outro lado, relação com a presença, concentração e/ou qualidade do RNA viral nas amostras analisadas devido: 1) ao curto período de viremia da infecção, que nos casos agudos ocorre predominantemente na fase pré-ictérica e desaparece com o início dos sintomas (MENG, 2010); 2) ao longo período de estocagem das amostras de soros utilizadas (até 21 anos) (FONTANA et al., 2016); e 3) à exposição prévia a baixas cargas virais do HEV, determinando infecções subclínicas seguidas por soroconversão (MENG, 2010).

Recentemente, estudo desenvolvido nos EUA detectou apenas três casos sorologicamente positivos para HEV entre 681 amostras de pacientes com falha hepática aguda (FHA), e além da baixa prevalência, os três casos positivos apresentavam outras causas primárias de doença hepática fazendo com que os autores não pudessem determinar se a infecção por HEV representou uma causa primária ou secundária de FHA no estudo em foco (FONTANA et al., 2016). Neste estudo, os autores inferiram uma baixa prevalência, entretanto ponderaram que o armazenamento prolongado das amostras pode ter influenciado na não detecção do HEV-RNA, de modo similar ao que pudemos inferir sobre nossa casuística.

Identificamos baixa soroprevalência de 3,4% (11/318) e 5,9% (19/318) de anti-HEV IgM e IgG confirmados, respectivamente, e a soroprevalência não foi associada com sexo e idade entre as amostras avaliadas, porém ressaltamos que houve uma limitação no número de

amostras de indivíduos com idade >45 anos, quando comparados aos outros grupos etários analisados. Prevalências sorológicas similares de anticorpos anti-HEV foram previamente descritas em outras regiões geográficas do Brasil: 2,1% (3/146) de anti-HEV IgG entre pacientes de um laboratório de referência em hepatites virais no Estado de São Paulo (TRINTA et al., 2001); 0,7% (3/431) e 5,1% (22/431) de anticorpos anti-HEV IgM e IgG, respectivamente, entre catadores de lixo reciclável na cidade de Goiânia (MARTINS et al., 2014); e 2,1% (3/146) de anti-HEV IgG entre pacientes com hepatite aguda não-A, não-B, não-C em São Paulo (47/2.271) (PASSOS-CASTILHO et al., 2015).

Passos-Castilho et al. (2016) determinaram uma prevalência de 10% de anti-HEV IgG em doadores de sangue na região geográfica do Vale do Itajaí, no Estado de Santa Catarina, no Sul do Brasil, área de maior produção em suinocultura no país. Na região Norte do Brasil e, em particular no Estado do Pará, a suinocultura é desenvolvida em escala muito inferior a outros Estados da Federação. Em termos comparativos, enquanto o Estado de Santa Catarina possuía um rebanho de 6.792.724 cabeças no ano de 2015, o Estado do Pará possuía apenas 557.848 cabeças no mesmo ano (IBGE, 2017), fato que pode indicar uma dinâmica epidemiológica de menor circulação do vírus no seu principal reservatório na Amazônia e, consequentemente, em uma menor porporção de exposição a seres humanos, resultando em prevalências sorológicas inferiores (CLEMENTE-CASARES et al., 2003).

Nossos resultados indicaram uma baixa prevalência do HEV, mesmo entre casos suspeitos de hepatite E, na Amazônia oriental brasileira, região geográfica que apresenta alta prevalência (> 80%) para HAV, outro patógeno de transmissão fecal-oral causador de hepatite aguda (DE PAULA et al., 2001; TRINTA et al, 2001; ASSIS et al, 2002; VITRAL et al, 2014; NUNES et al, 2016). Na casuística avaliada, anticorpos anti-HAV totais foram detectados em seis casos que apresentaram positividade para anti-HEV IgG e em um caso positivo para anti-HEV IgM, indicando evidências sorológicas de co-exposição prévia ao HAV e HEV, similar a outros estudos desenvolvidos na América Latina (LAY et al., 2008; GARCÍA et al., 2012; ECHEVARRÍA et al., 2013). A co-infecção por HAV e HEV pode sugerir que as fontes de exposição aos dois vírus podem ser similares na Amazônia, o que indica que a co-infecção por HEV entre indivíduos com hepatite A aguda pode ocorrer e investigações adicionais são importantes e necessárias.

Echevarría et al. (2013) indicaram que isolados do HEV ainda não foram detectados e caracterizados entre comunidades indígenas, apesar de existirem evidências sorológicas de transmissão do HEV nestas. O fato de termos observado casos confirmados de sorologia positiva para hepatite E entre indígenas da etnia Parakanã pode estar associado ao contato,

consumo de suínos e/ou de carne de caça de outros reservatórios silvestres desconhecidos, o que aponta a necessidade de estudos posteriores e específicos em relação a infecção por HEV nestas e em outras comunidades indígenas na Amazônia.

O uso do teste confirmatório (RIBT) entre os casos positivos para anti-HEV IgM e IgG por ELISA determinou uma redução de casos diagnosticados inicialmente. Esta redução no número de casos em indivíduos positivos para anti-HEV IgM após uso de RIBT já foi demonstrada e pode representar uma redução de positividade de até 50% após o uso do teste confirmatório (FOGEDA et al., 2012). Adicionalmente, a ocorrência de reação cruzada e ocorrência de falso-positivos para hepatite E já foi demonstrada em pacientes com quadro agudo de infecção por Citomegalovírus ou vírus Epstein-Barr (FOGEDA et al., 2009).

Entre cinco amostras positivas para anti-HEV IgM por ELISA e não confirmadas por RIBT, três foram positivas também para anti-HCV total e uma para anti-HAV total (resultados não mostrados); já entre as 10 amostras anti-HEV IgG positivas, não confirmadas por RIBT, um paciente foi positivo para anti-Hbc e anti-HBs; um para anti-HAV total e anti-HBc; um para anti-HAV total e anti-HBs; um somente para anti-HAV total; e um para anti-HBc total (resultados não mostrados). Estes resultados sugerem a ocorrência de possíveis reações cruzadas no teste de ELISA com os outros vírus causadores de hepatites, o que ressalta a importância de utilização de testes sorológicos confirmatórios para o acurado diagnóstico da infecção por HEV no nosso meio.

Apesar da ocorrência de anticorpos anti-HEV já ter sido demonstrada previamente entre comunidades ribeirinhas (DE PAULA et al., 2001), crianças (ASSIS et al., 2002) e populações rurais na Amazônia brasileira (VITRAL et al., 2014; NUNES et al., 2016), a associação do diagnóstico sorológico e molecular para pesquisa de infecção por HEV em pacientes com suspeita clínica e/ou laboratorial de hepatite E na região foi investigada pela primeira vez.

A baixa prevalência de infecção por HEV entre pacientes com suspeita clínica e/ou laboratorial de hepatite E corrobora com estudos prévios que demonstraram que há uma baixa circulação do HEV na Amazônia brasileira. Por outro lado, o diagnóstico da infecção por HEV pode e deve ser considerado no diagnóstico diferencial de doenças hepáticas agudas ou crônicas, especialmente quando as outras causas foram excluídas.

Assim, estudos sorológicos e moleculares mais amplos precisam ser desenvolvidos incluindo em indivíduos saudáveis e pacientes com doenças hepáticas agudas e crônicas para melhor caracterização do impacto em saúde pública e para o entendimento da epidemiologia da hepatite E na Amazônia, em outras regiões do Brasil e na América Latina.

6.2 ETAPA 2 - ESTUDO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR GENÓTIPO 3 SUÍNO DE HEV EM MACACOS-DA-NOITE

No estudo, todos os seis macacos-da-noite (*A. azarai infulatus*) foram infectados experimentalmente com um isolado suíno do genótipo 3 do HEV circulante na Amazônia oriental brasileira. Este estudo mostrou pela primeira vez que essa espécie de macaco-da-noite é sensível a este genótipo do HEV independente da via de inoculação e pode ser utilizado como modelo de estudo de infecção interespecíes. Os animais exibiram alterações clínicas e laboratoriais de hepatite aguda oligossintomática já na primeira semana após a inoculação e a detecção molecular do vírus no soro e/ou fezes teve início na segunda semana e teve duração até a oitava semana. Na quarta semana de estudo alguns animais exibiram alterações ultrassonográficas e lesão histopatológica de hepatite aguda, que também foi diagnosticada na décima segunda semana. Em comparação a outros estudos experimentais com PNH, o delineamento proposto foi o mais longo em acompanhamento e desenvolvido de modo em que os parâmetros clínicos, laboratoriais, moleculares, ultrassonográficos e histopatológicos fossem avaliados em conjunto (TSAREV et al., 1992; 1993a; 1993b; TICEHURST et al., 1992; MENG et al., 1998b; AGGARWAL et al., 2001; CARVALHO et al., 2013).

A característica dos parâmetros analisados apresentaram baixa intensidade e não homogêneos entre os animais de cada grupo, fato que pode estar relacionado à baixa carga viral do inóculo utilizado. O caráter dose-dependente da infecção em relação à detecção sorológica e/ou molecular do HEV, de manifestação clínico-laboratoriais e histopatológicas já foram demonstrados em estudos experimentais com macacos do velho mundo (TSAREV et al., 1994b; AGGARWALL et al., 2001).

A detecção e quantificação do HEV-RNA nas amostras de soro e fezes dos macacos-da-noite mostrou que a carga viral nas fezes foi maior e por mais tempo do que a detectada no soro, de forma similar ao demonstrado em macacos cynomolgus experimentalmente infectados por HEV humanos dos genótipos 1 e 3, que também apresentaram cargas virais e períodos maiores de detecção nas fezes (TSAREV et al., 1992; 1994a; CARVALHO et al., 2013). Este resultado pode estar relacionado ao curso biológico de infecção do HEV, pois uma vez que o agente apresenta sítio de replicação principal em hepatócitos e curto período de viremia, a principal forma de eliminação se dá por via fecal, o que faz com que partículas virais sejam secretadas do fígado por via biliar e resulte em períodos mais prolongados de

excreção e maiores cargas virais nas fezes (LONGER et al., 1993; TSAREV et al., 1993b; KAWAI et al., 1999).

Os estudos conduzidos com PNH infectados com HEV reproduzem curso de infecção similar ao de hepatite E aguda autolimitada em humanos, em que há, na fase aguda, aumento de transaminases com detecção do HEV-RNA no soro e fezes e soroconversão após normalização dos níveis de transaminases e clareamento viral na fase convalescente (MENG et al., 1998b; PURCELL; EMERSON, 2001; YUGO et al., 2014). De maneira similar, no estudo com os macacos-da-noite, nas condições experimentais que realizamos, as alterações de hepatite aguda e elevação de transaminases também ocorreram utilizando inóculo do genótipo 3 suíno. Macacos rhesus experimentalmente infectados com isolado suíno do genótipo 3 do HEV apresentaram HEV-RNA detectável no soro e fezes durante as semanas 1-5 PI, com picos de ALT entre as semanas 1 e 4 (MENG et al., 1998b). *Cynomolgus* infectados pelo HEV genótipo 3 humano apresentaram RNA viral detectável no soro e fezes no período de 2-4 semanas, com aumento de transaminases no mesmo período e desenvolvimento de anti-HEV IgG 8 semanas PI (ERKER et al., 1999). No caso dos macacos-da-noite, as alterações clínicas e laboratoriais se iniciaram com uma semana após administração de inóculo de baixa carga viral, independente da via de administração utilizada, e continuaram com manifestação até S9/S12, por via intravenosa e oral, respectivamente.

O período de detecção do HEV-RNA no soro e fezes dos macacos-da-noite foi similar ao período de detecção de VLPs/HEV-Ag/HEV-RNA em estudos com outras espécies de PNH como rhesus, *cynomolgus* e chimpanzés (BALAYAN et al., 1983; BRADLEY et al., 1987; KRAWCZYNSKI et al., 1989; VAN CUYCK-GANDRÉ et al., 1998; HUANG et al., 2008) e humanos (BALAYAN et al., 1983; CHAUAN et al., 1993) infectados experimentalmente pelos genótipos 1 e 2, sugerindo que a infecção experimental no modelo utilizado apresentou curso de viremia e excreção fecal viral similar, quando comparado a isolados de outros genótipos e espécies de primatas inoculados experimentalmente por HEV.

Com base nos resultados de detecção molecular, identificamos três cursos de viremia e excreção fecal do HEV em macacos-da-noite: três animais apresentaram um pico isolado de viremia; um apresentou somente excreção fecal do HEV e dois apresentaram viremia e excreção fecal do HEV. Os animais (BBF, AKC e AH-05/13) que apresentaram somente viremia entre as semanas 3-4, exibiram período de detecção compatível com a detecção do HEV no soro durante o curso clássico de infecção aguda autolimitada (MENG et al., 1998a; 1998b; 2010).

A via fecal-oral é a principal forma de transmissão natural do HEV e apesar de estudos experimentais prévios terem indicado que a infecção por via oral requer doses infectantes altas para observação de achados sorológicos e moleculares de infecção (TSAREV et al., 1994a.; PURCELL; EMERSON, 2001; KRAWCZYNSKI et al., 2011; YUGO et al., 2014), outros estudos experimentais indicaram que não há diferença de cargas virais detectadas em animais detectados por via intravenosa ou oral, exceto que no curso de infecção por via intravenosa o período de detecção de viremia e excreção fecal são menores (BOUWKNEGT et al., 2009; CARVALHO et al., 2013; YUGO et al., 2014).

De modo inverso, o animal AH-06/10, grupo 1, apresentou somente excreção fecal do HEV nas semanas 2-6, sem viremia detectável. Este perfil foi previamente observado em chimpanzés inoculados com suspensões fecais dos genótipos 1 (MCCAUSTLAND et al., 2000) e 3 suíno (MENG et al., 1998b) e em macacos cynomolgus infectados por *pool* de soro e fezes humana do genótipo 3 (CARVALHO et al., 2013). Os chimpanzés e o cynomolgus não apresentaram sinais clínicos ou aumento significantes nos níveis de transaminases, assim como o animal AH-06/10 que, exceto por dois eventos de diarreia observados nas semanas 1 e 2, não apresentou outras alterações clínicas ou distúrbios bioquímicos séricos.

Estes perfis de detecção do HEV-RNA somente no soro ou fezes pode ter relação com a dose do inóculo (TSAREV et al., 1992; 1994a; MENG et al., 1998b; MCCAUSTLAND et al., 2000), tempo de armazenamento da amostra e/ou redução da infectividade do inóculo (CARVALHO et al., 2013; MCCAUSTLAND et al., 2000).

Em relação aos dois animais que apresentaram viremia e excreção fecal do HEV, um macaco-da-noite (BCP) apresentou viremia entre S4-5, seguido excreção fecal entre as semanas S6-8 e o outro (BAZ) apresentou dois períodos de viremia, sendo um detectado na semana 2 e outro nas semanas S6 e S7 e um pico de excreção fecal em S5. Este perfil de infecção foi similar aos perfis clássicos identificados em outras espécies de PNH experimentalmente infectadas por HEV (MENG et al., 1998a; ERKER et al., 1999; YU, C. et al., 2010; AGGARWAL et al., 2001).

O animal BCP apresentou eliminação do vírus nas fezes em período posterior à detecção da viremia, enquanto o animal (BAZ) apresentou somente um pico de excreção fecal do HEV, sem detecção do genoma viral concomitante no soro na mesma semana. Este perfil de excreção fecal intermitente (com alternância de detecção do HEV-RNA no soro e/ou fezes) do HEV já foi observada em macacos cynomolgus (JI et al., 2008) e rhesus (ARANKALLE et al., 2006) experimentalmente infectados por isolados do genótipo 4 suíno do HEV e em chimpanzés (MCCAUSTLAND et al., 2000) e cynomolgus (AGGARWALL et al., 2001)

infectados com inóculos do genótipo 1 do HEV humano com baixa cargas virais, resultando em infecções experimentais subclínicas, sem aumentos expressivos de transaminases.

Neste sentido, o fato de termos utilizado inóculo com baixa carga viral pode justificar os achados de detecção molecular do HEV no soro e fezes, uma vez que há uma relação diretamente proporcional entre o título do inóculo e as respostas virológicas, sorológicas, alterações de bioquímica sérica e lesões microscópicas associadas à infecção experimental em modelo com PNH ou variabilidades individuais de susceptibilidade do hospedeiro (TSAREV et al., 1994; AGGARWALL et al., 2001; KRAWCZYNSKI et al., 2011).

Os parâmetros de avaliação clínica, hematológica e bioquímica sérica não são descritos sistematicamente na maioria dos modelos experimentais e a avaliação do curso de infecção é baseado, principalmente, nos achados relacionados à detecção do HEV em amostras biológicas (soro, fezes, bile) e conversão sorológica, associada à avaliação dos níveis de transaminases hepáticas (principalmente ALT) e, em menor frequência, avaliação histopatológica hepática para verificação de ocorrência de lesões de hepatite aguda (TICEHURST et al., 1992; TSAREV et al., 1992; 1993; 1994a; LONGER et al., 1993; CUYCK-GANDRÉ et al., 1998; MENG et al., 1998a; 1998b; MCCLAUSTLAND et al., 2000; PURCELL; EMERSON, 2001; YUGO et al., 2014). A análise conjunta das alterações clínicas e laboratoriais semanais dos macacos-da-noite é um diferencial dos estudos experimentais anteriores, e permitiu mostrar que a doença nos macacos-da-noite é oligossintomática nas oito primeiras semanas, mas que exibe uma manifestação clínico-laboratorial na S12 mesmo sem a detecção molecular do vírus.

As alterações clínicas e laboratoriais inespecíficas, gastroentéricas ou mesmo a ausência de alterações foi similar aos quadros de hepatite aguda em outros animais e nos seres humanos, os quais apresentam diarreia, vômitos, dores abdominais e icterícia, ou mais comumente as infecções ocorrem de forma subclínica/assintomática e a observação de alterações clínicas está associada, predominantemente, ao período agudo de infecção em que há distúrbio de transaminases (MUSHAHWAR, 2008; POLDERVAART et al., 2009; AGGARWAL, 2011; KRAIN et al., 2014).

Nos macacos-da-noite não observamos distúrbios graves de transaminases e a comparação com os achados clínicos em outros estudos experimentais é limitada, pois a grande maioria dos estudos experimentais em PNH ou outras espécies não reportam a ocorrência de alterações clínicas em estudos experimentais de infecção por HEV (TICEHURST et al., 1992; MENG et al., 1998a; 1998b; HALBUR et al., 2001) e apesar da ocorrência de diarreia ter sido demonstrada em macacos-da-noite infectados

experimentalmente por HAV (LEDUC et al., 1983), este tipo de alteração clínica não foi observada em *A. trivirgatus* infectados pelo genótipo 2 do HEV (TICEHURST et al., 1992). Diferenças em relação ao consumo de alimento, ganho de peso e temperatura também não foram observadas em gerbils infectados pelo genótipo 4 do HEV (LI et al., 2009).

Os achados clínicos brandos relacionadas a distúrbios gastrointestinais do estudo podem estar relacionados tanto à baixa carga viral, quanto à natureza do inóculo utilizado, uma vez que isolados do genótipo 3 suíno do HEV, assim como o utilizado no estudo, não induzem a alterações clínica de doença hepática em circunstâncias naturais e experimentais em suínos (MENG et al., 1997; MENG et al., 1998a; HALBUR et al., 2001) e sugere-se que as manifestações clínicas mais graves são observadas quando inóculos provenientes de humanos são utilizados para infectar PNH (MENG et al., 1998b).

Não existem dados publicados sobre o curso clínico-laboratorial de primatas neotropicais experimentalmente infectados pelos genótipos 3 e 4 do HEV, entretanto seis espécimes de macacos-da-noite (*A. trivirgatus*) inoculados com um isolado do genótipo 2 do HEV apresentaram aumento de ALT entre os dias 8 a 26 PI, período similar ao que foram detectadas excreção fecal de VLPs (entre os dias 9-28 dias PI), detecção do HEV-Ag no fígado (entre os dias 9-23) e evidências histopatológicas de hepatite aguda (no dia 23 PI), indicando que assim como em outros modelos de PNH, em macacos-da-noite os achados laboratoriais associados a infecção experimental por HEV são observados principalmente na fase aguda, durante o primeiro mês PI (TICEHURST et al., 1992). A análise dos resultados mostrou que a maioria das alterações clínicas ocorreram nas sete primeiras semanas, mas alguns animais ainda exibiram alterações clínicas e laboratoriais, e até mesmo histopatológicas até a S12, o que difere dos demais estudos e talvez aponte para particularidade de curso de infecção no modelo, similar à manifestações de curso bifásico descrita em cynomolgus (TSAREV et al., 1993b).

Um estudo experimental em chimpanzés infectados por HAV indicou uma persistência do vírus no fígado mesmo após clareamento viral (no soro e fezes), fato que foi associado pelos autores à uma resposta reduzida de interferon I (LANFORD et al., 2011). Não avaliamos o período de detecção intra-hepática do HEV-RNA nos macacos-da-noite e/ou o perfil de resposta de citocinas e quimiocinas à infecção, porém estudos subsequentes podem ser desenvolvidos para avaliar a hipótese de permanência intra-hepática do HEV em macacos-da-noite após clareamento do vírus em amostras de soro e fezes, auxiliando na compreensão de particularidades de curso de infecção no modelo.

De modo similar aos achados de Ticehurst et al. (1992), identificamos que os principais distúrbios de bioquímica sérica foram detectados da S1 a S6 , período em que foi observada em maior frequência a detecção do HEV-RNA no soro e fezes. O clareamento viral ocorreu a partir da S8, mas alguns animais continuaram a apresentar alterações laboratoriais e também clínicas até S12. Em PNH do velho mundo, distúrbios de bioquímica sérica também são observados em períodos similares: cynomolgus infectados apresentaram pico de ALT entre os dias 25 e 38 PI, HEV-RNA nas fezes e bile a partir da segunda semana e desenvolvimento de anticorpos anti-HEV IgM a partir da 4ª semana PI (VAN CUYCK-GANDRÉ et al., 1998). YU et al (2010) detectaram pico máximo de ALT de 87 U/L, em chimpanzés infectados pelo genótipo 1 do HEV, associado a clareamento viral após 4 a 5 semanas. Arankalle et al (1998) demonstraram que chimpanzés inoculados com HEV genótipo 1 apresentaram discreto aumento de ALT entre 3-5 semanas PI, evidências microscópicas de hepatite aguda seguida por soroconversão e clareamento viral.

Ressaltamos que macacos rhesus experimentalmente infectados com isolado suíno do genótipo 3 do HEV apresentaram picos de ALT menores quando comparados a outros estudos experimentais inóculos humanos dos genótipos 1 e 2 (MENG et al., 1998b), portanto a utilização de isolado suíno no modelo em *A. infulatus* pode também ter relação com a observação de picos discretos de aumento de transaminases. Esta ausência de aumento expressivo de transaminases também já foi descrita em rhesus infectados experimentalmente por isolado do genótipo 4 suíno do HEV (ARANKALLE et al., 2006) e em cynomolgus infectados pelo genótipo 3 (Carvalho et al, 2013).

Não foi observada diferença significativa nos níveis de colesterol, triglicerídeos entre os animais experimentais, contudo isolados suínos do genótipo 3 do HEV são capazes de induzir a disfunções na síntese de colesterol e metabolismo lipídico durante a fase aguda de infecção em suínos e a intensidade de observação destas alterações podem ser associadas tanto a fatores modulatórios do hospedeiro quanto à variabilidade genética de isolados do HEV (ROGÉE et al., 2015). De modo oposto, YU et al (2010) não avaliaram marcadores bioquímicos séricos relacionados ao metabolismo de lipídios, porém observaram alterações no perfil transcricional de genes reguladores do metabolismo de lipídios em chimpanzés infectados experimentalmente pelo genótipo 1 do HEV.

Nos macacos-da-noite infectados com isolado do genótipo 3 suíno do HEV não observamos disfunções graves em marcadores bioquímicos séricos relacionados ao metabolismo de lipídios, como em suínos (ROGÉE et al., 2015), fato que pode estar ter relação com particularidades de resposta metabólica no modelo experimental, porém

disfunções no metabolismo de lipídios associadas a infecção por vírus RNA hepatotrópicos já foram descritas em PN (*Callithrix jacchus*) experimentalmente infectados por vírus da hepatite GB tipo B - GBV-B (Gênero *Hepacivirus*) (MANICKAM et al., 2016) e os resultados da presente pesquisa podem auxiliar em pesquisas futuras para melhor caracterização da resposta metabólica de macacos-da-noite infectados por HEV.

No presente, somente um número limitado de estudos tem relatado manifestações extra-hepáticas associadas à hepatite E em humanos, incluindo alterações neurológicas, lesões renais, pancreatite e distúrbios hematológicos (AGGARWAL et al., 2011; KAMAR et al., 2014). Entre os macacos-da-noite infectados experimentalmente no estudo, não observamos sinais clínicos de alterações neurológicas, motoras e renais.

As alterações de ureia e creatinina observadas no estudo podem ter relação direta com o quadro de hipertermia, desidratação e diarreia que alguns animais apresentaram no período experimental, mas Lins et al. (2012) ponderam que fatores de sexo e idade devem ser considerados para avaliação do perfil bioquímico sérico de ureia e creatinina em macacos-da-noite e que animais mais velhos tendem a apresentar valores médios mais elevados destes marcadores, neste sentido, a elevação de creatinina no grupo 2 pode ter relação com o fato deste grupo possuir animais com idade superior ao dos animais do grupo 1.

Outro fator pode estar relacionado à replicação extra-hepática renal do HEV, que já foi demonstrada em coelhos infectados experimentalmente que apresentaram o tecido renal positivo para HEV-RNA, com imunomarcagem positiva de antígenos virais e observação de infiltrado inflamatório intersticial no rins (HAN et al., 2014). Devido ao fato de não ter sido avaliado o tecido renal não pudemos confirmar se as alterações de marcadores de função renal estavam relacionadas à infecção pelo vírus e estudos subsequentes devem ser desenvolvidos para melhor caracterização de possíveis manifestações extra-hepáticas no modelo.

As alterações hematológicas em quadros agudos de hepatite E podem incluir a ocorrência de trombocitopenia, hemólise e anemia aplástica (AGGARWAL et al., 2011; KAMAR et al., 2014), porém informações sobre os perfis hematológicos associados a infecção por HEV são escassos na literatura, mesmo em humanos e resultados de análises hematológicas não são apresentadas nos principais estudos experimentais de referência sobre o tema. Carvalho et al. (2013) descreveram pela primeira vez alterações hematológicas em cynomolgus infectados pelo genótipo 3 suíno do HEV que exibiram linfopenia, discreta monocitose e diminuição progressiva no número de neutrófilos.

Os valores médios da série vermelha, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e plaquetas identificados nos macacos-da-noite dos dois grupos experimentais

durante as 12 semanas permaneceram dentro do intervalo estabelecido em macacos-da-noite adultos criados no CENP (TAKESHITA et al., 2011).

Takeshita et al (2011) estabeleceram o valor médio de 77,15 monócitos/mm³ (intervalo $\pm$ DP; 0 – 302 $\pm$ 98,13) em macacos-da-noite na colônia do CENP. Observamos a ocorrência de monocitose nos animais dos grupos 2 na S7 (média $\pm$ DP; 444,0; 304,3) em relação ao valor basal (média $\pm$ DP; 252,8 $\pm$ 114,2), resultado similar ao observado em dois cynomolgus também infectados por isolados suínos do genótipo 3 da Holanda e Brasil (CARVALHO et al., 2013).

Trombocitopenia ainda não foi relatada em PNH infectos experimentalmente por HEV, entretanto observamos diminuição na média de plaquetas nos macacos-da-noite do grupo 1 na S3 (média $\pm$ DP; 182 x 10³ células/mm³ $\pm$ 60,0), quando comparado ao valor basal (média $\pm$ DP; 225,5 x 10³ $\pm$ 91). O animal AH-06/10 foi o que apresentou menor valor de contagem de plaquetas (129,0 x 10³) na S4.

Em seres humanos, a trombocitopenia associada à hepatite E pode apresentar manifestação grave e distúrbios imunomediados foram sugeridos como possíveis causas destas alteração (COLSON et al., 2008), porém entre os macacos-da-noite a ocorrência de trombocitopenia foi observada de modo transitório e discreto e avaliações adicionais ainda são necessárias para determinação se a espécie *A. infulatus* seria um modelo em potencial para reprodução deste tipo de manifestações de alterações clínico-laboratoriais extra-hepáticas associada à infecção por HEV.

Carvalho et al (2013) ponderaram que a observação de alterações hematológicas em um número pequeno de animais e o grande desvio entre os valores hematológicos individuais em cynomolgus infectados experimentalmente pelo genótipo 3 do HEV não permitiram uma completa interpretação de achados hematológicos em modelo com PNH em estudo HEV. Neste sentido, apesar de termos encontrado alterações hematológicas discretas durante o experimento, estudos adicionais com um número maior de animais precisam ser desenvolvidos para verificação correlação entre a ocorrência de distúrbios hematológicos e infecção experimental por HEV em macacos-da-noite.

A utilização de kits comerciais humanos para pesquisa de anticorpos anti-HEV já foi previamente descrita em macacos rhesus (ZHANG et al., 2003), cynomolgus (LIU et al., 2013) e outras espécies como suínos (ZHANG et al., 2011), gerbils (LI et al., 2009; HONG et al., 2015) e coelhos (MA et al., 2010) infectados experimentalmente por HEV e foi utilizada pela primeira vez em macacos-da-noite no presente estudo.

Obtivemos somente resultados inconclusivos para detecção de anticorpos anti-HEV IgM e IgG em sete amostras de animais do grupo 1 (BCP, AH-06/10 e BBF), entre as semanas 8 e 14 PI. Não detectamos amostras positivas ou inconclusivas em animais do grupo 2, porém ausência de soroconversão, mesmo após detecção de viremia, assim como os animais AKC e AH-05/13 do grupo 2, já foi demonstrada em chimpanzés infectados experimentalmente pelo HEV-1 (MCCAUSTLAND et al., 2000).

O fato de não termos detectado resultados positivos nos testes de ELISA pode ser relacionada a 3 fatores principais: 1) resposta específica da espécie de PN; 2) inóculo de baixa carga viral; e/ou 3) sensibilidade do teste e utilização de conjugado anti-humano nos ensaios de ELISA. Estudos experimentais prévios determinaram que macacos-da-noite (*A. trivirgatus*) são suscetíveis à infecção por HEV e estão aptos a desenvolver resposta imune humoral após infecção experimental (TICEHURST et al., 1992; TSAREV et al., 1993a).

Um estudo comparativo da resposta sorológica de chimpanzés, PNH do velho mundo e PN infectados experimentalmente por isolado do genótipo 1 do HEV foi desenvolvido a partir da pesquisa de anticorpos anti-HEV por ELISA *in house* baseado em antígenos recombinantes da ORF2 do HEV expressos em células de inseto SF9, indicaram que amostras de soro um chimpanzé, um cynomolgus e um macaco-da-noite em um mesmo período de infecção (S7 PI) apresentaram valores diferenciados de densidade óptica, e os autores inferiram que a resposta sorológica de macacos-da-noite é inferior, quando comparada a resposta sorológica de chimpanzé e PNH do velho mundo (TSAREV et al., 1993a). Comparados a outros PN, macacos-da-noite soroconverteram nos dias 21 e 28 PI, macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) apresentaram resposta sorológica inferior e mais tardia (nos dias 35 e 41 PI), já saguis (*Saguinus mystax*) não apresentaram soroconversão (TSAREV et al., 1993a).

Neste sentido, o fato de termos detectado somente amostras inconclusivas em animais do grupo 1 e entre as semanas S8 e S14, pode ter relação com um perfil de resposta humoral específica de *A. azarai infulatus* a infecção por um isolado suíno do genótipo 3 do HEV, com característica de soroconversão com baixos títulos de anticorpos, não detectável pelo teste sorológico comercial utilizado, e em período mais tardio. Adicionalmente, em casos de infecção interespecies, como no presente estudo, a soroconversão pode não ser tão robusta, fato que já foi evidenciado em suínos experimentalmente infectados por HVE de coelhos (COSSABOOM et al., 2012).

A relação entre a carga viral e a resposta sorológica foi demonstrada por estudos experimentais prévios. A resposta sorológica de macacos rhesus experimentalmente

infectados foi diretamente proporcional a carga dos inóculos (ZHANG et al., 2003) e Tsarev et al (1994a) indicaram que há relação entre antígeno e dose infectante, para detecção de anticorpos anti-HEV, portanto o fato de termos utilizado inóculo de baixa carga viral pode ter induzido a uma baixa resposta sorológica nos macacos-da-noite.

Tsarev et al (1993a) sintetizaram conjugados anti-PN e aplicaram em testes de ELISA com amostra de soro de macaco-da-noite e quando comparados a testes com conjugados anti-humano, anti-PNH do velho mundo, demonstraram que conjugado anti-PN apresentou melhores resultados na detecção de anticorpos anti-HEV nas diluições de 1:20, 1:400 e 1:800. O fato de não termos utilizado um conjugado específico anti-*Aotus* nas reações de ELISA pode ter interferido na sensibilidade e especificidade das reações sorológicas nos kits comerciais utilizados. Ressaltamos que não há comercialmente disponível um conjugado específico para PN e que a utilização de conjugados anti-humano e anti-macaco (PNH do velho mundo) em amostras de soro macaco-da-noite pode resultar em reatividade reduzida em teste de ELISA para HEV (TSAREV et al., 1993a).

Hirano et al (2003) testaram 17 espécimes de PNH neotropicais cativos (incluindo seis macacos-da-noite) por ELISA, utilizando conjugado anti-macaco, e não detectaram nenhum espécime de *Aotus* positivo, entretanto, na mesma casuística detectou anticorpos reativos para ORF2 do HEV em macacos do gênero *Macaca*, portanto a utilização e conjugados específicos podem representar aprimoramento no diagnóstico sorológico de infecção por HEV em animais. A reavaliação das amostras de soro dos macacos-da-noite do estudo experimental por outras técnicas sorológicas complementares e/ou aplicação de de conjugados anti-PNH nos testes de ELISA pode aprimorar a sensibilidade e especificidade dos ensaios, auxiliando na melhor interpretação dos achados de sorologia.

Os resultados de avaliação ultrassonográfica indicaram que não foram observadas alterações graves no parênquima hepático durante curso do experimento. Ponderamos que exames ultrassonográficos não são rotineiramente aplicados no diagnóstico de hepatites virais agudas na medicina humana e veterinária, mas em pacientes com hepatite crônica B e C, a utilização do US tem importante aplicação na avaliação de ocorrência e/ou grau de fibrose e/ou presença e acompanhamento da evolução de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas (MOLL et al., 2010).

Informações sobre os achados ultrassonográficos hepáticos em casos de hepatite aguda viral são controversos. Moll et al. (2012) indicaram que em humanos, a inflamação aguda do fígado pode levar à observação ultrassonográfica de hepatomegalia e edema portal, associado a diminuição da ecogenicidade do parênquima com aumento da ecogenicidade de espaços-

porta e vesícula biliar (MATTOS et al., 2012). Sharma et al. (1991) também descreveram a ocorrência de alterações na vesícula biliar (espessamento na parede, distúrbios de conteúdo e diminuição de volume) em hepatites virais, porém não determinaram uma correlação com alterações de transaminases e provas de função hepática.

Os macacos-da-noite infectados experimentalmente com genótipo 3 suíno do HEV apresentaram alterações ultrassonográficas discretas e transitórias, incluindo aumento da ecogenicidade do parênquima hepático e aumento de volume do fígado. Giorgio et al. (1986) indicaram que humanos com hepatite viral aguda podem apresentar aumento na ecogenicidade do parênquima hepático e balonização de hepatócitos, entretanto os autores ponderaram que este tipo de lesão microscópica também pode ser observada em pacientes com hepatite viral aguda sem aumento de ecogenicidade hepática. Apesar de termos observado dois macacos-da-noite com parênquima hepático hiperecogênico na S4, somente 1 deles apresentou discreta balonização em hepatócitos.

Não identificamos alterações hepáticas graves por ultrassonografia no estudo experimental, porém a utilização do US foi importante no modelo proposto, pois permitiu que os procedimentos de biópsias hepáticas nos animais fossem desenvolvidos com segurança.

A natureza e intensidade das lesões hepáticas microscópicas foram similares às lesões basais descritas em macacos-da-noite (*A. trivirgatus*) inoculados experimentalmente com HAV sem determinação da etiologia (LEDUC et al., 1983; KEENAN et al., 1994). Não pudemos definir as causas das lesões inflamatórias lobulares basais nos animais utilizados no experimento, entretanto com base nos testes moleculares desenvolvidos durante a triagem dos animais, excluímos a participação de agentes relacionados aos principais vírus hepatotrópicos humanos, segundo as metodologias utilizadas.

Lesões de esteatose e balonização também foram observadas desde S0 até o fim do experimento, incluindo nos animais controle. A frequência de ocorrência destas alterações degenerativas não apresentou diferenças significantes durante o curso do estudo. Suínos experimentalmente infectados com isolados suínos e humanos do genótipo 3 do HEV podem apresentar balonização (HALBUR et al., 2001) e alterações no metabolismo de lipídios que resultam na observação de esteatose (ROGEÉ et al., 2015).

Balonização foi observada em um macaco-da-noite infectado pelo genótipo 2 (TICEHURST et al., 1992) e esteatose foi descrita em cynomolgus infectados experimentalmente por isolados suínos e humanos do genótipo 3 (CARVALHO et al., 2013) porém em ambos os estudos não foram estatisticamente associadas à infecção. Outros estudos experimentais com isolados do genótipo 3 também não relataram um perfil de observação de

esteatose e/ou balonização em chimpanzés (MENG et al., 1998b; YU et al., 2010), rhesus (MENG et al., 1998b) e cynomolgus (ERKER et al., 1999; LIU et al., 2013). Neste sentido, indicamos que as lesões degenerativas observadas tiveram um caráter inespecífico e possivelmente não foram associadas à infecção pelo genótipo 3 do HEV no modelo.

Em humanos com hepatite E aguda causada pelo genótipo 3, podem ser observadas lesões necroinflamatórias tanto em ácinos e espaços-porta quanto lesões do trato biliar como colestase, colangite e proliferação ductular (MALCOLM et al., 2007; PERON et al., 2007). Como particularidade, nos casos fulminantes de hepatite E em humanos pode ocorrer importante de hepatite colestatia, até mesmo com características de colangite destrutiva (WENDUM et al., 2005), porém entre os macacos-da-noite infectados com genótipo 3 suíno do HEV, não ocorreram lesões biliares, corroborando com outros estudos que avaliaram a infecção pelo genótipo 3 em PNH e também não reportaram alterações desta natureza (MENG et al., 1998b; ERKER et al., 1999; CARVALHO et al., 1993; LIU et al., 2013), fato que pode estar associado a um perfil espécie-específico de resposta inflamatória em humanos infectados.

Devido ao caráter dose-dependente da infecção, em PNH experimentalmente infectados por HEV, a observação de lesões lobulares e portais está relacionada principalmente à carga viral do inóculo e ao período agudo de infecção, quando há aumento de transaminases (TICEHURST et al., 1992; LONGER et al., 1993; TSAREV et al., 1993a; AGGARWAL et al., 2001; KRAWCZYNSKI et al., 2011).

Estudos experimentais de infecções subclínicas demonstraram que inóculos de baixa carga viral não induzem a um aumento significativo de transaminases e à observação de lesões necroinflamatórias, mesmo na ocorrência de viremia, excreção fecal do vírus, soroconversão e/ou detecção do HEV-Ag no tecido hepático (MCCAUSTLAND et al., 2000; AGGARWAL et al., 2001), de modo similar aos resultados de nosso estudo, uma vez que não observamos diferença significativa indicativa de progressão de lesões inflamatórias lobulares e/ou portais após infecção experimental, fato que corrobora os resultados de discretos distúrbios bioquímicos identificados nos animais.

Meng et al (1998b) indicaram que as lesões hepáticas em PNH do velho mundo infectados com isolados suínos do genótipo 3 são mais brandas quando comparadas a outros estudos e, neste sentido, podemos inferir que a ausência de lesões necroinflamatórias nos macacos-da-noite estaria relacionada ao fato de utilizarmos um inóculo suíno do genótipo 3 de baixa carga viral que pode ter resultado em uma discreta replicação hepática do vírus e, consequentemente, resultando em sinais clínicos, alterações clinico-laboratoriais e

histopatológicas mais brandas (MENG et al., 1998a; 2010; AGGARWAL et al., 2001; KRAWCZYNSKI et al., 2011).

A baixa frequência de detecção imunohistoquímica do HEV no tecido hepático dos macacos-da-noite pode ter relação com esta menor replicação no fígado dos nos animais. A imunomarcagem de HEV-Ag foi positiva em somente uma amostra (animal BCP, grupo 1, S4), porém apesar desta baixa frequência de detecção, o resultado foi relevante para a confirmação da replicação hepática do HEV durante o experimento.

A técnica de imunohistoquímica já foi utilizada para detecção de antígenos do HEV no fígado de humanos (LAU et al., 1995; GUPTA et al., 2012), suínos (HA; CHAE, 2004; XIAO et al., 2012), javalis (NARDINI et al., 2014), macacos rhesus (HUANG et al., 2008), gerbils (LI et al., 2009; YANG et al., 2015) e coelhos (HAN et al., 2014; MAO et al., 2014; Xia 2015).

Em seres humanos, a pesquisa hepática de antígenos do HEV por imunohistoquímica pode apresentar uma boa consistência com a detecção molecular do HEV, porém ponderamos que dados destes estudos foram obtidos em casos humanos de hepatite E fulminante (LAU et al., 1995; GUPTA et al., 2012). Neste sentido, dois fatores principais devem ser levados em consideração para interpretação da baixa frequência de detecção imuno-histoquímica do HEV no estudo: 1) representação do tecido hepático dos macacos-da-noite por biópsia realizada por agulha; e 2) anticorpo utilizado nas reações imuno-histoquímicas.

A imunomarcagem de antígenos do HEV (pORF3) na amostra positiva apresentou padrão granular intracitoplasmático multifocal, com intensidade discreta e foi observada no citoplasma de um grupo de hepatócitos não degenerados, similar ao descrito por outros autores para detecção imunohistoquímica do HEV (HA; CHAE, 2004; JOHNE et al., 2010; GUPTA et al., 2012) e o fato de não termos observado imunomarcagem em hepatócitos degeneradas ou necróticos é um indicativo que as lesões celulares não provém de ação citopática direta da replicação viral (HA; CHAE, 2004; PRABHU et al., 2010; GUPTA et al., 2012; WEDERMEYER et al., 2013).

Nos cortes de controle positivo incluídos nas reações – fígado suíno positivo para HEV-RNA (DE SOUZA et al., 2012) – os antígenos do HEV foram detectados em hepatócitos, células de Kupffer e no epitélio biliar, em células isoladas ou grupos de células com distribuição multifocal nos lóbulos hepáticos, compatível com o descrito por outros estudos que demonstraram o HEV-Ag por imuno-histoquímica (HA; CHAE, 2004; MAO et al., 2014; NARDINI et al., 2014; SCHLOSSER et al., 2014; YANG et al., 2015) e hibridização *in situ* (LEE et al., 2009). Como a imunomarcagem do HEV não apresenta

aspecto de distribuição lobular zonal ou difusa ou, a técnica biópsia do tecido hepático por agulha pode não ter sido representativa o suficiente para detecção do HEV-Ag nos outros cinco animais infectados.

Estudo prévio indicou que a intensidade de imunomarcção de anticorpos anti-pORF2 é superior, quando comparada a anticorpos anti-pORF3, devido, possivelmente, a região ORF2 apresentar epítomos mais conservados (LEE et al., 2009; GUPTA et al., 2012), portanto devido ao fato de termos utilizado anticorpo anti-pORF3, a sensibilidade de detecção imuno-histoquímica do HEV pode ter sido reduzida, contribuindo, desta forma, para a baixa frequência de detecção de HEV-Ag nos macacos-da-noite.

A presente pesquisa foi pioneira em testar a susceptibilidade desta espécie de PN ao genótipo 3 do HEV. O estudo confirmou que macacos-da-noite da espécie *Aotus azarai infulatus*, nas condições experimentais, são suscetíveis à infecção pelo genótipo 3 suíno do HEV. Os achados associados à infecção apresentaram resultados que podem contribuir com o entendimento das características biológicas e de patogenicidade do genótipo 3 do HEV.

Até o momento, a hepatite E crônica em seres humanos foi relacionada somente ao genótipo 3 (WEDERMEYER et al., 2012) e o fato de termos validado uma espécie de PN como modelo de infecção por esse genótipo dá subsídios para que pesquisas adicionais possam ser desenvolvidas com macacos-da-noite imunossuprimidos para avaliação do desenvolvimento de infecção crônica e mecanismos de progressão para fibrose/cirrose causadas pelo genótipo 3 do HEV. Outra hipótese de aplicação do modelo seria a utilização de macacos-da-noite prenhes para avaliação dos mecanismos de desenvolvimento do quadro de hepatite fulminante, uma patogenia da hepatite fulminante em grávidas infectadas pelo genótipo 1 e do HEV ainda não foi completamente elucidada (AGGARWAL et al., 2011) e, exceto por um modelo em coelhos (XIA et al., 2015) modelos em PNH que reproduzam o quadro ainda não foram caracterizados (YUGO et al., 2014; MENG, 2016).

Os achados de detecção molecular, sorológica, clínico-laboratoriais, histopatológicos e imuno-histoquímicos, indicaram que macacos-da-noite infectados por isolado suíno do genótipo 3 do HEV com baixa carga viral, desenvolveram infecção oligossintomática, com viremia, excreção fecal, evidências de soroconversão, alterações clínico-laboratoriais brandas, lesões histopatológicas de hepatite aguda discreta e detecção imuno-histoquímica do antígeno viral no fígado.

Estudos adicionais ainda são necessários para avaliação do perfil de infecção dose-dependente em macacos-da-noite infectados com inóculos do genótipo 3 do HEV com diferentes cargas virais, assim como já foi estabelecido para PNH do velho mundo (TSAREV

et al, 1994b; AGGARWAL et al., 2001), porém o perfil de infecção subclínica/assintomática em macacos-da-noite experimentalmente infectados por um isolado suíno de genótipo 3 do HEV apresentou relevantes informação para compreensão de aspectos relacionados às características biológicas e epidemiológicas do genótipo 3 do HEV.

O perfil de manifestação oligo/assintomática observado nos macacos-da-noite já foi previamente relatado em macacos cynomolgus inoculados com isolado do genótipo 1 do HEV baixas cargas virais que, mesmo apresentando detecção do HEV-RNA nas fezes e soro, não desenvolveram soroconversão, alterações clínicas, lesões histopatológicas hepáticas, aumento significativo de transaminases ou detecção do HEV-Ag (AGGARWAL et al., 2001). Cynomolgus infectados experimentalmente com o genótipo 3 do HEV humano e suíno também apresentaram quadro assintomático (CARVALHO et al., 2013).

O estudo de Aggarwal et al (2001) confirmou que as fezes obtidas na fase aguda de infecção em um espécime de cynomolgus assintomático foi capaz de infectar, em uma segunda passagem, quatro outros cynomolgus *naïve*, indicando que mesmo em casos de infecções subclínicas em PNH, a transmissão do HEV pode ser mantida, fato que pode estar relacionado à manutenção da circulação do vírus entre humanos em áreas endêmicas e não endêmicas (AGGARWALL et al., 2001). Ticehurst et al (1992) também demonstraram que, em uma segunda passagem utilizando fezes de um *A. trivirgatus* infectado pelo genótipo 2, o inóculo foi capaz de induzir a soroconversão em um outro espécime *naïve* (TICEHURST et al., 1992).

Não desenvolvemos segunda passagem em macacos-da-noite para avaliação de infectividade das fezes de animais com infecção experimental oligossintomática, entretanto estudos subsequentes podem ser desenvolvidos com essa finalidade em macaco-da-noite, outras espécies de PN, animais de laboratório ou em sistemas de cultivo celular para determinação e comparação *in vivo* e *in vitro* das características de replicação e/ou infectividade deste isolado do genótipo 3 do HEV.

De modo análogo ao perfil oligossintomático/subclínico de infecção que observamos nos macacos-da-noite, a maior parte das infecções naturais pelos genótipos 3 e 4 do HEV em seres humanos de regiões não-endêmicas são subclínicas/assintomáticas e este fato pode estar relacionado a uma circulação “silenciosa” do vírus no ambiente e entre seres humanos e reservatórios animais (principalmente suínos), podendo, desta forma, explicar a observação de baixas soroprevalências em humanos associadas à ocorrência de casos esporádicos de hepatite E em áreas não-endêmicas (CLEMENTE-CASARES et al., 2003; MUSHAWAR, 2008; MENG, 2010; KRAIN et al., 2014).

Esta particularidade no perfil epidemiológico da hepatite E em regiões não endêmicas, causadas por infecções pelo genótipo 3 do vírus, pode ter relação com as baixas prevalências sorológicas e moleculares observadas em diversas populações no Brasil (DE PAULA et al., 2001; TRINTA et al., 2001; ASSIS et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2010; ECHEVARRIA et al., 2013; PASSOS et al., 2013; PASSOS-CASTILHO et al., 2014; MARTINS et al., 2014; VITRAL et al., 2014), porém, devido ao fato do HEV já ter sido descrito em suínos em diversas regiões geográficas do Brasil, algumas populações como veterinários, criadores e/consumidores de suínos podem estar expostos a um maior risco de infecção, reforçando a necessidade de pesquisas relacionadas ao diagnóstico laboratorial do HEV em humanos e animais no país (PAIVA et al., 2007, DOS SANTOS et al., 2009; 2011; DE SOUZA et al., 2012; GARDINALI et al., 2012; LANA et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2015; HELDT et al., 2016).

O presente estudo caracterizou experimentalmente um quadro de infecção pelo genótipo 3 suíno do HEV em PN e indicou que, diferentemente do cenário em alguns países europeus, em que o genótipo 3 é altamente prevalente e está associado a quadros graves de hepatite E aguda e crônica (KAMAR et al., 2008; GÉROLAMI et al., 2008; DALTON et al., 2009; KABA et al., 2011; FUJIWARA et al., 2013), no Brasil a infecção em humanos pode, não necessariamente, ocorrer de forma sintomática grave, portanto é necessário que estratégias de vigilância epidemiológica e diagnóstico laboratorial em seres humanos, amostras ambientais e em reservatórios animais domésticos e selvagens precisem ser aprimoradas para melhor caracterização do impacto em saúde pública da circulação do vírus no país.

7 CONCLUSÕES

Diante do exposto podemos concluir que:

- 1) O protocolo de RT-qPCR desenvolvido apresentou sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para detecção e quantificação do HEV-RNA em padrão internacional de amostras biológicas de soro humano e amostras de soro e fezes de macacos-da-noite, sendo, portanto, viável para aplicação em estudos relacionados à pesquisa molecular do vírus em amostras de humanos e animais.
- 2) A aplicação do protocolo de RT-qPCR em 318 amostras de soro de casos humanos suspeitos de hepatite E da Amazônia oriental brasileira em associação com a determinação sorológica de anticorpos anti-HEV IgM e IgG revelou que os soros estavam negativos para HEV-RNA e que a prevalência foi de 3,4% para anti-HEV IgM e 5,9% de anti-HEV IgG, indicando uma baixa frequência de infecção por HEV na Amazônia oriental brasileira, mesmo entre casos suspeitos de hepatite E.
- 3) A determinação da prevalência de infecção por HEV na Amazônia oriental revelou três casos sorologicamente confirmados de anticorpos anti-HEV entre indígenas da etnia Parakanã de aldeia no Estado do Pará, indicando a exposição prévia ao HEV de fontes/reservatórios desconhecidos e que merecem estudos futuros específicos para o diagnóstico de infecção por HEV nessas populações e definição dos possíveis reservatórios envolvidos.
- 4) A infecção pelo genótipo 3 do HEV suíno foi reproduzida em macacos-da-noite, *Aotus azarai infulatus*, independente da via de inoculação e utilizando dose única de inóculo de suspensão de fezes de suínos com carga viral de 1×10^3 cópias/mL. Nesta condição, a espécie de macaco-da-noite foi caracterizada como a primeira espécie de primata neotropical modelo para o estudo experimental de genótipo 3 de HEV suíno.
- 5) A infecção por via intravenosa em macacos-da-noite se caracterizou por viremia detectada entre S4 e S5 após a inoculação, eliminação fecal entre S2 e S8 e o clareamento viral a partir da S8, enquanto a infecção por via oral a viremia foi detectada entre S2 e S7, a eliminação

fecal na S5 e o clareamento na S7. Nestas condições, a carga viral foi maior nas amostras de fezes independente da via de infecção. Assim, a detecção molecular de HEV-RNA no soro e nas fezes de macacos-da-noite caracterizou que o período de detecção viral e a carga viral detectada variam, sem diferença estatística, entre as vias de infecção de forma similar a infecção em outros modelos de primatas do velho mundo.

6) A utilização de testes sorológicos comerciais para pesquisa de anticorpos anti-ORF2 viral indicou que somente macacos-da-noite inoculados via intravenosa apresentaram evidência de soroconversão. A ausência de confirmação sorológica e soroconversão entre as amostras testadas foram consideradas em decorrência da carga viral do inóculo e de características da resposta humoral dos macacos-da-noite a esse genótipo do HEV.

7) Os parâmetros clínicos, laboratoriais, ultrassonográficos e histopatológicos do parênquima hepático em relação à detecção molecular do vírus caracterizaram que a infecção experimental pelo genótipo 3 de HEV suíno em macacos-da-noite ocasionou em alguns animais hepatite aguda oligossintomática, com viremia, eliminação fecal, elevação discreta, transitória e intermitente de transaminases, colesterol e bilirrubinas, hipercogenidade e aumento de volume hepático e discreta hepatite aguda com detecção focal de antígenos virais em hepatócitos principalmente nas quatro primeiras semanas após a infecção. Assim, a caracterização da infecção pelo genótipo 3 de HEV suíno em macacos-da-noite mostrou que essa espécie reproduziu as alterações de hepatite E em humanos e, portanto, pode ser utilizada como modelo experimental para o estudo deste genótipo.

REFERÊNCIAS

- ABRAVANEL, F.; SANDRES-SAUNE, K.; LHOMME, S.; DUBOIS, M.; MANSUY, J. M.; IZOPET, J. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 897-902, 2012.
- ABRAVANEL, F.; CHAPUY-REGAUD, S.; LHOMME, S.; DUBOIS, M.; PERON, J. M.; ALRIC, L.; ROSTAING, L.; KAMAR, N.; IZOPET, J. Performance of two commercial assays for detecting hepatitis E virus RNA in acute or chronic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1913-1916, 2013.
- AGGARWAL, R.; KAMILI, S.; SPELBRING, J.; KRAWCZYNSKI, K. Experimental studies on subclinical hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 11, p. 1380-1385, 2001.
- AGGARWAL, R. Clinical presentation of hepatitis E. **Virus research**, v. 161, n. 1, p. 15-22, 2011.
- AGGARWAL, R. Diagnosis of hepatitis E. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 24-33, 2013.
- AHMAD, I.; HOLLA, R. P.; JAMEEL, S. Molecular virology of hepatitis E virus. **Virus Research**, v. 161, n. 1, p. 47-58, 2011.
- ARANKALLE, V. A.; TICEHURST, J.; SREENIVASAN, M. A.; KAPIKIAN, A. Z.; POPPER, H.; PAVRI, K. M.; PURCELL, R. H. Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. **The Lancet**, v. 331, n. 8585, p. 550-554, 1988.
- ARANKALLE, V. A.; CHADHA, M. S.; CHOBE, L. P.; NAIR, R.; BANERJEE, K. Cross-challenge studies in rhesus monkeys employing different Indian isolates of hepatitis E virus. **Journal of Medical Virology**, v. 46, n. 4, p. 358-363, 1995.
- ARANKALLE, V. A.; CHOBE, L. P.; CHADHA, M. S. Type-IV Indian swine HEV infects rhesus monkeys. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 13, n. 11, p. 742-745, 2006.
- ASHER, L.V.; BINN, L.N.; MENSING, T.L.; MARCHWICKI, R.H.; VASSELL, R.A.; YOUNG, G.D. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). **Journal of Medical Virology**, v. 47, n. 3, p. 260-268, 1995.
- ASSIS, S. B.; SOUTO, F. J.; FONTES, C. J.; GASPAR, A. M. C. Prevalence of hepatitis A and E virus infection in school children of an Amazonian municipality in Mato Grosso State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 2, p. 155-158, 2002.
- AVELLON, A.; MORAGO, L.; GARCIA-GALERA DEL CARMEN, M.; MUNOZ, M.; ECHEVARRÍA, J. M. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. **Journal of Medical Virology**, v. 87, n. 11, p. 1934-1939, 2015.

BAER, J. F. Husbandry and management of the owl monkey. In: BAER, J. F.; WELLER, R. E.; KAKOMA, I. **Aotus: The owl monkey**. 1st ed. California: Academic Press, 1994. cap. 5, p. 134-164.

BALAYAN, M. S.; ANDJAPARDIZE, A. G.; SAVINSKAYA, S. S.; KETILDAZE, E. S.; BRAGINSKY, D. N.; SAVINOV, A. P.; POLESCHUK, V. F. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via faecal-oral route. **Intervirolgy**, v. 20, n. 10, p. 23–31, 1983.

BALAYAN, M. S.; USMANOV, R. K.; ZAMYATINA, N. A.; DJUMALIEVA, D. I.; KARAS, F. R. Experimental hepatitis E infection in domestic pigs. **Journal of medical virology**, v. 32, n. 1, p. 58-59, 1990.

BATTS, W.; YUN, S.; HEDRICK, R.; WINTON, J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). **Virus Research**, v. 158, n. 1, 116-123, 2011.

BAYLIS, S. A.; BLÜMEL, J.; MIZUSAWA, S.; MATSUBAYASHI, K.; SAKATA, H.; OKADA, Y.; NÜBLING, C. M.; HANSCHMANN, K. M.; HEV COLLABORATIVE STUDY GROUP. World Health Organization international standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 729-735, 2013.

BILLAM, P.; HUANG, F. F.; SUN, Z. F.; PIERSON, F. W.; DUNCAN, R. B.; ELVINGER, F.; GUENETTE, D. K.; TOTH T. E.; MENG, X. J. Systematic pathogenesis and replication of avian hepatitis E virus in specific-pathogen-free adult chickens. **Journal of Virology**, v. 79, n. 6, p. 3429-3437, 2005.

BLASCO-PERRIN, H.; ABRAVANEL, F.; BLASCO-BAQUE, V.; PÉRON, J. M. Hepatitis E, the neglected one. **Liver International**, v. 36, p. 130-134, 2016. Supplement, 1.

BOUWKNEGT, M.; FRANKENA, K.; RUTJES, S. A.; WELLENBERG, G. J.; HUSMAN, A. M. R.; VAN DER POEL, W. H. M.; JONG, M. C. M. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. **Veterinary Research**, v. 39, n. 5, e40, 2008.

BOUWKNEGT, M.; RUTJES, S. A.; REUSKEN, C. B.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; FRANKENA, K.; DE JONG, M. C.; DE RODA HUSMAN, A. M.; VAN DER POEL, W. H. M. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. **BMC Veterinary Research**, 5, p. 7, 2009.

BRADLEY, D. W.; KRAWCZYNSKI, K.; COOK, E. H. JR.; MCCAUSTLAND, K. A.; HUMPHREY, C. D.; SPELBRING, J. E.; MYINT, H.; MAYNARD, J. E. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27-to 34-nm virus like particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 17, p. 6277-6281, 1987.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos**. 3ª ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. 2^a ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010b.

BRODERSON J. R.; CHAPMAN, W. L. JR.; HANSON, W. L. Experimental visceral leishmaniasis in the owl monkey. **Veterinary Pathology**, v. 23, n. 3, p. 293-302, 1986.

CAO, D.; MENG, X. J. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 1, n. 8, e17, 2012.

CARVALHO, L. G.; MARCHEVSKY, R. S.; DOS SANTOS, D. R. L.; DE OLIVEIRA, J. M.; DE PAULA, V. S.; LOPES, L. M.; VAN DER POEL, W. H. M.; GONZÁLEZ, J. E.; MUNNÉ, M. S.; MORAN, J.; CAJARAVILLE, A. C. R. A.; PELAJO-MACHADO, M.; CRUZ, O. G.; PINTO, M. A. Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 495, 2013.

CHAUHAN, A.; DILAWARI, J. B.; CHAWLA, Y. K.; JAMEEL, S.; KAUR, U.; GANGULY, N. K. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. **The Lancet**, v. 341, n. 8838, 149-150, 1993.

CLAYSON, E. T.; INNIS, B. L.; MYINT, K. S.; NARUPITI, S.; VAUGHN, D. W.; GIRI, S.; RANABHAT, P.; SHRESTHA, M. P. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 3, p. 228-232, 1995.

CLEMENTE-CASARES, P.; PINA, S.; BUTI, M.; JARDI, R.; MARTÍN, M.; BOFILL-MAS, S.; GIRONES, R. Hepatitis E Virus epidemiology in industrialized countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 448-454, 2003.

COLLINS, W. E. The owl monkey as a model for malaria. In: BAER, J. F.; WELLER, R. E.; KAKOMA, I. **Aotus: The owl monkey**. 1st ed. California: Academic Press, 1994. cap. 8, p. 8217-244.

COLSON, P.; PAYRAUDEAU, E.; LEONNET, C.; DE MONTIGNY, S.; VILLENEUVE, L.; MOTTE, A.; TAMALET, C. Severe thrombocytopenia associated with acute hepatitis E virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2450-2452, 2008.

COLSON, P.; BORENTAIN, P.; QUEYRIAUX, B.; KABA, M.; MOAL, V.; GALLIAN, P.; HEYRIES, L.; RAOULT, D.; GEROLAMI, R. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 6, p. 825-834, 2010.

COSSABOOM, C. M.; CÓRDOBA, L.; SANFORD, B. J.; PINEYRO, P.; KENNEY, S. P.; DRYMAN, B. A.; WANG, Y.; MENG, X. J. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 8, p. 1687-1695, 2012.

COUTINHO, L. N.; MONTEIRO, F. O. B.; TAKESHITA, R. S. C.; DE MIRANDA LINS E LINS, F. L.; DA SILVA, G. A.; FATURI, C.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.;

KUGELMEIER, T.; WHITEMAN, C. W.; VICENTE, W. R. R. Effect of age and number of parturitions on uterine and ovarian variables in owl monkeys. **Journal of Medical Primatology**, v. 40, n. 5, p. 310-316, 2011.

DALTON, H. R.; THURAIRAJAH, P. H.; FELLOWS, H. J.; HUSSAINI, H. S.; MITCHELL, J.; BENDALL, R.; BANKS, M.; IJAZ, S.; TEO, C. G.; LEVINE D. F. Autochthonous hepatitis E in southwest England. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 14, n. 5, p. 304–309, 2007.

DALTON, H. R.; BENDALL, R.; IJAZ, S.; BANKS, M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 698–709, 2008.

DALTON, H. R.; BENDALL, R. P.; KEANE, F. E.; TEDDER, R. S.; IJAZ, S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 10, p. 1025-1027, 2009.

DALTON, H. R.; PAS, S. D.; MADDEN, R. G.; VAN DER EIJK, A. A. Hepatitis E virus: current concepts and future perspectives. **Current Infectious Diseases Reports**, v. 16, n. 4, e399, 2014.

DE PAULA, V. S.; ARRUDA, M. E.; VITRAL, C. L.; GASPAR, A. M. C. Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the Western Region of the Brazilian Amazon Basin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1123-1128, 2001.

DE SOUZA A. J. S.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; SOARES, M. C. P.; PINHO, J. R. R.; MALHEIROS, A. P.; CARNEIRO, L. A.; DOS SANTOS, D. R. L.; PEREIRA, W. L. A. HEV infection in swine from Eastern Brazilian Amazon: Evidence of co-infection by different subtypes. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 477-485, 2012.

DENNIS J. M.; WOLMAN, A. 1955-56 infectious hepatitis epidemic in Delhi, India. **American Water Works Association**, v. 51, n. 10, p. 1288-1298, 1959.

DOCEUL, V.; BAGDASSARIAN, E.; DEMANGE, A.; PAVIO, N. Zoonotic Hepatitis E virus: classification, animal reservoirs and transmission Routes. **Viruses**, v. 8, n. 10, e270, 2016.

DOS SANTOS, D. R. L.; VITRAL, C. L.; DE PAULA, V. S.; MARCHEVSKY, R. S.; LOPES, J. F.; GASPAR, A. M.; SADDI, T. M.; JÚNIOR, N. C.; GUIMARÃES, F. R.; JÚNIOR, J. G.; XIMENES, L. L.; SOUTO, F. J.; PINTO, M. A. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 3, p. 474–480, 2009.

DOS SANTOS, D. R. L.; LEWIS-XIMENEZ, L.; DA SILVA, M. F.; DE SOUSA, P. S.; GASPAR, A. M.; PINTO, M. A. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 47, n. 3, p. 276–279, 2010.

DOS SANTOS, D. R. L.; DE PAULA, V. S.; DE OLIVEIRA, J. M.; MARCHEVSKY, R. S.; PINTO, M. A. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 1-2, p. 236–241, 2011.

DREXLER, J. F.; SEELEN, A.; CORMAN, V. M.; TATENO, A. F.; COTTONTAIL, V.; ZERBINATI, R. M.; GLOZA-RAUSCH, F.; KLOSE, S. M.; ADU-SARKODIE, Y.; OPPONG, S. K.; KALKO, E. K. V.; OSTERMAN, A.; RASCHE, A.; ADAM, A.; MÜLLER, M. A.; ULRICH, R. G.; LEROY, E. M.; LUKASHEV, A. N.; DROSTEN, C. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. **Journal of Virology**, v. 86, n. 17, p. 9134-9147, 2012.

DREXLER, J. F.; GEIPEL, A.; KÖNIG, A.; CORMAN, V. M.; VAN RIEL, D.; LEIJTEN, L. M.; BREMER, C. M.; RASCHE, A.; COTTONTAIL, V. M.; MAGANGA, G. D.; SCHLEGEL, M.; MÜLLER, M. A.; ADAM, A.; KLOSE, S. M.; CARNEIRO, A. J. B.; STÖCKER, A.; FRANKEI, C. R.; GLOZA-RAUSCH, F.; GEYER, J.; ANNAN, A.; ADU-SARKODIE, Y.; OPPONG, S.; BINGER, T.; VALLO, P.; TSCHAPKA, M.; ULRICH, R. G.; GERLICH, W. H.; LEROY, E.; KUIKEN, T.; GLEBE, D.; DROSTEN, C. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 40, p. 16151-16156, 2013.

DREXLER, J. F.; CORMAN, V. M.; LUKASHEV, A. N.; VAN DEN BRAND, J. M.; GMYL, A. P.; BRÜNK, S.; RASCHE, A.; SEGGEWIB, N.; FENG, H.; LEIJTEN, L. M.; VALLO, P.; KUIKEN, T.; DOTZAUER, A.; ULRICH, R. G.; LEMON, S. M.; DROSTEN, C.; HEPATOVIRUS ECOLOGY CONSORTIUM. Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 49, p. 15190-15195, 2015.

ECHEVARRÍA, J. M.; GONZÁLEZ, J. E.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; DOS SANTOS, D. R.; MUNNÉ, M. S.; PINTO, M. A.; PUJOL, F. H.; RODRÍGUEZ-LAY, L. A. Hepatitis E Virus Infection in Latin America: A review. **Journal of Medical Virology**, v. 85, n. 6, p. 1037-1045, 2013.

EMERSON, S. U.; NGUYEN, H.; TORIAN, U.; PURCELL, R. H. ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. **Journal of Virology**, v. 80, n. 21, p. 10457-10464, 2006.

EMERSON, S. U.; PURCELL, R. H. Hepatitis E virus. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (LWW) / Wolters Kluwer, 2013. cap. 70, p. 2242-2258.

ERKER, J. C.; DESAI, S. M.; SCHLAUDER, G. G.; DAWSON, G. J.; MUSHAHWAR, I. K. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 3, p. 681-690, 1999.

FEAGINS, A. R.; OPRIESSNIG, T.; HUANG, Y. W.; HALBUR, P. G.; MENG, X. J. Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. **Journal of medical virology**, v. 80, n. 8, p. 1379-1386, 2008.

FOGEDA, M.; DE ORY, F.; AVELLÓN, A.; ECHEVARRÍA, J. M. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, n. 3, p. 259-261, 2009.

FOGEDA, M.; AVELLÓN, A.; ECHEVARRÍA, J. M. Prevalence of specific antibody to Hepatitis E Virus in the general population of the community of Madrid, Spain. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 1, p. 71–74, 2012.

FONTANA, R. J.; ENGLE, R. E.; SCAGLIONE, S.; ARAYA, V.; SHAIKH, O.; TILLMAN, H.; ATTAR, N.; PURCELL, R. H.; LEE, W. M.; US ACUTE LIVER FAILURE STUDY GROUP. The role of hepatitis E virus infection in adult Americans with acute liver failure. **Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1870-1880, 2016.

FUJIWARA, S.; YOKOKAWA, Y.; MORINO, K.; HAYASAKA, K.; KAWABATA, M.; SHIMIZU, T. Chronic hepatitis E: a review of the literature. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 21, n. 2, p. 78-89, 2014.

GARCÍA, C. G.; SÁNCHEZ, D.; VILLALBA, M. C. M.; PUJOL, F. H.; LAY, L. Á. R.; PINTO, B.; CHACÓN, E. P.; GUZMÁN, M.G. Molecular characterization of hepatitis E virus in patients with acute hepatitis in Venezuela. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 7, p. 1025-1029, 2012.

GARDINALI, N. R.; BARRY, A. F.; DA SILVA, P. F.; DE SOUZA, C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1515-1519, 2012

GARSON, J. A.; FERNS, R. B.; GRANT, P. R.; IJAZ, S.; NASTOULI, E.; SZYPULSKA, R.; TEDDER, R. S. Minor groove binder modification of widely used TaqMan probe for hepatitis E virus reduces risk of false negative real-time PCR results. **Journal of Virological Methods**, v. 186, n. 1-2, p. 157-160, 2012.

GÉROLAMI, R.; MOAL, V.; COLSON, P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 8, p. 859-860, 2008.

GIORGIO, A.; AMOROSO, P.; FICO, P.; LETTIERI, G.; FINELLI, L.; DE STEFANO, G.; PESCE, G.; SCALA, V.; PIERRI, P.; PIERRI, G. Ultrasound evaluation of uncomplicated and complicated acute viral hepatitis. **Journal of Clinical Ultrasound**, v. 14, n. 9, p. 675-679, 1986.

GONÇALES, N. S. L.; PINHO, J. R. R.; MOREIRA, R. C.; SARACENI, C.P.; SPINA, A. M. M.; STUCCHI, R. B.; FILHO, A. D. R.; MAGNA, L. A.; GONÇALES JUNIOR, F. L. Hepatitis E virus immunoglobulin G antibodies in different populations in Campinas, Brazil. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 5, p. 813–816, 2000.

GUPTA, H.; JOSHI, Y. K.; VARMA, A.; SHENOY, S.; SRIRAMCHARI, S.; IYENGER, B.; TANDON, B. N. Transmission of enteric non-A, non-B hepatitis virus in *Macaca mulatta*, monkeys by intraportal route: subsequent passages of HEV virus. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 6, p. 608-615, 1990.

GUPTA, H.; IYENGER, B.; TANDON, B. N. Localization of a new enteric non-A, non-B [HEV] virus in target organ liver. **Gastroenterologia Japonica**, v. 28 n.1, p. 46-50, 1993.

GUPTA, P.; JAGYA, N.; PABHU, S. B.; DURGAPAL, H.; ACHARYA, S. K.; PANDA, S. K. Immunohistochemistry for the diagnosis of hepatitis E virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**, 19, n. 2, p. 177-183, 2012.

HA, S. K.; CHAE, C. Immunohistochemistry for the detection of swine hepatitis E virus in the liver. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 11, n. 3, p. 263-267, 2004.

HALBUR, P. G.; KASORNDORKBUA, C.; GILBERT, C.; GUENETTE, D.; POTTERS, M. B.; PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U.; TOTH, T. E.; MENG, X. J. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.3, p. 918-923, 2001.

HAN, J.; LEI, Y.; LIU, L.; LIU, P.; XIA, J.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; WANG, L.; WANG, L.; ZHUANG, H. SPF rabbits infected with rabbit hepatitis E virus isolate experimentally showing the chronicity of hepatitis. **PLoS One**, v. 9, n. 6, e99861, 2014.

HELDT, F. H., STAGGMEIER, R., GULARTE, J. S., DEMOLINER, M., HENZEL, A., SPILKI, F. R. Hepatitis E virus in surface water, sediments, and pork products marketed in Southern Brazil. **Food and environmental virology**, v. 8, n. 3, p. 200-205, 2016.

HERREMANS, M. M. P. T.; BAKKER, J.; DUIZER, E.; VENNEMA, H.; KOOPMANS, M. P. G. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 562-568, 2007.

HIRANO, M.; DING, X.; TRAN, H. T.; LI, T. C.; TAKEDA, N.; SATA, T.; NAKAMURA, S.; ABE, K. Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 56, n. 1, p. 8-11, 2003.

HONG, Y.; HE, Z. J.; TAO, W.; FU, T.; WANG, Y. K.; CHEN, Y. Experimental infection of Z: ZCLA Mongolian gerbils with human hepatitis E virus. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 3, e862, 2015.

HUANG, F. F.; SUN, Z. F.; EMERSON, S. U.; PURCELL, R. H.; SHIVAPRASAD, H. L.; PIERSON, F. W.; TOTH, T. E.; MENG, X. J. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 6, p. 1609-1618, 2004.

HUANG, S.; ZHANG, X.; JIANG, H.; YAN, Q.; AI, X.; WANG, Y.; CAI, J.; JIANG, L.; WU, T.; WANG, Z.; GUAN, L.; SHIH, J. W.; NG, M. H.; ZHU, F.; ZHANG, J.; XIA, N. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. **PloS one**, v. 5, n. 10, e13560, 2010.

HUANG, W.; ZHANG, H.; HARRISON, T. J.; LANG, S.; HUANG, G.; WANG, Y. Cross-protection of hepatitis E virus genotypes 1 and 4 in rhesus macaques. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 5, p. 824-832, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pecuária 2015**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pa&tema=pecuaria2015>. Acesso em: 20/01/2017.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Virus Taxonomy: 2015 Release**. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em 19 dez 2015.

ISHAK, K.; BAPTISTA, A.; BIANCHI, L.; CALLEA, F.; DE GROOTE, J.; GUDAT, F.; DENK, H.; DESMET, V.; KORB, G.; MACSWEEN, R. N. M.; PHILLIPS, M. J.; PORTMANN, B. G.; POULSEN, H.; SCHEUER, P. J.; SCHMID, M.; THALER, H. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **Journal of Hepatology**, v. 22, n. 6, p. 696-699, 1995.

JAMEEL, S.; DURGAPAL, H.; HABIBULLAH, C. M.; KHUROO, M. S.; PANDA, S. K. Enteric non-A, non-B hepatitis: Epidemics, animal transmission, and hepatitis E virus detection by the polymerase chain reaction. **Journal of medical virology**, v. 37, n. 4, p. 263-270, 1992.

Jl, Y.; ZHU, Y.; LIANG, J.; WEI, X.; YANG, X.; WANG, L.; LI, L.; CHANG, Y.; TANG, R.; ZHUANG H. Swine hepatitis E virus in rural southern China: genetic characterization and experimental infection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Journal of Gastroenterology**, v. 43, n. 7, p. 565-570, 2008.

JOHNE, R.; HECKEL, G.; PLENGE-BÖNIG, A.; KINDLER, E.; MARESCH, C.; REETZ, J.; SCHIELKE, A.; ULRICH, R. G. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1452–1455, 2010.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990-993, 2008.

JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T. L.; ROBERTSON, B. H.; MENG, X. J.; HILL, V. R. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. **Journal of Virological Methods**, v. 131, n. 1, p. 65-71, 2006.

KABA, M.; DAVOUST, B.; MARIÉ, J.L.; COLSON, P. Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers. **The Veterinary Journal**, v. 186, n. 2, p. 259–261, 2010.

KABA, M.; RICHET, H.; RAVAU, I.; MOREAU, J.; POIZOT-MARTIN, I.; MOTTE, A.; NICOLINO-BRUNET, C.; DIGNAT-GEORGE, F.; MÉNARD, A.; DHIVER, C.; BROUQUI, P.; COLSON, P. Hepatitis E virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 10, p. 1704-1716, 2011.

KABA, M.; MOAL, V.; GÉROLAMI, R.; COLSON, P. Epidemiology of mammalian hepatitis E virus infection. **Intervirolgy**, v. 56, n. 2, p. 67-83, 2013.

KAMAR, N.; SELVES, J.; MANSUY, J. M.; OUEZZANI, L.; PÉRON, J. M.; GUITARD, J.; COINTAULT, O.; ESPOSITO, L.; ABRAVANEL, F.; DANJOUX, M.; DURAND, D.;

VINEL, J. P.; IZOPET, J.; ROSTAING, L. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 8, p. 811-817, 2008

KAMAR, N.; BENDALL, R.; LEGRAND-ABRAVANEL, F.; XIA, N. S.; IJAZ, S.; IZOPET, J.; DALTON, H. R. Hepatitis E. **The Lancet**, v. 379, n. 9835, p. 2477-2488, 2012.

KAMAR, N.; ROSTAING, L.; LEGRAND-ABRAVANEL, F.; IZOPET, J. How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? **American Journal of Transplantation**, v. 13, n. 7, p. 1935-1936, 2013.

KAMAR, N.; DALTON, H. R.; ABRAVANEL, F.; IZOPET, J. Hepatitis E virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, 116-138, 2014.

KAMAR, N.; ABRAVANEL, F.; LHOMME, S.; ROSTAING, L.; IZOPET, J. Hepatitis E virus: chronic infection, extra-hepatic manifestations, and treatment. **Clinical Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 39, n. 1, p. 20-27, 2015.

KAPOOR, A.; SIMMONDS, P.; SCHEEL, T. K. H.; HJELLE, B.; CULLEN, J. M.; BURBELO, P. D.; CHAUHAN, L. V.; DURAISAMY, R.; LEON, M. S.; JAIN, K.; VANDEGRIFT, K. J.; CALISHER, C. H.; RICE, C. M.; LIPKIN, W. I. Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. **MBio**, v. 4, e00216–e00313, 2013.

KASORNDORKBUA, C.; THACKER, B. J.; HALBUR, P. G.; GUENETTE, D. K.; BUITENWERF, R. M.; ROYER, R. L.; MENG, X. J. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. **Canadian journal of veterinary research**, v. 67, n. 4, p. 303-306, 2003.

KAWAI, H. F.; KOJI, T.; IIDA, F.; KANEKO, S.; KOBAYASHI, K.; NAKANE, P. K. Shift of hepatitis E virus RNA from hepatocytes to biliary epithelial cells during acute infection of rhesus monkey. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 6, n. 4, p. 287-297, 1999.

KEENAN, C. M.; LEMON, S. M.; LEDUC, J. W.; MCNAMEE, G. A.; BINN, L. N. Pathology of hepatitis A infection in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). **American Journal of Pathology**, v. 115, n. 1, p. 1-8, 1984.

KHURROO, M. S. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. **Virus Research**, v. 161 n. 1, p. 3-14, 2011.

KHURROO, M. S. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. **The American Journal of Medicine**, v. 68, n. 6, p. 818-824, 1980.

KLEINER, D. E.; BRUNT, E. M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M. J.; CUMMINGS, O. W.; FERRELL, L. D.; LIU, Y. C.; TORBENSON, M. S.; UNALP-ARIDA, A.; YEH, M.; MCCULLOUGH, A. J.; SANYAL, A. J.; NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS CLINICAL RESEARCH NETWORK. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.

KRAIN L. J.; NELSON, K. E.; LABRIQUE, A. B. Host immune status and response to hepatitis E virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 139-165, 2014.

KRAWCZYNSKI, K.; BRADLEY, D. W. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 6, p. 1042-1049, 1989.

KRAWCZYNSKI, K.; MENG, X. J.; RYBCZYNSKA, J. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. **Virus Research**, v. 161, n. 1, p. 78-83, 2011.

KUMAR, A.; BENIWAL, M.; KAR, P.; SHARMA, J. B.; MURTHY, N. S. Hepatitis E in pregnancy. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 85, n. 3, p. 240-244, 2004.

LANA, M. V. C.; GARDINALI, N. R.; DA CRUZ, R. A.; LOPES, L. L.; SILVA, G. S.; CARAMORI JÚNIOR, J.G.; DE OLIVEIRA, A. C.; DE ALMEIDA, SOUZA, M.; COLODEL, E. M.; ALFIERI, A. A.; PESCADOR, C. A. Evaluation of hepatitis E virus infection between different production systems of pigs in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 2, p. 399-404, 2014.

LANFORD, R. E.; FENG, Z.; CHAVEZ, D.; GUERRA, B.; BRASKY, K. M.; ZHOU, Y.; YAMANEC, D.; PERELSON, A. S.; WALKER, C. M.; LEMON, S. M. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 27, p. 11223-11228, 2011.

LAY, L.L.R.; QUINTANA, A.; VILLALBA, M. C.; LEMOS, G.; CORREDOR, M. B.; MORENO, A. G.; PRIETO, P. A.; GUZMÁN, M. G.; ANDERSON, D. Dual infection with hepatitis A and E viruses in outbreaks and in sporadic clinical cases: Cuba 1998-2003. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 5, p. 798-802, 2008.

LAU, J. Y.; SALLIE, R.; FANG, J. W.; YARBOUGH, P. O.; REYES, G. R.; PORTMANN, B. C.; MIELI-VERGANI, G.; WILLIAMS, R. Detection of hepatitis E virus genome and gene products in two patients with fulminant hepatitis E. **Journal of Hepatology**, v. 22, n. 6, p. 605-610.

LEBLANC, D.; WARD, P.; GAGNÉ, M. J.; POITRAS, E.; MÜLLER, P.; TROTTIER, Y. L.; SIMARD, C.; HOUDE, A. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 160-166, 2007.

LEDUC, J. W.; LEMON, S. M.; KEENAN, C. M.; GRAHAM, R. R.; MARCHWICKI, R. H.; BINN, L. N. Experimental infection of the New World owl monkey (*Aotus trivirgatus*) with hepatitis A virus. **Infection and Immunity**, v. 40, n. 2, p. 766-772, 1983.

LEE, G. H.; TAN, B. H.; TEO, E. C.; LIM, S. G.; DAN, Y. Y.; WEE, A.; AW, P. P.; ZHU, Y.; HIBBERD, M. L.; TAN, C. K.; PURDY, M. A.; TEO, C. G. Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. **Gastroenterology**, v. 150, n. 2, p. 355-357, 2016.

LEE, Y. H.; HA, Y.; AHN, K. K.; CHAE, C. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 3, p. 417-421, 2009.

LI T. C.; YOSHIZAKI S.; AMI, Y.; SUZAKI, Y.; YANG, T.; TAKEDA, N.; TAKAJI, W. Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection. **Intervirology**, v. 58, n. 3, p.139-42, 2015.

LI, T. C.; YANG, T.; YOSHIZAKI, S.; AMI, Y.; SUZAKI, Y.; ISHII, K.; KISHIDAC, N.; SHIRAKURAC, M.; ASANUMAC, H.; TAKEDAE, N.; WAKITAA, T. Ferret hepatitis E virus infection induces acute hepatitis and persistent infection in ferrets. **Veterinary Microbiology**, v. 183, p. 30-36, 2016.

LI, W.; SUN, Q.; SHE, R.; WANG, D.; DUAN, X.; YIN, J.; DING, Y. Experimental infection of Mongolian gerbils by a genotype 4 strain of swine hepatitis E virus. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 9, p. 1591-1596, 2009.

LINS, F. L. D. M. L.; MONTEIRO, F. O. B.; TAKESHITA, R. S. C.; DA SILVA, G. A.; FATURI, C.; PALHA, M. D. D. C.; MONTEIRO, M. V.; COUTINHO, L. N.; KUGELMEIER, T.; CASTRO, P. H. G. Renal evaluation of *Aotus azarai infulatus* by ultrasonography and serum chemistry profile. **American Journal of Primatology**, v. 74, n. 5, p. 482-490, 2012.

LIU, P.; BU, Q. N.; WANG, L.; HAN, J.; DU, R. J.; LEI, Y. X.; OUYANG, Y. Q.; LI, J.; ZHU, Y. H.; LU, F. M.; ZHUANG, H. Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 559-565, 2013.

LONGER, C. F.; DENNY, S. L.; CAUDILL, J. D.; MIELE, T. A.; ASHER, L. V.; MYINT, K. S. A.; HUANG, C. C.; ENGLER, W. F.; LEDUC, J. W.; BINN, L. N.; TICEHURST, J. R. Experimental hepatitis E: pathogenesis in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). **The Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 3, p. 602-609, 1993.

MA, H., ZHENG, L., LIU, Y., ZHAO, C., HARRISON, T. J., MA, Y., SUN, S.; ZHANG, J.; WANG, Y. Experimental infection of rabbits with rabbit and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses. **PLoS One**, v. 5, n. 2, e9160, 2010.

MALCOLM, P.; DALTON, H.; HUSSAINI, H. S.; MATHEW, J. 2007. The histology of acute autochthonous hepatitis E virus infection. **Histopathology**, v. 51, n. 2, p. 190-194, 2007.

MANEERAT, Y.; CLAYSON, E. T.; MYINT, K. S.; YOUNG, G. D.; INNIS, B. L. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. **Journal of medical virology**, v. 48, n. 2, p. 121-128, 1996.

MANICKAM, C.; WACHTMAN, L.; MARTINOT, A. J.; GIAVEDONI, L. D.; REEVES, R. K. Metabolic dysregulation in *Hepacivirus* infection of common marmosets (*Callithrix jacchus*). **PLoS One**, v. 12, n. 1, e0170240, 2017.

MAO, J.; ZHAO, Y.; SHE, R.; CAO, B.; XIAO, P.; WU, Q.; GUO, Z.; MA, L.; SOOMRO, M. H. Detection and localization of rabbit hepatitis e virus and antigen in systemic tissues from experimentally intraperitoneally infected rabbits. **PLoS One**, v. 9, n. 3, e88607, 2014.

MARTINS, R. M.; FREITAS, N. R.; KOZLOWSKI, A.; REIS, N. R.; LOPES, C. L.; TELES, S. A.; GARDINALI, N. R.; PINTO, M. A. Seroprevalence of hepatitis E antibodies in a

population of recyclable waste pickers in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 59, n. 3, p. 188-191, 2014.

MATSUDA, H.; OKADA, K.; TAKAHASHI, K.; MISHIRO, S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 6, p. 944, 2003.

MAYOR, P.; TAKESHITA, R. S. C.; COUTINHO, L. N.; SÁNCHEZ, N.; GÁLVEZ, H.; IQUE, C.; RUIZ, J. C.; MONTEIRO, F. O. B. Functional morphology of the tubular genital organs in the female owl monkey (*Aotus* spp.). **Journal of medical primatology**, v. 44, n. 3, p. 158-167, 2015.

MBITH, J.N.; SPRINGTHORPE, V.S.; SATTAR, S.A. Chemical disinfection of hepatitis A virus on environmental surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 3601-3604, 1990.

MCCAUSTLAND, K. A.; KRAWCZYNSKI, K.; EBERT, J. W.; BALAYAN, M. S.; ANDJAPARIDZE, A. G.; SPELBRING, J. E.; COOK, E. H.; HUMPHREY, C.; YARBOUGH, P. O.; FAVOROV, M. O.; CARSON, D.; BRADLEY, D. W.; ROBERTSON, B. H. Hepatitis E virus infection in chimpanzees: a retrospective analysis. **Archives of Virology**, v. 145, n. 9, p. 1909-1918, 2000.

MENEZES, A. N.; BONVICINO, C. R.; SEUÁNEZ, H. N. Identification, classification and evolution of Owl Monkeys (*Aotus*, Illiger 1811). **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, p. 248, 2010.

MENG, X. J.; PURCELL, R. H.; HALBUR, P. G.; LEHMAN, J. R.; WEBB, D. M.; TSAREVA, T. S.; HAYNES, J. S.; THACKER, B. J.; EMERSON, S. U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 18, p. 9860-9865, 1997.

MENG, X. J.; HALBUR, P. G.; HAYNES, J. S.; TSAREVA, T. S.; BRUNA, J. D.; ROYER, R. L.; PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. **Archives of Virology**, v. 143, n. 7, p. 1405-1415, 1998a.

MENG, X. J.; HALBUR, P. G.; SHAPIRO, M. S.; GOVINDARAJAN, S.; BRUNA, J. D.; MUSHAHWAR, I. K.; PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 12, p. 9714-9721, 1998b.

MENG, X. J. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 256-265, 2010.

MENG, X. J. Expanding host range and cross-species infection of hepatitis E virus. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 8, e1005695, 2016.

MESLIN, F. X. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 223-228, 1997.

MOKHTARI, C.; MARCHADIER, E.; HAÏM-BOUKOBZA, S.; JEBLAOU, A.; TESSÉ, S.; SAVARY, J.; ROQUE-AFONSO, A. M. Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 1, p. 36–40, 2013.

MOLL, A. J.; MOLL, A. F. J.; SILVA, F. D. Investigações nas doenças hepatobiliares. In: MATTOS, A. A.; DANTAS-CORRÊA, E. B. D. **Tratado de Hepatologia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. cap. 4, p. 53-88.

MONTEIRO, F. O. B.; COUTINHO, L. N.; DE ARAÚJO, K. F.; BARROS MONTEIRO, M. V.; DE CASTRO P. H. G.; DA SILVA, K. S. M.; BENIGNO, R. N. M.; VICENTE, W. R. R. Biochemical and haematological parameters in owl monkeys infected and uninfected with *Trypanoxyuris* sp. **Journal of Helminthology**, v. 83, p. 225-229, 2009.

MORSE, S. S.; MAZET, J. A.; WOOLHOUSE, M.; PARRISH, C. R.; CARROLL, D.; KARESH, W. B.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.; LIPKIN, W. I.; DASZAK, P. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. **The Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1956-1965, 2012.

MUNNÉ, M. S.; VLADIMIRSKY, S.; OTEGUI, L.; CASTRO, R.; BRAJTERMAN, L.; SOTO, S.; GUARNERA, E.; MOLINA, V.; MONFELLANO, M.; SCHLAUDER, G. G.; GONZÁLEZ, J. E. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 12, p. 1579-1583, 2006.

MUSHAHWAR, I. K. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. **Journal of medical virology**, v. 80, n. 4, p. 646-658, 2008.

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, K.; TAIRA, K.; TAIRA, M.; OHNO, A.; SAKUGAWA, H.; ARAI, M.; MISHIRO, S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. **Hepatology Research**, v. 34, n. 3, p. 137–140, 2006.

NARDINI, R.; VERIN, R.; MAZZEI, M.; FORZAN, M.; POLI, A. Hepatitis E virus-related liver alterations and viral antigen localization in European wild boar (*Sus scrofa*). **European Journal of Wildlife Research**, v. 60, n. 5, p. 835-838, 2014.

NORDER, H.; KARLSSON, M.; MELLGREN, Å.; KONAR, J.; SANDBERG, E.; LASSON, A.; CASTEDAL, M.; MAGNIUS, L.; LAGGING, M. Diagnostic performance of five assays for anti-hepatitis E virus IgG and IgM in a large cohort study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 549-555, 2016.

NUNES, H.M.; SOARES, M. C. P.; SARMENTO, V. P.; MALHEIROS, A. P.; BORGES, A. M.; SILVA, I. S.; PAIXÃO, J. F. Soroprevalência da infecção pelos vírus das hepatitis A, B, C, D e E em município da região oeste do Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica em Saude**, v. 7, n. 1, p. 55-62, 2016.

OKAMOTO, H. Hepatitis E virus cell culture models. **Virus Research**, v. 161, n. 1, p. 65-77, 2011.

OKAMOTO, H. Culture systems for hepatitis E virus. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 2, p. 147-158, 2013.

PAIVA, H. H.; TZANEVA, V.; HADDAD, R.; YOKOSAWA, J. Molecular characterization of swine hepatitis e virus from Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 693-698, 2007.

PANDA, K. K.; VARMA, S. P. K. Hepatitis E: molecular virology and pathogenesis. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 114-124, 2013.

PANG, L.; ALENCAR, F. E.; CERUTTI, C. JR.; MILHOUS, W. K.; ANDRADE, A. L.; OLIVEIRA, R.; KANESA-THASAN, N.; MACARTHY, P. O.; HOKE, C. H. JR. Short report: Hepatitis E infection in the Brazilian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 4, p. 347-348, 1995.

PARANÁ, R.; COTRIM, H. P.; CORTEY-BOENNEC, M. L.; TREPO, C.; LYRA, L. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibodies in patients from a referral unit of liver diseases in Salvador, Bahia, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 1, p. 60-61, 1997.

PASSOS, A. M.; HERINGER, T. P.; MEDINA-PESTANA, J. O.; FERRAZ, M. L.; GRANATO, C. F. First report and molecular characterization of hepatitis E virus infection in renal transplant recipients in Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 85, n. 4, p. 615-619, 2013.

PASSOS-CASTILHO, A. M.; PORTA, G.; MIURA, I. K.; PUGLIESE, R. P.; DANESI, V. L.; PORTA A.; GUIMARÃES, T.; SEDA, J.; ANTUNES, E.; GRANATO, C. F. Chronic hepatitis E virus infection in a pediatric female liver transplant recipient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4425-4427, 2014.

PASSOS-CASTILHO, A. M.; SENA, A.; REINALDO, M. R.; GRANATO, C. F. H. Hepatitis E virus infection in Brazil: results of laboratory-based surveillance from 1998 to 2013. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 468-470, 2015.

PASSOS-CASTILHO, A. M.; SENA, A.; GERALDO, A.; SPADA, C.; GRANATO, C. F. H. High prevalence of hepatitis E virus antibodies among blood donors in Southern Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 2, p. 361-364, 2016.

PAVIO, N.; MENG, X. J.; DOCEUL, V. Zoonotic origin of hepatitis E. **Current Opinion in Virology**, v. 10, p. 34-41, 2015.

PERALTA, B.; BIARNÉS, M.; ORDÓÑEZ, G.; PORTA, R.; MARTÍN, M.; MATEU, E.; PINA, S.; MENG, X.J. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1-2, p. 31-36, 2009.

PÉREZ-GRACIA, M. T.; SUAY, B.; MATEOS-LINDEMANN, M. L. Hepatitis E: An emerging disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 40-59, 2014.

PERON, J. M.; DANJOUX, M.; KAMAR, N.; MISSOURY, R.; POIRSON, H.; VINEL, J. P.; MANSUY, J. M.; BUREAU, C.; IZOPET, J.; BROUSSET, P.; SELVES, J. Liver

histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. **Virchows Archiv** 450, n. 4, p. 405–410, 2007.

PISCHKE, S.; GREER, M.; HARDTKE, S.; BREMER, B.; GISA, A.; LEHMANN, P.; HAVERICH, A.; WELTE, T.; MANNS, M. P.; WEDEMEYER, H.; GOTTLIEB, J.; HEPATITIS E STUDY GROUP. Course and treatment of chronic hepatitis E virus infection in lung transplant recipients. **Transplant Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 333-339, 2014.

POLDERVAART, J. H.; FAVIER, R. P.; PENNING, L. C.; VAN DEN INGH, T. S. G. A. M.; ROTHUIZEN, J. Primary hepatitis in dogs: a retrospective review (2002–2006). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 1, p. 72-80, 2009.

PRABHU, S. B.; GUPTA, P.; DURGAPAL, H.; RATH, S.; GUPTA, S. D.; ACHARYA, S. K.; PANDA, S. K. Study of cellular immune response against Hepatitis E virus (HEV). **Journal of Viral Hepatitis**, v. 18, n. 8, p. 587-594, 2011.

PUJOL, F. H.; FAVOROV, M. O.; MARCANO, T.; ESTÉ, J. A.; MAGRIS, M.; LIPRANDI, F.; KHUDYAKOV, Y. E.; KHUDYAKOVA, N. S.; FIELDS, H. A. Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. **Journal of Medical Virology**, v. 42, n. 3, p. 234-236, 1994.

PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. Animal models of hepatitis A and E. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v. 42, n. 2, p. 161-177, 2001.

PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 3, p. 494-503, 2008.

PURCELL, R. H.; ENGLE, R. E.; ROOD, M. P.; KABRANE-LAZIZI, Y.; NGUYEN, H. T.; GOVINDARAJAN, S.; ST. CLAIRE, M.; EMERSON, S. U. Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 2216-2222, 2011.

PURDY, M. A.; KHUDYAKOV, Y. E. The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. **Virus Research**, v. 161, n. 1, p. 31-39, 2011.

RAJ, V. S.; SMITS, S. L.; PAS, S. D.; PROVACIA, L. B.; MOORMAN-ROEST, H.; OSTERHAUS, A. D.; HAAGMANS, B. L. Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 8, p. 1369-1370, 2012.

REYES, G. R.; PURDY, M. A.; KIM, J. P.; LUK, K. C.; YOUNG, L. M.; FRY, K. E.; BRADLEY, D. W. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. **Science**, v. 247, n. 4948, p. 1335-1339, 1990.

RIEZEBOS-BRILMAN, A.; PUCHHAMMER-STÖCKL, E.; VAN DER WEIDE, H. Y.; HAAGSMA, E. B.; JAKSCH, P.; BEJVL, I.; NIESTERS, H. G.; VERSCHUUREN, E. A. Chronic hepatitis E infection in lung transplant recipients. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 32, n. 3, p. 341-346, 2013.

ROGÉE, S.; LE GALL, M.; CHAFEY, P.; BOUQUET, J.; CORDONNIER, N.; FREDERICI, C.; PAVIO, N. Quantitative proteomics identifies host factors modulated during acute

hepatitis E virus infection in the swine model. **Journal of Virology**, v. 89, n. 1, p. 129-43, 2015.

SANTOS, D. C. M.; SOUTO, F. J. D.; DOS SANTOS, D. R. L.; VITRAL, C. L.; GASPAR, A. M. C. Seroepidemiological markers of enterically transmitted viral hepatitis A and E in individuals living in a community located in the North area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 637-640, 2002.

SARTHOU, J. L.; BUDKOWSKA, A.; SHARMA, M. D.; LHUILLIER, M.; PILLOT, J. Characterization of an antigen-antibody system associated with epidemic non-A, non-B hepatitis in West Africa and experimental transmission of an infectious agent to primates. **Annales de l'Institut Pasteur / Virologie**, v. 137, p. 225-232, 1986.

SCHLAUDER, G. G.; FRIDER, B.; SOOKOIAN, S.; CASTAÑO, G. C.; MUSHAHWAR, I. K. Identification of 2 novel isolates of Hepatitis E Virus in Argentina. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 294-7, 2000.

SCHLOSSER, J.; VINA-RODRIGUEZ, A.; FAST, C.; GROSCHUP, M. H.; EIDEN, M. Chronically infected wild boar can transmit genotype 3 hepatitis E virus to domestic pigs. **Veterinary microbiology**, v. 180, n. 1, p. 15-21, 2015.

SCOBIE, L.; DALTON, H. R. Hepatitis E: source and route of infection, clinical manifestations and new developments. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2013.

SHARMA, M.P.; DASARATHY, S. Gallbladder abnormalities in acute viral hepatitis: a prospective ultrasound evaluation. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 13, n. 6, p. 697-700, 2001.

SMITH, D. B.; SIMMONDS, P.; MEMBERS OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES HEPEVIRIDAE STUDY GROUP, JAMEEL, S.; EMERSON, S. U.; HARRISON, T. J.; MENG, X. J.; OKAMOTO, H.; VAN DER POEL, W. H. M.; PURDY, M.A. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. **Journal of General Virology**, v. 95, n. 10, p. 2223-2232, 2014.

SOE, S.; UCHIDA, T.; SUZUKI, K.; KOMATSU, K.; AZUMI, J. I.; OKUDA, Y.; IIDA, F.; SHIKATA, T.; RIKIHISA, T.; MIZUNO, K.; WIN, K. M.; TIN, K. M. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in cynomolgus monkeys: morphology and probable mechanism of hepatocellular necrosis. **Liver**, v. 9, n. 3, p. 135-145, 1989.

SONODA, H.; ABE, M.; SUGIMOTO, T.; SATO, Y.; BANDO, M.; FUKUI, E.; MIZUO, H.; TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5371-5374, 2004.

SPELMAN, L. H.; OSBORN, K. G.; ANDERSON, M. P. Pathogenesis of hemosiderosis in lemurs: role of dietary iron, tannin, and ascorbic acid. **Zoo Biology**, v. 8, n. 3, p. 239-251, 1989.

STANAWAY, J. D.; FLAXMAN, A. D.; NAGHAVI, M.; FITZMAURICE, C.; VOS, T.; ABUBAKAR, I.; ABU-RADDAD, L. J.; ASSADI, R.; BHALA, N.; COWIE, B.;

FOROUZANFOUR, M. H.; GROEGER, J.; HANAFIAH, K. M.; JACOBSEN, K. H.; JAMES, S. L.; MACLACHLAN, J.; MALEKZADEH, R.; MARTIN, N. K.; MOKDAD, A. A.; MOKDAD, A. H.; MURRAY, C. J.; PLASS, D.; RANA, S.; REIN, D. B.; RICHARDUS, J. H.; SANABRIA, J.; SAYLAN, M.; SHAHRAZ, S.; SO, S.; VLASSOV, V. V.; WEIDERPASS, E.; WIERSMA, S. T.; YOUNIS, M.; YU, C.; EL SAYED ZAKI, M.; COOKE, G. S.; The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 388, n. 10049, p. 1081-1088, 2016.

SUN, Z. F.; LARSEN, C. T.; HUANG, F. F.; BILLAM, P.; PIERSON, F. W.; TOTH, T. E.; MENG, X. J. Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2658-2662, 2004.

TANG, Y. W.; PROCOP, G. W.; PERSING, D. H. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, v. 43, n. 11, p. 2021-2038, 1997.

TAKAHASHI, K.; KITAJIMAB, N.; ABE, N.; MISHIRO, S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. **Virology**, v. 330, n. 2, p. 501– 505, 2004.

TAKESHITA, R. S. C., MONTEIRO, F. O. B., DE MIRANDA LINS E LINS, F. L., DA SILVA, G. A., FATURI, C., COUTINHO, L. N., MONTEIRO, M. V.; KUGELMEIER, T.; CASTRO, P. H.; MUNIZ, J. A. P. C. Hematological, hepatic, and renal evaluation in *Aotus azarai infulatus*. **Journal of Medical Primatology**, v. 40, n. 2, p. 104-110, 2011.

TAM, A. W., SMITH, M. M.; GUERRA, M. E.; HUANG, C. C.; BRADLEY, D. W.; FRY, K. E.; REYES, G. R. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. **Virology**, v. 185, n. 1, p. 120–131, 1991.

TANAKA, T.; TAKAHASHI, M.; KUSANO, E.; OKAMOTO, H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 3, p. 903-911, 2007.

TANAKA, T.; TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, H.; ICHIYAMA, K.; HOSHINO, Y.; NAGASHIMA, S.; MIZUO, H.; OKAMOTO, H. Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1906-1910, 2009.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOOLHOUSE, M. E. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.

TEI, S.; KITAJIMA, N.; TAKAHASHI, K.; MISHIRO, S. Zoonotic transmission of Hepatitis E Virus from deer to human beings. **The Lancet**, v. 362, p. 371–373, 2003.

THIRY, D.; MAUROY, A., PAVIO, N.; PURDY, M. A., ROSE, N.; THIRY, E.; DE OLIVEIRA-FILHO, E. F. Hepatitis E virus and related viruses in animals. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 1, p. 37-52, 2015.

THIRY, D.; ROSE, N.; MAUROY, A.; PABOEUF, F.; DAMS, L.; ROELS, S.; PAVIO, N.; THIRY, E. Susceptibility of pigs to zoonotic hepatitis E virus genotype 3 isolated from a wild boar. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2017. No prelo.

TICEHURST, J. R.; RHODES JR., L.L.; KRAWCZYNSKI, K.; ASHER, L.V.S.; ENGLER, W.F.; MENSING, T.L.; CAUDILL, J.D.; SJOGREN, M.H.; HOKE JR., C.H; LEDUC, J.W.; BRADLEY, D.W.; BINN, L.N. Infection of Owl Monkeys (*Aotus trivirgatus*) and Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) with Hepatitis E Virus from Mexico. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 5, p. 835-845, 1992.

TRINTA K. S.; LIBERTO, M. I. M.; DE PAULA, V. S.; YOSHIDA, C. F. T.; GASPAR, A. M. C. Hepatitis E Virus infection in selected Brazilian populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 25-29, 2001.

TSAREV, S. A.; EMERSON, S. U.; REYES, G. R.; TSAREVA, T. S.; LEGTERS, L. J.; MALIK, I. A.; IQBAL, M.; PURCELL, R. H. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 2, p. 559-563, 1992.

TSAREV, S. A.; TSAREVA, T. S.; EMERSON, S. U.; KAPIKIAN, A. Z.; TICEHURST, J.; LONDON, W.; PURCELL, R. H. ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open-reading frame-2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates. **The Journal of infectious diseases**, v. 168, n. 2, p. 369-378, 1993a.

TSAREV, S. A.; EMERSON, S. U.; TSAREVA, T. S.; YARBOUGH, P. O.; LEWIS, M.; GOVINDARAJAN, S.; REYES, G. R.; SHAPIRO, M.; PURCELL, R. H. Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 6, p. 1302-1306, 1993b.

TSAREV, S. A.; TSAREVA, T. S.; EMERSON, S. U.; YARBOUGH, P. O.; LEGTERS, L. J.; MOSKAL, T.; PURCELL, R. H. Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in cynomolgus monkeys. **Journal of medical virology**, v. 43, n. 2, p. 135-142, 1994a.

TSAREV, S. A.; TSAREVA, T. S.; EMERSON, S. U.; GOVINDARAJAN, S.; SHAPIRO, M.; GERIN, J. L.; PURCELL, R. H. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p.10198-10202, 1994b.

TSAREV, S. A.; TSAREVA, T. S.; EMERSON, S. U.; RIPPY, M. K.; ZACK, P.; SHAPIRO, M.; PURCELL, R. H. Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 1, p. 31-37, 1995.

TURNER, J.; GODKIN, A.; NEVILLE, P.; KINGHAM, J.; CH'NG, C.L. Clinical Characteristics of Hepatitis E in a "Non-Endemic" Population. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1899-1902, 2010.

USMANOV, R. K.; BALAYAN, M. S.; DVOINIKOVA, O. V.; ALYMBAYEVA, D. B.; ZAMIATINA, N. A.; KAZACHKOV, L. A.; BELOV, V. I. Experimental infection of lambs with hepatitis E virus. **Voprosy virusologii** v. 39, n. 4, p. 165-168, 1994.

VAN CUYCK-GANDRÉ, H.; COCKMAN-THOMAS, R.; CAUDILL, J. D.; ASHER, L. S.; ARMSTRONG, K. L.; HAUROEDER, B.; CLEMENTS, N. J.; BINN, L. N.; LONGER, C. F. Experimental African HEV infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). **Journal of Medical Virology**, v. 55, n. 3, p. 197-202, 1998.

VASCONCELOS, J.; SOLIMAN, M. C.; STAGGEMEIER, R.; HEINZELMANN, L.; WEIDLICH, L.; CIMIRRO, R.; ESTEVES, P. A.; SILVA, A. D.; SPILKI, F. R. Molecular detection of hepatitis E virus in feces and slurry from swine farms, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 777-782, 2015.

VITRAL, C. L.; YOSHIDA, C. F. T.; GASPAR, A. M. C. The use of non-human primates as animal models for the study of hepatitis viruses. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, n. 8, p. 1035-1048, 1998.

VITRAL, C. L.; DA SILVA-NUNES, M.; PINTO, M. A.; DE OLIVEIRA, J. M.; GASPAR, A. M. C.; PEREIRA, R. C.; FERREIRA, M. U. Hepatitis A and E seroprevalence and associated risk factors: a community-based cross-sectional survey in rural Amazonia. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 458, 2014.

WEDEMEYER, H.; PISCHKE, S.; MANNS, M. P. Pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infection. **Gastroenterology**, v. 142, n. 6, p. 1388-1397, 2012.

WEDEMEYER, H.; RYBCZYNSKA, J.; PISCHKE, S.; KRAWCZYNSKI, K. Immunopathogenesis of hepatitis E virus infection. **Seminars in Liver Disease**, v. 33, n. 1, p. 71-78, 2013.

WEISS, R. A.; MCMICHAEL, A. J. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. **Nature Medicine**, v. 10, p. 70-76, 2004. Supplement 12.

WENDUM, D.; NACHURY, M.; YVER, M.; LEMANN, M.; FLÉJOU, J. F.; JANIN, A.; BERTHEAU, P. Acute hepatitis E: a cause of lymphocytic destructive cholangitis. **Human Pathology**, v. 36, n. 4, p. 436-438, 2005.

WONG, D. C.; PURCELL, R. H.; SREENIVASAN, M. A.; PRASAD, S. R.; PAVRI, K. M. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. **The Lancet**, v. 2, n. 8200, p. 876-879, 1980.

WOOLHOUSE, M. E. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 3-7, 2002. Supplement 10.

WRIGHT, P. C. The behavior and ecology of the owl monkey. In: BAER, J. F.; WELLER, R. E.; KAKOMA, I. **Aotus: The owl monkey**. 1st ed. California: Academic Press, 1994. cap. 3, p. 97-112.

XIA, J.; LIU, L.; WANG, L.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; LIU, P.; ZHOU, Q.; WANG, L.; ZHUANG, H. Experimental infection of pregnant rabbits with hepatitis E virus demonstrating high mortality and vertical transmission. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 22, n. 10, p. 850-857, 2015.

XIAO, P.; LI, R.; SHE, R.; YIN, J.; LI, W.; MAO, J.; SUN, Q. Prevalence of hepatitis e virus in swine fed on kitchen residue. **PLos One**, v. 7, n. 3, e33480, 2012.

YANG, Y.; SHI, R.; SHE, R.; SOOMRO, M. H.; MAO, J.; DU, F.; ZHAO, Y.; LIU, C. Effect of swine hepatitis E virus on the livers of experimentally infected Mongolian gerbils by swine hepatitis E virus. **Virus Research**, v. 208, p. 171-179, 2015.

YOO, D.; WILLSON, P.; PEI Y.; HAYES M.A.; DECKERT, A.; DEWEY, C.E.; FRIENDSHIP, R.M.; YOON, Y.; GOTTSCHALK, M.; YASON, C.; GIULIVI, A. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1213–1219, 2001.

YU, C.; BOON, D.; MCDONALD, S. L.; MYERS, T. G.; TOMIOKA, K.; NGUYEN, H.; ENGLE R. E.; GOVINDARAJAN, S.; EMERSON, S. U.; PURCELL, R. H. Pathogenesis of hepatitis E virus and hepatitis C virus in chimpanzees: similarities and differences. **Journal of virology**, v. 84, n. 21, p. 11264-11278, 2010.

YU, W.; YANG, C.; BI, Y.; LONG, F.; LI, Y.; WANG, J.; HUANG, F. Characterization of hepatitis E virus infection in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 80, 2016.

YUGO, D. M.; COSSABOOM, C. M.; MENG, X. J. Naturally occurring animal models of human hepatitis E virus infection. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v. 55, n. 1, p. 187-199, 2014.

ZHANG, H.; MOHN, U.; PRICKETT, J. R.; SCHALK, S.; MOTZ, M.; HALBUR, P. G.; FEAGINS, A. R.; MENG, X. J.; OPRIESSNIG, T. Differences in capabilities of different enzyme immunoassays to detect anti-hepatitis E virus immunoglobulin G in pigs infected experimentally with hepatitis E virus genotype 3 or 4 and in pigs with unknown exposure. **Journal of Virological Methods**, v. 175, n. 2, p. 156-162, 2011.

ZHANG, J.; GE, S. X.; HUANG, G. Y.; LI, S. W.; HE, Z. Q.; WANG, Y. B.; ZHENG Y. J.; GU, Y.; NG, M. H.; XIA, N. S. Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model. **Journal of Medical Virology**, v. 71, n. 4, p. 518-526, 2003.

ZHANG, J.; SHIH, J. W.; XIA, N. S. Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 23, p. 2265-2266, 2015.

ZHAO, C.; MA, Z.; HARRISON, T. J.; FENG, R.; ZHANG, C.; QIAO, Z.; FAN, J.; MA, H.; LI, M.; SONG, S.; WANG, Y. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 8, p. 1371–1379, 2009.