MAX DIEGO CRUZ SANTOS

Caracterização genotípica dos vírus das hepatites B, C e Delta em cinco municípios do estado do Maranhão, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

Max Diego Cruz Santos

Caracterização genotípica dos vírus das hepatites B, C e Delta em cinco municípios do estado do Maranhão, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. João Renato Rebello Pinho

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Santos, Max Diego Cruz.
Caracterização genotípica dos vírus das hepatites B, C e Delta em cinco municípios do estado do Maranhão, Brasil / Max Diego Cruz Santos. -- São Paulo, 2016.

Orientador: João Renato Rebello Pinho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Diversidade genética viral.

Versão do título para o inglês: Genotypic characterization of hepatitis B, C and Delta viruses in five municipalities of Maranhão state, Brazil.

1. Diversidade genética 2. Vírus da hepatite B 3. Vírus da hepatite C 4. Vírus da hepatite Delta 5. Maranhão 6. I. Pinho, João Renato Rebello II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB085/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Max Diego Cruz Santos.

Título da Tese: Caracterização genotípica dos vírus das hepatites B, C e Delta em *cinco municípios do estado do Maranhão, Brasil.*

Orientador(a): João Renato Rebello Pinho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº. do Parecer: 053/2012 Registro do CEP: 140/11 Nº do Protocolo: 003642/2011-20 Data de Entrada no CEP: 26/07/2011 Parecer: APROVADO
PROJETO DE PESQUISA	

I - Identificação:

Título do projeto: Prevalência de Hepatite B, C e D no município de Urbano Santo, Humberto de Campos e da Região do Baixo Munin,Maranhão, Brasil		
Identificação do Pesquisador Responsável: Adalgisa de Souza Paiva Ferreira		
Equipe Executora: Lena Maria Barros Fonseca, João Renato Rebello Pinho, Antonio Augusto Moura da Silva, Max Diego Cruz Santos, Marinilde Telles Sousa, Genildo Cardoso, Francisco Carlos Costa Magalhães, Ilana Mirian Almeida Felipe, Michele Soares Gomes Gouvêa, Fernando Luis Bacelar de Carvalho Lobato, Letícia Alana Barros Souza, Adna Gesarone Carvalho Ferreira, Nilgicy Maria de Jesus Amorin, Valéria Christine Albuquerque de Sá Matos.		
Instituição onde será realizado: Municípios maranhenses de Urbano Santos, Humberto de Campos, Axixá, Morros e Icatú		
Área temática: III	Multicêntrico: Não	Solicitação de inclusão de objetivos Data: 23.01.12
Cooperação estrangeira: Não		

II - Objetivos:

Geral

Conhecer a prevalência das hepatites virais B, C e D e caracterizar os genótipos e subgenótipos desses vírus no município de Urbano Santos, Axixá, Morros, Icatu e Humberto de Campos – MA e realizar estudos imunogenéticos e de ancestralidade nessa população.

Específicos

- Identificar os indivíduos com sorologia positiva para os marcadores HBsAg, anti-HBc e/ou anti-HBs e anti-HCV.
- Identificar os indivíduos que apresentam o marcador sorológico para a hepatite D (anti-HDV) entre os portadores do HBsAg.
- Caracterizar os genótipos, subgenótipos (HBV) e subtipos (HCV) dos vírus da hepatite B, C e D através da técnica de sequenciamento direto.
- Estimar a ancestralidade genômica nessa população através de marcadores moleculares.
- Verificar a diversidade genética do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, genes KIR e IL28B.
- Verificar a existência de associação entre maior percentagem de marcadores africanos e portadores das hepatites comparadas com não portadores.
- Verificar a existência de associação entre maior percentagem de marcadores africanos e genótipos virais.
- Verificar a existência de associação entre os alelos de MHC, KIR e IL28B com a presença da infecção viral pelos HBV e HCV.

III- Sumário do projeto:

Trata-se de um estudo de prevalência com base em uma população definida, para se determinar a Prevalência de Hepatite B, C e D no município de Urbano Santo, Humberto de Campos e da Região do Baixo Munin,Maranhão, Brasil. O estudo será realizado nos municípios maranhense de Urbano Santos, Humberto de Campos e Região do Baixo Munin no período de março de 2012 a março de 2014. A população será composta por indivíduos que residem nos referidos municípios há pelo menos seis meses e que concordarem participar do estudo, após esclarecimento dos objetivos e metodologia do estudo em foco. A amostra será

composta por 4.000 pessoas com idade mínima de um ano. Para calcular a amostra foi adotada uma prevalência de 0,5% do HBsAg (considerando o resultado da prevalência do HBsAg, encontrada no inquérito nacional na região nordeste) com erro absoluto de 0,3%, nível de confiança de 95%, com uma amostra total de 3. 856 a 4.000 indivíduos. A amostragem será feita por conglomerado em dois estágios: no primeiro serão sorteados os setores com probabilidade proporcional à população. No segundo será sorteado o quarteirão inicial. Os sujeitos serão submetidos à coleta de 15 ml de sangue periférico para realização dos seguintes marcadores sorológicos: HBsAg, anti-HBc (IgG) e anti-HBs, anti-HDV e anti-HCV que serão realizados no Laboratório Central do Estado do Maranhão (LACEN), através da técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kits comerciais da DIASORIN. Serão também realizados os testes de biologia molecular no CEPEC (Com a orientação do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical da Faculdade de Medicina da USP – LGHT-FM/USP).

IV - Comentários do relator frente à resolução 196/96 e complementares:

O protocolo de pesquisa possui a seguinte estrutura: Folha de Rosto, Folhas de identificação, Sumário, Introdução, Fundamentação Teórica, Objetivos, Justificativas, Metodologia, Orçamento, Cronograma, Referência Bibliográficas, Currículo Lattes e TCLE. Portanto, em conformidade com os requisitos da Res. 196/96 CNS/MS e suas complementares.

V - Parecer Consubstanciado do CEP

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos requisitos fundamentais da Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde / MS.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a este CEP, relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final gravado em CD-ROM.

São Luís, 20 de março de 2012

Profª Drª Doriene Mª Cardoso de Aquino
Coordenadora do CEP-HUUFMA
Ethica homini habitat est

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que cederam suas amostras de sangue e concordaram assim a aumentar o conhecimento científico. Dedico também a todos os agentes e profissionais de saúde dos municípios e suas respectivas prefeituras pelo apoio logístico.

AGRADECIMENTOS

Não cabe aqui o quão grande é o número de agradecimentos, pois se estou aqui é a soma de diversas assistências que recebi desde o início dos meus estudos. Contudo, mesmo sendo um clichê que tenho orgulho de citar, meu agradecimento vai primeiramente ao Deus único dentro de mim, Ele é o que mais importante nessa conquista e concedeu tudo que tenho. Palavras são poucas para agradecer a ti, mas ações serão minha pelha gratidão.

Aos meus pais, Raimundo Santos e Lucy Mary Cruz, que são as imagens de esforço para criar um filho em direção ao bem. Esses, mesmo que no início com pouco recurso numa periferia conhecida como uma das mais violentas e pelo tráfico de drogas, conseguiram criar esse cidadão que agora vêem. Eles são heróis como poucos que abriram mão do conforto pela aquisição de educação para seus filhos, direito básico que muitas crianças ainda são privadas.

Aos meus irmãos, Pablo Santos e Deivd Santos, que cresceram e enfretaram comigo todos os desafios que encontramos.

À minha amiga e companheira Eliene Sousa, pela compreensão da minha ausência e apoio nessa minha caminhada.

Aos meus parentes em geral, pelo apoio na minha formação, em especial ao meu tio José Cruz e sua esposa Angela Jorge que me receberam de braços abertos em sua casa mesmo com pouco espaço.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa e auxílio de bancada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e Fundação de Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento dos insumos de pesquisa.

Ao meu orientador Dr. João Pinho e amiga e tutora Dra.Michele Gomes-Gouvêa que são os grandes culpados por eu estar me titulando em umas das melhores Universidades da América Latina. Um sonho nunca sonhado que se tornou realidade graças ao incentivo desses dois

grandes profissionais, além é claro, do grande conhecimento laboratorial e teórico fornecidos.

À Dra. Fernanda Malta por todo o apoio laboratorial e teórico, além de me receber de braços abertos e sempre com um sorriso no rosto.

Aos amigos do Laboratório em São Paulo, Ariana Ferreira, João Moreira, Livia Lima, Caroline Noble, Paola Faria, Ketti Oliveira e Thiago Araújo, pela receptividade e apoio durante esses anos.

À minha amiga de laboratório e pós-gradução, Karine Gaspareto, pelo apoio recíproco nos grandes momentos de ansiedade e preocupação.

A todos os profissionais que convivi indiretamento no Laboratório em São Paulo pela gentileza e sorrisos prestados.

Às Doutoras Adalgisa Souza e Lena Barros do Centro de Pesquisa Clínica do Maranhão, pelos projetos idealizados e realizados juntamente. Pelo apoio e confiança na minha formação.

A todos os demais profissinais e amigos do Centro de Pesquisa Clínica, em especial meu amigo Jomar Nunes, pelo companherismo do dia a dia na pesquisa.

A minha amiga Dra. Teresa Viveiros e família, pelo apoio e incentivo.

À Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão através dos profissionais da Secretaria de Vigilância Epidemiologia, em especial Maria Oneide Lima e Genildo Filho e do LACEN-MA, em especial Almir e Penha.

A Dra. Ana Schenberg por ter me orientado sobre o Programa de Pós-Gradução Interunidades em Biotecnologia e por ter me dado apoio e incentivo para realização da prova de ingresso, além da comprensão nos momentos em que precisava ficar ausente em sua disciplina devido à pesquisa.

Aos profissionais da Secretaria de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial Fábia Vila-Nova que sempre não mediu esforços para auxiliar ou tirar todas as dúvidas quando necessário.

Enfim, agradeço a minha pessoa, esse homem batalhador e corajoso que mesmo com empecilhos conseguiu sempre ter foco em seus objetivos. O negro da periferia conseguiu ser o primeiro da família a se formar em universidade pública. Esse mesmo está conquistando um passo adiante maior, primeiro doutor da família. Não obstante todo sofrimento de estar distante da minha família, ele foi efêmero, enquanto a recompensa será para sempre. Não importa de onde tu vens ou o que dizem a respeito de você, o que você tem dentro de ti é muito mais forte, Deus.

“Se eu fizesse uma aposta, apostaria que lá para o ano 2050- quem dera até mais cedo- nós teremos descoberto que mais de 80% de todo câncer humano é causado por infecção”

(Paul W. Ewald)

RESUMO

Santos MDC. Caracterização genotípica dos vírus das hepatites B, C e Delta em cinco municípios do estado do Maranhão, Brasil [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Doenças virais vêm preocupando a humanidade. Algumas dessas, que afetam o fígado, são conhecidas como hepatites virais. Entre essas infecções temos aquelas provocadas pelos vírus B (HBV), C (HCV) e Delta (HDV). Essas doenças causam grande impacto para a saúde pública mundial. No estado do Maranhão, há poucas informações sobre o perfil molecular desses vírus. Assim, objetivamos caracterizar os genótipos e/ou subgenótipos (para HBV e HDV) e subtipos (para HCV) em cinco municípios desse estado. Um total de 3.860 e 3.845 amostras foram triadas para HBsAg e anti-HCV, respectivamente. Aquelas positivas para HBsAg foram investigadas em relação a presença do anti-HD. Noventa e duas, quatro e oito amostras positivas para os marcadores HBsAg, anti-HCV e anti-HD foram identificadas, respectivamente. Essas foram submetidas à extração de DNA (HBV) e RNA (HCV e HDV) através de kits específicos. Para amplificar HCV e HDV, as amostras foram submetidas à transcrição reversa para produção do cDNA. Para amplificação dos fragmentos, foi utilizada a reação em cadeia da polimerase, utilizando *primers* e procedimentos já descritos. Os fragmentos obtidos foram submetidos à purificação e posteriormente sequenciados. As sequências obtidas foram examinadas quanto à qualidade e alinhadas com outras sequências publicadas para determinação dos genótipos e subgenótipos, assim como para construção de árvores filogenéticas. As amostras positivas para HBV DNA (50) foram classificadas: o subgenótipo D4 representou mais de dois terços das sequências (42/86%) seguido pelo subgenótipo A1 (8/14%). Das oito amostras positivas para anti-HD, quatro tiveram HDV RNA detectável e foram classificadas como pertencentes ao tipo africano HDV-8. As quatro amostras positivas para anti-HCV não apresentaram positividade para a PCR qualitativa. O estado do Maranhão tem uma grande contribuição de descendentes africanos e um padrão particular de estabelecimento de tráfico de escravos parecido com os países caribenhos. O subgenótipo do HBV encontrado em dois estudos no Maranhão sustenta a hipótese de que algumas variantes tenham se originado na África quando comparados com os vírus circulantes em outros estados do Brasil, onde o subgenótipo D4 é raramente encontrado. Assim, D4 parece ser o principal representante nessa região, enquanto A1 é o principal na região metropolitana. A topologia da árvore filogenética sugere que houve a introdução de uma única cepa do subgenótipo D4 no Maranhão, enquanto que para o subgenótipo A1 sugere-se a introdução de diferentes cepas. A confirmação do achado do HDV-8 em coinfecção com HBV- D4 confima a sugestão anterior da origem desses vírus na África. Os poucos indivíduos nos quais se observou positividade para o anti-HCV não apresentaram RNA detectável, o que sugere uma infecção pregressa já resolvida. A razão da baixa prevalência do HCV na região pode ser devida á introdução recente desse vírus e/ou menor frequência de meios de transmissão eficientes. Esse é um trabalho pioneiro no estado do Maranhão, utilizando amostra de base populacional, com um número representativo de indivíduos, contudo, muito ainda deve ser investigado em outras regiões do interior do estado, nas quais é desconhecido o perfil de infecção por esses vírus.

Palavras-chave: Diversidade genética. Vírus da hepatite B. Vírus da hepatite C. Vírus da hepatite Delta. Maranhão.

ABSTRACT

Santos MDC. Genotypic characterization of hepatitis B, C and Delta viruses in five municipalities of Maranhão state, Brazil [Ph.D. thesis (Biotechnology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Diseases caused by viruses have been threatening mankind. Among these illnesses, viral hepatitis are caused by hepatitis B (HBV), C (HCV) and Delta (HDV) viruses. These infections represent a major universal public health concern. Data on the genetic profile of these viruses are scarse. Thus, we aimed to characterize genotypes and/or subgenotypes (for HBV and HDV) and subtypes (for HCV) in five municipalities of Maranhão, Brazil. A total of 3,860 and 3,845 samples were screened for HBsAg and anti-HCV, respectively. Anti-HD serological marker were screened in those who were positive for HBsAg. Ninety-two, eight and four individuals were positive for HBsAg, anti-HD and anti-HCV, respectively. Extractions of DNA/RNA were performed by specific kits. For HCV and HDV RNAs detection, extracted samples were first submitted to reverse transcription to yield cDNA. The genome fragments of the viruses were amplified by polymerase chain reaction with primers and procedures previously described. The obtained fragments were subjected to purification and then sequenced. All sequences were checked for quality and then aligned with other published sequences to determine genotype and/or subgenotypes. For HBV, phylogenetic reconstructions were peformed using fifty sequences. The subgenotype D4 represented more than two thirds of the sequences - 42 (86%); followed by subgenotype A1 - 8 (14%). Among the eight samples positive for anti-HD, four had detectable HDV RNA and were classified as HDV-8. Anti-HCV positive samples were negative for qualitative HCV PCR. The state of Maranhão has a great contribution of African ancestrality. Futhermore, there was a particular pattern of slave trade, like the Caribbean countries. The finding of HBV subgenotypes in two studies in Maranhão supports the hypothesis that some variants have originated in Africa when compared to the viruses circulating in other states of Brazil, where the subgenotype D4 is rare. Therefore, this subgenotype seems to be the main representant of this region as subgenotype A1 is in the metropolitan area. The phylogenetic tree topology suggests there was the introduction of a single strain of subgenotype D4 in Maranhão, whereas subgenotype A1 had several introductions of different strains. The finding of HDV-8 in coinfection with HBV D4 confirms the hypothesis of origin of these viruses in Africa as earlier proposed. The few individuals with positive anti-HCV did not show detectable RNA, suggesting a prior infection already resolved. The low number of HCV infection in this region may be due to the recent introduction of the virus and / or to the lower frequency of efficient means of transmission in this population. This is a first-hand population-based study in Maranhão state with a representative number of individuals. Nevertheless, much remains to be investigated in other regions of the state where is unknown the profile of infection with these viruses.

Keywords: Genetic diversity. Hepatitis B virus. Hepatitis C virus. Hepatitis Delta virus. Maranhão.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Micrografia eletrônica e esquema representativo do HBV..... 25
Figura 2 - Esquema simplificado circular e horizontal do genoma do HBV..... 26
Figura 3 - Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B..... 32
Figura 4 - Distribuição geográfica dos genótipos do HBV..... 37
Figura 5 - Esquema representativo do HDV com as proteínas de envelope do HBV 40
Figura 6 - Processo de edição do RNA do HDV..... 41
Figura 7 - Modelo replicativo do HDV..... 42
Figura 8 - Prevalência mundial do HDV e seus genótipos..... 44
Figura 9 - Esquema estrutural e organização genômica do HCV..... 47
Figura 10 - Distribuição dos genótipos do HCV no mundo..... 53
Figura 11 - Foto de um dos setores rurais de difícil acesso estudados..... 58
Figura 12 – Mapa do Maranhão com os municípios participantes da pesquisa..... 59
Figura 13 - Esquema resumido dos procedimentos realizados na pesquisa..... 61
Figura 14 - Processamento de amostras no município de coleta..... 62
Figura 15 - Árvore filogenética das sequências do HBV..... 72
Figura 16 - Sequências de aminoácidos do subtipo *adw2* do subgenótipo A1..... 73
Figura 17 - Sequências de aminoácidos do subtipo *ayw2* do subgenótipo D4..... 73
Figura 18 - Árvore filogenética das sequências do HDV..... 76
Figura 19 - Suposta origem e rotas de migração do subgenótipo A1..... 84
Figura 20 - Esquema da hipótese de introdução do HDV-8 no Maranhão..... 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência categórica das idades da população do estudo..... 68

Tabela 2 - Características demográficas dos portadores dos genótipos do HBV..... 70

Tabela 3 - Características demográficas dos portadores dos genótipos do HDV..... 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV - *adeno-associated virus*

ADAR1 - *adenosine deaminase-1*

AASLD - *American Association for the Study of Liver Diseases*

Anti-HBc - anticorpo contra o antígeno do *core* do vírus da hepatite B

Anti-HBs - anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B

Anti-HCV - anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite C

Anti-HD - anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite D

AuAg - antígeno Austrália

CAAE - certificado de apresentação para apreciação ética

CAP3 - *contig assembly program 3*

cccDNA - *covalently closed circular DNA*

CDC - C*Center for Disease Control and Prevention*

cDNA - c*omplementary deoxyribonucleic acid*

CEPEC - Centro de Pesquisa Clínica

CHC - Carcinoma Hepatocelular

CLDN1- Claudina 1

CMIA - *chemiluminescent microparticle immuno assay*

COP - *coat complex protein*

CD81- *cluster of differentiation 81*

DEPC - *diethylpyrocarbonate*

DMV - d*ouble membrane vesicles*

DNA - *deoxyribonucleic acid*

dNTPs - *deoxynucleotide triphosphates*

DP - desvio padrão

DR - *direct repeats*

DTT - *Dithiothreitol*

E1 - envelope 1

E2 - envelope 2

EIAs - *enzyme immunoassays*

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

HBcAg - antígeno do *core* do vírus da hepatite B

HBeAg - antígeno “e” do vírus da hepatite B

HBsAg - antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBV - *hepatitis B virus*

HBxAg - antígeno “x”do vírus da hepatite B

HCV - *hepatitis C virus*

HDAg - antígeno da hepatite D

HDV- *hepatitis D virus*

HLA - *Human Leukocyte Antigen*

HNANB - Hepatite não A não B

HUUFMA - Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IRES - *internal ribossomal entry site*

L-HBsAg - *large hepatitis B surface antigen*

L-HDAg - *large hepatitis D antigen*

MCMC - *Markov chain Monte Carlo*

M-HBsAg - *medium hepatitis B surface antigen*

MMV - *multiple membrane vesicles*

MW - *Membranous Web*

NAT - *nucleic acid tests*

NS - *nonstructural*

NS2 - *nonstructural 2*

NS3 - *nonstructural 3*

NS4A - *nonstructural 4A*

NS4B - *nonstructural 4B*

NS5A - *nonstructural 5A*

NS5B - *nonstructural 5B*

NTCP - *sodium-taurocholate cotransporting polypeptide*

OCLN - Ocludina

ORF - *open reading frame*

PCR - *polymerase chain reaction*

Pol - *polymerase*

qRT-PCR - *quantitative real time PCR*

rcDNA - *relaxed circular DNA*

RNA - *ribonucleic acid*

RNAm - RNA mensageiro

RNApg - RNA pré-genômico

RNase H - *Ribonuclease H*

RNase OUT - *Recombinant Ribonuclease Inhibitor*

RNAss+ - RNA fita simples em conformação positiva

RT-PCR - *Reverse transcription PCR*

S-HBsAg - *small hepatitis B surface antigen*

S - HDAg - *small hepatitis D antigen*

SIM - sistema de informação de mortalidade

SR-BI - *Scavenger receptor class B type I*

STR - *Short tandem Repeats*

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

UTR - *untranslated region*

VNTRs - *Varible Numbers of Tandem Repeats*

WHO - *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - grau Celsius

µL - microlitros

kb - quilobase

kda - quilodaltons

M - molar

mL - mililitros

mM - milimolar

nm - nanometros

ng - nanogramas

pb - pares de bases

UI - unidades internacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **22**
1.1 Uma visão geral **22**
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **23**
2.1 Hepatite B **23**
2.1.1 Histórico 23
2.1.2 Características biológicas e moleculares do vírion 24
2.1.3 Replicação viral 27
2.1.4 Diagnóstico e formas de transmissão 29
2.1.5 Epidemiologia 30
2.1.6 Diversidade genética e epidemiologia molecular 33
2.2 Hepatite Delta **38**
2.2.1 Histórico 38
2.2.2 Características biológicas e moleculares do vírion 39
2.2.3 Replicação viral 41
2.2.4 Diagnóstico e formas de transmissão 42
2.2.5 Epidemiologia 43
2.2.6 Diversidade genética e epidemiologia molecular 45
2.3 Hepatite C **46**
2.3.1 Histórico 46
2.3.2 Características biológicas e moleculares do vírion 46
2.3.3 Replicação viral 48
2.3.4 Diagnóstico e formas de transmissão 49
2.3.5 Epidemiologia 50
2.3.6 Diversidade genética e epidemiologia molecular 51
3 OBJETIVOS **55**
3.1 Objetivo geral **55**

3.2 Objetivos específicos 55

4 MATERIAL E MÉTODOS **57**

4.1 Amostra e área de estudo **57**

4.2 Desenho de estudo e cálculo amostral **59**

4.3 Sorologia **60**

4.4 Biologia Molecular **62**

4.4.1 Extração do DNA (HBV) e RNA (HDV e HCV) a partir de soro e plasma 62

4.4.2 Síntese do cDNA do HDV RNA e HCV RNA. 62

4.4.3 Amplificação do HBV DNA, HCV cDNA, HDV cDNA 63

4.4.4 Determinação das cargas virais dos HBV e HCV 64

4.4.5 Detecção dos fragmentos amplificados para sequenciamento 64

4.4.6 Sequenciamento dos fragmentos do HBV DNA e HDV cDNA 64

4.4.7 Análise das sequências, genotipagem e análise filogenética 65

4.4.8 Análise estatística 66

5 RESULTADOS **68**

6 DISCUSSÃO **79**

7 CONCLUSÕES **91**

REFERÊNCIAS **92**

APÊNDICES **114**

A-Artigo científico submetido-HBV 114

B-Artigo científico submetido-HDV 138

ANEXOS **154**

A - Termo de esclarecimento livre e esclarecido 154

B - Parecer do comitê de ética pela plataforma Brasil (prorrogação de prazo) 155

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uma visão geral

Nos últimos anos, doenças provocadas por vírus, como Dengue, Chikungunya, Zika e ebola, por exemplo, vêm tomando conta dos noticiários em todos os meios de comunicação. Outras doenças também provocadas por esse tipo de microrganismo, conhecidas como hepatites virais, são distribuídas globalmente e apresentam características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais definidas, com distinções particulares de acordo com a região geográfica (Brasil, 2008). Entre essas infecções temos aquelas provocadas pelos vírus B (HBV) e C (HCV) das hepatites. Embora essas doenças não sejam as principais discutidas nos meios de comunicação, ainda são muito relevantes para a saúde pública mundial, pois ambas possuem um amplo impacto individual, econômico e social (Beutels, 2001).

Outro agente conhecido como vírus da hepatite delta (HDV) tem sido considerado importante em relação ao desenvolvimento da cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), que pela sua replicação persistente, aumenta a taxa de mortalidade dos indivíduos infectados (Romeo et al., 2009).

A maioria dos casos letais relacionado ao câncer de fígado é provocada por hepatites virais, principalmente em países em desenvolvimento como é o caso do Brasil, chegando a números estimados anualmente de aproximadamente 600 mil a mais de 780 mil mortes em todo o mundo associadas com o HBV (Goldstein et al., 2005; Ott et al., 2011; World Health Organization, 2014a). Estima-se que dois bilhões de pessoas já tiveram contato com o HBV (aproximadamente 30% da população global), sendo que 240 a 400 milhões estejam cronicamente infectadas por esse vírus (Goyal, Murray, 2014; Merrill, Hunter, 2011; WHO, 2014a). Em relação ao HCV, há estimativas de 140 milhões de portadores crônicos (WHO, 2014b). Considerando o HDV, há uma variação na distribuição geográfica, com uma estimativa de no mínimo 12 milhões de infectados entre os 240 milhões de portadores crônicos do HBV, ou seja, 5% em todo o mundo (Rizzetto, Ciancio, 2012).

Diante do exposto, são altamente claros os prejuízos incalculáveis para os serviços de saúde de quaisquer países. No Brasil, no estado do Maranhão, especificamente, há poucas informações sobre as prevalências dessas infecções, e principalmente o estudo do perfil molecular desses vírus, que será o tema estudado nesta tese.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hepatite B

2.1.1 Histórico

A icterícia, ou seja, o aspecto amarelo nos tecidos ou secreções, é um dos sintomas marcantes das hepatites observado por Hipócrates em um surto na ilha de Thassos na Grécia, há centenas de anos antes de Cristo, sendo conhecida como icterícia epidêmica. Todavia, não há como relacionar alguns sintomas descritos naquela época por Hipócrates aos vírus causadores das hepatites atuais, podendo esses fatores terem sido atribuídos a um agente etiológico já extinto (Martin, 2003). Devido à ausência de instrumentos e técnicas avançadas de diagnóstico, as hipóteses sobre as infecções eram simplesmente especulativas. Apenas após mais de dois milênios, os agentes causadores de doenças virais começaram a ser investigados, mesmo sem evidência da existência dessas partículas menores que as bactérias. Somente em 1898, Martinus Beijerinck, depois da tentativa de vários outros cientistas, conseguiu descrever o microrganismo da doença do mosaico do tabaco como agente etiológico dessa doença, denominando-o de "veneno" ou "toxina", em latim, *virus* (Beijerinck, 1898).

No século dezenove, a vacinação acabara sendo uma faca de dois gumes, em que possibilitou o primeiro surto epidêmico relacionado ao HBV, pois não existia informação sobre meios de contágio de agentes transmissíveis pelo sangue. 191 indivíduos, entre os mais de 1.200 trabalhadores que foram vacinados contra varíola, desenvolveram icterícia após seis meses da vacinação (Lurman, 1885[*] apud Martin, 2003). Outros casos de icterícia relacionados à vacinação contra febre amarela também foram descritos, sendo que essa infecção, muitas vezes fatal, levava vários soldados britânicos na África e América do Sul à morte (Martin, 2003). O lado antagônico da vacinação foi investigado por cientistas daquela época. Esses constataram que a icterícia não era devido à vacinação, surgindo entre outras hipóteses aquela que o desenvolvimento da icterícia deveria ser ligado a agentes presentes (provavelmente vírus) nos soros de indivíduos aparentemente saudáveis que eram utilizados para preparar as vacinas (Findlay, McCallum, 1937, 1938).

---

[*] Lurman A. Eine Icterusepidemie. Klinische Wochenschrift. 1885; 22: 20.

Há pouco mais de meio século, revelou-se o agente microbiológico que seria um dos grandes problemas de saúde pública mundial. Baruch Blumberg (1925-2011) relatou a descoberta de um novo antígeno denominado Austrália que lhe valeria um prêmio Nobel (Blumberg, 2002). A descoberta desse antígeno aconteceu por acaso, ao coletar amostras de soro de diversas pessoas no mundo, de vários grupos étnicos, para estudar a susceptibilidade genética a doenças. Assim, através de uma abordagem imunológica, já que naquele tempo as técnicas eram limitadas, ele postulou que pessoas que recebiam transfusões sanguíneas de uma grande quantidade de doadores acabavam desenvolvendo anticorpos contra proteínas "polimórficas". Através desse estudo, encontrou um novo antígeno em uma grande quantidade de amostras, incluindo amostras de aborígenes australianos, e por essa razão, esse foi nomeado antígeno Austrália (AuAg) (Blumberg et al., 1965; Blumberg, 2002; Gerlich, 2013).

Okochi e Murakami, no Japão, e Alfred Prince, nos EUA, através de seus trabalhos envolvendo pacientes com hepatites, observaram que os antígenos que estavam procurando nesses pacientes eram idênticos ao Austrália (Okochi, Murakami, 1968; Prince, 1968), assim, muitos outros estudos de vários grupos chegaram a conclusão que o AuAg era o marcador de infecção aguda e crônica para o HBV. Foi então que em 1970, David S. Dane e colaboradores observaram que o AuAg se associava com partículas virais com nucleocapsídeo bem aparente (Dane et al., 1970). Um ano depois, June Almeida e colaboradores foram capazes de separar esse nucleocapsídeo de dentro da chamada partícula de Dane, através de tratamento com detergente, e desse modo, confirmaram que a hepatite B nos pacientes infectados tinha como agente etiológico uma particular viral completa, em que o AuAg seria um antígeno de superfície (HBsAg) e os anticorpos contra o core (anti-HBc) eram devidos a reação imunológica contra o antígeno do core ou nucleocapsídeo (HBcAg) (Almeida et al., 1971).

2.1.2 Características biológicas e moleculares do vírion

O HBV é a espécie prototípica pertencente à família *Hepadnaviridae* e ao gênero *Orthohepadnavirus*. Esse vírus afeta humanos e possui espécies relacionadas que infectam outros mamíferos como morcegos, macacos, marmotas e esquilos (Glebe, Bremer, 2013; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2014). Esse organismo é um vírion envelopado e esférico de aproximadamente 42 nm de diâmetro, com um nucleocapsídeo icosaédrico que envolve seu material genético constituido de uma molécula de DNA semi

dupla-fita com 3.000 a 3.300 pares de base (pb), apresentando-se como característica particular, uma conformação circular e relaxada (rcDNA) (Glebe, Bremer, 2013; Liang, 2009). O envelope do HBV é uma estrutura lipoprotéica composta por três proteínas codificadas pelo genoma viral. Esse envoltório circunda um nucleocapsídeo de 240 subunidades proteicas, com aproximadamente 36 nm de diâmetro que por sua vez isola o DNA viral ligado com uma polimerase (Glebe, Bremer, 2013; Liang, 2009). Além da estrutura completa viral, outras formas de partículas secretadas pelos hepatócitos infectados são encontradas no soro de indivíduos infectados, as quais são constituídas apenas por proteínas do envelope e apresentam formatos esféricos ou filamentosos e, não são infecciosas devido à ausência do genoma viral (Glebe, Bremer, 2013) (Figura 1A).

Vírus de DNA que afetam animais são relativamente maiores em relação ao HBV, forçando assim esse a aperfeiçoar sua organização genômica, através de estratégias como a sobreposição das fases de leitura aberta (do inglês *Open Reading Frames*-ORFs) e a participação de todo o repertório de nucleotídeos na codificação de pelo menos um polipeptídio, sendo que desse modo, as regiões regulatórias também estão inseridas dentro das regiões codificantes (Kay, Zoulim, 2007). Há quatro ORFs no genoma do HBV: pré-S/S, que codifica as proteínas de superfície; Precore/core, as proteínas do nucleocapsídeo e o HBeAg; Pol, a polimerase viral e X, a proteína X (Figura 2) (Glebe, Bremer, 2013; Liang, 2009).

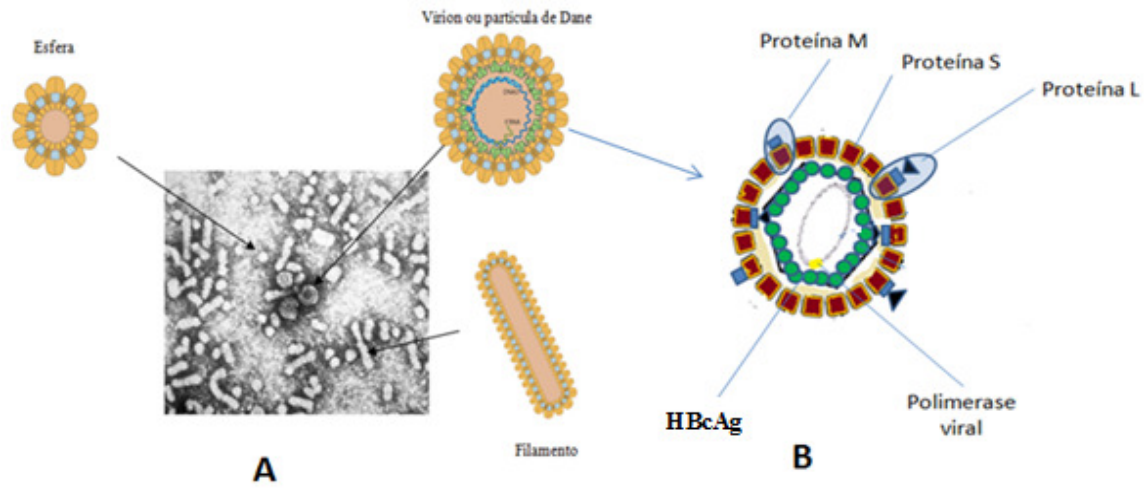


Figura 1-(A) Micrografia eletrônica mostrando as partículas de Dane, partículas esféricas e filamentosas. (B) Esquema representativo do vírion do HBV.
Fonte: Figura 1A-Modificado de *Center for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library* (Micrografia) e *Swiss Institute of Bioinformatics* (Partícula de Dane, esfera e filamento). Figura 1B-Autoria própia.

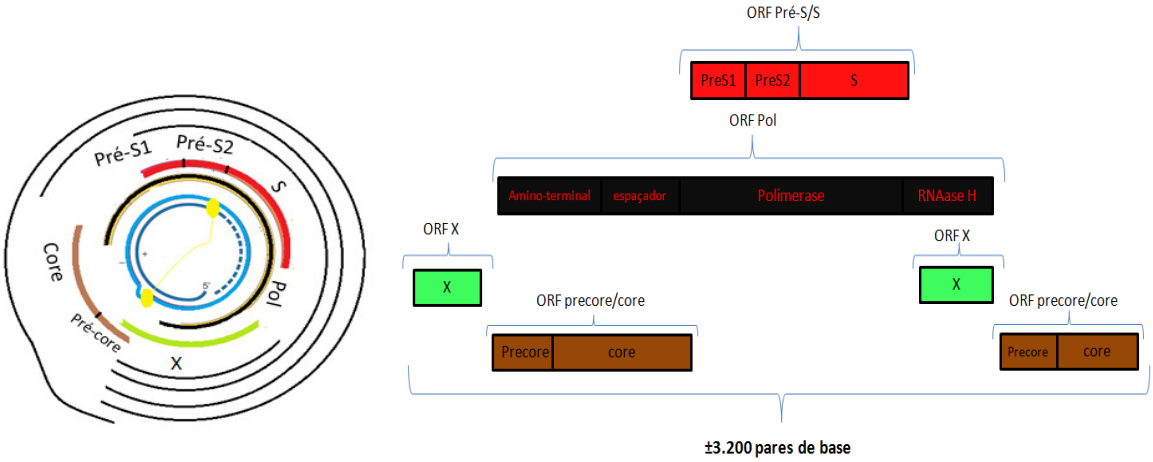


Figura 2-Esquema simplificado circular e horizontal da organização genômica do HBV. As quatro linhas pretas exteriores no esquema circular representam os RNAs mensageiros.
Fonte: Autoria própia

Os polipeptídeos de superfície são codificados por uma única ORF que possui a capacidade de transcrever dois RNAs mensageiros de tamanhos distintos, os quais traduzem proteínas relacionadas embora com funções diferentes (Liang, 2009). O maior RNA que possui 2,4 quilobases (kb) é traduzido em uma proteína denominada L-HBsAg (grande, do inglês *Large*) e o menor de 2,1 kb possui dois códons de início de tradução: para o polipeptídeo M-HBsAg (Médio, do inglês *Medium*) e a S-HBsAg (Pequena, do inglês tanto *Surface* como *Small*) (Figura 1B) (Glebe, Bremer, 2013; Liang, 2009).

Assim como o RNAm para Pré S/S, o RNAm para Precore/core possui múltiplos inícios de tradução em uma única molécula de 3,5 kb, o RNApg (RNA pré-genômico) (Liang, 2009). Esse RNA codifica o HBcAg, que não é secretado no soro dos indivíduos infectados, sendo encontrado apenas no núcleo de seus hepatócidos ou na superfície dos mesmos (Gerlich, 2013; Glebe, Bremer, 2013). Essas proteínas aglomeram-se para formar um capsídeo, que junto com o DNA e polimerase viral, formam o nuclecapsídeo (Gazina et al., 2000) (Figura 1B). Essa mesma ORF codifica também uma proteína não estrutural que é secretada no soro dos pacientes em replicação viral, o HBeAg, não é essencial no ciclo de vida do vírus, mas participa do processo de desenvolvimento de uma infecção persistente (Glebe, Bremer, 2013).

A polimerase viral também é codificada pelo RNApg. Essa proteína possui uma região espaçadora entre três subdomínios funcionais: a região amino-terminal, que possui um papel importante no encapsidamento, assim como na ligação das regiões 5' das extremidades do RNApg para síntese da fita negativa do DNA do HBV; a região com função de transcriptase

reversa; e por fim, a região carboxi-terminal RNAse H, que cliva o RNA apresentado em dupla fita com o DNA (Seeger, Mason, 2000).

A região denominada de X ainda não é totalmente conhecida em relação a sua função no ciclo de vida do HBV, contudo, já se sabe que essa possui função tanto no estabelecimento da infecção como nos processos replicativos e de transcrição (Lucifora et al., 2011).

Há outras regiões, não mostradas na figura 2, responsáveis pelo controle de um eficiente processo de transcrição e especificidade celular de expressão do HBV. Como exemplo temos regiões duplas de repetições diretas (DR – do inglês - *Direct repeat*), responsáveis pela especificidade de ligação da fita de DNA durante a replicação (Liang, 2009; Seeger et al., 1986) e os acentuadores (En – do inglês - *Enhancers*) que conferem a especificidade de expressão do HBV ao fígado (Yee, 1989).

2.1.3 Replicação viral

O HBV possui duas etapas para sua replicação completa: a primeira inclui a ligação do viríon na superfície do hepatócito e sua fusão na membrana celular, onde seu genoma é desempacotado e internalizado através do poro nuclear, e por fim convertido em DNA circular covalentemente fechado (cccDNA- do inglês - *covalently closed circular* DNA) pela enzima polimerase do vírus; a segunda parte é relacionada à transcrição de RNAs mensageiros por enzimas celulares denominadas RNA polimerases II. Dois tipos de RNAs são formados: os subgenômicos, responsáveis pela formação das proteínas de superfície e do HBxAg e os genômicos que são RNAs maiores do que o genoma, servindo como molde para a formação do DNA circular relaxado (rcDNA – do inglês – *relaxed circular* DNA), assim como produção de polipeptídios estruturais e não estruturais (HBeAg, HBcAg e Polimerase viral) (Beck, Nassal, 2007; Glebe, Bremer, 2013).

O entendimento sobre a entrada dessa partícula viral na célula hepática, pode ser a receita mestre para um tratamento inovador que possa cessar a mortalidade relacionada a esse vírus. Pouco se conhece sobre suas estratégias de fixação na superfície dos hepatócitos devido à inexistência, há muito tempo, de culturas celulares que desenvolvessem eficientemente o ciclo replicativo (Yan et al., 2012). Sabe-se a importância que a proteína L do HBsAg (domínio PreS-1) possui na interação de baixa afinidade com receptores celulares da superfície hepática, sendo o proteoglicano de heparan sulfato o primeiro receptor para essa partícula (Schulze et al., 2007). Contudo, recentemente em trabalho feito por Yan et al. (2012)

com células hepáticas de *Tupaia* e humanas, revelou-se que um cotransportador de ácido biliar, o polipeptídio de cotransporte taurocolato de sódio (NTCP) possui uma interação de alta afinidade com a região PreS1 do L-HBsAg. Isso foi demonstrado através do silenciamento do gene que expressa esse transportador, mostrando assim a inibição da infecção pelo HBV, criando desse modo esperanças para uma nova droga que possa ser eficiente antes da entrada desse parasita celular.

Após a entrada do HBV no citoplasma da célula, apenas na forma de nucleocapsídeo sem envelope viral, seu genoma é exposto e internalizado através do poro nuclear ainda como uma fita de DNA semicircular ligado a sua polimerase, onde tanto essa enzima viral como aquelas dos hospedeiros participam de um complexo e elusivo processo de transformação do rcDNA em cccDNA (Köck et al., 2010; Rabe et al., 2009). Esse último DNA viral é estável e pode permanecer nos hepatócitos provocando infecções *de novo* no hospedeiro (Beck, Nassal, 2007). Assim, para que haja a manutenção do *pool* de cccDNA nas células infectadas, há um reaproveitamento das partículas maduras do nucleocapsídeo. Essa estratégia é encontrada em todos os membros da família desse vírus e demonstra um processo eficiente para sua manutenção (Glebe, Bremer, 2013; Wu et al., 1990). Além do mais, diferentemente de muitos retrovírus, a transcrição reversa do HBV deve ser finalizada dentro do citoplasma do hepatócito antes de todos os outros processos de montagem e maturação viral (Glebe, Bremer, 2013).

Ainda no núcleo, o processo de transcrição e maturação do RNAm se assemelha ao processo de RNAm celulares, em que os RNAs transcritos do cccDNA são protegidos em suas extremidades 5' e 3', possuem sinal de exportação nuclear e mecanismos de processamento e estabilização, embora não possuam geralmente o processo de *splicing* gênico (Beck, Nassal, 2007; Glebe, Bremer, 2013; Glebe, König, 2014).

O principal autor, no processo de replicação entre os RNA mensageiros do HBV, é o RNApg pois interage com a polimerase viral no citoplasma. Esse RNAm possui uma organização com elementos *cis* que são essenciais para o processo de replicação. Entre eles temos as regiões DR, e uma estrutura denominada épsilon (ε) que possui forma de grampo de cabelo (*hairpin*), encontrada nas duas extremidade do RNApg (Beck, Nassal, 2007).

Por fim, o RNApg é encapsidado com a polimerase e inicia o processo de transcrição reversa para produção de uma fita completa de DNA (fita negativa) do HBV e por fim a fita incompleta (fita positiva), formando um genoma parcialmente em dupla fita (Liang, 2009). Após a formação do nucleocapsídeo com o rcDNA, há duas vias possíveis: a reimportação

para o núcleo de forma a manter o *pool* de cccDNA ou formação de novos vírions (Glebe, Bremer, 2013; Liang, 2009). Existem também partículas virais não completas (Figura 1A), incapazes de infectar outras células devido à ausência do nucleocapsídeo, que possuem importância na imunogenicidade. Tanto o vírion como essas partículas virais são secretados em uma proporção de um vírion para dez partículas não infecciosas (Glebe, Bremer, 2013).

2.1.4 Diagnóstico e formas de transmissão

O marcador HBsAg é secretado em grande quantidade nos hepatócitos infectados, tanto na partícula completa (partícula de Dane), como em partículas não infecciosas de formato esférico ou de filamento (Figura 1A). Esse antígeno é utilizado para identificar indivíduos infectados e sua presença por mais de seis meses é aceita como evidência de infecção crônica (Gerlich, 2013; Glebe, König, 2014).

Desde os anos 80, é possível através de métodos imunológicos de diagnóstico, estabelecer se o indivíduo está infectado ou imune à infecção pelo HBV. O anti-HBc (anticorpos contra o HBcAg) é o primeiro anticorpo a surgir após o contato com a partícula viral, frequentemente durante a fase aguda ou sem mesmo nenhum sintoma; o HBsAg isolado, ou seja, sem o anti-HBc ou outros marcadores, é o primeiro marcador sorológico que se torna positivo e é um indício que o indivíduo pode ainda desenvolver a doença clínica que se torna crônica quando o HBsAg persiste por mais de seis meses (Gerlich, 2013; Glebe, König, 2014). A resolução da infecção é observada quando encontramos o anti-HBs (anticorpos contra o HBsAg) e o anti-HBc sem o HBsAg, todavia, isso significa apenas que o sistema imune do individuo foi capaz de combater a replicação do vírus, mas que há a possibilidade de reativação em ocasiões em que ocorra um comprometimento do sistema imune (Gerlich, 2013; Nebbia et al., 2012).

Como mencionado, a detecção de antígenos ou anticorpos relacionados ao HBV são utilizados atualmente em triagens laboratoriais e inquéritos sorológicos, através de imunoensaios como o ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se kits comerciais específicos para cada marcador (Bowden, 2006). Contudo, a existência de mutantes de escape diagnóstico, assim como a não eficiente detecção do HBsAg quando em níveis muito baixos, levam a problemas diagnósticos que podem ser corrigidos através de testes que se baseiam no genoma viral (Datta et al., 2014). Vários testes que se fundamentam na detecção de ácidos nucléicos se tornaram nos últimos anos ferramentas adicionais ou

alternativas, sendo que para o HBV, duas vertentes têm sido comumente usadas: ensaios com detecção direta através de sondas e, mais frequentemente, ensaios de detecção indireta *in vitro* através de amplificação de sequências alvos do genoma do vírus, sendo a reação em cadeia de polimerase (PCR) a mais famosa e utilizada entre os ensaios de detecção indireta (Datta et al., 2014).

O HBV é extremamente infeccioso, sendo até 100 vezes mais provável uma infecção após exposição a sangue ou fluidos corporais (sêmen e secreção vaginal) de indivíduo em replicação viral, em relação à contaminação por HIV a partir de um indivíduo soropositivo para este último vírus (Centers for Disease Control and Prevention, 2008). O HBV pode permanecer durante sete dias em ambiente externo e ainda ser viável e infeccioso (Bond et al., 1981; Shepard et al., 2006). As maiores concentrações do HBV são encontradas no sangue. Além de quaisquer indivíduos com hepatite B crônica, indivíduos apenas com HBsAg e/ou anti-HBc positivo são potencialmente infecciosos e capazes de transmitir o vírus (Shepard et al., 2006; Seo et al., 2015).

Existem inúmeras formas de transmissão do HBV, sendo as principais vias de transmissão a sexual, percutânea (utilização de drogas injetáveis contaminadas, procedimento de manicure/pedicure, acupuntura ou tatuagem sem utilização de materiais esterilizados), perinatal (da mãe para o filho), horizontal (utensílios domésticos contaminados), transfusão com sangue contaminado, transplante de órgão e nosocomial (acidente ocupacional em ambiente hospitalar) (Wasmuth, 2010a). O conhecimento sobre a via e o momento de contaminação é uma importante ferramenta para o resultado clínico, já que há uma alta probabilidade de desenvolvimento de uma infecção crônica nos indivíduos que se infectaram ao nascimento através da mãe ou ainda nos primeiros anos de vida (Chen et al., 2000).

2.1.5 Epidemiologia

A hepatite B é uma doença infectocontagiosa de abrangência mundial. Estima-se que o surpreendente número de dois bilhões de pessoas já tiveram contato com seu agente etiológico, afetando de 240 a 400 milhões de indivíduos com sua forma crônica e levando à morte de 500 mil a 1,2 milhão de indivíduos todos os anos, sendo considerada a décima causa principal de mortes no mundo (Goldstein et al., 2005; Goyal, Murray, 2014; Ott et al., 2012; WHO, 2014a). Mesmo com esses números preocupantes, até 30 milhões de pessoas são infectadas globalmente anualmente por esse vírus, principalmente em países em

desenvolvimento com altas taxas de endemicidade que não são capazes de implementar uma vacinação em massa, devido ao custo da vacina, ou a problemas na gestão e incorporação de medidas de saúde pública gerados por situações políticas e/ou econômicas, que dificultam o acesso da população à vacinação (Datta et al., 2014).

Baseado na presença do marcador sorológico de infeccção, o HBsAg, foi padronizado que regiões do mundo com menos de dois por cento de prelavência desse marcador seriam considerados como de baixa endemicidade; entre dois e oito por cento como endemicidade intermediária (baixa ou alta); e elevada, aquelas regiões com prevalência acima de oito por cento (WHO, 2015) (Figura 3).

No mundo, as prevalências do HBV variam consideravelmente, sendo que de acordo com revisão feita por Merrill e Hunter (2011), há praticamente quase a mesma proporção de estudos realizados em diferentes regiões do mundo que atestam baixa, intermediária e alta prevalência do HBsAg: 30%, 36% e 34% respectivamente. O mesmo estudo mostra que as regiões com altas prevalências são a África, Pacífico ocidental, Mediterrâneo oriental e, partes da Europa oriental. Já aquelas regiões com baixa endemicidade englobam as Américas, Europa ocidental e algumas regiões desenvolvidas do Pacífico ocidental. Contudo, a Organização Mundial da Saúde, mais recentemente, considera que quase metade da população mundial esteja em região de alta prevalência (WHO, 2015).

Nas Américas, o Brasil também é considerado como um país de baixa prevalência de acordo com estudo realizado em capitais das cinco macrorregiões do Brasil e no Distrito Federal, onde aproximadamente 0,37% de indivíduos apresentaram o marcador HBsAg, tendo o Nordeste uma prevalência bem próxima àquela das regiões como um todo (0,42%) (Universidade de Pernambuco, 2010). Embora esse último estudo tenha mostrado uma prevalência baixa do HBsAg no Brasil, há registros, principalmente na região Norte, de casos de elevada endemicidade, chegando a quase 10% na Amazônia e aproximadamente 9% em uma comunidade de afrodescendentes (Braga et al., 2001; Motta-Castro et al., 2003). Em uma recente revisão, se identificaram regiões isoladas com maior prevalência, especialmente na Amazônia, bem como grupos específicos, como moradores de rua nas grandes cidades e comunidades afrodescendentes isoladas no centro do país (Souto, 2015).

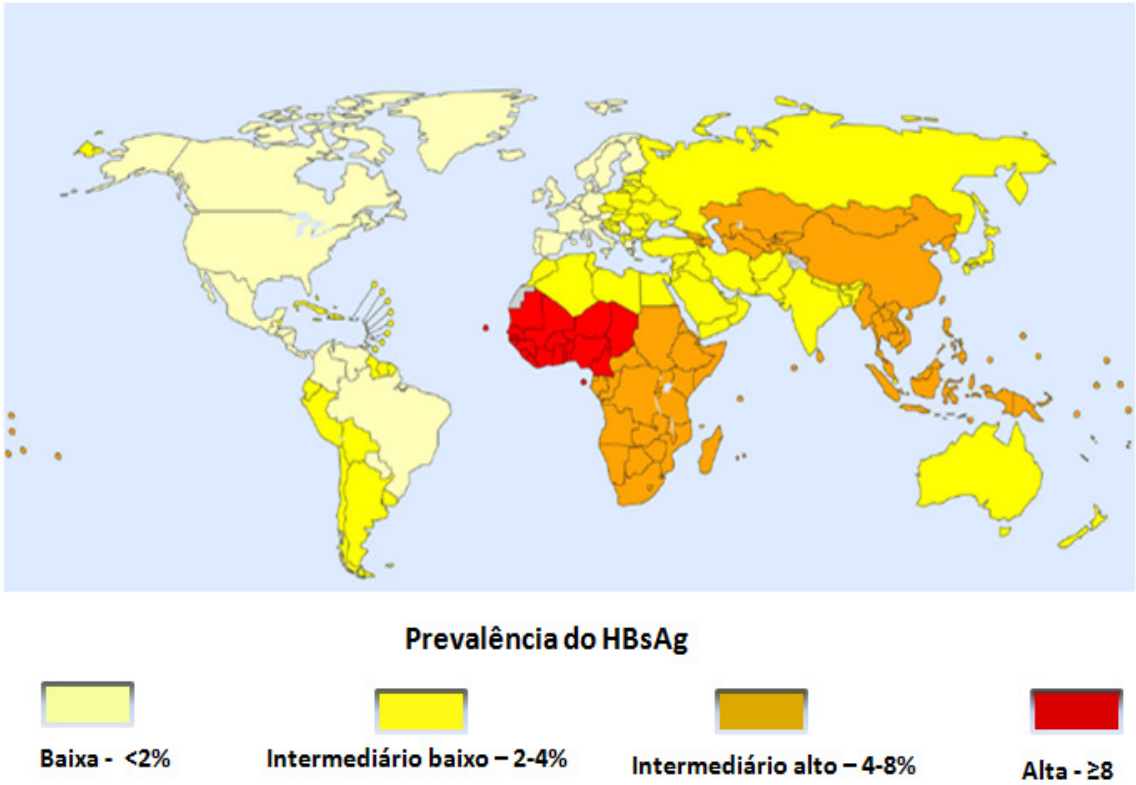


Figura 3 - Prevalência da infecção pela Hepatite B em indivíduos de 19 a 49 anos no ano de 2005.
Fonte: Modificado de Ott et al., 2012.

A principal limitação do inquérito realizado no Brasil é a sua abrangência apenas nas capitais, excluindo outros municípios, principalmente aqueles rurais mais distantes das capitais onde a educação, prestação serviços de saúde, higiene e condições de moradia são relativamente ruins (Souto, 2015). De acordo com o Ministério da Saúde, entre 2000 e 2011 o Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) registrou 9.659 mortes relacionadas ao HBV (Brasil, 2012) e cerca de 600 mil pessoas como portadores crônicos no Brasil, com apenas 2% em tratamento, e desse modo, fonte de transmissão do vírus, principalmente para aqueles que vivem em regiões de pouco acesso à saúde e que possuem uma baixa cobertura vacinal (Brasil, 2011).

A importância do conhecimento da prevalência do HBsAg, em certa áreas geográficas, auxilia tanto no conhecimento sobre o meio de transmissão mais eficiente, como no direcionamento de implementação de políticas públicas de conscientização e imunização (Ott et al., 2012; Shepard et al., 2006). Por exemplo, em regiões com endemicidade baixa,

possivelmente o meio de transmissão mais comum é o horizontal em adultos jovens, através de sexo desprotegido ou pela utilização de drogas injetáveis, enquanto a perinatal é a mais encontrada em regiões de prevalências intermediárias a altas (Shepard et al., 2006; WHO, 2014a).

Em relação à probabilidade de infecção, as crianças são as mais afetadas pelo HBV, pois essas ainda possuem uma resposta imunológica antiviral fraca, e, consequentemente, maior probabilidade de se tornarem portadoras crônicas da doença e transmissores eficientes desse vírus (Merril, Hunter, 2011). Das crianças infectadas no primeiro ano de vida ou no parto, até 90% tornam-se portadoras crônicas e essa percentagem diminui com o passar da idade, sendo 30-50% quando em idade de um a cinco anos. Na fase adulta, no mínimo 90% de indivíduos infectados irão se recuperar no primeiro ano de infecção (Te, Jensen, 2010; WHO, 2014a).

2.1.6 Diversidade genética e epidemiologia molecular

A despeito de ser um vírus com regiões codificantes importantes em sobreposição, o HBV possui uma grande diversidade molecular devido à sua polimerase com atividade de transcriptase reversa e propensa a erro, ou seja, sem a capacidade revisora (*proof-reading)* (Locarnini, Zoulim, 2010). Desse modo, ocorreu um grande processo de variabilidade durante milhares de anos de evolução dentro de seus hospedeiros, mesmo com essas limitações (Kay, Zoulim, 2007; Mizokami et al., 1997). Recentemente em trabalho realizado por Torres et al. (2013) foi demonstrado que regiões de sobreposição possuem várias diferenças a nível genômico em relação às regiões onde não há sobreposição. Os autores propuseram que existam alguns mecanismos que auxiliem na tolerância de mudança nucleotídica no genoma desse vírus como: utilização de aminoácidos que sejam altamente degenerados, ou seja, que sejam codificados por vários códons; uma tendência à utilização de códons específicos (mais flexíveis) para certa ORF, e por fim a escolha de códons que possuam a maior probabilidade de em caso de substituições não sinônimas, codificar aminoácidos com as mesmas propriedades físico-químicas.

Como o HBV apresenta regiões com genes expressos em diferentes fases de leitura, isso explica a existência de regiões com diferentes taxas de mutações, que são de difícil avaliação, dado que não existem amostras virais documentadas que sejam coletadas com um grande intervalo de tempo a partir de um mesmo indivíduo infectado. Isso implica em

dificuldades na avaliação de estudos de taxas evolucionárias do HBV, que acabam tendo que ser determinadas por eventos históricos conhecidos em paralelo aos estudos da diversidade genética encontrada (Bouckaert et al., 2013).

Observando-se a grande variabilidade encontrada em cepas do HBV ao redor do mundo, a necessidade de classificação após a descoberta do HBsAg, era questão de tempo. Assim, a primeira forma de separação dessas cepas foi implementada quando pesquisadores observaram que anticorpos específicos contra o HBsAg (anti-HBs) não reagiam da mesma forma contra antígenos HBsAg de portadores distintos. Nasce então a serotipagem como uma das primeiras formas de classificação do HBV (Bouvier, Williams, 1975).

Com a maior facilidade de uso da biologia molecular, a classificação serotípica começou a se basear em relação a aminoácidos em certas posições dentro da região do determinante "a" do HBV, localizado entre os resíduos 124 e 147, classificando atualmente o HBsAg em nove subtipos: ayw (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4) adw (adw2, adw4), adr (adrq+ e adrq-) e ayr (Norder et al.,2004). Através de estudos moleculares foi possível constatar que as variações d/y e w/r dependiam apenas de substituções pontuais de Lisina/Arginina nas posições 122 e 160, respectivamente, ou seja, os epitopos d e w têm uma lisina nas duas posições, e o y e r apresentam arginina. A classificação dos subdeterminantes denominados por numerais arábicos (w1 a w4) e a letra q com sinal positivo ou negativo (q-, q+) se baseam também na posição de aminoácidos. Uma prolina na posição 127 está relacionada à expressão de w1/w2, treonina com w3 e leucina/ isoleucina w4. Cinco posições são importantes na diferenciação entre ayw1 e ayw2: posição 134 (fenilalanina por tirosina); 143 (treonina por serina), 159 (alanina por glicina), 161 (tirosina por fenilalanina) e 168 (valina por alanina). Já em relação aos subtipos q- e q+, as posições 158, 159, 177 e 178 possuem regiões adjacentes onde se encontra substituição de aminoácidos apenas nos subtipos q- (Norder et al., 1992).

Com o advento do sequenciamento, a primeira sequência completa do HBV foi publicada (Galibert et al., 1979), e desde então, vários grupos de pesquisa ao redor do mundo publicam sequências completas ou de regiões importantes desse vírus. Isso vem possibilitando a comparação eficiente dessas sequências através de análises filogenéticas robustas que permitem a classificação desse vírus (Kramvis et al., 2008; Norder et al., 2004).

A separação em genótipos deve seguir um padrão de divergência nucleotídica de 7,5% ou mais no genoma completo, entre outros critérios estabelecidos como, por exemplo, não haver indício de recombinação com outros genótipos e ser preferencialmente evidenciados por suas características clínico-epidemiológicas (Kramvis et al., 2008, Kurbanov et al., 2010).

Atualmente, dez genótipos já foram descritos, sendo nomeados em ordem alfabética e pela ordem de descoberta (A-J) (Arauz-Ruiz et al., 2002; Huy et al., 2008; Naumann et al., 1993; Norder et al., 1994; Okamoto et al., 1988; Stuyver et al., 2000; Tatematsu et al., 2009). Contudo, os dois últimos genótipos I e J descritos ainda são questões de especulação por não possuírem todos os critérios para sua classificação (Kurbanov et al., 2010).

Além dos genótipos, divergência superior a 4% e inferior a 7,5% classificam esses em subgenótipos (Kramvis et al., 2008). A nomeação se dá através de numerais arábicos (seguidos eventualmente de letras minúsculas no caso dos subgenótipos do genótipo F), sendo que esses subgenótipos foram até então encontrados apenas entre os genótipos A, B, C, D e F (Kramvis et al., 2008; Norder et al., 2004). Esses genótipos, assim como os subgenótipos, parecem ter distribuições geográficas particulares, sendo relacionados com algumas etnias, e por esse motivo tem se discutido sobre a relação entre seus tipos e estudos antropológicos, em especial ao que se refere às migrações populacionais (Kramvis et al., 2008; Kurbanov et al., 2010; Okamoto et al., 1988; Orito et al., 2001) (Figura 4).

Vários grupos científicos ao redor do mundo possuem facilidade na obtenção de sequências de microrganismos em bancos de dados na internet, para construção filogenética e/ou designação de tipos genômicos. Contudo, em relação ao HBV, os critérios de designação de subgenótipos entre especialistas nem sempre convergem, o que culminou em diversas classificações errôneas na literatura científica que seriam evitadas caso seguissem critérios mundiais pré-estabelecidos e houvesse um controle por um órgão designado para tal trabalho (e. g. ICTV) (Schaefer et al., 2009). Essas incongruências já foram discutidas para vários subgenótipos (Shi et al., 2013), por exemplo, os subgenótipos do genótipo A, com exceção do A1 e A2, têm sido alvo de incertezas por pesquisadores que levando em conta os critérios para classificação, propõem o reagrupamento dos subgenótipos A3, A4, A5 e A7 em "quase-subgenótipo" A3 e o A6 sendo reclassificado como A4 (Pourkarim et al., 2010; 2011).

O genótipo A é dividido de A1 a A7; sendo o A1 encontrado principalmente nos continentes africano, asiático (Índia e Bangladesh), e no continente americano (Brasil, Haiti e Martinica) (Andernach et al., 2009b; Barros et al., 2014; Brichler et al., 2013; Hübschen et al., 2009; Kramvis et al., 2008; Norder et al., 2004); o A2 no norte da Europa e na América do Norte (Kramvis et al., 2008; Norder et al., 2004). Os subgenótipos A3, A4, A5 e A7 já foram encontrados em diversas regiões da África, enquanto o A6 já foi isolado em pacientes de origem africana na Bélgica (Hübschen et al., 2011; Kurbanov et al., 2005; Olinger et al., 2006; Pourkarim et al., 2010; Shi et al., 2013).

O genótipo B é dividido em B1 a B9; sendo o B1 frequentemente encontrado no Japão; B2-5, no leste da Ásia; B6, em populações indígenas do Ártico e B7-9 na Indonésia (Dunford et al., 2012; Norder et al., 2004; Nurainy et al., 2008; Mulyanto et al., 2009; Sakamoto et al., 2006, 2007; Shen et al., 2009; Shi et al., 2013).

O genótipo C possui uma similaridade de distribuição com o genótipo B, e está dividido em 16 subgenótipos, sendo o maior em diversidade intragenotípica; o subgenótipo C1 é encontrado no sudeste da Ásia e sul da China; C2, no nordeste da Ásia; C3, na Oceania e Indonésia; C4, na Austrália; C5, nas Filipinas; C6, na Indonésia e Filipinas; C7, Filipinas e C8-16, na Indonésia (Huy et al., 2004; Mulyanto et al., 2010, 2011, 2012; Norder et al., 2004; Sakamoto et al., 2006; Shi et al., 2013).

O genótipo D, o mais distribuído pelo mundo, é dividido em oito subgenótipos e são amplamente distribuídos no Oriente Médio, Europa oriental, Rússia, norte da Ásia e região do Mediterrâneo. Também são encontrados em outros países com população de origem europeia, como o Brasil e os Estados Unidos, assim como em populações indígenas do Ártico. Mais precisamente, o subgenótipo D1 é encontrado na Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Índia e China; D2, no Japão e norte da Europa; D3, na Índia, África do Sul e sul da Europa; D4, na Oceania, Haiti e Brasil; D5, na Índia e Japão; D6, na Indonésia; D7, na Tunísia e D8 na Nigéria (Abdou Chekaraou et al., 2010; Andernach et al., 2009b; Banerjee et al., 2006; Barros et al., 2014; Meldal et al., 2009; Norder et al., 2004; Shi et al., 2013; Yousif, Kramvis, 2013).

O genótipo E não possui subgenótipos descritos até então, devido provavelmente ser um genótipo de disseminação recente encontrado mais frequentemente na África Ocidental e Central (Kramvis, Kew, 2007). A principal causa de disseminação desse genótipo parece ser devido a eventos de vacinação em massa com seringas não descartáveis, utilização de materiais perfurocortantes em rituais e contato próximo com indivíduos infectados, incluindo o sexual (Andernach et al., 2009a).

O genótipo F é mais restrito em populações ameríndias na América do Sul, embora casos tenham sido descritos na Europa (Mello et al., 2007; Norder et al., 2004). Esse genótipo é dividido em quatro subgenótipos; F1, sendo dividido em dois clados diferentes: F1a encontrado na América Central e F1b na América do Sul. Do mesmo modo o F2 é dividido em dois clados encontrados principalmente na região setentrional da América do Sul. O subgenótipo F3 também é encontrado nessa última região, principalmente na Venezuela e

Colômbia e o F4 é encontrado na região central e sul desse mesmo continente (Devesa et al., 2008; Kato et al., 2005; Torres et al., 2011).

Os genótipos G e H ainda não são bem descritos, tendo o G sido encontrado na Europa (Alemanha e França) e nas Américas (Canadá, Estados Unidos, México, Colômbia) (Lindh, 2005; Locarnini et al., 2013; Norder et al., 2004) enquanto o genótipo H foi encontrado na América Central, principalmente no México onde é bastante frequente (Arauz-Ruiz et al., 2002; Panduro et al., 2013).

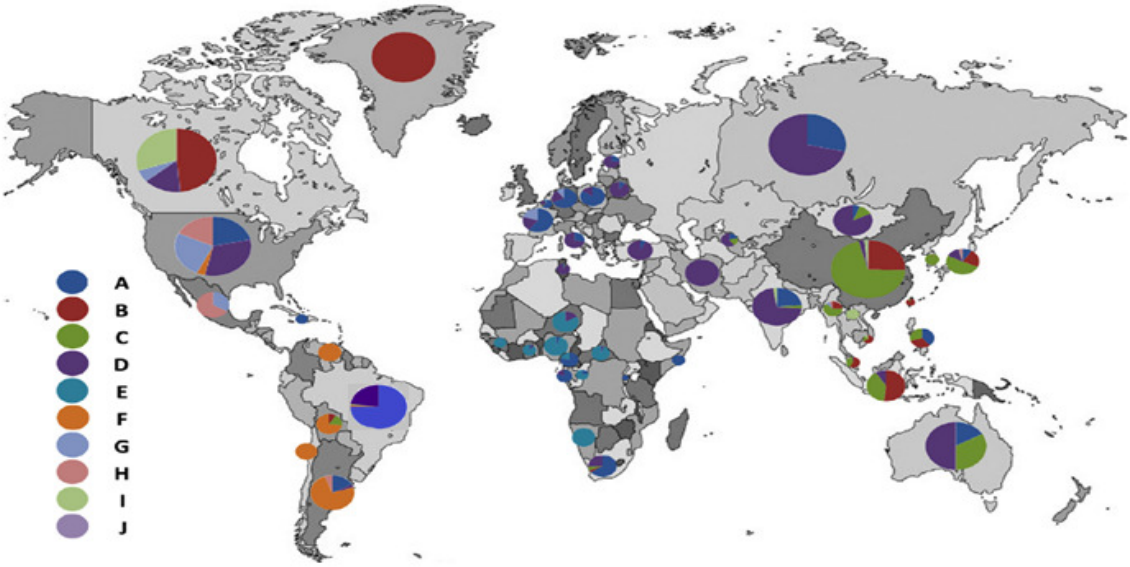


Figura 4 - Distribuição geográfica dos genótipos do HBV.
Fonte: Adaptado de Shi et al. 2013

Estudos realizados em algumas regiões do Brasil mostram que o genótipo mais frequente é o A, seguido por D e F. Esse primeiro foi encontrado em 67,1% dos mais de 700 indivídos provindo de diversos estados do Brasil (Gomes- Gouvea et al., 2015). Além disso, trabalhos em todas as regiões já demostraram que o genótipo A é o mais frequente (Crispim et al., 2014; Mello et al., 2007).

O genótipo D é o mais frequente no sul do país (Becker et al., 2010; Bertolini et al., 2012; Carrilho et al., 2004; Gomes-Gouvea et al., 2009; Gusatti et al., 2015; Mello et al., 2007; Santos et al., 2010). O genótipo F é encontrado em quase todas as regiões brasileiras, sendo considerado um genótipo nativo dos indígenas americanos, embora tenha sido descrito em maior frequência em Pernambuco (Mello et al., 2007). Contudo, estudos realizados na região norte mostram a preponderância desse genótipo nessa região em relação às demais no Brasil (Castilho et al., 2012; Santos et al, 2010; Viana et al., 2005).

Os outros genótipos já foram descritos no Brasil em menor frequência, com exceção dos I e J, sendo os genótipos B e C descritos em indivíduos com descendência oriental (Clemente et al., 2009; Sitnik et al., 2004); o E, em imigrantes africanos (Sitnik et al.,2007); o G, em alguns indivíduos do sudeste do Brasil e no Acre (Bottecchia et al., 2008; Lobato et al., 2006; Silva et al., 2010) e o genótipo H em um caso no Paraná (Bertolini et al., 2012).

Ainda são escassos os estudos da distribuição dos subgenótipos no Brasil. Contudo, o A1 parece ser o mais frequente nos casos de genótipo A; D3, nos casos de genótipo D e F2a entre os genótipos F (Barros et al., 2014; Bertolini et al., 2012; Gomes-Gouvêa et al., 2009; Mello et al., 2007; Santos et al., 2010).

No Maranhão, em estudo realizado em pacientes atendidos em um centro de referência no tratamento hepático do Hospital da Universidade Federal do Maranhão, foi encontrada uma grande quantidade de indivíduos com o genótipo A1 e D4, sendo este último raramente encontrado no Brasil (Barros et al., 2014; Gomes-Gouvêa et al., 2009; Santos et al., 2010). Outro trabalho publicado recentemente em que sua casuística foi representada por sete estados, mostrou o mesmo padrão de distribuição de subgenótipos do Brasil, embora tenham sido encontrados outros nove subgenótipos (Gomes-Gouvêa et al., 2015).

2.2 Hepatite Delta

2.2.1 Histórico

Não bastando todo o mistério e especulações existentes na atualidade, sobre esses microscópicos organismos dependentes do sistema celular do hospeiro, mais peças são colocadas nesse quebra cabeça com a descorbeta de um vírus único que não necessita somente do hospedeiro, mas de outro vírus. O HBV acabara de ser descoberto e o interesse em investigar os agentes etiológicos de outras hepatites virais começou a ser levado em consideração mais frequentemente, através de indícios de diferenças clínicas relacionadas a essa doença (Thomas et al., 2015). Assim, o HDV foi primeiramente descrito por acaso em 1977 em pacientes portadores crônicos do HBV, principalmente aqueles com hepatite pesistente e doença hepática ativa, através de análises de rotina histológica e do sangue desses pacientes (Rizzetto et al., 1977). A técnica de imunomarcação era um procedimento diagnóstico de rotina nos anos 70 (Thomas et al., 2015) e foi assim que o grupo do Dr Rizzetto observou que aqueles indivíduos positivos para HBcAg possuíam um coloração no

antígeno HBsAg sem envidência do capsídeo (Rizzetto et al., 1977). Três anos mais tarde, experimentos em grupos de chimpanzés com/sem hepatite B crônica esclareceram a hipótese da descoberta de um novo vírus associado ao HBV (Rizzetto et al., 1980; Smedile, Rizzetto, 2011). Assim, com o passar dos anos, mais pesquisadores se interessaram em estudar essa nova partícula viral, até que em 1986 seu genoma foi sequenciado (Wang et al., 1986).

2.2.2 Características biológicas e moleculares do vírion

Atualmente esse vírus é designado por muitos adjetivos, tais como satélite, quimera, híbrido, subviral, defectivo etc., devido à incapacidade *per se* de infectar as células do hospedeiro, sendo necessária a assistência de seu *helper* vírus, o HBV. Desse modo, essa partícula viral infecta somente indivíduos com HBsAg, pois necessita dessas proteínas para a montagem do vírion capaz de entrar nos hepatócitos (He et al., 2015; Pascarella, Negro, 2010; Rizzetto, 2016). Assim, o HDV ocorre como coinfecção aguda conjuntamente com o HBV ou como superinfecção quando infecta pacientes com hepatite B crônica (Pascarella, Negro, 2010). Essa necessidade compulsória de associação de dois agentes infecciosos é pouco vista na natureza em humanos, sendo encontrado outro exemplo parecido em AAV (vírus associado ao adenovírus, do inglês-*adeno-associated virus*) que apenas replicam em células infectadas com adenovírus ou herpesvírus (Daya, Berns, 2008).

A Hepatite Delta é causada por um pequeno vírion de não menos que aproximadamente 30 nm de diâmetro, sendo assim um dos menores organismos virais conhecidos que infectam células humanas (Alves et al., 2013; He et al., 1989). Esse vírion foi classificado em um gênero único denominado *Deltavirus* e é relacionado aos viróides (patógenos de plantas), devido à formação de estruturas em fita dupla de RNA parecidas com bastões, assim como seu pequeno tamanho e modo de replicação. Contudo, diferentemente de um viróide, o HDV possui um genoma maior, com capacidade de codificar seu próprio antígeno Delta (HDAg), o que não é encontrado nos viróides (Flores et al., 2012; Taylor et al., 2014).

As peculiaridades do HDV, pequeno genoma circular de fita simples de RNA (aproximadamente 1.700 nucleotídeos) de conformação negativa, o fizeram ser considerado como único entre os vírus que infectam animais (Taylor et al., 2014). Seu genoma possui uma ORF capaz de codificar um único polipeptídio chamado HDAg. Esse antígeno possui duas diferentes formas: uma conhecida como pequena ou S (do inglês - *short*), de 24 Kda com 195

aminoácidos e uma grande ou L (do inglês- *large*) de 27 kda com 214 aminoácidos (Rizzetto, 2016) (Figura 5). Essa última é traduzida através de uma edição no RNA mensangeiro por uma enzima chamada de ADAR1 (do inglês, *Adenosine Deaminase*) que modifica (i.e., deamina) uma adenina na posição amber (término de tradução) por uma inosina, que consequentemente, leva ao prosseguimento da cadeia peptídica até a formação de uma proteína L, que é essencial para a parada da replicação viral e início do processo de montagem viral (Casey, 2006) (Figura 6). Desse modo, a proteína S-HDAg tem sido apontada como necessária para iniciação da replicação viral (Yamaguchi et al., 2001), enquanto a grande (L-HDAg) serve como a principal inibidora da replicação e é essencial para o processo de empacotamento dos novos vírions (Lee et al., 1995).

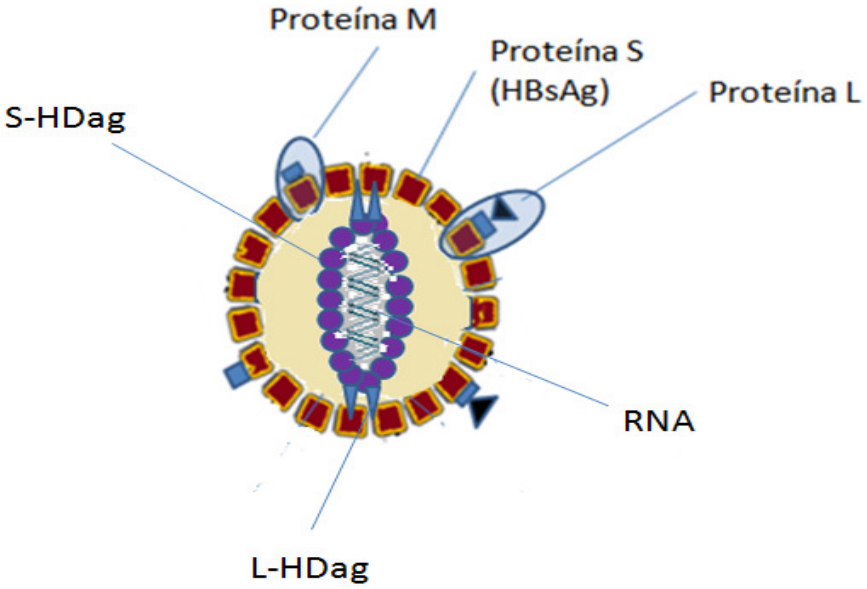


Figura 5 - Figura representativa do vírion do HDV com as proteínas de envelope do HBV.
Fonte: Autoria própia.

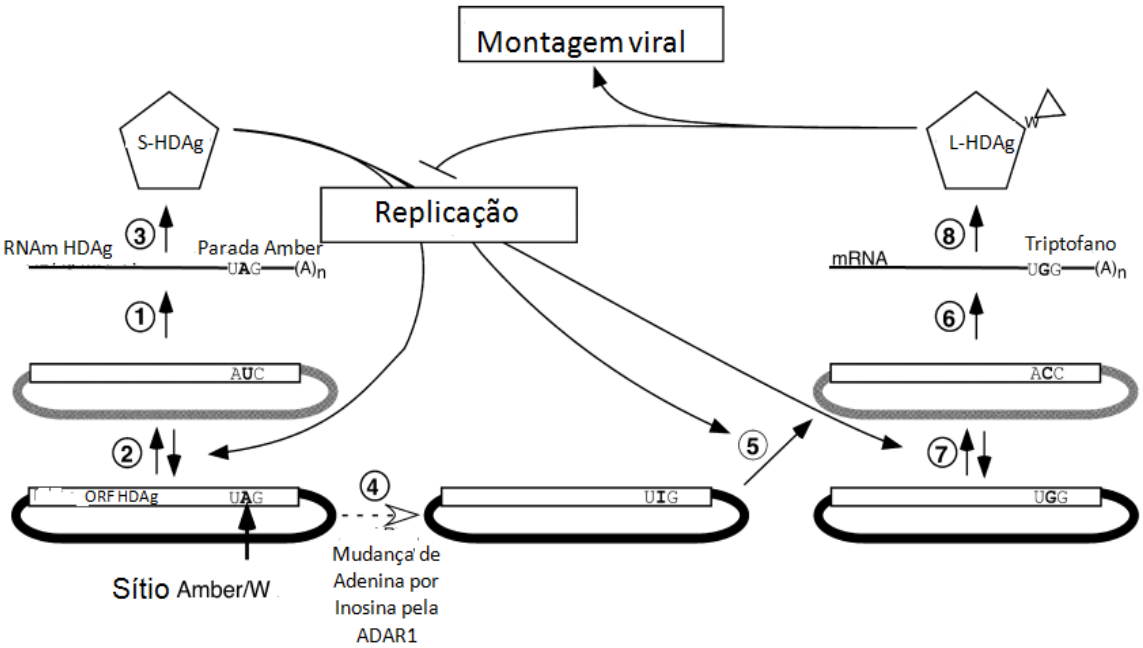


Figura 6-Processo de edição no RNAm do HDV. A linhas grossas e pretas representam os RNAs antigenômicos e as cinzas os genômicos. 1, síntese do RNA mensageiro codificante da proteína S-HDAg; 2, replicação do RNA genômico e antigenômico; 3 tradução da proteína S-HDAg; 4, edição do RNA; 5, RNA antigenômico modificado; 6, síntese do RNAm modificado; 7, replicação do RNA genômico e antigenômico; 8, tradução da proteína L-HDAg.
Fonte: Adaptado de Casey, 2006.

2.2.3 Replicação viral

Os detalhes sobre a replicação desse vírus ainda são pouco definidos, contudo, após a entrada do vírus no hepatócito por processo provavelmente idêntico ao HBV (Abbas et al., 2013), o RNA é direcionado ao núcleo das células hepáticas, onde as RNA polimerases do hospedeiro participam do processo replicativo (Huang et al., 2008), embora de forma ainda não esclarecida (Alves et al., 2013). Estudos mostram que existem três RNAs que se acumulam nas células infectadas e que parecem ter surgido pelo processo de transcrição denominado “círculo rolante” (Branch, Robertson, 1984; Taylor, 1992). O genoma de RNA circular é usado como molde para obtenção de precursores de RNAs mensageiros e de RNAs multiméricos de polaridade oposta. Esses últimos possuem pelo menos duas cópias de ribozimas de HDV que têm a capacidade de autoclivagem para produção de antigenomas de HDV RNA, sendo o processo de religação provavelmente comandado por RNA ligases do hospedeiro (Reid, Lazinski, 2000). Após essa ligação, o novo RNA antigenômico serve como molde para RNAs multiméricos de polaridade genômica (Alves et al., 2013) (Figura 7) .

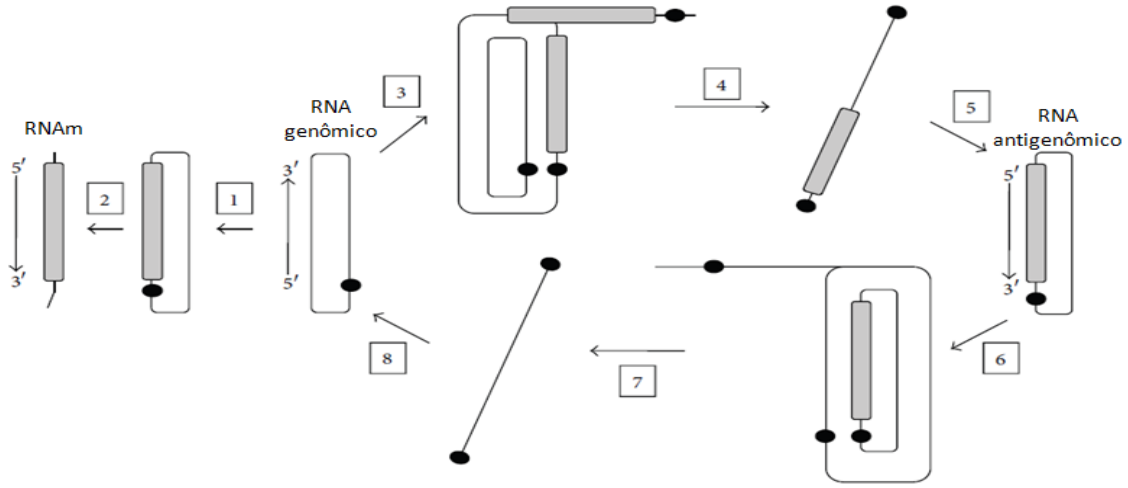


Figura 7 - Modelo replicativo do HDV. 1, 2 e 3, RNA genômico do HDV é utilizado como molde para os RNAm e para RNAs multiméricos de conformidade antigenômica; 4, Esses últimos contêm duas cópias de ribozimas que autoclivam o RNA, produzindo o RNA linear; 5, esses RNAs são ligados para a produção de RNA circulares antigenômicos; 6, esses servem como molde para produção de RNAs multiméricos de conformidade genômica; 7 e 8, esses são autoclivados e ligados para produzir novos RNAs genômicos circulares.
Fonte: Adaptado de Alves et al., 2013

2.2.4 Diagnóstico e formas de transmissão

Em 1984, após a descoberta do vírus delta, ensaios sorológicos comerciais que tinham como alvo o anticorpo contra o HDV (anti-HD) se tornaram disponíveis, e assim, os primeiros estudos epidemiológicos surgiram (Rizzetto, Alavian, 2013). Um indivíduo que foi exposto a infecção apresenta anticorpos anti-HD IgG em seu sangue, persistindo esse anticorpo por toda vida do infectado (Hughes et al., 2011). Contudo, isso significa apenas que o indivíduo teve contato com a proteína viral HDAg e deste modo, a infecção só pode ser diagnosticada através de testes moleculares para investigação do RNA viral (Ahn, Gish, 2014).

O genoma do HDV é investigado através de métodos moleculares, que avaliam a presença de RNA do HDV através da reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa (do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) (Denniston et al., 1986). Recentemente, alguns estudos têm mostrado técnicas chamadas *one-step* através da qRT-PCR que podem identificar e quantificar o RNA do HDV de forma mais rápida e eficiente (Karataylı et al., 2014; Scholtes et al., 2012).

Em razão de o HDV precisar de seu “ajudante” HBV, os modos de transmissão parecem ser os mesmos desse último (Alves et al., 2013).

2.2.5 Epidemiologia

Através dos primeiros estudos epidemiológicos no final dos anos 80, surgiu a hipótese de que no mínimo 5% dos indivíduos HBsAg positivos estavam também infectados pelo HDV (Rizzetto, Ciancio, 2012). Esse número é apenas uma estimativa, já que existem lugares com alta prevalência do HBV, que não foram investigados sobre a ocorrência do HDV, assim podendo ser esse número muito maior (Alves et al., 2013).

A coinfecção HBV-HDV é geralmente associada a uma difícil resposta ao tratamento e maior lesão hepática (Rizzetto, 2016). Desse modo, como já comentado, as medidas de controle do HBV são as chaves para a interrupção da cadeia de transmissão do HDV. Entre essas medidas temos a vacinação para o HBV, políticas públicas de prevenção tanto para a população em geral como àqueles mais susceptíveis à infecção (como usuários de drogas endovenosas) e medidas de controle de higiene (Rizzetto, Alivian, 2013).

Com o advento da vacinação para o HBV nos anos 90, e a diminuição da infecção pelo HBV, a sensação que o HDV poderia ter sido extinto da lista de doenças transmissíveis ficou cada vez mais evidente, pelo menos nos países mais ricos (Rizzetto, Ciancio, 2012). Contudo, essa percepção fez com que essa infecção se tornasse negligenciada em muitos países e consequentemente a investigação para esse vírus foi diminuída, e desse modo, prováveis prevalências errôneas dessa infecção foram obtidas (Rizzetto, Alavain, 2013).

O HDV é endêmico em países do Mediterrâneo, do Oriente Médio, África Central e partes do norte da América do Sul, sendo encontrado na região Amazônica, inclusive brasileira (Paraná et al., 2006; Radjef et al., 2004). Na Turquia, a prevalência da infecção pelo HDV, em indivíduos HBsAg positivos, varia de acordo com a região, sendo 5% no oeste e ao redor de 30% no sudeste (Degertekin et al., 2008) (Figura 8).

Na Europa ocidental, essa infecção parece estar reaparecendo devido à imigração de indivíduos de localidades endêmicas, contudo, a vacinação contra o HBV dessa população é uma segurança de que não haverá uma reemergência dessa infecção nessa localidade, ficando a infecção restrita aos indivíduos imigrantes (Rizzetto, 2016).

A hepatite fulminante, causada pela infecção pelo HDV, tem sido associada com os altos surtos de mortalidade em algumas regiões da América do Sul (Gomes-Gouvêa et al.,

2009; Manock et al., 2000). No Brasil, a hepatite Delta concentra-se na Amazônica ocidental, e apresenta juntamente com o HBV um importante problema de saúde pública (Crispim et al., 2014). Nessa região, a prevalência de infecção pelo HDV entre indivíduos HBsAg positivos já chegaram aos surpreendentes 34% (Fonseca et al., 1988).

No Maranhão, encontraram-se os primeiros casos publicados sobre hepatite Delta, fora da área conhecida como de elevada endemicidade para essa infecção no Brasil, com cinco indivíduos anti-HD positivos entre 133 indivíduos com hepatite B crônica (Barros et al., 2011). Isso mostra que ainda muito deve ser investigado sobre a presença desse vírus fora da região Amazônica.

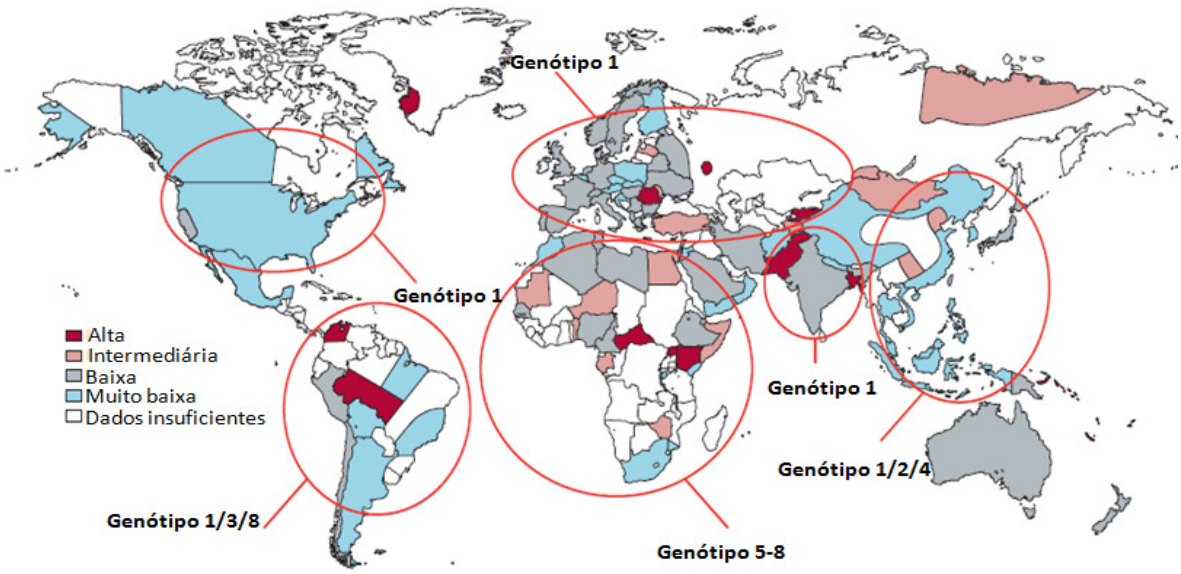


Figura 8 - Prevalência mundial do HDV e seus genótipos.
Fonte: Modificado de Hughes et al., 2011

2.2.6 Diversidade genética e epidemiologia molecular

Como mencionado, o HDV possui um genoma pequeno, com aproximadamente metade do tamanho de seu ajudante HBV (Taylor et al., 2014). Além do mais, sua conformação é circular em forma de haste não ramificada e com intra-pareamento de bases em mais da metade de seu genoma (Wang et al., 1986). Seu genoma, assim como o do HCV, possui grande taxa de erro devido à falta de capacidade revisora da RNA polimerase do hospedeiro, como encontrado nos organismos de genoma de RNA (Holland et al., 1982). Desse modo, existe uma grande diversidade entre cepas, chegando até 40% em relação ao seu genoma completo, sendo a região com maior divergência aquela que codifica a região C-

terminal da proteína L-HDAg, enquanto a mais conservada são as sequências codificantes da ribozima e ligante de RNA (Dény, 2006; Hughes et al., 2011). Assim como os outros vírus abordados aqui, essa divergência é altamente relacionada com a localidade geográfica (Le Gal et al., 2006).

A diversidade genômica encontrada no HDV, junto à disponibilidade de comparação de sequências ao redor do mundo, possibitou a classificação de suas variantes. As primeiras classificações do HDV foram realizadas alguns anos após o sequenciamento do genoma desse organismo, dividindo-o em três genótipos (Casey et al., 1993; Imazeki et al., 1991; Wang et al., 1986). Estudos filogenéticos de um número maior de amostras procedentes de regiões não estudadas anteriormente apontaram que o HDV possuía uma variabilidade muito mais complexa, semelhante ao do seu ajudante HBV (Radjef et al., 2004). Atualmente, a separação das cepas de diversas partes do mundo se expande em oito genótipos, com distribuíções particulares ao redor do mundo, nomeadas por numerais arábicos (HDV-1 a HDV-8) (Le Gal et al., 2006).

Com exceção do HDV-1 que é mundialmente encontrado, cada grupo do HDV é geograficamente localizado (Le Gal et al., 2006) (Figura 8). O HDV-2 e 4 são encontrados no leste da Ásia (Hughes et al., 2011; Imazeki et al., 1990; Ivaniushina et al., 2001; Sakugawa et al., 1999); o HDV-3, principalmente na Bacia Amazônica (Gomes-Gouvêa et al., 2008) e os genótipos 5-8 em indivíduos na África (François-Souquiere et al., 2016; Le Gal et al., 2006; Makuwa et al., 2008, 2009; Radjef et al., 2004).

A maioria dos estudos relacionados ao HDV no Brasil são descritos na região Amazônica, sendo escassos os trabalhos fora dessa (Mendes-Correa et al., 2011). Entre esses trabalhos, o HDV- 3 é o mais frequente (Crispim et al., 2014; Gomes-Gouvêa et al., 2008, 2009) exceto em um estudo em que se encontrou o HDV-1 (Paraná et al., 2006). Recentemente foi descrito no Maranhão entre pacientes atendidos em um núcleo de referência em doença do fígado, dois indivíduos com um genótipo nunca descrito no Brasil, o HDV-8 (Barros et al., 2011).

2.3 Hepatite C

2.3.1 Histórico

Há quatro décadas houve o primeiro vestígio do HCV provocando hepatite em indivíduos submetidos à transfusão sanguínea, sendo essa primeiramente denominada de hepatite não A, não B (Alter et al., 1978; Feinstone et al., 1975). Somente depois de mais de uma década, de muitas tentativas por diversos métodos, a partícula viral responsável pela infecção seria identificada pelo grupo do Dr. Michel Houghton, sendo que os primeiros dados foram apresentados na Universidade da Califórnia em São Francisco em 1988 e publicados em 1989 (Choo et al. 1989; Houghton, 2009). Em poucas palavras, o agente etiológico da hepatite não-A, não-B (HNANB), denominado posteriormente pela terceira letra do alfabeto, foi desvendado a partir de uma biblioteca de DNA complementar (do inglês – *complementary* DNA - cDNA) provindos de amostras de fígado e plasma de chimpanzés infectados experimentalmente com soros de pacientes com HNANB crônica (Houghton, 2009).

2.3.2 Características biológicas e moleculares do vírion

O HCV é um vírion envelopado de tamanho relativamente maior do que o HBV (55-65 nm), com pequenas projeções na superfície do envelope (Kaito et al., 1994), e um nucleocapsídeo de 33 a 40 nm, com uma forma semelhante a um icosaédro (Ishida et al., 2001) (Figura 9A). Esse microrganismo possui família e gênero designados como *Flaviviridae* e *Hepacivirus*, respectivamente, sendo que essa família também possui espécies bem conhecidas como o vírus da Febre Amarela e da Dengue (ICTV, 2015). Dentro do gênero, estão ainda vários outros vírus ainda a serem ratificados, como os encontrados em mamíferos que infectam morcegos, roedores, cães, bovinos, equinos, entre outros. (National Center for Biotechnology Information, 2016).

Seu genoma é composto de ácido ribonucleico em fita simples de polaridade positiva (RNAss+), com tamanho aproximado de 9.600 bases nucleotídicas, com uma ORF cuja extremidades 5' e 3'são regiões não traduzíveis (do inglês, *untranslated region* -UTR) de estrutura secundária complexa (*hairpins*) que possuem pouca diversidade nucleotídica entre cepas e papéis fundamentais para a replicação desse vírus (Figura 9B) (Ashfaq et al., 2011; Jones et al., 2007; Kaito et al., 1994).

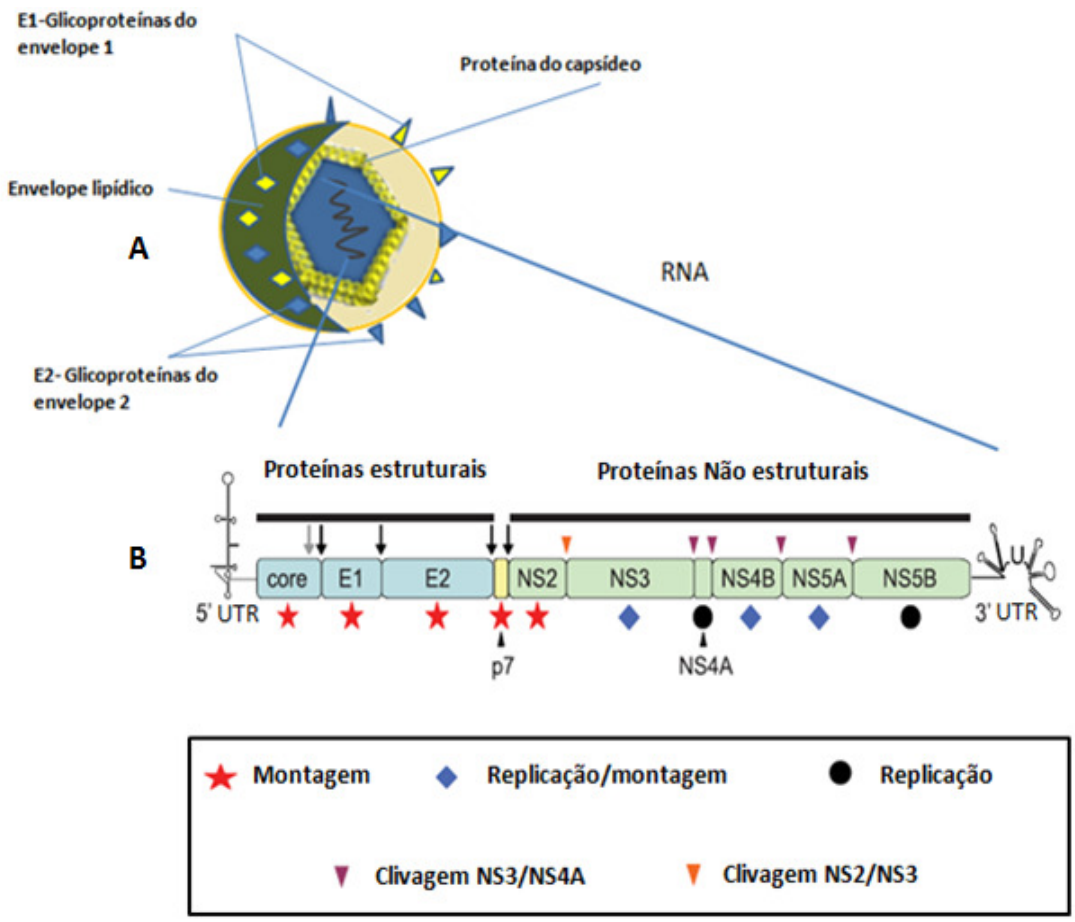


Figura 9 - Esquema estrutural e organização genômica do HCV. (A) ilustração evidenciando a superfície viral com o envelope lipídico e as glicoproteínas. (B) Genoma do HCV mostrando as regiões UTR e codificantes de proteínas estruturais e não estruturais, e suas principais funções. As setas cinza e preta representam a atividade de proteases do hospedeiro.
Fonte: Figura A- Autoria própia; figura B, adaptado de Jones, McLauchlan, 2010.

Um único polipeptídeo de aproximadamente 3.000 aminoácidos chamado de poliproteína, traduzido diretamente do genoma, é processado em dez moléculas estruturais (S) e não estruturais (NS) (Figura 9B) (Catanese et al., 2013). As proteínas estruturais denominadas core, E1 e E2 estão localizadas na região N terminal da poliproteína, enquanto as não estruturais p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B se localizam na região C-terminal (Jones et al., 2007). Cada uma dessas moléculas possuem diferentes papéis no processo replicativo ou na montagem das partículas virais.

A proteína core forma o nucleocapsídeo em estrutura icosaédrica, que envolve o RNA viral. As glicoproteínas virais E1 e E2 se ancoram na camada bilipídica derivada do hospedeiro, formando um heterodímero (Ishida et al., 2001; Jones et al., 2007; Popescu et al.,

2014). O nucleocapsídeo com as proteínas E1 e E2 formam o vírion completo (Figura 9A). Esse vírion se encontra na corrente sanguínea interagindo com lipoproteínas, o que eventualmente leva a formação a partículas de diversos tamanhos e densidades (Andre et al., 2002; Zhu et al. 2014).

A proteína p7, conhecida como uma viroporina, não é necessária para o processo replicativo do HCV, mas acredita-se que possui papel importante nos primeiros estágios de montagem das partículas virais, embora ainda não esteja totalmente elucidada sua função (Jones et al., 2007). Assim como essa última, a NS2 parece fazer parte na montagem viral precoce, em que junto com a NS3 formam um complexo com capacidade proteolítica, especificamente clivando a região N-terminal na região NS3 da poliproteína (Grakoui et al., 1993; Jones et al., 2007).

A proteína NS3 possui duas funções, proteolíticas e de ATPase/Helicase, sendo responsável pela clivagem entre as proteínas NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A e NS5A-NS5B (Bartenschlager et al., 1993; Jones, Mclaunchon,2010). Essa precisa de uma proteína como cofator, a NS4A, responsável pelo envio da proteína NS3 ao retículo endoplasmático (Ashfaq et al., 2011; Wolk et al., 2000).

A NS4B possui um papel fundamental no recrutamento de outros polipeptídeos, assim como também interagi com o cofator NS4A e a proteína NS5A, formando um complexo de proteínas (Ashfaq et al., 2011; Lin et al., 1997). Tanto a NS5A e B são essenciais no processo replicativo do vírus, sendo que a primeira age formando um complexo com outras proteínas NS (Ashfaq et al., 2011; Neddermann et al., 1999) e a segunda tem função de RNA polimerase (Behrens et al,. 1996).

2.3.3 Replicação viral

O HCV é um vírus hepatotrópico que infecta as células ligando-se a vários receptores expressos na superfície dessas, por processos sequenciais complexos que promovem a ligação e internalização do vírion (Atoom et al., 2014). As proteínas do envelope interagem com receptores da membrana do hepatócito através de mecanismos que dependem tanto do vírus como do hospedeiro (Zeisel et al., 2011). Entre os receptores temos o receptor de lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *low-density lipoprotein receptor* – LDL-R) (Agnello et al., 1999), o receptor SR-BI (do inglês, *scavenger receptor B type I*) (Scarselli et al., 2002) e a molécula CD81 (do inglês, *cluster of differentiation 81*) (Pileri et al., 1998). Além desses

receptores de superfície, também são descritas interações entre o HCV e duas proteínas que compõem as junções intercelulares denominadas *tight junctions*, a claudina-1 (do inglês, *Claudin-1* -CLDN1) (Krieger et al., 2010) e a ocludina (do inglês, *occluding* - OCLN) (Liu et al., 2009).

Dentro do citoplasma da célula do hospedeiro o genoma viral é prontamente traduzido, pois possui conformação de RNA mensageiro (polaridade positiva), contudo, diferentemente dos eucariotos, não possui uma região 5'-cap para o início da tradução. Assim, a tradução do RNAm do HCV é mediada por uma sequência denominada sítio ribossomal de entrada interna (do inglês, *internal ribossomal entry site*- IRES) localizado na região 5' – UTR (Hoffman, Liu, 2011). Nessa região, ribossomos do hospedeiro reconhecem e traduzem o RNAm em uma poliproteína que é tanto co- e pós-processada por proteases derivadas do vírus e do hospedeiro, e assim, geram as proteínas estruturais e não estruturais maduras (Moradpour et al., 2007). Esses polipeptídios derivados da poliproteína são importantes para o processo de replicação viral que ocorre em um complexo chamado de rede membranosa (do inglês *Membranous Web*- MW) tanto de forma múltipla (do inglês, *multiple membrane vesicles*-MMVs) como de forma dupla (do inglês, *double membrane vesicles*-DMVs) derivados do retículo endoplasmático, endossomos, vesículas COP, mitocôndrias e gotas lipídicas (Romero-Brey et al., 2012). Esse complexo é induzido por proteínas virais, e serve como uma base para o processo de formação de novos vírions (Egger et al., 2002).

2.3.4 Diagnóstico e formas de transmissão

Os testes diagnósticos, que têm como função detectar a infecção pelo HCV, são aqueles baseados na detecção de anticorpos (anti-HCV) e ácido nucleicos virais, utilizando plasma ou soro (Richter, 2002), sendo que os ensaios amplamente utilizados devido ao custo baixo e facilidade de uso são baseados no primeiro, denominados ensaios imunoenzimáticos (do inglês, *enzyme immunoassays* - EIAs) em que são direcionados à detecção de imunoglobulinas ou antígeno desse vírus (Chevaliez, Powlotsky, 2009). Contudo, um resultado positivo nesse teste *per se* não é indicativo de infecção corrente. NAT (testes de ácido nucleico, do inglês, *nucleic acid tests*) é o padrão ouro de detecção do HCV RNA, por PCR e sua variante PCR em tempo real quantitativa (do inglês, *quantitative real time polimerase chain reaction* - qRT-PCR) que são utilizados atualmente para distinguir infecções crônicas de infecções passadas (Chevaliez, Powlotsky, 2008; Lange, Sarrazin,

2010). A hepatite aguda é caracterizada pela presença de HCV RNA e ausência de marcador sorológico, uma vez que os indivíduos infectados só irão desenvolver anticorpos anti-HCV semanas após a infecção, enquanto a hepatite crônica é designada pela presença do marcador sorológico anti-HCV e do HCV RNA persistente no soro por seis meses ou mais (Chevaliez, Powlotsky, 2008). Portanto, testes sorológicos são pouco eficientes para a detecção da fase aguda da infecção (Lange, Sarrazin, 2010).

A *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) recomenda que indíviduos que passaram ou tem comportamentos/fatores de risco façam os testes diagnósticos para detecção. Entre esses fatores temos: utilização de drogas injetáveis; pessoas positivas para HIV; indivíduos submetidos à hemodiálise; aqueles que possuem aminotranferases anormais; pessoas que receberam produtos sanguíneos antes de 1992 e entre outros (Ghany et al., 2009).

A exposição parenteral é o meio mais eficiente de transmissão do HCV. As principais situações de risco para a infecção pelo HCV são o uso de drogas ilícitas por via endovenosa, assim como a hemodiálise (Wasmuth, 2010b). O vírus pode também ser transmitido através de outras formas de contato percutâneo, como no procedimento de realização de tatuagens (Haley, Fisher, 2001). Além do mais, a relação sexual desprotegida com indivíduos infectados pode ser uma via de transmissão, embora ainda não esteja bem estabelecida (Terrault, 2013). No passado, a transfusão de sangue era um meio de infecção eficiente, contudo devido à introdução da triagem para marcadores sorológicos específicos para o HCV desde os anos 90, esse meio de contágio está quase totalmente extinto, pelo menos nos países desenvolvidos (Wasmuth, 2010b).

2.3.5 Epidemiologia

Anualmente, aproximadamente meio milhão de indivíduos morre por doenças relacionadas com ao HCV (Lozano et al., 2012). Além do mais, estimativas apontam que cerca de 2% da população mundial sejam portadores crônicos dessa infecção, com risco de desenvolvimento de doenças hepáticas graves (WHO, 2014b).

Nos continentes africano e asiático se encontram os maiores índices de prevalência dessa infecção no mundo, baseando-se na prevalência do anti-HCV. Nos países desenvolvidos (América do Norte, Europa Ocidental e Austrália), as prevalências são baixas, contudo, mesmo nestes locais existem grupos com prevalências mais elevadas (Shepard et al., 2005).

As prevalências pelo mundo variam de 15% no Egito (El-Zanaty, Way, 2009) a menos de 0,5% em países da Europa Central e Ocidentais (Cornberg et al., 2011). Na América Latina, o quadro entre adultos demonstra aproximadamente oito milhões com o anti-HCV em 2011 (Kershenobich et al., 2011).

No Brasil, a prevalência do anti-HCV nas capitais é de 1,38%, baseado em inquérito nacional (Pereira et al., 2013). Apesar disso, há variações entre as regiões geográficas brasileiras devido à sua grande extensão territorial, adicionado às divergêngias culturais e econômicas (Kretzer et al., 2014). De 1999 a 2011, o SIM registrou 82.041 casos de indivíduos com anti-HCV e RNA detectável, sendo a esmagadora percentagem, aproximadamente 90%, nas regiões Sul e Sudeste (Brasil, 2012). Contudo, ainda são poucos estudados os níveis de prevalência do anti-HCV de forma homogênea, existindo relativamente mais informações, principalmente em alguns grupos populacionais específicos, como é o caso dos doadores de sangue (Ferreira, Silveira, 2004).

Diferentemente do HBV, o HCV não possui uma vacina, o que implica aos órgãos de saúde pública a promoção de campanhas que esclareçam a população sobre as formas de contaminação por esse último vírus, bem como as maneiras de prevenção, incentivando a utilização de materiais perfurocortantes descartáveis ou com esterilização eficiente. Contudo, a hepatite C viral é considerada uma infecção curável, devido à existência de drogas eficientes capazes de eliminar o vírus em até 95% dos indivíduos submetidos ao tratamento (Hanafiah et al., 2013), mas este tratamento é extremamente custoso.

2.3.6 Diversidade genética e epidemiologia molecular

O genoma do HCV possui como região menos variável, a 5'-UTR, provavelmente devido sua grande necessidade para os processo de replicação e tradução, enquanto as regiões E1 e E2 são as mais variáveis, e desse modo são designadas de hipervariáveis (Ashfaq et al., 2011). Essa grande diversidade em seu genoma é devido a alguns fatores importantes: sua RNA polimerase RNA-dependente não possui capacidade revisora, existindo assim erros de incorporação de pelo menos 1,48 x 10^{-3} substituição de base/sítio/ano; sua taxa de replicação é alta, sendo que em um indivíduo, é estimada a produção de um trilhão de vírions por dia e existe grande pressão seletiva provocada pelo sistema imune do hospedeiro (Major et al., 1999; Neumann et al., 1998; Troesch et al., 2006). Esses fatores influenciam na produção de uma população de cepas no hospedeiro chamada de quasispécies, que são variantes com

divergência genômica dentro de um único hospedeiro (Holmes, 2010). Essa população de variantes dentro do hospeideiro é uma grande vantagem adaptativa para esse vírus, pois qualquer pressão ambiental, por exemplo, pela utilização de drogas antivirais, pode selecionar cepas mutantes mais resistentes e capazes de estabelecerem infecção eficientemente (Martell et al., 1992; Nasu et al., 2011).

A evolução do HCV é direcionada por importantes pressões seletivas relacionadas ao processo de adaptação ao seu hospedeiro, desencadeada por respostas rápidas adaptativas à pressão seletiva imunológica e por tratamentos antivirais (Simmonds, 2004). Essa diversidade pode chegar a 35% no genoma viral completo, dividindo essas cepas em genótipos do HCV, com subtipos que variam de 20 a 25% entre si (Simmonds et al., 1993; Simmonds, 2004). Existem sete genótipos do HCV, designados por números arábicos e seus diversos subtipos por letras minúsculas, sendo que a maior parte dos genótipos possuem múltiplos subtipos, distribuídos em diferentes áreas geográficas do mundo (Messina et al., 2015; Simmonds, 2004).

A distribuição genotípica do HCV revela poucas variantes frequentes ao redor do mundo, onde os subtipos 1a e 1b dentro do genótipo 1; o 2a dentro do genótipo 2 e o 3a dentro do genótipo 3 são os mais frequentes e considerados como pandêmicos (Messina et al., 2015). Essa distribuição pode estar relacionada aos meios de transmissão como compartilhamento de drogas injetáveis e contaminação por derivados sanguíneos utilizados sem triagem específica até o início dos anos 90 (transfusão de sangue, hemodiálise), além do uso de instrumentos sem esterilização adequada, como seringa não descartável e outros equipamentos utilizados para vacinação em massa (Magiorkinis et al., 2009; Smith et al., 1997).

O genótipo 1 do HCV é o mais prevalente em todo o mundo, sendo responsável por 46,2% das infecções (Messina et al., 2015) seguido pelo genótipo 3 (30.1%); o genótipo 2 é mais frequentemente encontrado na África ocidental e central, assim como em alguns países ocidentais (Simmonds, 2004; Thong et al., 2014). Os genótipos 4, 5 e 6 são mais restritos a áreas distintas, sendo o genótipo 4 encontrado com mais frequência no Egito e África subsaariana; o 5 na África do Sul e o 6 no Sudoeste asiático (Antaki et al., 2010; Mellor et al., 1995; Smith et al., 1997; Simmonds, 2004; Thong et al., 2014) (Figura 10).

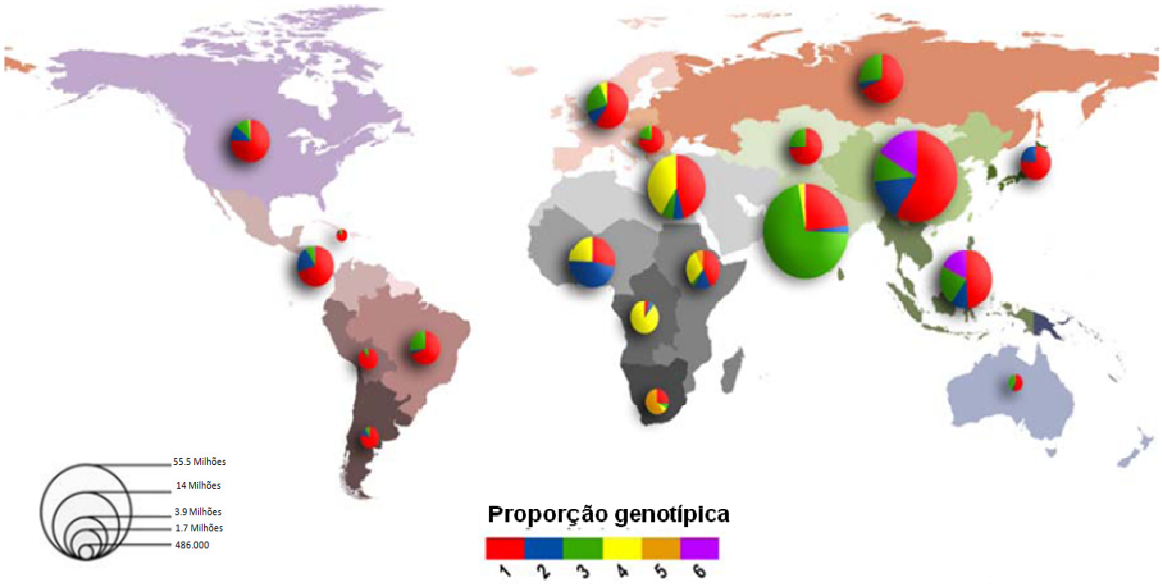


Figura 10 - Distribuição dos genótipos do HCV no mundo.
Fonte: Adaptado de Messina et al., 2015

O Brasil segue os padrões mundias de distribuição genotípica do HCV. Estudos mostram que o subtipo 1a é amplamente distribuído no Brasil e parece ter sido introduzido por um único evento, enquanto os outros subtipos 1b e 3a mostraram comportamento de várias introduções em regiões distintas do país (Lampe et al., 2013; Romano et al., 2010). Campiotto et al. (2005), em diversas localidades do Brasil, observaram uma grande frequência dos subtipos 1a, 1b e 3a, sendo o genótipo 1 o mais prevalente (64,9%), variando de 37,5% no Rio Grande do Sul a 82,1% em Alagoas. De acordo com o mesmo estudo, o genótipo 3 é o segundo mais frequente (30,2%) seguido pelo genótipo 2 (4,6%). Em estudo na região Nordeste foi encontrado uma grande frequência do subtipo 3a (49%) seguido pelo 1a e 1b com 26 e 24%, respectivamente (Veras et al., 2009). Em doadores de sangue de três regiões brasileiras, notou-se uma alta frequência do subtipo 1a (34,3%), seguido pelo 1b e 3a com 30% e 25,7% respectivamente (Martins et al., 1998).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar os genótipos e subgenótipos (para HBV) dos vírus das hepatites B, C e Delta nos municípios de Urbano Santos, Axixá, Morros, Icatu e Humberto de Campos – Maranhão.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os indivíduos com HBV DNA, HDV RNA e HCV RNA detectável entre aqueles com positividade para os marcadores sorológicos HBsAg, anti-HD e anti-HCV, respectivamente;

- Caracterizar os genótipos (HDV), subgenótipos (HBV) e subtipos (HCV) desses vírus por sequenciamento (Sanger);

- Comparar as sequências desses vírus, através de construção filogenética, com as previamente descritas no Maranhão e no mundo.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra e área de estudo

Em 2008, iniciou-se uma pesquisa realizada com pacientes crônicos para hepatite B no Centro de Estudos do Fígado do Hospital da Universidade Federal do Maranhão, referência no tratamento de doenças hepáticas nesse estado, em cooperação com o Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical em São Paulo. Esse trabalho deu origem a dois artigos importantes: o primeiro descrevendo a diversidade genotípica do HBV (Barros et al., 2014) e o segundo relatando um achado único no Brasil, a detecção do HDV genótipo 8 (Barros et al., 2011). Esse último achado nos incentivou a estudar as regiões próximas a Urbano Santos, onde foi encontrada a maioria dos casos de hepatite Delta, de modo a responder nossa hipótese que essa região poderia ser endêmica para esse vírus, o qual no Brasil é comum apenas na região Amazônica. Desse modo, realizou-se um estudo de base populacional, em que aproximadamente quatro mil indivíduos foram selecionados nos municípios maranhenses de Urbano Santos, Axixá, Morros, Icatú e Humberto de Campos, no período de março de 2012 a março de 2014. Toda a região dos municípios foi levada em consideração para o cálculo amostral e sorteio sistemático dos setores censitários, sendo alguns desses isolados e de difícil acesso (Figura 11). Portanto, essa tese faz parte desse projeto maior denominado "Estudo das Hepatites B, C e D nos municípios de Urbano Santos, Humberto de Campos e da Região do Baixo Munin, Maranhão, Brasil" em que utilizamos como casuística os indivíduos com marcadores de infecção para o vírus das hepatites, B (HBsAg), Delta (anti-HD) e C (anti-HCV). A figura 12 mostra a localização desses municípios e o número de indivíduos participantes. O esquema representativo do processamento das amostras é resumido na figura 13.

Figura 11 - A- Foto de um dos setores rurais. B- Estradas de areia encontrado em alguns acessos aos setores rurais.
Fonte: Arquivo pessoal

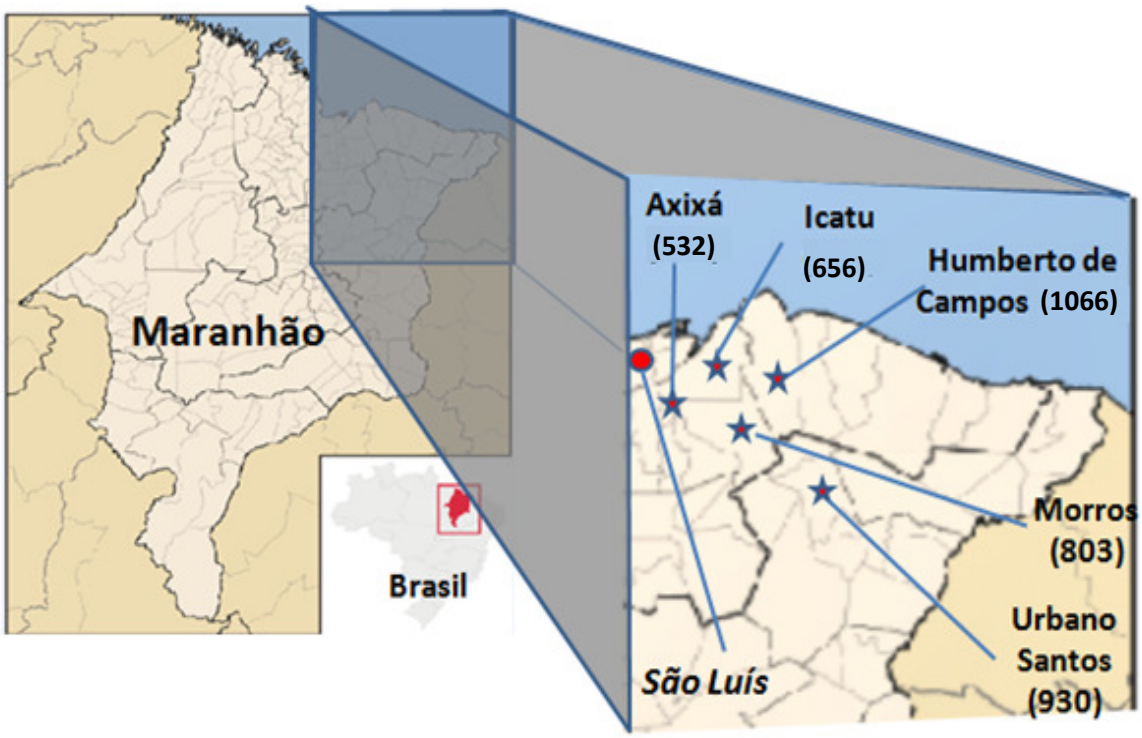


Figura 12 - Esquema do mapa do Maranhão indicando os municípios participantes da pesquisa (estrelas) e seus respectivos números amostrais.
Fonte: Modificado de Wikimedia Commons
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maranhao_MesoMicroMunicip.svg#/media/File:Maranhao_MesoMicroMunicip.svg>

4.2 Desenho de estudo e cálculo amostral

As coletas das amostras foram feitas de maneira sistemática por conglomerados, baseando-se pelo número populacional de cada município. Para calcular a amostra foi adotada uma prevalência de 0,5% do HBsAg, considerando o resultado de prevalência do HBsAg encontrada em inquérito nacional na região Nordeste (Universidade de Pernambuco, 2010), com erro absoluto de 0,3%, nível de confiança de 95% e assumindo um efeito de desenho igual a 2, totalizando uma amostra total de 3.856 a 4.000 indivíduos. A amostragem foi feita por conglomerado em dois estágios: no primeiro foram sorteados os setores censitários com probabilidade proporcional à população. No segundo foram sorteados os quarteirões dos setores sorteados através da numeração das quadras e sorteio aleatório. Os mapas dos setores censitários foram disponibilizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Todos os domicílios dos quarteirões selecionados foram sequencialmente visitados, de acordo com o sorteio do local de início (esquina do quarteirão e prosseguindo no sentido horário), e

todos os indivíduos foram incluidos no estudo se estivessem dentro dos critérios de inclusão: idade mínima de um ano e residindo no local há mais de seis meses; além de concordarem em participar da pesquisa após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A).

A pesquisa "Estudo das hepatites B, C e D nos municípios de Urbanos Santos, Humberto de Campos, e da Região do Baixo Munin, Maranhão", foi aprovado no comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, CAAE 20935413.5.0000.5086 e Parecer nº 448.731 (Anexo B).

4.3 Sorologia

Os indivíduos, após a entrevista e assinatura do TCLE, foram submetidos à coleta de sangue periférico. As amostras foram processadas em alíquotas de soro, plasma e *buffy-coat* (anel leucocitário) no mesmo dia da coleta (Figura 14) e transportadas ao Centro de Pesquisa Clínica do Maranhão (CEPEC), em caixa térmica devidamente refrigerada, onde foram armazenadas em freezer – 70ºC até realização dos testes sorológicos para os marcadores totais HBsAg, Anti-HBs, anti-HBc, anti-HCV e anti-HD no Laboratório Central do Estado do Maranhão (LACEN), através da técnica de ELISA utilizando kits comerciais (DiaSorin, Saluggia, Vercelli, Italy). A imunotécnica de quimioluminescência por micropartículas (CMIA)-ARCHITECT (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany) foi utilizada para confirmação dos casos positivos para anti-HCV. Nessa tese abordamos apenas a identificação dos marcadores HBsAg, anti-HCV e Anti-HD para definir a casuística que foi utilizada para esse estudo. Os aspectos epidemiológicos e fatores de risco serão abordados em outros trabalhos.

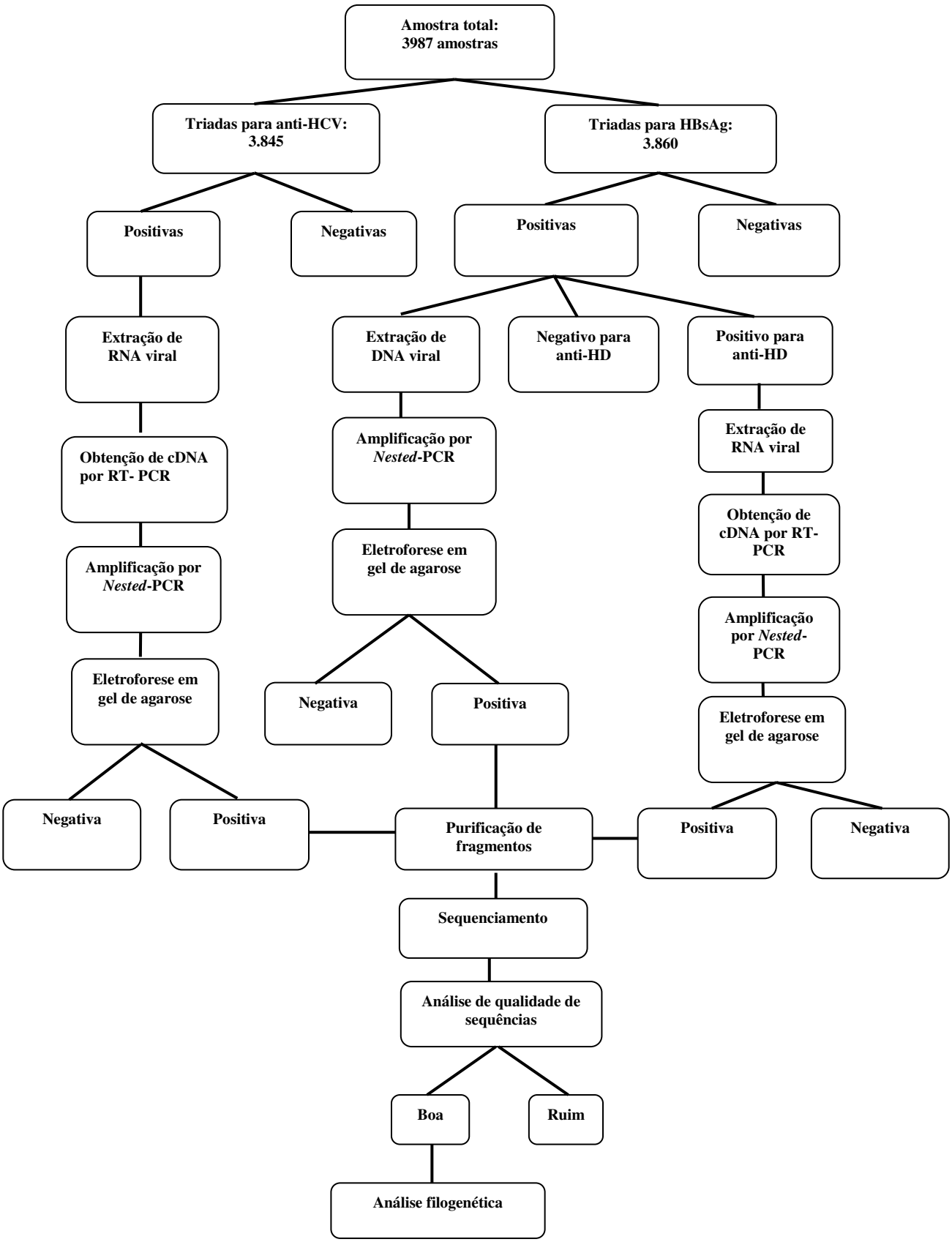


Figura 13 - Esquema resumido dos procedimentos realizados na pesquisa.

Figura 14 - Processamento de amostras no laboratório de um dos Municípios de coleta.
Fonte: Arquivo pessoal

4.4 Biologia Molecular

4.4.1 Extração do DNA (HBV) e RNA (HDV e HCV) a partir de soro e plasma

As amostras positivas para os marcadores de infecção HBsAg, anti-HD e anti-HCV foram submetidas a extração de DNA/RNA viral de soro ou plasma, utilizando-se kits: *QIAamp DNA Blood Mini* para o HBV e *QIAamp MinElute Virus Spin* para os demais (Qiagen, Inc., Hilden, Germany), seguindo as instruções estabelecidas pelo fabricante.

4.4.2 Síntese do cDNA do HDV RNA e HCV RNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se a enzima SuperScript® III ReverseTranscriptase e *primers* randômicos (Invitrogen™, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, USA). Para o HDV e HCV foram utilizados os mesmos procedimentos com exceção que para o HDV, o RNA extraído foi submetido a uma incubação inicial para denaturação da fita de RNA a 94 °C por cinco minutos. O volume final da reação foi de 60 µL com as seguintes

concentrações: 7,5 ng/µL do primer randômico (150 ng/µL), 1 X de Tampão (5 X), 10 mM de DTT (0,1 M), 0,5 mM de dNTPs (10 mM), 30 U de RNAse OUT (40 U/ µL), 300 U de Enzima SuperScript III (200 U/µL) e água DEPC. As amostras foram submetidas às seguintes temperaturas no termociclador (Eppendorf): 70 °C por 10 minutos; 25 °C por 5 minutos; 37 °C por 1 hora e 2 minutos e 95 °C por 15 minutos.

4.4.3 Amplificação do HBV DNA, HDV cDNA e HCV cDNA

A amplificação de regiões específicas dos genomas virais foi realizada utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase aninhada (*nested* PCR), utilizando a enzima platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) através de procedimentos já descritos (Enomoto et al., 1990; Gomes-Gouvêa et al., 2008; Gomes-Gouvêa et al., 2015; Sandres-Sauné et al., 2003). Os *primers* utilizados foram os seguintes:

a) HBV - Um fragmento de 1.306 pb da região que parcialmente engloba os genes codificantes do HBsAg/Polimerase (S/Pol) foi gerado a partir de uma primeira PCR com os *primers* PS3132F (5' CCT CCY GCH TCY ACC AAT CG 3'; nt 3132–3151)/2920RM (5' ACG TCC CKC GHA GRA TCC AG 3'; nt 1417–1398) e uma segunda PCR com os *primers* PS3201F (5' CAY CCH CAG GCM ATG CAG TGG 3'; nt 3201–3221)/P1285R (5' CWA GGA GTT CCG CAG TAT GG 3'; nt 1285–1266) (Gomes-Gouvêa et al., 2015);

b) HCV - Um fragmento de 380 pb correspondente a região parcial do gene NS5B foi obtido através de uma primeira rodada de PCR com os *primers* NS5B PR1 (5' TGG GGA TCC CGT ATG ATA CCC GCT GCT TTG A 3' nt; 8245-8275) /NS5B PR2 (5' GGC GGA ATT CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA 3' nt; 8616-8645) e uma segunda rodada com os *primers* NS5B PR3 (5' TAT GAY ACC CGC TGY TTT GAC TC 3' nt; 8256-8278)/ NS5B PR5 (5' GCT AGT CAT AGC CTC CGT 3' nt; 8619-8636) (Sandres-Sauné et al., 2003).

c) HDV – Um fragmento de 403 pb da região genômica parcial do antígeno delta foi gerado a partir de uma primeira PCR com os primers HDV-853 IU (5' CGG ATG

CCC AGG TCG GAC C 3'; nt 853-871)/ HDV-1302 OD (5' GGA TTC ACC GAC AAG GAG AG 3' nt; 1322–1303) e uma segunda PCR com os primers HDV-A (5' GAA GGA AGG CCC TCG AGA ACA AGA 3'; nt 1290-1267)/ HDV-E (5' GAG ATG CCA TGC CGA CCC GAA GAG 3'; nt 887-910) (Casey et al., 1993; Zhang et al., 1996).

Todos os procedimentos de biologia molecular seguiram critérios já estabelecidos para evitar contaminação ou resultados falsos positivos (Kwok, Higuchi, 1989).

4.4.4 Determinação das cargas virais dos HBV e HCV

A carga viral do HBV foi avaliada através de PCR em tempo real, utilizando conjunto de *primers* e sondas complementares a regiões conservadas do gene S do HBV, através do sistema TaqMan® (Life Technologies) através de procedimentos e *primers* já descritos, com limite de detecção de 50 UI (unidades internacionais)/mL (Sitnik et al., 2010). Uma curva padrão foi realizada através de amostra confiavelmente já quantificada, a partir da qual foram obtidos pontos em duplicata através de diluições seriadas de 1/10. Todas as amostras também foram colocadas em duplicada, com um controle negativo (água ultrapura) a cada cinco amostras. Os resultados foram obtidos com o aparelho ABI 7500 Fast (Applied Biosystems), analisados no próprio software do equipamento e expressos em UI/mL.

A carga viral do HCV foi determinada pelo kit comercial Abbott Real Time HCV (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA), com limite mínimo de deteção de 12 UI/mL.

4.4.5 Detecção dos fragmentos amplificados para sequenciamento

Os fragmentos amplificados foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2% concomitantemente com padrão molecular *Low Mass Ladder*, 200 pb (Life Technologies), para identificação do tamanho do fragmento e respectiva quantificação. O gel foi corado utilizando-se o SYBR® safe (Invitrogen) e visualizado sob luz ultravioleta.

4.4.6 Sequenciamento dos fragmentos do HBV DNA e HDV cDNA

Os protudos do segundo ciclo de PCR foram submetidos à puficação antes de serem sequenciados. Para isso, utilizamos o kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit (Life Technologies, USA).

O sequenciamento foi feito através do kit ABI PRISM® BigDye™ terminator (Applied Biosystem). Todos os procedimentos e *primers* utilizados já foram descritos (Casey et al., 1993; Gomes-Gouvêa et al., 2008; 2015; Zhang et al., 1996).

A eletroforese e leitura foram feitas utilizando-se o sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.4.7 Análise das sequências, genotipagem e análise filogenética

As sequências foram analisadas quanto sua qualidade através do programa Phred-Phrap e a sequência consenso de cada amostra montada, a partir do alinhamento das sequências geradas de cada fragmento sequenciado, utilizando o programa CAP3 (Togawa, Brigido 2003). Ambos os programas estão disponíveis no site *Eletropherogram quality analysis* (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/).

Para a classificação dos genótipos e subgenótipos, as sequências consenso obtidas foram alinhadas com sequências de diferentes genótipos e subgenótipos dos vírus disponíveis no *GenBank* (NCBI, 2014). Foi utilizado o programa Clustal_W no BioEdit para o alinhamento das sequências (Hall, 1999).

A análise filogenética foi feita utilizando-se o programa BEAST 1.6.1 (Drummond, Rambaut, 2007) através do método Bayesiano de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC). Foi utilizado um relógio molecular relaxado através do GTR + G + I como modelo de substituição nucleotídica. Para o HBV foram rodadas 20 milhões de gerações em que a cada dois mil foram amostradas uma arvóre; enquanto que para o HDV, 10 milhões de gerações foram realizadas e a cada mil foram amostradas uma árvore, para obtenção de convergência de parâmetros. As árvores para o HBV e HDV com maior credibilidade de clados foram obtidas, excluindo 10% de *burn-in*, através do programa TreeAnnotator v.1.6.1 e visualizadas com o programa FigTree v1.4.2. (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

Os subtipos sorológicos do HBV foram designados através da tradução das sequências genômicas pelo programa BioEdit (Hall, 1999), e a observação das posição de aminoácidos da principal região antigênica do HBsAg, nas posições 120, 122, 127, 134, 159 e 160, para a determinação das especificidades *a*, *d/y* e *w/r* (Norder et al., 2004).

4.4.8 Análise estatística

Indivíduos com positividade para DNA/RNA dos vírus estudados foram organizados em tabelas através do programa Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) e suas características demográficas e virológicas foram descritas. Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Stata v. 11.0 (StataCorp, 2009) e foram aplicados os testes t de S*tudent* e exato de Fisher. Diferenças foram consideradas significantes quando o valor *p* foi menor que 0,05.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise sociodemográfica da amostra

Um total de 3.997 amostras foram coletadas de indivíduos dos cinco municípios participantes. Dessas, dez foram excluídas em virtude de incompatibilidade e/ou falta de dados. Em relação à amostra total analisada, mais da metade provinha de indivíduos do sexo feminino (57,9%; 2.308/3.987), com uma idade média de 28,3 (DP=20,15) anos. A maioria desses residia em setor rural (62,45%; 2.490/3.987). Os dados referentes à faixa etária dos indivíduos participantes estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 - Frequência categórica das idades da população do estudo.

Idade	Número de indivíduos	Porcentagem (%)
1 a 18 anos	1.665	41,76
19 a 36 anos	1.108	27,79
37 a 60 anos	868	21,77
61 a 99 anos	346	8,7
Total	3.987	100

5.2 O vírus da hepatite B

5.2.1 Identificação sorológica

Das amostras coletadas, 3.860 foram triadas para o marcador HBsAg, sendo 92 (2,38%) com positividade confirmada, após checagem com dois/três testes de ELISA sucessivos, ou seja, todas que apresentassem positividade no primeiro teste eram submetidos a um segundo teste e, caso fosse negativo, essa era submetida a um terceiro teste de confirmação. A maioria dos 92 indivíduos com HBsAg positivo eram do sexo masculino (56,5%; 52/92) com idade média de 42,3 (DP=20, 7).

5.2.2 Características sociodemográficas dos indivíduos positivos para HBV DNA por nested PCR e PCR em tempo real

Das amostras positivas para HBsAg, 58,69% (54/92) apresentaram HBV DNA detectável por *nested* PCR ou PCR em tempo real. Deste modo, encontramos uma prevalência de HBV DNA de 1,39% (54/3.860) na população geral. Esses eram na maioria do sexo masculino 55,55% (30/54) com idade média de 43,79 (DP = 20,77) anos. Levando em consideração a origem, a maioria era de Humberto de Campos (42,59%; 23/54) e residiam em setor rural (70,37%; 38/54). Esses indivíduos possuíam uma renda familiar de menos de um salário mínimo (66,66%; 36/54). Observamos também que a maioria desses indivíduos se declarou como sendo negro ou mestiço/mulato (74,07%; 40/54).

5.2.3 Distribuição dos genótipos e subgenótipos do HBV

A amplificação do fragmento de 1.306 pb do gene S/Pol foi realizada com sucesso em 51 das 54 amostras com HBV DNA detectável. Dessas, 50 tiveram sequências de boa qualidade, nas quais foi possível a caracterização genotípica. Todas as amostras foram classificadas em genótipos A e D, sendo a maioria dessas (86%; 42/50) desse último. A filogenia das sequências do genótipo A mostra que todas pertencem ao subgenótipo A1, distribuídas em vários ramos da árvore (Figura 15A). Esses isolados se agruparam com outros de poucas regiões africanas, sendo considerado assim dentro de um clado asiático-americano. Todas essas amostras foram classificadas como subtipo *adw2* (Figura 16).

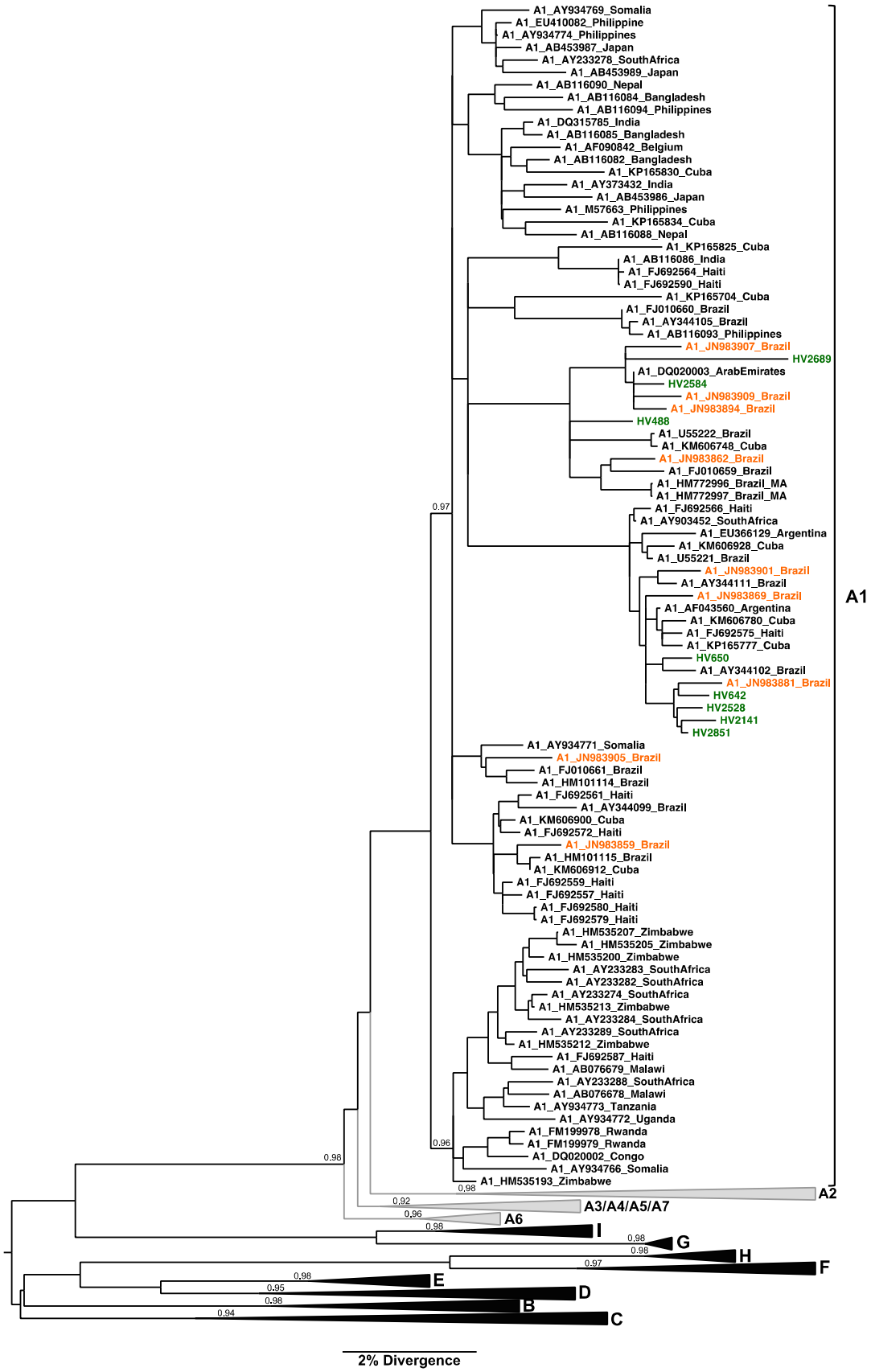
O genótipo D também foi classificado em apenas um subgenótipo, D4. Essas sequências, diferentemente do A1, agruparam-se em um grupo monofilético e se aproximaram de outras sequências descritas no Maranhão (Figura 15B). Todas as sequências foram classificadas em apenas um subtipo sorológico, *ayw2* (Figura 17).

Na tabela 2 são apresentadas as características sociodemográficas dos indivíduos, nos quais foi possível caracterizar o genótipo do HBV envolvido na infecção. De todas as características mostradas, apenas renda familiar e origem tiveram diferenças com significância estatística, p = 0,019 e 0,015, respectivamente, em que o genótipo D4 foi mais prevalente em indivíduos com menos de um salário mínimo e residindo nos municípios de Humberto de Campos, Urbanos Santos e Morros.

Tabela 2 - Características sociodemográficas dos portadores dos subgenótipos do HBV.

Variável	Subgenótipo			
	A1 (%)	D4 (%)	Total (%)	*p*
N	8 (16)	42 (84)	50	1
Masculino	5 (17,86)	23 (82,14)	28 (56)	
Feminino	3 (13,64)	19 (86,36)	22 (44)	
Idade Média (±DP)	41,5 (±18,7)	45,3 (±21,8)	44,7 (±21,2)	,647
Origem				
Axixá	1 (50)	1 (50)	2 (4)	**,015**
Morros	2 (16,7)	10 (83.3)	12 (24)	
Icatu	4 (50)	4 (50)	8 (16)	
Humberto de Campos	1 (4,55)	21 (95,4)	22 (44)	
Urbano Santos	0	6 (100)	6 (12)	
Setor				
Urbano	3 (21,4)	12 (78,6)	15 (30)	,683
Rural	5 (13,9)	30 (86,1)	35 (70)	
Raça*				
Negro	3 (25)	9 (75)	12 (24)	,32
Branco	0	5 (100)	5 (10)	
Índio	2 (40)	3 (60)	5 (10)	
Mestiço/Mulato	3 (11,5)	23 (88,5)	26 (52)	
Outro/Não Sabe	0	2 (100)	2 (4)	
Nível de educação				
Analfabeto	0	12 (100)	12 (24)	,336
Fundamental incompleto	5 (23,81)	16 (76,2)	21 (42)	
Fundamental completo	0	4 (100)	4 (8)	
Médio incompleto	1 (20)	4 (80)	5 (10)	
Médio completo	2 (28,6)	5 (71,4)	7 (14)	
Superior	0	0	-	
Não se aplica	0	1 (100)	1 (2)	
Renda familiar				
Menos de um salário mínimo	2 (6,3)	30 (93,7)	32 (64)	**,019**
1 a 3 salários mínimos	6 (33,3)	12 (66,7)	18 (36)	

* Baseado em autodeclaração


A1_AY934769_Somalia
A1_EU410082_Philippine
A1_AY934774_Philippines
A1_AB453987_Japan
A1_AY233278_SouthAfrica
A1_AB453989_Japan
A1_AB116090_Nepal
A1_AB116084_Bangladesh
A1_AB116094_Philippines
A1_DQ315785_India
A1_AB116085_Bangladesh
A1_AF090842_Belgium
A1_AB116082_Bangladesh
A1_KP165830_Cuba
A1_AY373432_India
A1_AB453986_Japan
A1_M57663_Philippines
A1_KP165834_Cuba
A1_AB116088_Nepal
A1_KP165825_Cuba
A1_AB116086_India
A1_FJ692564_Haiti
A1_FJ692590_Haiti
A1_KP165704_Cuba
A1_FJ010660_Brazil
A1_AY344105_Brazil
A1_AB116093_Philippines
A1_JN983907_Brazil
HV2689
A1_DQ020003_ArabEmirates
HV2584
A1_JN983909_Brazil
A1_JN983894_Brazil
HV488
A1_U55222_Brazil
A1_KM606748_Cuba
A1_JN983862_Brazil
A1_FJ010659_Brazil
A1_HM772996_Brazil_MA
A1_HM772997_Brazil_MA
A1_FJ692566_Haiti
A1_AY903452_SouthAfrica
A1_EU366129_Argentina
A1_KM606928_Cuba
A1_U55221_Brazil
A1_JN983901_Brazil
A1_AY344111_Brazil
A1_JN983869_Brazil
A1_AF043560_Argentina
A1_KM606780_Cuba
A1_FJ692575_Haiti
A1_KP165777_Cuba
HV650
A1_AY344102_Brazil
A1_JN983881_Brazil
HV642
HV2528
HV2141
HV2851
A1_AY934771_Somalia
A1_JN983905_Brazil
A1_FJ010661_Brazil
A1_HM101114_Brazil
A1_FJ692561_Haiti
A1_AY344099_Brazil
A1_KM606900_Cuba
A1_FJ692572_Haiti
A1_JN983859_Brazil
A1_HM101115_Brazil
A1_KM606912_Cuba
A1_FJ692559_Haiti
A1_FJ692557_Haiti
A1_FJ692580_Haiti
A1_FJ692579_Haiti
A1_HM535207_Zimbabwe
A1_HM535205_Zimbabwe
A1_HM535200_Zimbabwe
A1_AY233283_SouthAfrica
A1_AY233282_SouthAfrica
A1_AY233274_SouthAfrica
A1_HM535213_Zimbabwe
A1_AY233284_SouthAfrica
A1_AY233289_SouthAfrica
A1_HM535212_Zimbabwe
A1_FJ692587_Haiti
A1_AB076679_Malawi
A1_AY233288_SouthAfrica
A1_AB076678_Malawi
A1_AY934773_Tanzania
A1_AY934772_Uganda
A1_FM199978_Rwanda
A1_FM199979_Rwanda
A1_DQ020002_Congo
A1_AY934766_Somalia
A1_HM535193_Zimbabwe
0.97
0.96
0.98
0.98
A1
A2
0.92
A3/A4/A5/A7
0.96
A6
0.98
I
0.98
G
0.98
H
0.97
F
0.98
E
0.95
D
0.98
B
0.94
C
2% Divergence

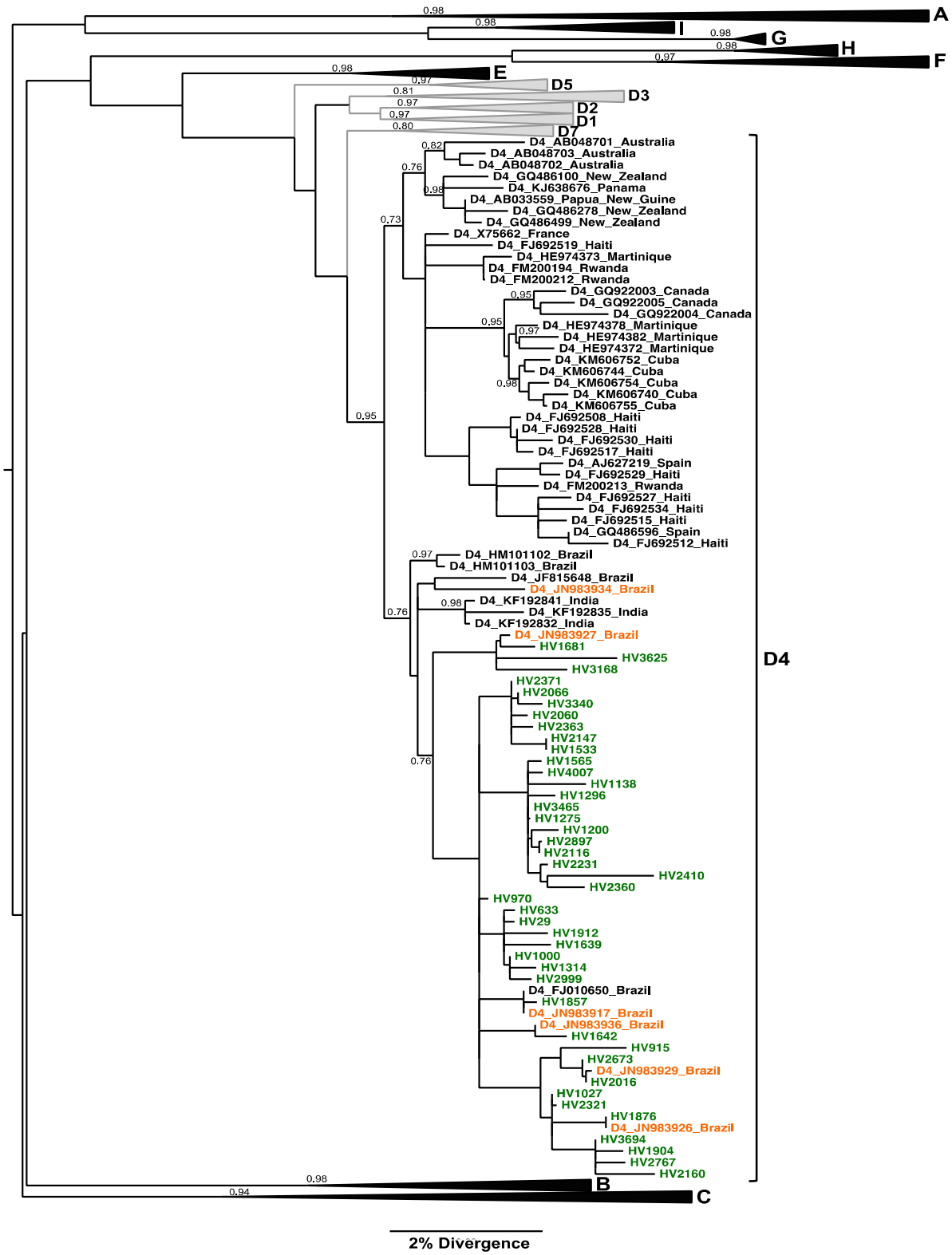


Figure 15 - Análise filogenética dos subgenótipos do HBV. (A) Subgenótipo A1. (B) subgenótipo D4. As sequências desse estudo são identificadas pela cor verde e as descritas anteriormente no Maranhão pela cor laranja. Sequências do *GenBank* são apresentadas por seu genótipo/subgenótipo correspondente mais número de acesso e origem. Os valores de probabilidade posterior são mostrados nos ramos principais.

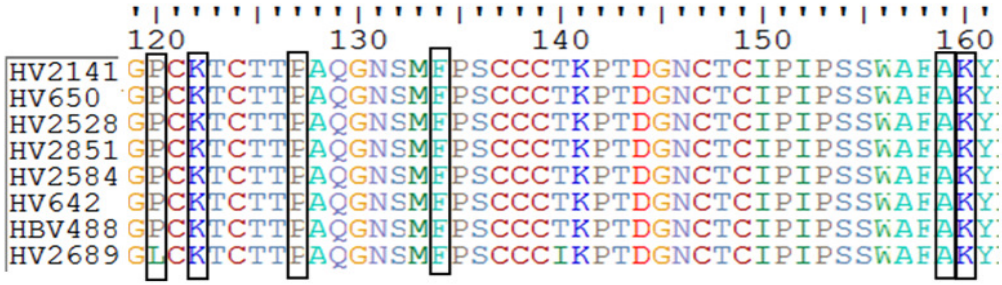


Figura 16 - Sequências de aminoácidos do subtipo sorológico *adw2* do subgenótipo A1 desse estudo. A região do resíduo 124-147 delimita o determinante "a" do gene S do HBV. Os retângulos verticais demarcam posições importantes para classificação do subtipo sorológicos do HBV.
Fonte: Figura criada através do programa BioEdit

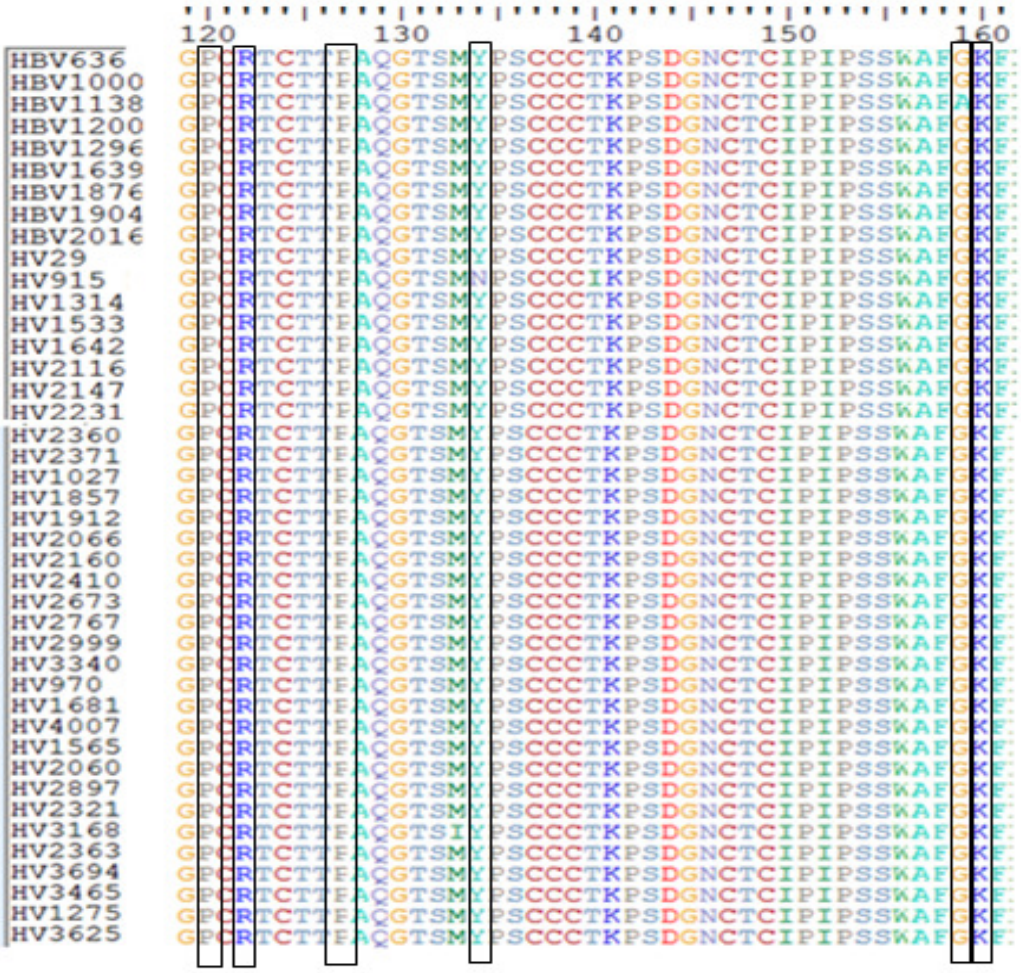


Figura 17 - Sequências de aminoácidos do subtipo sorológico *ayw2* do subgenótipo D4 desse estudo. A região do resíduo 124-147 delimita o determinante "a" do gene S do HBV. Os retângulos verticais demarcam posições importantes para classificação do subtipo sorológicos do HBV.
Fonte: Figura criada através do programa BioEdit

5.3 O vírus da hepatite Delta

5.3.1 Identificação sorológica

As 92 amostras positivas para o marcador HBsAg foram submetidas a investigação do marcador anti-HD. Oito amostras apresentaram positividade para esse marcador. Desses, a maioria era do sexo masculino (62,5%; 5/8) e tinham idade média de 33,5 anos (DP=10,6). Os casos positivos foram encontrados: em Morros (25%; 2/8), Humberto de Campos (50%; 4/8) e Urbano Santos (25%; 2/8).

5.3.2 Características sociodemográficas dos indivíduos positivos para HDV RNA

Entre as oito amostras positivas, apenas metade tiveram RNA detectável, sendo assim uma frequência do RNA HDV de 4,35% (4/92) entre os casos positivos para HBsAg. Esses indivíduos com infecção ativa tinham idade que variavam de 23 a 49 anos e apenas uma amostra era de indivíduo do sexo feminino. Metade dessas amostras teve também o subgenótipo do HBV identificado. A tabela 3 descreve algumas características dos indivíduos positivos para o RNA HDV.

Tabela 3 **-** Características sociodemográficas dos indivíduos positivos para o RNA do HDV.

ID	Sexo	Raça*	Idade	Origem	Zona	Nível de escolar	Renda familiar (SM)	HDV-genótipo	HBV-Subgenótipo
1015	M	Negro	23	Morros	Rural	F.Inc	Menos de 1	HDV-8	ND
2231	M	Negro	25	H. Campos	Rural	F.Com	Menos de 1	HDV-8	D4
2321	M	Negro	49	H. Campos	Rural	Anf	Menos de 1	HDV-8	D4
3959	F	Mestiço/ Mulato	39	U. Santos	Urbano	Anf	Menos de 1	HDV-8	ND

* baseado em autodeclaração; ND- Não determinado. SM – Salário mínimo; F. Inc-Fundamental incompleto; F Com-Fundamental Completo; Anf- Analfabeto.

5.3.3 Distribuição dos genótipos do HDV

As quatro sequências foram submetidas à análise filogenética. Todas se agruparam no clado HDV-8, com um bom suporte de probabilidade posterior, junto com as outras duas descritas anteriomente no Brasil (Figura 18).

As amostras brasileiras agruparam dentro do clado do HDV-8, em um braço a parte de todas as outras sequências encontradas no *GenBank*, todas elas provenientes da África ocidental e central, com maior representatividade do Gabão. Embora dois indivíduos infectados sejam do mesmo município de Humberto de Campos (2231 e 2321), as sequências dessas amostras não se agruparam no mesmo braço final da árvore, assim como o isolado encontrado em Urbano Santos (3959) neste trabalho não se agrupou da mesma forma com os dois outros do mesmo município descritos no trabalho de Barros et al. (2011) (JF 298899_MA_Brazil e JF 298898_MA_Brazil).

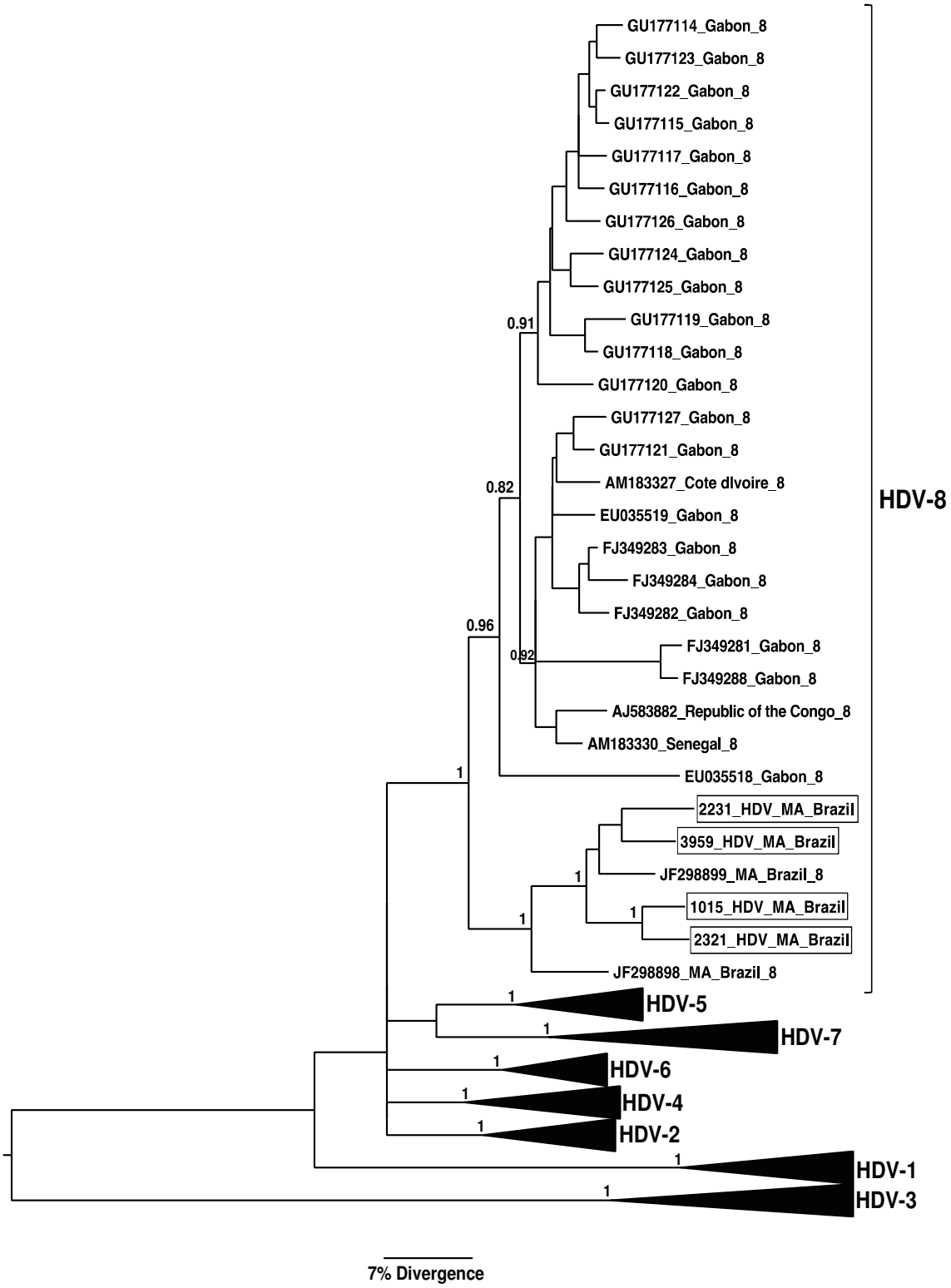


Figura 18 - Análise filogenética dos isolados do HDV (retângulos). Sequências do *GenBank* são apresentadas por seu genótipo correspondente mais número de acesso e origem. Os valores de probabilidade posterior são mostrados nos ramos principais.

5.4 O vírus da hepatite C

5.4.1 Identificação sorológica

De modo oposto ao HBV, a triagem do número mínimo de indivíduos representativos para o estudo (3.856 amostras) não foi alcançado para o marcador anti-HCV, mas foram analisadas 3.845. Todas as amostras foram incialmente testadas com o kit sorológico Murex (DiaSorin, Italy) e retestatadas através do kit ARCHITECT anti-HCV (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany), sendo confirmadas apenas quatro (0,1%) amostras positivas. Essas quatro amostras eram de indivíduos do sexo feminino, sendo dois deles do município de Axixá e os outros de Icatu. Suas idades variavam de sete a 69 anos.

Um dos indivíduos com anti-HCV apresentou positividade para o marcador HBsAg. Contudo, a carga viral do HBV não foi detectável.

5.4.2 Características sociodemográficas dos indivíduos positivos para HCV RNA

As quatro amostras com sorologia positiva para o HCV foram primeiramente submetidas a PCR qualitativa, no entanto, nenhuma delas apresentou amplificação de HCV RNA. Esse resultado foi confirmado pelo ensaio de carga viral em duas dessas amostras (PCR quantitativo). Nas outras duas amostras não foi possível a realização do ensaio, devido a quantidade insuficiente de soro para análise.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Esse é o primeiro trabalho no Maranhão que tem como casuística indivíduos positivos para os principais marcadores sorológicos de infecção dos vírus da hepatite B, Delta e C de uma amostra de base populacional, com um número representativo de indivíduos, e desse modo, de grande importância para entender a distribuições desses vírus no estado.

Os vírus hepatotrópicos abordados aqui provocam grande impacto socioeconômico em vários países em longo prazo, principalmente aquelas com baixos índices de desenvolvimento (Lemoine et al., 2013). Nesse estudo, considerando apenas os marcadores descritos nesta parte do trabalho, encontramos as seguintes frequências do HBsAg, anti-HD e anti-HCV: 2,38% (92/3.860); 8,69% (8/92) e 0,10% (4/3.845), respectivamente. Ou seja, esta população não apresenta o HCV como um agente patogênico importante. Ademais, a quantidade de indivíduos com infecção pelo HDV, não comum fora da região amazônica, é o dobro daquela encontrada para o HCV. Esse trabalho tem dois aspectos diferentes de muitos outros até agora realizados envolvendo o estudo do HDV, pois permitiu avaliar essa infecção em uma região fora da Amazônia em uma população geral, enquanto que os poucos estudos fora da Amazônia são de grupos específicos (coinfectados HBV/HIV e usuários de drogas) (Mendes-Correa et al., 2011; Oliveira et al., 1999).

Diferentemente do HCV, o HBV pode ser combatido com vacinação de crianças e adultos, o que também é eficaz para combater o HDV (Goyal, Murray, 2014). Contudo, não apenas a vacinação seria a chave para resolução desse problema de saúde pública. Um bom nível de instrução educacional sobre os meios de prevenção de transmissão desses vírus, assim como melhores condições de saúde e higiene também são eficientes no controle da dissiminação dessas infecções (Lemoine et al., 2013; Souto, 2015). A região aqui estudada está localizada no nordeste do Maranhão e é composta de cinco municípios onde os baixos índices de desenvolvimento são comuns aos encontrados em muitas outras regiões do interior desse estado (IBGE, 2012). A maioria dos indivíduos com positividade para HBV DNA e HDV RNA sobrevivia com menos de um salário mínimo e o nível de educação era frequentemente baixo, mas sem diferença estatística significativa. Portanto, devido à predominância da pobreza e baixa escolaridade, esses indivíduos desconhecem muitas vezes informações sobre meios de transmissão e prevenção de doenças, como as hepatites virais e, consequentemente, podem ser mais susceptíveis de serem infectados.

Dos noventa e dois indivíduos com sorologia positiva para HBsAg, em um pouco a mais do que a metade se observou evidência de replicação viral ativa, ou seja, HBV DNA detectável por *nested* PCR ou PCR em tempo real (58,69%; 54/92), sendo assim uma prevalência de 1,39% (54/3.860) do HBV DNA na população geral. A baixa percentagem de HBV DNA entre os indivíduos HBsAg do nosso estudo difere bastante da percentagem de positividade para o HBV DNA entre pacientes crônicos descritos no último estudo no Maranhão que foi de 89% (Barros et al., 2014). Contudo, esse último estudo avaliou pacientes crônicos (ou seja, com mais de seis meses de presença do HBsAg no soro) em acompanhamento ambulatorial. Nosso estudo não envolveu pacientes em acompanhamento nem levou em consideração a cronicidade, pois trata-se de um estudo transversal. Desse modo, a maioria desses indivíduos pode não estar em fase de infecção ativa.

Em relação ao HDV, dos noventa e dois indivíduos portadores do HBsAg identificados, apenas oito tiveram positividade para o anti-HD, e desses, quatro apresentaram evidência de infecção ativa, um caso a mais do que o último estudo realizado no Maranhão (Barros et al., 2011). Outros estudos fora do Brasil, em regiões consideradas endêmicas como na África subsariana, já desmostraram altos índices de prevalência do HDV RNA em estudos específicos, como em pacientes com sintomas de doença hepática e indivíduos positivos para HIV (Andernach et al., 2014; Lunel-Fabiani et al., 2013; Opaleye et al., 2016). Contudo, no Brasil, resultados com alta positivade do RNA do HDV são mais frequentes apenas na região amazônica (Crispim et al., 2014; Paraná et al., 2006) sendo quase nula a presença fora dessa, (Mendes-Correa et al., 2011) com exceção da região nordeste do Maranhão (Barros et al., 2011).

Levando em consideração o HCV, não encontramos indivíduos positivos para RNA desse vírus entre os quatro indivíduos positvos para anti-HCV. De acordo com nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho no Maranhão a investigar a presença do HCV através de um estudo de base populacional, levando em consideração municípios fora da região metropolitana da capital do estado. Há conhecimento que meios de transmissão eficientes entre o HBV e HDV, como contato sexual e transmissão perinatal, parecem ser pouco importantes em relação ao HCV (Wasley, Alter, 2000). No Brasil, além da transfusão de sangue, tatuagem parece ser também um grande fator de risco, além de ter moradias com condições sanitárias deficientes quanto à presença de esgoto ou água encanada (Pereira et al., 2013). Desse modo, se justifica a ausência de indivíduos HCV RNA positivos em nosso estudo, provavelmente, devido às poucas vias de transmissão mais eficientes para o HCV

encontradas na população estudada (dados não mostrados), somado ao relativo isolamento desta população. Assim, o HCV pode não ter se estabelecido nessa região devido a poucos meios eficientes de infecção ou a população pode possuir características moleculares que a faz menos susceptíveis à infecção crônica. Essa especulação somente será respondida através da realização de mais estudos epidemiológicos em associação com estudos de marcadores moleculares humanos.

A epidemiologia molecular é uma ferramenta de grande auxílio para entender a dispersão de doenças infecciosas, e assim, obter informações úteis para controle e combate de organimos transmissíveis como os vírus das hepatites (Leitner, 2002). Deste modo, esse trabalho vem adicionar mais informações sobre esses vírus no estado do Maranhão de modo a incentivar estratégias de políticas públicas de controle e de tratamento, levando-se em conta a freqûencia das infecções nesse estado.

Em relação ao HBV, apenas dois genótipos foram encontrados, A e D. O genótipo D foi o mais frequente seguido por poucos casos do tipo A. Esse achado não está de acordo com o encontrado em estudos passados no Maranhão e no Brasil como um todo, em que o genótipo A é o mais preponderante (Alvarado-Mora et al., 2011; Barros et al., 2014; Crispim et al., 2014; Gomes-Gouvea et al., 2009; Mello et al., 2007; Moura et al., 2013; Santos et al., 2010; Sitnik et al., 2004; Victoria et al., 2008). Apenas no sul brasileiro já foi descrito uma maior quantidade de genotipo D (Becker et al., 2010; Bertolini et al., 2012; Carrilho et al., 2004), o que pode estar relacionado com a imigração de europeus vindos de regiões de alta prevalência desse genótipo (Bertolini et al., 2012).

Em relação aos subgenótipos, A1 e D4 foram os únicos encontrados. O subgenótipo A1 é o mais frequente no Brasil (Gomes-Gouvea et al., 2015) e também com o maior número de casos encontrados no último estudo realizado no estado do Maranhão (Barros et al., 2014), conduzido no Centro de Estudos do Fígado do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA) em São Luís. Além do subgenótipo A1, os autores identificaram mais quatro variantes (D2, D3, F2a e D4). Diferentemente desse último estudo, nosso trabalho encontrou poucos casos do subgenótipo A1 e alta frequência do subgenótipo D4. Vale chamar atenção sobre a diferença encontrada entre nossos resultados e aqueles de Barros et al. (2014). A explicação é relacionada à origem das amostras analisadas. No trabalho de Barros et al. (2014), a casuística provinha de doentes crônicos atendidos naquele centro de referência em São Luís, em que mais de 75% eram da grande região metropolitana do estado, que inclui a capital São Luís, São José de Ribamar, Raposa e Paço do Lumiar. Assim, o subgenótipo A1

parece ser mais prevalente nessa região metropolitana enquanto o D4 deve ser encontrado com maior frequência em algumas regiões do interior do estado. Outra questão importante se diz respeito ao fato que a capital São Luís possui maior ancestralidade europeia, de acordo com análises ancestrais por VNTRs (*Varible Numbers of Tandem Repeats*) e STR (*Short tandem Repeats*) (Ferreira et al., 2005). Não temos conhecimento de um trabalho específico de ancestralidade da população que estudamos, contudo, nossas observações mostraram uma grande quantidade de autodeclarados negros ou mulatos. Além do mais, no município de Icatu um dos municípios desse estudo, possui presença de remanescentes quilombolas (Comissão Pró-índio de São Paulo, 2016). Deste modo, isso deve também explicar a diferença genotípica do HBV encontrada entre os dois estudos (Barros et al., 2014).

O subgenótipo A1 foi o único encontrado em um povoado quilombola no município de Mirinzal no noroeste do Maranhão (Alvarado-Mora et al., 2011), que apresentava HBsAg em frequência elevada: 9/72 (12,5%). Apesar da maior frequência de infecção pelo HBV encontrada nessa população, não foi encontrada coinfecção com o HDV em nenhum caso. Além disso, esse trabalho contou com apenas quatro sequências analisadas filogeneticamente entre os nove indivíduos HBsAg positivos. Assim, nosso estudo é inédito no Maranhão no que se diz respeito ao número de amostras que representam uma região maranhense não metropolitana. Mais estudos na região quilombola de Mirinzal são necessários para que conclusões seguras sejam obtidas sobre a distribuição de subgenótipos e sobre a presença ou ausência de coinfecção com o HDV.

O subgenótipo D4 provavemente é antigo, já que foi encontrado em populações nativas de indivíduos na ilha de Papua-Nova Guiné, Austrália e no Canadá (Norder et al., 2004; Osiowy et al., 2011). Essa variante viral já foi previamente encontrada no Maranhão com uma frequência relativamente elevada (Barros et al., 2014), o que é diferente do encontrado no Brasil, onde não é frequentemente descrito. Esse subgenótipo foi primeiramente encontrado em dois estudos em diferentes regiões da área amazônica (Gomes-Gouvêa et al., 2009) e Rondônia (Santos et al., 2010). O subgenótipo D4 também já foi encontrado em 5,1% (36/702) em amostras coletadas em diferentes estados brasileiros (Gomes-Gouvêa et al., 2015), sendo a maioria do Maranhão e algumas de outros estados do sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e norte do Brasil (Pará) (Gomes-Gouvêa, 2014). Nossa hipótese é que essa variante tenha sido introduzida no Maranhão e posteriormente distribuida para os outros estados por migração interna, o que poderia justificar a presença desse subgenótipo nessas regiões, em especial o Pará, estado com maior fronteira com o Maranhão.

A alta prevalência do D4 no Maranhão sustenta a sugestão que essa variante não foi introduzida pela imigração europeia, uma vez que essa não é encontrada com frequência na Europa (Schaefer, 2007), mas já foi descrito antes na Oceania, China, Japão, Somália (Norder et al., 2004), Ruanda (Hübschen et al., 2009), Quênia (Kwange et al., 2013), Etiópia (Hundie et al., 2016); Marrocos (Baha et al., 2012), África do Sul (Amponsah-Dacosta et al., 2015), Índia (Banerjee et al., 2014), entre Inuits no Canadá (Osiowy et al., 2011), Panamá (Martinez et al., 2014) e nos paises do Caribe com grande contribuição de descendência africana na população, tais como Haiti, Martinica e Cuba (Andernach et al., 2009b; Brichler et al., 2013; Loureiro et al., 2015). Vale a pena citar que no Quênia, somente os subgenótipos A1 (85,7%) e D4 (14,3%) foram descritos (Kwange et al., 2013), mas em proporções inversas ao encontrado em nosso estudo. Como sugerido por Barros et al. (2014), o subgenótipo D4 poderia ter sido uma variante frequente no continente africano no passado, onde provavelmente, durante o periodo do tráfico de negros para diversas partes do mundo, essa tenha sido distribuída para esses vários países. Considerando outras regiões fora da África em que o subgenótipo D4 é frequente, Haiti e Cuba são os principais exemplos na América Central (Andernach et al., 2009b; Loureiro et al., 2015). Estimativas apontam que o Caribe tenha participado de uma intensa importação de negros da África no passado, perdendo apenas para o Brasil (Perbi, 2001). Assim, a história da formação populacional somado a evidências científicas de traços moleculares desses vírus podem dar suporte para melhor entendimento da dispersão de infecções como o HBV.

Em relação ao estudo filogenético, observamos que o subgenótipo D4 encontra-se agrupado em um ramo separado de outras amostras descritas fora do Brasil (com exceção de três da Índia), sugerindo que uma única introdução deve ter ocorrido no país. O subgenótipo A1 se agrupou em um ramo diferente daquele onde a maioria das sequências africanas é encontrada, e diferentemente do D4, ele se agrupou em vários ramos que contêm sequências distribuídas ao redor do mundo com poucas amostras africanas da Somália e África do Sul, sendo assim não podendo ser considerado um clado africano.

Em trabalho realizado com alguns isolados brasileiros do subgenótipo A1, foi concluído que os vírus encontrados no Brasil não são oriundos da África ocidental ou central, mas de africanos da região sudeste desse continente, trazidos ao Brasil nos meados do século 19, já que suas amostras se agruparam em um clado “asiático-americano”, assim como encontrada em nossas amostras (Lago et al., 2014). Existem poucas sequências disponíveis desses genótipos do leste da África, o que pode ser relevante considerando que alguns

registros apontam africanos trazidos ao Maranhão desses países (Meireles, 2009). Além do mais, um estudo filogeográfico realizado com várias sequências A1 de 22 países da África e do mundo, mostrou que o continente africano pode ser considerado como a fonte de dispersão dessa variante ao redor do planeta, onde essa distribuição parece ter ocorrido no mesmo momento para Ásia e América Latina (Kramvis, Paraskekevis, 2013) (figura 19). Isso pode explicar o agrupamento de algumas sequências de países da Ásia junto dos ramos A1 de nossas amostras e algumas da Índia com as nossas sequências D4.

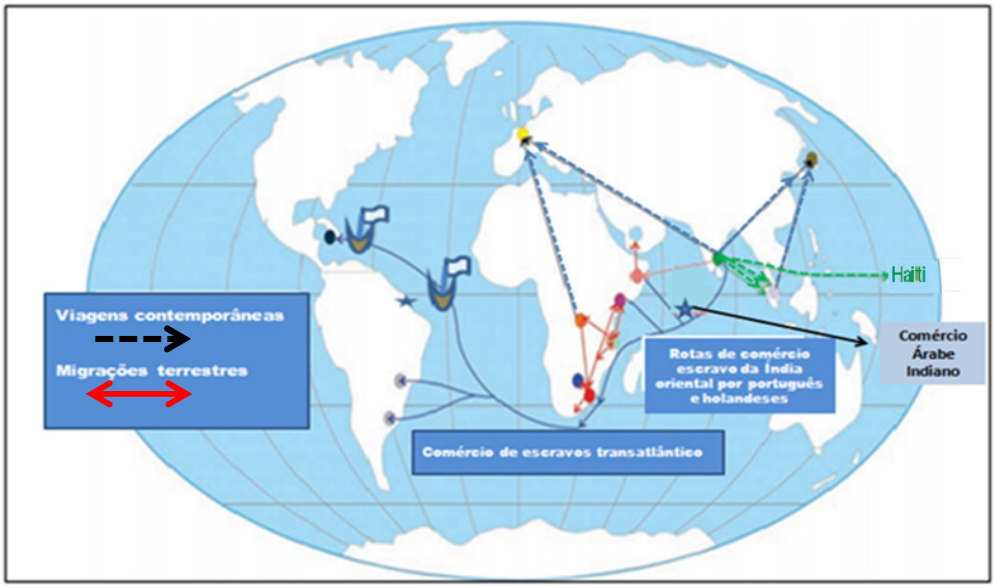


Figura 19 - Suposta origem e rotas de migração do subgenótipo A1
Fonte : Modificado de Kramvis, Parakevis, 2013.

A população brasileira é formada por três raízes ancestrais nesta ordem de contribuição: europeus, africanos e ameríndios, estando o Maranhão em uma região com maior contribuição africana (Pena et al., 2011). Nossos resultados apresentam um maior número de indivíduos que se autodeclararam como negro (24%) ou mestiço/mulato (52%), o que reforça a associação entre esses dois subgenótipos e ancestralidade africana. Além do mais, o Maranhão teve um padrão único entre os outros estados brasileiros em relação ao tráfico de negros, fazendo com que suas rotas fossem mais parecidas com aquelas das regiões do Caribe e do Atlântico norte: 1) padrão geográfico (isolado de outras regiões do país devido à falta de conexão com rios e o continente); 2) padrão de navegação (vento e correntes oceânicas) (Silva, 2008). Desse modo, o perfil molecular - epidemiológico do HBV seria provavelmente mais semelhante entre o Maranhão e países do Caribe, do que o da Bahia, por exemplo, outro estado com grande contribuição africana em sua população (Lyra et al., 2005;

Ribeiro et al., 2006). Essa hipótese é suportada através das nossas análises filogenéticas em que se observam muitas sequências de Haiti e Cuba agrupadas com as nossas sequências A1 e as já descritas no Maranhão (Barros et al., 2014). Além do mais, as nossas sequências, tanto do A1 como do D4 foram do subtipo sorológico *adw2 e ayw2,* respectivamente*,* sendo as mesmas encontradas com frequência em Cuba (Loureiro et al., 2015). Outro estudo realizado em Cuba mostrou que as sequências do genótipo A e D, eram as mesmas encontradas em nosso trabalho (Rodríguez Lay et al., 2015). Contudo, um resultado intrigante foi encontrado em Cuba por Loureiro et al. (2015), amostras com subtipo sorológico *ayw4* foram encontras em subgenótipos D4 em alta frequência. Entretando, uma reanálise dessas sequências realizada por nosso grupo (comunicação pessoal)[†], mostrou que elas de fato pertencem ao subtipo *ayw2*, o que corrobora a hipótese de que ocorreram poucas entradas desse subgenótipo no continente americano.

O HDV não é conhecido por muitas pessoas, principalmente devido à negligência sobre a infecção por esse vírus em relação àquelas causadas por outros vírus mais abordados como o HBV e HCV. Como diria o Dr. Thor Dantas:"o HDV representa uma doença negligenciada dentro do grupo das doenças negligenciadas!"(comunicação verbal)[‡]. Contudo, esse vírus em coinfecção com o HBV é extramente perigoso para o indivíduo (Farci, Niro, 2012) e mesmo com a pouca frequência encontrada em outros estados fora da região amazônica, deve ser levado em consideração entre os indivíduos portadores do HBV. Esse trabalho mostrou que na população estudada do interior do estado do Maranhão, a infecção pelo HDV é mais frequente que a infecção pelo HCV. A região amazônica ocidental é a principal na descrição da infecção pelo HDV no Brasil, onde em coinfecção com o HBV leva a casos com quadro clínico grave (Bensabath et al., 1987; Viana et al., 2005). Em outras regiões, casos isolados já foram descritos (Mendes-Correa et al., 2011; Strauss et al., 1987). No nordeste brasileiro, o Maranhão, de acordo com nosso conhecimento, foi o primeiro estado onde se observou a circulação desse vírus fora da região endêmica na Amazônia, em uma frequência de 3,8%, ou seja, cinco indivíduos anti-HD positivos dentre os 133 casos de pacientes portadores crônicos para HBV, além da confirmação do genótipo africano HDV-8, em Urbano Santos, Maranhão, Brasil (Barros et al., 2011). Em nosso estudo, o HDV foi encontrado não apenas em Urbanos Santos como também em Humberto de Campos e Morros, outras localidades do nordeste do estado do Maranhão. Deste modo, nossa pesquisa vem

[†] Informação fornecida pela Dra.Michele Gomes-Gouvea.
[‡] Informação fornecida por Dr. Thor Dantas.

confimar a presença desse vírus ao menos no nordeste do estado do Maranhão, comprovando assim os achados do trabalho anterior.

Entre as oito amostras que encontramos com o marcador anti-HD, quatro tiveram parte de seus genomas virais sequenciados e foram submetidos à análise filogenética. Todas foram classificadas no tipo africano HDV-8 que foi primeiramente descrito no mundo em indivíduos que nasceram na Africa Ocidental e Central (Le Gal et al., 2006; Makuwa et al., 2008; 2009). Nesse ano, mais sequências foram descritas no Gabão (François-Souquière et al., 2016). Já fora do continente africano, o HDV-8 foi apenas descrito no Brasil, como já mencionado, em dois indivíduos do mesmo estado do nosso estudo (Barros et al., 2011). Embora nossa amostra tenha sido coletada no mesmo estado, no primeiro trabalho os autores contaram com mais amostras (76%) de indivíduos da região metropolitana do estado. Apenas um indivíduo da capital foi descrito com o HDV-3, enquanto que o HDV-8 foi encontrado em duas pessoas não aparentadas do município de Urbano Santos, fora da área metropolitana. Não foi constatada história de viagem para outros países ou contato com indivíduos africanos, as mesmas características observadas nos indivíduos infectados com esse genótipo em nosso estudo. Além do mais, encontramos pessoas infectadas com esse genótipo do HDV em dois outros municípios, mostrando que essa infecção não é restrita a região de Urbano Santos. Assim, esse vírus provavelmente encontra-se presente em diferentes localidades do Maranhão. Estudos como esse são necessários para descobrir se essa infecção é encontrada em outras regiões do estado. Isso reforça ainda mais a necessidade da implementação de políticas públicas de saúde direcionadas para a prevenção da infecção pelo HBV, e consequentemente, pelo HDV, visando frear a cadeia de transmissão desses vírus.

Em comparação ao HBV, existem poucos estudos sobre a epidemiologia molecular do HDV. Ambos os virus não são antigos em relação a suas descobertas, com não menos de uma década entre eles (Blumberg et al., 1965; Rizzeto et al., 1977). A principal explicação para os poucos estudos nessa área é relacionada com a ideia que a vacinação para o HBV nos anos 90 poderia reduzir também significativamente o HDV, sendo assim, estudos sobre o HDV acabaram sendo deixados de lado por mais de uma década (Ahn, Gish, 2014; Rizzeto, Ciancio, 2012). Portanto, a despeito do pequeno número de casos descritos aqui, cuidados devem ser tomados para que o HDV não venha a ser um problema significativo no futuro, dado que infecções virais podem vir a se espalhar rapidamente, como é o caso das pandemias recorrentes por vírus respiratórios, em particular, o vírus Influenza, e dos vírus transmitidos pelo *Aedes aegypti,* como Dengue, Chikungunya e Zika, grandes problemas atuais de saúde

pública e massivamente informados nos meios de comunicação. Os vírus das hepatites B e Delta têm como principais meios de transmissão as vias sexual e parenteral e sua transmissão pode ser prevenida com o uso da vacina contra hepatite B. Ainda contamos com um grande número de casos crônicos destas doenças em áreas rurais de difícil acesso a programas de vacinação e controle, onde parcela importante da população pode estar susceptível a essas infecções.

As primeiras variantes do HDV-8 foram identificadas na França, e o único fator de risco associados a essa infecção foi que os portadores deveriam ter sido infectados nos seus países de origem (Senegal e Costa do Marfim) onde viveram durante a infância (Le Gal et al., 2006). Além do mais, uma cepa isolada no Congo, antes classificada como HDV-7 foi retificada como HDV-8 (Le Gal et al., 2006; Radjef et al., 2004). Outros casos de genótipo 8 na África já foram encontrados no Gabão (François-Souquière et al., 2016; Makuwa et al., 2008; 2009). Somando essas útimas informações com aquela sobre a coinfecção HDV-8/HBV-D4 encontrada em dois indivíduos do nosso estudo inicial, reforça a hipótese de que essas variantes tenham tido origem na África (Barros et al., 2011), pois o subgenótipo D4 é raro no mundo, sendo encontrado principalmente em países desse continente assim como em países com passado de formação populacional com grande contribuição africana de acordo com registros históricos (Andernach et al., 2009b; Barros et al., 2011; Brichler et al., 2013; Hübschen et al., 2009; Kwange et al., 2013; Loureiro et al., 2015; Osiowy et al., 2011; Perbi, 2001).

Nossos isolados do HDV-8 junto com os dois descritos de Barros et al. (2011) se agruparam em um único grupo, com 100% de probabilidade posterior. Esse padrão é diferente do encontrado recentemente em trabalho no Gabão, onde um agrupamento de dois subgrupos distintos foi observado (François-Souquière et al., 2016). Outra característica que nos chama atenção é o fato que o padrão monofilético encontrado em nossas amostras também foi encontrado em individuos infectados com o HBV-D4 em mono ou coinfecção com o HDV-8 (Barros et al., 2011). Da mesma forma desse último trabalho, tivemos entre nossas amostras dois casos de coinfecção HDV-8/HBV-D4 entre as quatro amostras submetidas a sequenciamento do genoma viral do HDV. Esses dois indivíduos eram homens da zona rural de Humberto de Campos, o qual não é um município vizinho a Urbano Santos, cidade onde foram encontrados os últimos casos de HDV-8 no Brasil como já mencionado. Isso nos leva a crer que esse isolado tenha sido introduzido apenas uma vez no Maranhão junto com o subgenótipo D4 do HBV.

Devido aos poucos estudos disponíveis para discutir sobre a presença do HDV-8 no Brasil, a história pode ser uma grande ferrramenta para explicar a conexão entre o Brasil e a África. Assim, fazendo um paralelo entre Maranhão, África e Caribe, em relação ao tráfico de negros no passado, encontramos observações interessantes. Primeiramente, as principais cargas de africanos para o Maranhão era da África ocidental (Meireles, 2009; Silva, 2008) onde as primeiras variantes do HDV-8 foram encontradas (Le Gal et al., 2006). Segundo, como já mencionado para o HBV, algumas características geográficas e de navegação (vento e correntes oceânicas) fez o Maranhão adotar o comércio de negros dos países do Atlântico norte (Silva, 2008) (Figure 20). Infelizmente, dados de estudos sobre a infecção do HDV em países do Caribe são inexistentes, de acordo com nosso conhecimento, o que nos daria mais base sobre a introdução do HDV-8. Desse modo, a identificação do HDV-8 no Maranhão está provavelmente relacionada com o tráfico de negros no passado (Barros et al., 2011), uma vez que nenhum dos indivíduos que tinha essa infecção relataram contato com africanos. Vale notar também que todos os indivíduos infectados com essa cepa declararam-se como negros ou mestiços/mulatos, o que corrobora a grande contribuição africana durante o comércio negreiro de escravos para o Novo Mundo e a informação que o Maranhão está em uma região com maior ancestralidade africana do Brasil (Pena et al., 2011; Silva, 2008).

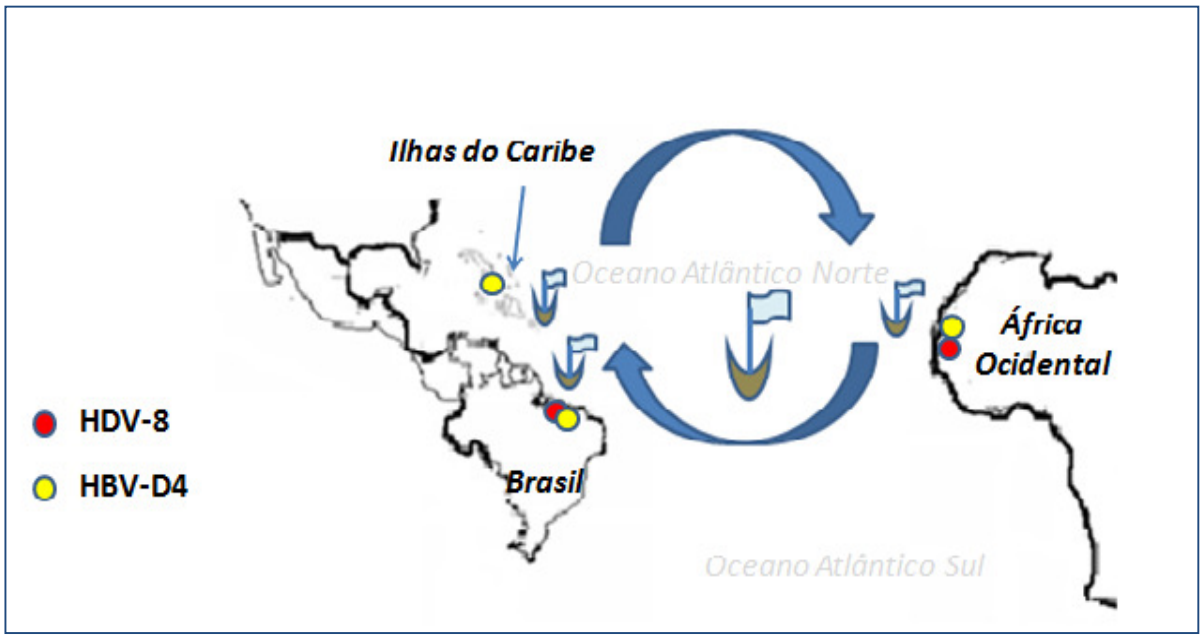


Figura 20 - Esquema representativo da hipótese de introdução do HDV-8 no Maranhão. As setas representam a oritentação do vento e correntes marítimas.
Fonte: Autoria própia

Assim, os nossos achados permitem confirmar a hipótese que a população rural do nordeste do estado do Maranhão permaneceu relativamente isolada dos outros grupos populacionais do Brasil e que os agentes infecciosos nela encontrados refletem muito mais aqueles presentes na região de onde vieram (i.e., o genótipos A1 e D4 do HBV e o genótipo 8 do HDV) do que outros agentes que mais recentemente se espalharam pelo mundo, como é o caso do HCV e de outros genótipos do HBV e HDV comumente encontrados em outras populações de nosso país. É interessante verificar nesta população qual o padrão de frequência e de diversidade genotípica seriam encontrados para diversos outros patógenos presentes pelo mundo, pois o isolamento populacional deste grupo pode trazer padrões diferentes dessas infecções do que o encontrado em outras populações brasileiras.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- ✓ A região dos cinco municípios estudados apresentou importantes prevalências de infecção ativa para o HBV e HDV, mas não foram encontradas evidências de infecção ativa para o HCV;
- ✓ A região estudada possui uma baixa diversidade de variantes genéticas do HBV, sendo apenas os subgenótipos A1 e D4 encontrados;
- ✓ Os estudos filogenéticos mostraram mesmo comportamento dos subgenótipos encontrados em estudos passados. O D4 parece ter sido introduzido através de uma única cepa enquanto o A1 possui comportamento de várias introduções;
- ✓ O subgenótipo D4 foi provavelmente introduzido no período de tráfico de negros, pelas mesmas rotas marítimas dos países do Caribe devido ao padrão semelhante de comércio escravo com o Maranhão;
- ✓ Foi confirmada a presença do tipo africano HDV-8. Com ajuda de embasamento histórico e a informação de que esse é encontrado apenas na África, reforçamos a hipótese que esse tenha sido introduzido no período de tráfico de negros junto com o HBV-D4.

REFERÊNCIAS[§]

Abbas Z, Afzal R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. World J Hepatol. 2013;5(12): 666-75.

Abdou Chekaraou M, Brichler S, Mansour W, Le Gal F, Garba A, Deny P et al. A novel hepatitis B virus (HBV) subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains. J Gen Virol. 2010; 91(Pt 6): 1609-20.

Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(22): 12766-71.

Ahn J, Gish RG. Hepatitis D Virus: A Call to Screening. Gastroenterology & Hepatology; 2014, 10(10): 647-86.

Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. Lancet. 1971; 2(7736): 1225-7.

Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. Lancet. 1978; 1(8062): 459-63.

Alvarado-Mora MV, Botelho L, Gomes-Gouvea MS, de Souza VF, Nascimento MC, Pannuti CS, et al. Detection of Hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhao, Brazil. Virol J. 2011; 8: 415.

Alves C, Branco C, Cunha C. Hepatitis delta virus: a peculiar virus. Adv Virol. 2013; 2013: 560105.

Amponsah-Dacosta E, Lebelo RL, Rakgole JN, Selabe SG, Gededzha MP, Mayaphi SH, et al. Hepatitis B virus infection in post-vaccination South Africa: occult HBV infection and circulating surface gene variants. J Clin Virol. 2015; 63: 12-7.

Andernach IE, Hubschen JM, Muller CP. Hepatitis B virus: the genotype E puzzle. Rev Med Virol. 2009a; 19(4): 231-40.

Andernach IE, Nolte C, Pape JW, Muller CP. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. Emerg Infect Dis. 2009b; 15(8): 1222-8.

Andernach IE, Leiss LV, Tarnagda ZS, Tahita MC, Otegbayo JA, Forbi JC, et al. Characterization of hepatitis delta virus in sub-Saharan Africa. J Clin Microbiol. 2014; 52(5): 1629-36.

[§] De acordo com: International Commitee of Medical Journal Editors. [Internet].Uniform requirements for manuscripts submited to biomedical journals (Vancouver). [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. J Virol. 2002; 76(14): 6919-28.

Antaki N, Craxi A, Kamal S, Moucari R, Van der Merwe S, Haffar S, et al. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. Liver Int. 2010; 30(3): 342-55.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. J Gen Virol. 2002; 83(Pt 8): 2059-73.

Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. Virol J. 2011; 8: 161.

Atoom AM, Taylor NG, Russell RS. The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein. Virology. 2014; 462-463: 377-87.

Baha W, Ennaji MM, Lazar F, Melloul M, El Fahime E, El Malki A, et al. HBV genotypes prevalence, precore and basal core mutants in Morocco. Infect Genet Evol. 2012; 12(6): 1157-62.

Banerjee A, Kurbanov F, Datta S, Chandra PK, Tanaka Y, Mizokami M, et al. Phylogenetic relatedness and genetic diversity of hepatitis B virus isolates in Eastern India. J Med Virol. 2006; 78(9): 1164-74.

Banerjee P, Mondal RK, Nandi M, Ghosh S, Khatun M, Chakraborty N, et al. A rare HBV subgenotype D4 with unique genomic signatures identified in north-eastern India--an emerging clinical challenge? PLoS One. 2014; 9(10): e109425.

Barros LM, Gomes-Gouvea MS, Pinho JR, Alvarado-Mora MV, Dos Santos A, Mendes-Correa MC, et al. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? Virus Res. 2011; 160(1-2): 333-9.

Barros LM, Gomes-Gouvea MS, Kramvis A, Mendes-Correa MC, dos Santos A, Souza LA, et al. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhao state, Northeast Brazil. Infect Genet Evol. 2014; 24: 68-75.

Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H: Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. J Virol. 1993; 67: 3835-44.

Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. World J Gastroenterol. 2007; 13(1): 48-64.

Becker CE, Mattos AA, Bogo MR, Branco F, Sitnik R, Kretzmann NA . Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil. Arq Gastroenterol. 2010; 47 (1): 13-17.

Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. EMBO J. 1996; 15(1): 12-22.

Beijerinck MW. Concerning a contagium vivum fluidum as a cause of the spot-disease of tobacco leaves. Verh. Akad. Wet. Amsterdam. 1898; 2(6): 3-21.

Bensabath G, Hadler SC, Soares MC, Fields H, Dias LB, Popper H, et al. Hepatitis delta virus infection and Labrea hepatitis. Prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon Basin. JAMA. 1987; 258(4): 479-83.

Bertolini DA, Gomes-Gouvea MS, Carvalho-Mello IM, Saraceni CP, Sitnik R, Grazziotin FG et al. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. Infect Genet Evol. 2012; 12(6): 1295-1304.

Beutels P. Economic evaluations of hepatitis B immunization: a global review of recent studies (1994-2000). Health Econ. 2001; 10(8): 751-74.

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "New" Antigen in Leukemia Sera. JAMA. 1965; 191: 541-6.

Blumberg BS. Hepatitis B - The hunt for a killer virus. Princeton: Princeton University Press; 2002. 244 p.

Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, Gravelle CR, Ebert JW, Maynard JE. Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. Lancet. 1981; 1(8219): 550-1.

Bottecchia M, Souto FJ, O KM, Amendola M, Brandão CE, Niel C, Gomes SA. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. BMC Microbiol. 2008; 8: 11.

Bouckaert R, Alvarado-Mora MV, Pinho JR. Evolutionary rates and HBV: issues of rate estimation with Bayesian molecular methods. Antivir Ther. 2013; 18(3 Pt B): 497-503.

Bouvier GL, Williams A. Serotypes of hepatitis B antigen (HBs Ag): the problem of "new" determinants, as exemplified by "t". Am J Med Sci. 1975; 270(1): 165–71.

Bowden S. Serological and molecular diagnosis. Semin Liver Dis. 2006; 26(2): 97-103.

Braga WS, Brasil LM, Souza RA, Castilho MC, Fonseca JC. The occurrence of hepatitis B and delta virus infection within seven Amerindian ethnic groups in the Brazilian western Amazon. Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34: 349-55.

Branch AD, Robertson HD. A replication cycle for viroids and small infectious RNAs. Science. 1984; 223 (4635): 450–55.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites virais: o Brasil está atento. 3ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Hepatites virais no Brasil: situações, ações e agenda. Brasília: Ministério da Saúde. 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Boletim epidemiológico em Hepatites virais. Brasília: Ministério da Saúde. 2012.

Brichler S, Lagathu G, Chekaraou MA, Le Gal F, Edouard A, Deny P, et al. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. J Gen Virol. 2013; 94(Pt 10): 2318-29.

Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, Pereira LMMB, Coelho HSM, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CMC and Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. Braz J Med Biol Res. 2005; 38(1): 41-9.

Castilho M da C, Costa de Oliveira CM, Gimaque JB de L, Leão JDT, Braga WSM. Epidemiology and Molecular Characterization of Hepatitis B Virus Infection in Isolated Villages in the Western Brazilian Amazon. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2012; 87(4): 768-74.

Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JRR, Mello IMVGC, Bertolini DA, Lemos MF, Moreira RC, Bassit LC, Cardoso RA, Ribeiro-dos-Santos G, Da Silva LC. Hepatitis B virus infection in haemodialysis centres from Santa Catarina State, southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. BMC Public Health. 2004; 4: 13.

Casey JL, Brown TL, Colan EJ, Wignall FS, Gerin JL. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993; 90(19): 9016-20.

Casey JL. RNA editing in hepatitis delta virus. Curr Top Microbiol Immunol. 2006; 307: 67–89.

Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, Silvestry M, Kuhn RJ, Rice CM. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110(23): 9505-10.

Centers for Disease Control and Prevention [homepage]. Atlanta: Division of Viral Hepatitis and National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention 2008. Hepatitis B FAQs for the public [Citado 28 Nov. 2014]. Available from: http://www.cdc.gov/hepatitis/B/bFAQ.htm.

Centers for Disease Control and Prevention [homepage]. Public Health Image Library. This electron micrograph reveals the presence of hepatitis-B virus HBV "Dane particles", or virions. 2005. Available from: http://phil.cdc.gov/phil/download.asp.

Chen CJ, Wang LY, Yu MW. Epidemiology of hepatitis B virus infection in the Asia-Pacific region. J Gastroenterol Hepatol. 2000; 15 Suppl: E3–6.

Chevaliez S, Pawlotsky JM. Diagnosis and management of chronic viral hepatitis:antigens, antibodies and viral genomes. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2008; 22(6): 1031-48.

Chevaliez S, Pawlotsky JM. How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C. Liver Int. 2009; 29 Suppl 1: 9-14.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science. 1989; 244(4902): 359-62.

Clemente CM, Carrilho FJ, Pinho JRR, Ono-Nita SK, Da Silva LC, Moreira RC, Lemos MF, de Carvalho Mello IM. A phylogenetic study of hepatitis B virus in chronically infected Brazilian patients of Western and Asian descent. J Gastroenterol. 2009; 44 (6): 568-76.

Comissão Pró-índio de São Paulo [internet]. São Paulo: Comissão Pró-índio de São Paulo c1995-2008 [citado em 9 junho de 2016]. Available from: http://www.cpisp.org.br/terras/asp/terras_tabela.aspx.

Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. Liver Int. 2011;31 Suppl 2: 30-60.

Crispim MA, Fraiji NA, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MM, Kiesslich D. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. BMC Infect Dis. 2014; 14: 94.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet. 1970; 1(7649): 695–98.

Datta S, Chatterjee S, Veer V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B Vírus. World J Gastroenterol. 2014; 20(40): 14615-25.

Daya S, Berns KI. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors.Clinical Microbiology Reviews. 2008; 21(4): 583-593.

De Abreu RL. Map of Maranhão state [SVG file]. 2016. 758 × 990 pixels. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMaranhao_MesoMicroMunicip.svg.

Degertekin H, Yalcin K, Yakut M, Yurdaydin C. Seropositivity for delta hepatitis in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis in Turkey: a meta-analysis. Liver Int. 2008; 28(4): 494–8.

Denniston KJ, Hoyer BH, Smedile A, Wells FV, Nelson J, Gerin JL. Cloned fragment of the hepatitis delta virus RNA genome: sequence and diagnostic application. Science. 1986; 232 (4752): 873-5.

Dény P. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? Curr Top Microbiol Immunol. 2006; 307: 151-71.

Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC et al. Subgenotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. J Med Virol. 2008; 80 (1): 20-6.

Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol Biol. 2007; 7: 214.

Dunford L, Carr MJ, Dean J, Nguyen LT, Ta Thi TH, Nguyen BT et al. A multicentre molecular analysis of hepatitis B and blood-borne virus coinfections in Viet Nam. Plos One. 2012; 7 (6): e39027.

Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membranealterations including a can didate viral replication complex. J Virol. 2002; 76(12): 5974-84.

El-Zanaty F, Way A. Egypt Demographic and Health Survey, 2008, Ministry of Health and Population. 2009.

Enomoto N, Takada A, Nakao T, Date T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. Biochem Biophys Res Commun. 1990; 170(3): 1021-5.

Farci P, Niro GA. Clinical features of hepatitis D. Semin Liver Dis. 2012; 32(3):228-36.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. N Engl J Med. 1975; 292(15): 767-70.

Ferreira CT, Silveira TR. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. Rev Bras Epidemiol. 2004; 7 (4): 473-87.

Ferreira FL, Leal-Mesquita ER, Santos SEB and Ribeiro-dos-Santos AKC. Genetic characterization of São Luís, MA, Brazil. Genet Mol Biol. 2005; 28: 22-31.

FigTree v.1.4.2. [(acesso em May 2015)]. Available online: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/.

Findlay GM, MacCallum FO. Note on acute hepatitis and yellow fever immunization. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1937; 31(3): 297–308.

Findlay GM, MacCallum FO. Hepatitis and jaundice associated with immunization against certain virus diseases. Proc R Soc Med. 1938; 31(7): 799–806.

Flores R, Ruiz-Ruiz S, Serra P. Viroids and hepatitis delta virus. Semin Liver Dis. 2012; 32(3): 201–10.

Fonseca JC, Simonetti SR, Schatzmayr HG, Castejon MJ, Cesario AL, Simonetti JP. Prevalence of infection with hepatitis delta virus (HDV) among carriers of hepatitis B surface antigen in Amazonas State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988; 82(3): 469–71.

Francois-Souquiere S, Makuwa M, Bisvigou U, Kazanji M. Epidemiological and molecular features of hepatitis B and hepatitis delta virus transmission in a remote rural community in central Africa. Infect Genet Evol. 2016; 39: 12-21.

Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. Nature. 1979; 281 (5733): 646 – 50.

Gazina EV, Fielding JE, Lin B, Anderson DA. Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. J Virol. 2000; 74(10)**:** 4721-28.

Gerlich WH.. Medical virology of hepatitis B: How it began and where we are now. Virol J. 2013; 10: 239.

Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. American association for the study of liver diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. Hepatology.2009; 49: 1335–74.

Glebe D, Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus. Semin Liver Dis. 2013; 33(2): 103-12.

Glebe D, König A. Molecular virology of hepatitis B virus and targets for antiviral intervention. Intervirology. 2014; 57(3-4): 134-40.

Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. Int J Epidemiol. 2005; 34(6): 1329-39.

Gomes-Gouvêa MS, Pereira Soares Mdo C, Guedes de Carvalho Mello IM, Brito EM, Pereira Moia Lde J, Bensabath G et al. Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin. Acta Trop. 2008; 106(3): 149-55.

Gomes-Gouvêa MS, Soares MC, Bensabath G, de Carvalho-Mello IM, Brito EM, Souza OS et al. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. J Gen Virol. 2009; 90(pt 11): 2638-43.

Gomes-Gouvêa MS. Prevalência de resistência primária aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite B entre pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B não submetidos a tratamento (Tese de doutorado [Ciências em Gastroenterologia]). São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Gomes-Gouvea MS, Ferreira AC, Teixeira R, Andrade JR, Ferreira AS, Barros LM, et al. HBV carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naive patients. Antivir Ther. 2015; 20(4): 387-95.

Goyal A, Murray JM. The Impact of Vaccination and Antiviral Therapy on Hepatitis B and Hepatitis D Epidemiology. Plos One. 2014; 9(10): e110143.

Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(22): 10583-7.

Gusatti CS, Costi C, Halon ML, Grandi T, Medeiros AF, Silva CM, et al. Hepatitis B Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapeco, Southern Brazil, Originate from Italy. PLoS One. 2015; 10(8): e0135816.

Haley RW, Fischer RP. Commercial tattooing as a potentially important source of hepatitis C infection. Clinical epidemiology of 626 consecutive patients unaware of their hepatitis C serologic status. Medicine (Baltimore). 2001; 80(2): 134-51.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. Nucleic Acids Symp Ser. 1999; 41: 95–8.

Hanafiah MK, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. Hepatology. 2013; 57(4): 1333-42.

He LF, Ford E, Purcell RH, London WT, Phillips J, Gerin JL. The size of the hepatitis delta agent. J Med Virol. 1989; 27(1): 31-3.

He W, Ren B, Mao F, Jing Z, Li Y, Liu Y, Peng B, Yan H, Qi Y, Sun Y, Guo JT, Sui J, Wang F2,Li W. Hepatitis D Virus Infection of Mice Expressing Human Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide. PLoS Pathog. 2015; 11(4): e1004840.

Hoffman B, Liu Q. Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. Liver Int. 2011; 31(10): 1449–67.

Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. Science. 1982; 215(4540): 1577-85.

Holmes EC. The RNA virus quasispecies: fact or fiction? J Mol Biol. 2010; 400(3): 271-3.

Houghton M. Discovery of the hepatitis C virus. Liver Int. 2009; 29 Suppl 1: 82-8.

Huang WH, Chen YS, Chen PJ. Nucleolar targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication. J Virol. 2008; 82(2): 692-9.

Hübschen JM, Mugabo J, Peltier CA, Karasi JC, Sausy A, Kirpach P et al. Exceptional genetic variability of hepatitis B virus indicates that Rwanda is east of an emerging African genotype E/A1 divide. J Med Virol. 2009; 81: 435-40.

Hübschen JM, Mbah PO, Forbi JC, Otegbayo JA, Olinger CM, Charpentier E et al. Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(1): 88-94.

Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. The Lancet. 2011; 378(9785): 73-85.

Hundie GB, Raj VS, Michael DG, Pas SD, Osterhaus AD, Koopmans MP, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus in Ethiopia. J Med Virol. 2016; 88(6): 1035-43.

Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. J Gen Virol. 2004; 85(Pt 2): 283-92.

Huy TTT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. J Virol. 2008; 82 (11): 5657-63.

Imazeki F, Omata M, Ohto M. Heterogeneity and evolution rates of delta virus RNA sequences. J Virol. 1990; 64 (11): 5594-9.

Imazeki F, Omata M, Ohto M. Complete nucleotide sequence of hepatitis delta virus RNA in Japan. Nucleic Acids Research. 1991; 19(19): 5439.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo demográfico 2010: Resultados gerais da amostra. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2012. 239p.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [homepage]. Virus Taxonomy; 2014. [citado em 21 de Janeiro de 2016]. Available from: http://www.ictvonline.org/index.asp.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [homepage]. Virus Taxonomy; 2015. [citato em 1 de Junho, 2016]. Available from: http://www.ictvonline.org/index.asp.

Ishida S, Kaito M, Kohara M, Tsukiyama-Kohora K, Fujita N, Ikoma J et al. Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. Hepatol Res. 2001; 20(3): 335-47.

Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, Gault E, Semenov S, Salhi M et al. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. J Gen Virol. 2001; 82(Pt 11): 2709-18.

Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. J Virol. 2007; 81 (16): 8374-83.

Jones DM, McLauchlan J. Hepatitis C virus: assembly and release of virus particles. J Biol Chem. 2010; 285(30): 22733-9.

Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. J Gen Virol. 1994; 75 (Pt 7): 1755-60.

Karataylı E, Altunoğlu YÇ, Karataylı SC, Alagöz SG, Cınar K, Yalçın K et al. A one step real time PCR method for the quantification of hepatitis delta virus RNA using an external armored RNA standard and intrinsic internal control. J Clin Virol. 2014; 60(1): 11-5.

Kato H, Fujiwara K, Gish RG, Sakugawa H, Yoshizawa H, Sugauchi F et al. Classifying genotype F of hepatitis B virus into F1 and F2 subtypes. World J. Gastroenterol. 2005; 11(40): 6295–304.

Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. Virus Res. 2007; 127(2): 164-76.

Kershenobich D, Razavi HA, Sanchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. Liver Int. 2011; 31 Suppl 2:18-29.

Köck J, Rösler C, Zhang JJ, Blum HE, Nassal M, Thoma C. Generation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Viruses via Intracellular Recycling Is Regulated in a Virus Specific Manner. PLoS Pathog. 2010; 6(9): e1001082.

Kramvis A, Kew MC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. Hepatol Res. 2007; 37(s1): S9-S19.

Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. J Med Virol. 2008; 80(1): 27-46.

Kramvis A, Paraskevis D. Subgenotype A1 of HBV-tracing human migrations in and out of Africa. Antivir Ther. 2013; 18(3 Pt B): 513-21.

Kretzer IF, do Livramento A, da Cunha J, Goncalves S, Tosin I, Spada C, et al. Hepatitis C worldwide and in Brazil: silent epidemic--data on disease including incidence, transmission, prevention, and treatment. Scientific World Journal. 2014; 2014: 827849.

Krieger SE, Zeisel MB, Davis C, Thumann C, Harris HJ, Schnober EK et al. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. Hepatology. 2010; 51(4): 1144-57.

Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanya D, Zekeng L, et al. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. J Gen Virol. 2005; 86(Pt 7): 2047-56.

Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. Hepatol Res. 2010; 40(1): 14–30.

Kwange SO, Budambula NL, Kiptoo MK, Okoth F, Ochwoto M, Oduor M et al. Hepatitis B virus subgenotype A1, occurrence of subgenotype D4, and S gene mutations among voluntary blood donors in Kenya. Virus genes. 2013; 47: 448-55.

Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature. 1989; 339(6221): 237–238.

Lago BV, Mello FC, Kramvis A, Niel C, Gomes SA. Hepatitis B Virus Subgenotype A1: Evolutionary Relationships between Brazilian, African and Asian Isolates. PLoS One. 2014; 9(8): e105317.

Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A, et al. Genetic diversity of HCV in Brazil. Antivir Ther. 2013; 18(3 Pt B): 435-44.

Lange C, Sarrazin C. Diagnostic tests in acute and chronic hepatitis C. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. Hepatology: a clinical text book. Germany: Flying Publisher; 2010. p. 159-70.

Le Gal F, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E et al. Eighth major clade for hepatitis delta virus. Emerg Infect Dis. 2006; 12(9): 1447-50.

Lee CZ, Chen PJ, Chen DS. Large hepatitis delta antigen in packaging and replication inhibition: role of the carboxyl-terminal 19 amino acids and amino-terminal sequences. J Virol. 1995; 69(9): 5332-6.

Leitner T. The use of Molecular epidemiology In: Leitner T editor. The Molecular Epidemiology of Human Viruses. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2002. pp. 1-9.

Lemoine M, Nayagam S, Thursz M. Viral hepatitis in resource-limited countries and access to antiviral therapies: current and future challenges. Future Virol. 2013; 8(4): 371-80.

Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. Hepatology. 2009; 49 suppl 5: S13-S21.

Lin C, Wu JW, Hsiao K, Su MS. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. J Virol. 1997; 71:6465–71.

Lindh M. HBV genotype G-an odd genotype of unknown origin. J Clin Virol. 2005; 34(4): 315–6.

Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. J Virol. 2009; 83: 2011-14.

Lobato C, Tavares-Neto J, Rios-Leite M, Trepo C, Vitvitski L, Parvaz P et al.. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon Region: epidemiologic and biomolecular study. J Gastroenterol Hepatol. 2006; 21 (5): 863-8.

Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). Semin Cancer Biol. 2013; 23(6 Pt B): 561-75.

Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection. Antivir Ther. 2010; 15 Suppl 3:3-14.

Loureiro CL, Aguilar JC, Aguiar J, Muzio V, Penton E, Garcia D, et al. HBV genotypic variability in Cuba. PLoS One. 2015; 10(3): e0118959.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 2012; 380(9859): 2095-128.

Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M et al. Hepatitis B Virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. J Hepatol. 2011; 55(5): 996-1003.

Lunel-Fabiani F, Mansour W, Amar AO, Aye M, Le Gal F, Malick FZ et al. Impact of hepatitis B and delta virus co-infection on liver disease in Mauritania: a cross sectional study. J Infect. 2013; 67(5): 448-57.

Lyra AC, Pinho JR, Mello IM, de M Malta F, Gomes MM, Di Bisceglie AM, et al. Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among patients with acute viral hepatitis. J Clin Gastroenterol. 2005; 39(1): 81-2.

Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG, et al. The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. PLoS Med 2009; 6: e1000198.

Major ME, Mihalik K, Fernandez J, Seidman J, Kleiner D, Kolykhalov AA et al. Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. J Virol. 1999; 73(4): 3317-25.

Makuwa M, Caron M, Souquiere S, Malonga-Mouelet G, Mahe A, Kazanji M. Prevalence and genetic diversity of hepatitis B and delta viruses in pregnant women in Gabon: molecular evidence that hepatitis delta virus clade 8 originates from and is endemic in central Africa. J Clin Microbiol. 2008; 46 (2): 754-6.

Makuwa M, Mintsa-Ndong A, Souquiere S, Nkoghe D, Leroy EM, Kazanji M. Prevalence and molecular diversity of hepatitis B virus and hepatitis delta virus in urban and rural populations in northern Gabon in central Africa. J Clin Microbiol. 2009; 47 (7)**:** 2265-8.

Manock SR, Kelley PM, Hyams KC, Douce R, Smalligan RD,Watts DM et al. An outbreak of fulminant hepatitis delta in the Waorani, an indigenous people of the Amazon basin of Ecuador. Am J Trop Med Hyg. 2000; 63 (3-4): 209-13.

Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R et al. A population of different but closelyrelated genomes: quasispecies nature of HCV genome dis tribution. J Virol. 1992; 66 (5): 3225-9.

Martin NA. The discovery of viral hepatitis: a military perspective. J R Army Med Corps. 2003; 149(2): 121-4.

Martinez AA, Zaldivar YY, Group C-N, De Castillo Z, Ortiz AY, Mendoza Y, et al. High diversity of hepatitis B virus genotypes in Panamanian blood donors: a molecular analysis of new variants. PLoS One. 2014; 9(8): e103545.

Martins RM, Vanderborght BO, Yoshida CF. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93 (3): 299-300.

Meireles MC. As conexões do Maranhão com a África no tráfico atlântico de escravos na segunda metade do século XVIII. Outros Tempos. 2009; 6: 130-144.

Meldal BHM, Moula NM, Barnes IHA, Boukef K, Allain JP. A novel hepatitis B virus subgenotype, D7, in Tunisian blood donors. J. Gen. Virol. 2009; 90(pt 7): 1622-28.

Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. BMC Microbiol. 2007; 7: 103.

Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds P. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. J Gen Virol. 1995; 76 (Pt 10): 2493-2507.

Mendes-Correa MC, Gomes-Gouvêa MS, Alvarado-Mora MV, Da Silva MH, Lázari C, Cavalcanti NC, Alonso FK, Carpinelli CC, Uip DE, Pinho JR. Hepatitis delta in HIV/HBV co-infected patients in Brazil: is it important? Int J Infect Dis. 2011; 15(12): e828-32.

Merrill RM, Hunter BD. Seroprevalence of markers for hepatitis B viral infection. Int J Infect Dis. 2011; 15(2): e78-e121.

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology. 2015; 61(1): 77-87.

Mizokami M, Orito E, Ohba K, Ikeo K, Lau JYN, Gojobori T. Constrained evolution with respect to gene overlap of hepatitis B virus. J Mol Evol. 1997; 44 Suppl 1: S83-90.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. Nat Rev Microbiol. 2007; 5(6): 453-63.

Motta-Castro AR, Yoshida CF, Lemos ER, Oliveira JM, Cunha RV, Ximenez LL et al. Seroprevalence of Hepatitis B virus infection among an Afro-descendant community in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 13-17.

Moura IF, Lopes EP, Alvarado-Mora MV, Pinho JR, Carrilho FJ. Phylogenetic analysis and subgenotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. Infect Genet Evol. 2013; 14: 195-9.

Mulyanto R, Depamede SN, Surayah K, Tsuda F, Ichiyama K, Takahashi M et al. A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in Indonesia: identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. Arch Virol. 2009; 154(7): 1047-59.

Mulyanto R, Depamede SN, Surayah K, Tjahyono AA, Jirintai, Nagashima S, et al. Identification and characterization of novel hepatitis B virus subgenotype C10 in Nusa Tenggara, Indonesia. Arch Virol. 2010; 155(5): 705-15.

Mulyanto R, Depamede SN, Wahyono A, Jirintai, Nagashima S, Takahashi M, et al. Analysis of the full-length genomes of novel hepatitis B virus subgenotypes C11 and C12 in Papua, Indonesia. J Med Virol. 2011; 83(1): 54-64.

Mulyanto R, Pancawardani P, Depamede SN, Wahyono A, Jirintai S, Nagashima S, et al. Identification of four novel subgenotypes (C13–C16) and two inter-genotypic recombinants (C12/G and C13/B3) of hepatitis B virus in Papua province, Indonesia. Virus Res. 2012; 163(1): 129-40.

Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y et al. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with antiviraltherapy determined by u ltra-deep sequencing. PLoS One. 2011; 6(9): e24907.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Taxonomy browser [internet]. [Citado 18/04/2016]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=11102.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank [database]. [Citado 05/10/2014]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank.

Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF, Gaspar AM, Repp R, Gerlich WH. Identification of a new hepatitis-B-virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. J Gen Virol. 1993; 74 (Pt 8): 1627-32.

Nebbia G, Peppa D, Maini MK. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. QJM. 2012; 105(2): 109-13.

Neddermann P, Clementi A, De Francesco R. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. J Virol. 1999; 73: 9984–91.

Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. Science. 1998; 282: 103-7.

Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. J Gen Virol. 1992; 73 (Pt 12): 3141-5.

Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis b virus, four of which represent two new genotypes. Virology. 1994; 198(2): 489-503.

Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. Intervirology. 2004; 47(6): 289-309.

Nurainy N, Muljono DH, Sudoyo H, Marzuki S. Genetic study of hepatitis B virus in Indonesia reveals a new subgenotype of genotype B in east Nusa Tenggara. Arch Virol. 2008; 153(6): 1057–65.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. J Gen Virol. 1988; 69 (Pt 10): 2575-83.

Okochi K, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. Vox Sang. 1968; 15(5): 374-85.

Olinger CM, Venard V, Njayou M, Oyefolu AO, Maïga I, Kemp AJ et al. Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. J Gen Virol. 2006; 87(Pt 5): 1163-73.

Oliveira ML, Bastos FI, Telles PR, Yoshida CF, Schatzmayr HG, Paetzold U et al. Prevalence and risk factors for HBV, HCV and HDV infections among injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Med Biol Res. 1999; 32(9): 1107-14.

Opaleye OO, Japhet OM, Adewumi OM, Omoruyi EC, Akanbi OA, Oluremi AS, et al. Molecular epidemiology of hepatitis D virus circulating in Southwestern Nigeria. Virol J. 2016; 13(1): 61.

Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horilke N, Hino K et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. Hepatology. 2001; 34(3): 590-94.

Osiowy C, Larke B, Giles E. Distinct geographical and demographic distribution of hepatitis B virus genotypes in the Canadian Arctic as revealed through an extensive molecular epidemiological survey. J Viral Hepat. 2011; 18: e11-9.

Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. Vaccine. 2012; 30(12): 2212-9.

Ott JJ, Ullrich A, Mascarenhas M, Stevens GA. Global cancer incidence and mortality caused by behavior and infection. J Public Health (Oxf). 2011; 33(2): 223-33.

Panduro A, Maldonado-Gonzalez M, Fierro NA, Roman S. Distribution of HBV genotypes F and H in Mexico and Central America. Antivir Ther. 2013; 18 (3 pt B): 475–84.

Paraná R, Kay A, Molinet F, Viana S, Silva LK, Salcedo JM et al. HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: a preliminary report. Am J Trop Med Hyg. 2006; 75(3): 475-9.

Pascarella S, Negro F. Hepatitis D virus: an update. Liver Int. 2010; 31(1): 7-21.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform

than expected. PLoS One. 2011; 6(2): e17063.

Perbi, A. Slavery and the slave trade in pre-colonial Africa. University of Illinois, 2001, 1-13.

Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR, et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. BMC Infectious Diseases. 2013; 13: 60.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. Science. 1998; 282(5390): 938-41.

Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. Biology (Basel). 2014; 3(4): 892-921.

Pourkarim MR, Lemey P, Amini-Bavil-Olyaee S, Maes P, Van Ranst M. Novel hepatitis B virus subgenotype A6 in African–Belgian patients. J Clin Virol. 2010; 47(1): 93–6.

Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyaee S, Lemey P, Maes P, Van Ranst M. HBV subgenotype misclassification expands quase-subgenotype A3. Clin Microbiol Infect. 2011; 17: 947–9.

Prince AM. Relation of Australia and SH antigens. Lancet. 1968; 2(7565): 462–3.

Rabe B, Delaleau M, Bischof A, Foss M, Sominskaya I, Pumpens P, et al. Nuclear Entry of Hepatitis B Virus Capsids Involves Disintegration to Protein Dimers followed by Nuclear Reassociation to Capsids. PLoS Pathog. 2009; 5(8): e1000563.

Radjef N, Gordien E, Ivanisuhina V, Gault E, Anais P, Drugan T et al. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a delta virus genus of at least seven major clades. J Virol. 2004; 78 (5): 2537-44.

Reid CE, Lazinski DW. A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. Proc. Natl. Acad Sci U S A. 2000; 97(1): 424–9.

Ribeiro NR, Campos GS, Angelo AL, Braga EL, Santana N, Gomes MM et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. Liver Int. 2006; 26(6): 636-42.

Richter SS. Laboratory Assay for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. J Clin Microbiol. 2002; 40 (12): 4407-12.

Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. Gut. 1977; 18(12): 997-1003.

Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980; 77(10): 6124-8.

Rizzetto M, Ciancio A. Epidemiology of hepatitis D. Seminars in Liver Disease. 2012; 32(3): 211-9.

Rizzetto M, Alavian SM. Hepatitis delta: the rediscovery. Clin Liver Dis. 2013; 17(3): 475-87.

Rizzetto M. The adventure of delta. Liver Int. 2016; 36 Suppl 1: 135-40.

Rodríguez Lay LA, Corredor MB, Villalba MC, Frómeta SS, Wong MS, Valdes L, et al. Genetic Diversity of the Hepatitis B Virus Strains in Cuba: Absence of West-African Genotypes despite the Transatlantic Slave Trade. PLoS One. 2015; 10(5): e0125052.

Romano CM, de Carvalho-Mello IM, Jama LF, de Melo FL, Iamarino A, Motoki M et al. Social networks shape the transmission dynamics of hepatitis C virus. PLoS One. 2010; 5(6): e11170.

Romeo R, Del Ninno E, Rumi M, Russo A, Sangiovanni A, de Franchis R et al. A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2009; 136(5): 1629-38.

Romero-Brey I, Merz A, Chirame A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. PLoS Pathog. 2012; 8(12): e1003056.

Sakamoto T, Tanaka Y, Orito E, Co J, Clavio J, Sugauchi F, Ito K, Ozasa A, Quino A, Ueda R, Sollano J, Mizokami M.. Novel subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotypes B and C among chronic liver disease patients in the Philippines. J Gen Virol. 2006; 87(Pt 7): 1873-82.

Sakamoto T, Tanaka Y, Simonetti J, Osiowy C, Borresen ML, Koch A et al. Classification of hepatitis B virus genotype B into 2 major types based on characterization of a novel subgenotype in Arctic indigenous populations. J Infect Dis. 2007; 196(10): 1487-92.

Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Miyazato S, Kinjo F et al. Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. J Med Virol. 1999; 58(4): 366-72.

Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. J Virol Methods. 2003; 109(2): 187-93.

Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Vieira DS, Pinho JR, Carrilho FJ, Honda ER, Salcedo JM. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. Virol J. 2010; 7: 315.

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. The EMBO Journal. 2002; 21(19): 5017-25.

Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes in Europe. Hepatol Res. 2007; 37(s1): S20-6.

Schaefer S, Magnius L, Norder H. Under Construction: Classification of Hepatitis B Virus Genotypes and Subgenotypes. Intervirology 2009; 52: 323–5.

Scholtes C, Icard V, Amiri M, Chevallier-Queyron P, Trabaud MA, Ramière C et al. Standardized one-step real-time reverse transcription-PCR assay for universal detection and quantification of hepatitis delta virus from clinical samples in the presence of a heterologous internal-control RNA. J Clin Microbiol. 2012; 50(6): 2126-8.

Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. Hepatology. 2007; 46(6): 1759-68.

Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Genetic and biochemical evidence for the hepatitis B virus replication strategy. Science 1986; 232: 477-85.

Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64: 51–68.

Seo DH, Whang DH, Song EY, Han KS. Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion. World J Hepatol. 2015; 7(3): 600-6.

Shen T, Gao JM, Zou YL, Dong H, Yan XM. Novel hepatitis B virus subgenotype in the Southern Yunnan province of China. Intervirology. 2009; 52(6): 340-6.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet Infect Dis. 2005; 5 (9): 558-67.

Shepard CW, Simard EP, Finelli L, FIore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. Epidemiol Rev. 2006; 28: 112-25.

Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ et al. Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications and corrections. Infect Genet Evol. 2013; 16: 355-61.

Silva, DBDd. The Atlantic Slave Trade to Maranhaão, 1680–1846: Volume, Routes and Organisation. Slavery and Abolition. 2008; 29: 477–501.

Silva AC, Spina AM, Lemos MF, Oba IT, Guastini Cde F, Gomes-Gouvêa MS et al. Hepatitis B genotype G and high frequency of lamivudine-resistance mutations among human immunodeficiency virus/hepatitis B virus co-infected patients in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(6): 770-8.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. J Gen Virol. 1993; 74(Pt 11): 2391-9.

Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. J Gen Virol. 2004; 85(Pt 11): 3173-88.

Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, Da Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B

virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. J Clin Microbiol. 2004; 42 (6): 2455–60.

Sitnik R, Sette H Jr, Santana RA, Menezes LC, Graça CH, Dastoli GT et al. Hepatitis B virus genotype E detected in Brazil in an African patient who is a frequent traveler. Braz J Med Biol Res. 2007; 40(12): 1689-92.

Sitnik R, Paes A, Mangueira CP, Pinho JR. A real-time quantitative assay for hepatitis B DNA virus (HBV) developed to detect all HBV genotypes. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010; 52(3): 119-24.

Smedile A, Rizzetto M. HDV: Thirty years later. Dig Liver Dis. 2011; 43: S15–S18.

Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL et al. The origin of hepatitis C virus genotypes. J Gen Virol. 1997; 78(Pt 2): 321-8.

Souto FJD. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2015; ahead of print Epub Dec 22.

StataCorp. 2009. Stata: Release 11. Software. College Station, TX: StataCorp LP.

Strauss E, Gayotto LC, da Silva LC, Alves VA, Carrilho F, Chamone DA et al. Unexpected low prevalence of delta antibodies in the east Amazon region and Sao Paulo: evidence for regional differences in the epidemiology of delta hepatitis virus within Brazil. Trans R Soc of Trop Med Hyg. 1987; 81: 73-4.

Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. J Gen Virol. 2000; 81(Pt 1): 67-74.

Swiss Institute of Bioinformatics. Viralzone. (Dane particle). Available from: http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/1404.html.

Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. J Virol. 2009; 83 (20): 10538-47.

Taylor JM. Structure and replication of hepatitis delta virus. Annu Rev Microbiol. 1992; 46: 253-76.

Taylor JM. Host RNA circles and the origin of hepatitis delta virus. World J Gastroenterol. 2014; 20(11): 2971-78.

Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. Clin Liver Dis. 2010; 14(1): 1-21.

Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, Levin TR et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study.

Hepatology. 2013; 57(3): 881-9.

Thomas E, Yoneda M, Schiff ER. Viral hepatitis: past and future of HBV and HDV. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015; 5(2): a021345.

Thong VD, Akkarathamrongsin S, Poovorawan K, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Hepatitis C virus genotype 6: Virology, epidemiology, genetic variation and clinical implication. World J Gastroenterol. 2014; 20(11): 2927-40.

Togawa RC, Brigido MM. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In: 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology; 2003; Ribeirao Preto. São Paulo.

Torres C, Pineiro y Leone FG, Pezzano SC, Mbayed VA, Campos RH. New perspectives on the evolutionary history of hepatitis B virus genotype F. Mol Phylogenet Evol. 2011; 59 (1): 114–22.

Torres C, Fernández MD, Flichman DM, Campos RH, Mbayed VA. Influence of overlapping genes on the evolution of human hepatitis B virus. Virology. 2013; 441(1): 40-8.

Troesch M, Meunier I, Lapierre P, Lapointe N, Alvarez F, Boucher M et al. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. Virology. 2006; 352(2):357-67.

Universidade de Pernambuco. Núcleo de Pós-Graduação. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Relatório de Pesquisa. Brasil, 2010.

Veras KN, Jacobina KS, Soares VY, Avelino MA, Vasconcelos Cde M, Parente JM. Chronic hepatitis C virus in the state of Piaui, northeastern Brazil. Braz J Infect Dis. 2009; 13 (12): 125-9.

Viana S, Paraná R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73(4): 808-14.

Victoria Fda S, Oliveira CM, Victoria MB, Victoria CB, Ferreira LC. Characterization of HBeAg-negative chronic hepatitis B in western Brazilian Amazonia. Braz J Infect Dis. 2008; 12: 27-37.

Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian RC, Thayer RM, et al. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. Nature. 1986; 323(6088): 508-14.

Wasley A, Alter M. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. Semin Liver Dis. 2000; 20(1): 1–16.

Wasmuth CJ. Hepatitis B - Epidemiology, transmission and natural history In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. Hepatology: a clinical text book. Germany: Flying Publisher; 2010a. p. 7-18.

Wasmuth CJ. Hepatitis C - Epidemiology, transmission and natural history In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. Hepatology: a clinical text book. Germany: Flying Publisher; 2010b. p. 19-30.

Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE et al. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. J Virol. 2000; 74: 2293-304.

World Health Organization (WHO) [internet]. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. Geneva, Switzerland: Media Centre; 2015 [cited Feb 10, 2015]. Available from: http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-b-guidelines/en/.

World Health Organization (WHO) [internet]. Hepatitis B key facts, Fact sheet no. 204. Geneva, Switzerland: Media Centre; 2014a [cited Feb 10, 2015]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/.

World Health Organization (WHO) [internet]. Hepatitis C key facts, Fact sheet no. 164 .Geneva, Switzerland: Media Centre; 2014b [cited Feb 10, 2015]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/.

Wu TT, Coates L, Aldrich CE, Summers J, Mason WS. In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. Virology. 1990; 175: 255–61.

Yamaguchi Y, Filipovska J, Yano K, Furuya A, Inukai N, Narita T, Wada T, Sugimoto S, Konarska MM, Handa H.. Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. Science. 2001; 293(5527): 124-7.

Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. Elife. 2012; 1: e00049.

Yee JK. A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. Science. 1989; 246(4930): 658-61.

Yousif M, Kramvis A. Genotype D of hepatitis B virus and its subgenotypes: an update. Hepatol Res. 2013; 43 (4): 355-64.

Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, Baumert TF. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. J Hepatol. 2011; 54(3): 566-76.

Zhang YY, Tsega E, Hansson BG. Phylogenetic analysis of hepatitis D viruses indicating a new genotype I subgroup among African isolates. Journal of Clinical Microbiology. 1996; 34(12): 3023-30.

Zhu YZ, Qian XJ, Zhao P, Qi ZT. How hepatitis C virus invades hepatocytes: the mystery of viral entry. World J Gastroenterol. 2014; 20(13): 3457-67.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Artigo científico submetido-HBV

Elsevier Editorial System(tm) for Infection, Genetics and Evolution

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: High prevalence of the rare hepatitis B subgenotype D4 virus may reflect a peculiar slave trade pattern in Maranhão, northeast Brazil

Article Type: Research paper

Keywords: HBV; Subgenotype D4; Slave trade; Maranhão; Brazil

Corresponding Author: Mr. Max Diego Cruz Santos,

Corresponding Author's Institution: São Paulo Institute of Tropical Medicine

First Author: Max Diego Cruz Santos

Order of Authors: Max Diego Cruz Santos; Michele S Gomes-Gouvêa; Jomar C Nunes; Camila M Romano; Marinilde T Sousa; Lena F Barros; Flair J Carrilho; Adalgisa P Ferreira; João R Pinho

Abstract: Hepatitis B virus (HBV) infection leads to a chronic disease that is distributed worldwide. An efficient vaccine exists, but thousands of people die annually worldwide from HBV-related complications. The characterization of HBV into genotypes/subgenotypes is not only a mere procedure for distinguishing different HBV strains around the world because determining their geographic distribution is crucial to understanding their spread across the world. In this study, we characterized different HBV genotypes and subgenotypes in five municipalities located in northeastern Maranhão, in the Brazilian north Atlantic Coast. Of 3,860 participants, 92 individuals were HBsAg-positive. Fifty samples were sequenced using automated Sanger sequencing and classified by phylogenetic methods. Subgenotypes D4 and A1 were found in 42 (86%) and eight (14%) samples, respectively. To our knowledge, this is the first study to describe a high frequency of subgenotype D4 in any population. Subgenotype A1 is frequently found across Brazil, but D4 has been rarely detected and only in a few Brazilian states. This study shows the presence of HBV subgenotypes originated from Africa in the state of Maranhão, particularly in populations that have not been exposed to populations from other regions of the world. This pattern probably reflects the viruses that were brought with the slave trade from Africa to Maranhão. This study also reinforces the need to evaluate the status of HBV dispersion not only in large urban centers, but also in the hinterland, to enable the implementation of effective control and treatment measures.

Suggested Reviewers: Anna Kramvis
anna.kramvis@wits.ac.za

Flor Pujol
fpujol@ivic.ve

Helene Norder
helene.norder@smi.ki.se

Claude Muller
claude.muller@lns.etat.lu

Covering Letter

Dear Sir/Madam

I am pleased to submit our manuscript entitled, "High prevalence of the rare hepatitis B subgenotype D4 virus may reflect a peculiar slave trade pattern in Maranhão, northeast Brazil" for consideration for publication in the Infection, Genetics and Evolution Journal. This is a original manuscript that describes a high prevalence of the rare subgenotype D4 of HBV in individuals from five Municipalities of a state in Northeast Brazil. It is noteworthy to remember that molecular characterization of HBV into genotypes/subgenotypes is quite importance for determining its geographic distribution and to understand its spread across the world. Our phylogenetic analysis showed all D4 sequences strains were clustered in a separate branch in the tree suggesting the introduction of a unique strain in that region, probably during the slave trade. All this information is of great importance for the scope your journal since it may add more information about the molecular epidemiology of HBV in Brazil. I thank you for receiving our manuscript and we look forward to your response.

Regards,

Max Santos, PhD student.

title page

High prevalence of the rare hepatitis B subgenotype D4 virus may reflect a peculiar slave trade pattern in Maranhão, northeast Brazil

Max Diego Cruz Santos[1,+,*], Michele Soares Gomes-Gouvêa[1], Jomar Diogo Costa Nunes[2], Camila Malta Romano[3], Marinilde Teles Sousa[2], Lena Maria Fonseca Barros[2], Flair José Carrilho[1], Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira[2], João Renato Rebello Pinho[1,4,+]

1 Laboratory of Tropical Gastroenterology and Hepatology "João Alves de Queiroz and Castorina Bittencourt Alves", LIM-07, São Paulo Institute of Tropical Medicine and Department of Gastroenterology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;

2 Center of Clinical Research, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

3 Laboratory of Virology, LIM-52, São Paulo Institute of Tropical Medicine and Department of Infectious Diseases, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

4 Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author. Address: Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, Instituto de Medicina Tropical, FMUSP, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar,500, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 1130618218.
E-mail address: maxdiegocs@usp.br

[+]Bolsista do CNpq - Brasil

*Manuscript
Click here to download Manuscript: manuscript.docx
Click here to view linked References

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection leads to a chronic disease that is distributed worldwide. An efficient vaccine exists, but thousands of people die annually worldwide from HBV-related complications. The characterization of HBV into genotypes/subgenotypes is not only a mere procedure for distinguishing different HBV strains around the world because determining their geographic distribution is crucial to understanding their spread across the world. In this study, we characterized different HBV genotypes and subgenotypes in five municipalities located in northeastern Maranhão, in the Brazilian north Atlantic Coast. Of 3,860 participants, 92 individuals were HBsAg-positive. Fifty samples were sequenced using automated Sanger sequencing and classified by phylogenetic methods. Subgenotypes D4 and A1 were found in 42 (86%) and eight (14%) samples, respectively. To our knowledge, this is the first study to describe a high frequency of subgenotype D4 in any population. Subgenotype A1 is frequently found across Brazil, but D4 has been rarely detected and only in a few Brazilian states. This study shows the presence of HBV subgenotypes originated from Africa in the state of Maranhão, particularly in populations that have not been exposed to populations from other regions of the world. This pattern probably reflects the viruses that were brought with the slave trade from Africa to Maranhão. This study also reinforces the need to evaluate the status of HBV dispersion not only in large urban centers, but also in the hinterland, to enable the implementation of effective control and treatment measures.

Keywords: HBV, Subgenotype D4, Slave trade, Maranhão, Brazil.

1 Introduction

Even though an efficient vaccine to prevent infection from the hepatitis B virus (HBV) is available since the 1980s more than 700,000 people have died worldwide from its complications in 2010 (Beutels, 2001; Lozano *et al.*, 2012). HBV is a highly prevalent and silent infection (World Health Organization, 2015). HBV infection is a public health problem in regions where complete vaccination coverage has been difficult to achieve, particularly in infants, who are more prone to develop the chronic course of the disease (Centers for Disease & Prevention, 2003; Schweitzer *et al.*, 2015).

East Asia and Sub-Saharan Africa show high HBV prevalence, whereas Tropical Latin America, Central Latin America, Western Europe, and North America are considered low prevalence areas (Ott *et al.*, 2012). According to a national survey, Brazil is considered a low prevalence area (Pereira *et al.*, 2009), although some areas with higher prevalence have been reported in the Amazon Basin and in the Southeast and South regions (Souto, 2015).

HBV is a DNA virus classified into eight genotypes (A–H) that differ by 7.5% or more in their genome and have distinct geographical distributions (Kramvis *et al.*, 2008; Norder *et al.*, 2004). A putative genotype I has also been described (Tran *et al.*, 2008), although some authors have contested it, based on new recommendations for sorting a new genotype (Kurbanov *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2013). Additionally, a genotype J has also been described in Japan (Tatematsu *et al.*, 2009). This tentative genotype shows similarities to gibbon and orangutan viruses and further studies are needed to ratify its classification (Kurbanov *et al.*, 2010). HBV genotypes may also be further divided into subgenotypes based on a nucleotide intragenotypic difference between 4 and 7.5% (Kramvis *et al.*, 2008).

The distribution of genotypes around the world is a reflection of human population movements and is related to each ethnical background (Kurbanov *et al.*, 2010; Orito *et al.*, 2001). In Brazil, genotype A is the most frequent genotype found followed by D, and F (Barros *et al.*, 2014; Bertolini *et al.*, 2012; Gomes-Gouvea *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2010; Sitnik *et al.*, 2004; Victoria Fda *et al.*, 2008), whereas A1, D3, and F2a seem to be the most prevalent

subgenotypes (Barros *et al.*, 2014; Bertolini *et al.*, 2012; Gomes-Gouvea *et al.*, 2015; Gomes-Gouvea *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010).

The population of Brazil is composed of three main ancestral backgrounds: Europeans, Amerindians, and Africans (Pena *et al.*, 2011). The latter group consisted of African slaves brought to work in many regions of the New World. Brazil received the largest numbers of slaves, followed by the Caribbean (Perbi, 2001). Maranhão is a state in the north Atlantic Coast of Brazil that has particular features in the history of African slave trade: later establishment of slavery, isolation from other regions of the country due to the lack of river connection with the continent, and the similarity of slave trading routes with those in North Atlantic regions (Silva, 2008).

The state of Maranhão is one of the Brazilian states with a higher percentage of Afro-descendants and remained isolated from the rest of the country until the mid-19th century (Silva, 2008). There are only two previous studies analyzing the distribution of HBV genotypes in the state of Maranhão: one that analyzed patients followed up in the city of São Luís, the state capital (Barros *et al.*, 2014), and another that analyzed a quilombo community in northwestern Maranhão (Alvarado-Mora e*t al.*, 2011). In both studies, HBV genotypes also found in Africa were the most frequent, but genotype D4 found at the São Luís Referral Center for Liver Studies, São Luís, Maranhão, Brazil, has rarely been detected in other Brazilian regions.

This study aimed to characterize the different HBV genotypes and subgenotypes found in five municipalities (Axixá, Icatu, Humberto de Campos, Morros, and Urbano Santos) located in northeastern Maranhão. Their inhabitants have had few contacts with other populations; in addition, these regions are distant from the capital and improvements in living and hygiene conditions are usually implemented slowly (Souto, 2015).

The classification of HBV into genotypes/subgenotypes is not only a mere procedure for distinguishing different strains around the world because determining their geographic distribution is crucial to understanding their spread and analyzing evolutionary pathways (Araujo *et al.*, 2011).

2 Material and Methods

2.1 Sample selection and ethical approval

A total of 3,860 samples were screened for HBsAg serological marker using commercial kits according to the manufacturer's instructions (DiaSorin, Italy) in the five municipalities cited above located in northeastern Maranhão along the Brazilian north Atlantic Coast (Fig. 1) from 2012 to 2014. The representative sample number for the study region was calculated by considering an HBsAg prevalence of 0.5% in Brazil and the total number of individuals in each municipality. The collection procedure was performed by two-stage cluster sampling: first by choosing sectors according to population proportion and second by selecting the squares in these sectors by random sampling.

The study was approved by the research ethics committee at University Hospital, Federal University of Maranhão (HUUFMA), São Luís, Maranhão, Brazil, and written consent was obtained from all individuals that agreed to participate in the study.

2.2 HBV DNA amplification and sequencing

HBsAg positive samples were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) to detect HBV DNA. HBV DNA was extracted using the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen®, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Fragments of 1,306 base pairs (bp) comprising the whole HBsAg and part of the DNA polymerase genes were amplified by nested PCR. Primers'sequences, PCR conditions, and sequencing procedures are described elsewhere (Barros *et al.*, 2014; Gomes-Gouvea *et al.*, 2015).

2.3 Viral load

PCR negative samples were analyzed for detection of viral load by real time PCR. We used the TaqMan® system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and probes, primers, and thermocycling conditions used are described elsewhere (Sitnik *et*

al., 2010). The amplification was performed using a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA) and results are expressed as IU/mL.

2.4 HBV genotyping and subgenotyping

Chromatograms were evaluated using Phred–Phrap software (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998) and a quality score of 20 was used to select good quality readings. The consensus sequence of each sample was obtained using CAP3 software available at the Electropherogram quality analysis webpage (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/). Sequences were aligned using BioEdit (v. 7.0.8) software and edited using CLUSTAL W software. HBV genotypes and subgenotypes were classified by phylogenetic reconstructions with published reference sequences from the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Phylogenetic trees were constructed using the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method implemented in the BEAST package v.1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007) under a relaxed molecular clock using GTR + G + I as nucleotide substitution model; MCMC was run for 20 million generations and trees were sampled every 2000 generations. Maximum clade credibility tree was summarized using TreeAnnotator v.1.6.1 and the tree was visualized in FigTree v1.4.2. software (available at: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

2.5 Statistical analysis

The Student's t-test was used to determine the difference in mean age between subgenotypes; the Fisher's exact test was used to compare the other variables between subgenotypes. Differences were considered significant at $p < 0.05$. All analyses were performed using STATA software version 11.0.

3 Results

3.1 Demographic characteristics of HBV-positive individuals

Of the 3,860 samples, 92 were positive for HBsAg serological marker. Fifty-one (55.4%) of the 92 HBsAg-positive individuals had detectable HBV DNA. Most HBV-

positive individuals were men (56.9%; 29/51) and their mean age was 44.3 (SD=21.1) years. In addition, most HBV-positive samples were from Humberto de Campos (43.1%; 22/51), which is the most populated municipality. We also found that most HBV-positive individuals were from the rural zone (70.6%; 36/51), had a family income of < 1 minimum wage (64.7%; 33/51), and declared themselves as being Afro-American or mestizo/mullato (76.5%; 39/51).

3.2 Viral load

Forty-one of the 92 positive HBsAg samples were negative for HBV-DNA. Viral load detection was performed in 39 of the 41 samples because two serum samples were unusable. In total, 36 of the 39 samples analyzed had undetectable HBV viral load.

3.3 Genotype/subgenotype distribution

All 51 positive samples had their partial HBV sequence determined. One sample was excluded from the final analysis because the sequence did not achieve a good quality index, but the remaining 50 samples had their HBV genotype and subgenotype determined.

Genotypes A and D were only found in our sample and genotype D was the most frequent (86%; 42/50). The phylogeny of genotype A sequences showed that all samples were subgenotype A1 and all genotype D individuals were subgenotype D4. Additionally, subgenotype D4 clustered in a monophyletic group together with other sequences from Maranhão, whereas subgenotype A1 samples grouped with different HBV/A1 branches, except with the one containing sequences from Africa only (Fig. 2).

3.4 HBV subgenotypes and sociodemographic characteristics

We found no significant difference in most sociodemographic characteristics between subgenotypes A1 and D4, except for municipality and family income (Table 1). There were more subgenotype D4 individuals in Morros, Humberto de Campos, and Urbano Santos than in Axixá and Icatu ($P = 0.015$). Axixá and Icatu were closer to São Luís (the state capital) than Morros, Humberto de Campos, and Urbano Santos.

Additionally, the frequency of subgenotype D4 was higher in families with income < 1 minimum wage ($P = 0.019$).

4 Discussion

While this is the third study to determine HBV genotype/subgenotype distribution in the state of Maranhão, in the north Atlantic coast of Brazil (Barros et al., 2014; Alvarado-Mora et al., 2011). It is the first to obtain a representative number of HBsAg-positive samples from a regional population-based survey. The study region is located in northeastern Maranhão and consists of five municipalities with low socio-economical index (IBGE, 2012). Unfortunately, we did not have access to other epidemiological variables and risk factors associated with this infection in this population. These data are under analysis and will be published soon by our group.

Most infected individuals lived with less than one minimum wage for the whole family and the level of education was often low. Thus, because of poverty and low educational status, these individuals are often unaware about means of transmission and prevention of diseases such as hepatitis, and thus may be more susceptible to infection. The delayed improvements in living and hygiene conditions and the difficulties in launching prevention, control, and treatment strategies that are important to control viral hepatitis and other diseases are known and have been described elsewhere (Souto, 2015).

Two different HBV genotypes were found in our sample. Genotype D was the most prevalent followed by few genotype A cases. This finding is contrary to the HBV genotype prevalence described for Maranhão and Brazil as a whole, where genotype A is the most prevalent (Alvarado-Mora *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2014; Crispim *et al.*, 2014; Gomes-Gouvea *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2010; Sitnik *et al.*, 2004; Victoria Fda *et al.*, 2008). An exception to that pattern is found in southern Brazil, where genotype D is the most frequent genotype (Becker *et al.*, 2010; Bertolini *et al.*, 2012; Carrilho *et al.*, 2004), which is related to the immigration of European people from highly HBV/D prevalent regions (Bertolini *et al.*, 2012).

Only two subgenotypes were identified in our study, A1 and D4 being the latter the most frequent. Subgenotype A1 is the most frequent subgenotype found in cases of genotype A across Brazil (Gomes-Gouvea *et al.*, 2015) and it was also the most

frequent subgenotype found in the previous study conducted in São Luís, in Maranhão (Barros *et al.*, 2014). In addition to subgenotype A1 that study also identified other four subgenotypes (D2, D3, F2a, and D4). Unlike the current study, subgenotype A1 was the most prevalent in that study, even though subgenotype D4 also had a relatively high frequency (24%; 29/119).(Barros et al., 2014). The difference between our results and those of Barros *et al.* (2014) is noteworthy and may be related to the samples analyzed: the population from the latter study consisted of chronic HBV carrier patients treated at a referral center for treatment of liver disease, and even though it covers the entire state of Maranhão, more than 75% of participants were from the metropolitan area of São Luís, the state capital. Thus, subgenotype A1 seems to be more prevalent in the metropolitan region, whereas subgenotype D4 is more frequent in other regions of the state such as the northeast.

Alvarado-Mora *et al.* (2011) only found subgenotype A1 in four sequenced samples from quilombo Frechal, located in the municipality of Mirinzal, northwestern Maranhão. More studies in other regions of Maranhão should be conducted to analyze a larger number of HBV-positive samples for a better understanding of subgenotype prevalence in the state.

Subgenotype D4 was previously found in the aforementioned study conducted in Maranhão (Barros *et al.*, 2014), but it is not frequently found in Brazil. This genotype was initially described in two different studies conducted in the Brazilian Amazon, in the states of Amazonas (Gomes-Gouvea *et al.*, 2009) and Rondônia (Santos *et al.*, 2010). Genotype D4 was also found in 5.1% (36/702) of samples collected across Brazil (Gomes-Gouvea *et al.*, 2015), mostly in Maranhão, but also in other states in the southeast (São Paulo and Minas Gerais) and north (Pará) of Brazil (Gomes-Gouvêa, 2014). We hypothesize that internal migrations among different Brazilian states may explain the presence of subgenotype D4 in these regions, particularly in Pará, which has a large border with the state of Maranhão.

The high prevalence of subgenotype D4 in Maranhão supports the hypothesis that this strain was not introduced in Brazil through European immigration, because this subgenotype is not frequent in Europe (Schaefer, 2007). In fact, subgenotype D4 has been previously described in Brazil (Barros *et al.*, 2014; Gomes-Gouvea *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010), Oceania, China, Japan, Somalia (Norder *et al.*, 2004), Rwanda (Hubschen *et al.*, 2009), Kenya (Kwange *et al.*, 2013), Ethiopia (Hundie *et al.*, 2015), Morocco (Baha *et al.*, 2012), South Africa (Amponsah-Dacosta *et al.*, 2015), India

(Banerjee *et al.*, 2014), among Inuit in Canada (Osiowy *et al.*, 2011), Panama (Martinez *et al.*, 2014), and in Caribbean countries of significant African descent such as Haiti, Martinique, and Cuba (Andernach *et al.*, 2009; Brichler *et al.*, 2013; Loureiro *et al.*, 2015). Interestingly, in Kenya, only subgenotypes A1 (85.7%) and D4 (14.3 %) have been reported (Kwange *et al.*, 2013), but in proportions that are the opposite to those found in Maranhão. As suggested by Barros *et al.* (2014), subgenotype D4 may have infected individuals frequently in the past, and during the period of slavery these strains may have reached other continents where African slaves were also traded. For instance, Haiti and Cuba are regions outside Africa with a high frequency of subgenotype D4 cases (Andernach *et al.*, 2009; Loureiro *et al.*, 2015). The Caribbean had intense trading of slaves from Africa, lower only than that in Brazil (Perbi, 2001). Thus, the history of population formation, combined with molecular evidence of virus traits, may support a better understanding of the spread of infections such as HBV.

Subgenotype D4 strains found in Brazil clustered in a separate branch in the phylogenetic tree with other samples described elsewhere (except from two samples from India), suggesting the introduction of a unique strain in the country. Subgenotype A1 strains also clustered in a branch different than the one where most African sequences were grouped and differently than subgenotype D4 strains, A1 strains did not aggregate in a few branches but rather in many branches containing samples from across the world, with only few African samples from Somalia and South Africa. Thus A1 strains cannot be considered an African clade. In a study that analyzed A1 strains from Brazil (Lago *et al.*, 2014), the authors concluded that Brazilian A1 genotypes are not of Central or Western Africa origin, but originated from slaves brought from southeastern Africa during the mid-19th century, because the study's samples clustered into an "Asian-American" clade similarly to the samples in our study. However, there are few available sequences with these genotypes from East African countries, despite the reports of slaves coming to Maranhão from these countries (Meireles, 2009).

The Brazilian population was formed by three ancestral backgrounds in decreasing order of contribution: Europeans, Africans, and Amerindians. Nevertheless, the state of Maranhão is one of the regions in Brazil with the greatest contribution of African ancestry (Pena *et al.*, 2011). Our results show that most individuals who were assigned to subgenotypes A1 and D4 declared themselves as being Afro-American (24%) or mestizo/mulatto (52%), reinforcing the association between these two subgenotypes and African ancestry. Moreover, the pattern of slavery establishment in

Maranhão was peculiar: due to geographic features (isolation from other regions in the country because of a lack of river connection to the continent) and navigation issues (wind and ocean currents), slave trade routes in Maranhão were more similar to those in Caribbean and North Atlantic countries than those in the rest of Brazil (Silva, 2008). Thus, we expected to find the same subgenotype in Maranhão and in Caribbean countries, which is not the same one found in Bahia, another Brazilian state with a large number of Afro-descendants (Gomes-Gouvea *et al.*, 2015). Finally, the recent finding of an African HDV genotype (HDV-8) in Maranhão co-infecting two individuals that carried HBV/D4 corroborates the African origin of the latter subgenotype (Barros *et al.*, 2011).

5 Conclusions

This study emphasized the presence of HBV genotypes originated from Africa in the state of Maranhão, particularly in areas in which the population has not been in contact with populations from other regions in the world or in Brazil. This pattern probably reflects the viruses that were brought with the slave trade from Africa to Maranhão that was interrupted in the middle of the 19th century. Maranhão has a great contribution of African ancestors originated from a particular slave trade route that is similar to the one followed in the Caribbean islands and both areas share a similar pattern of HBV subgenotype distribution.

This study also reinforces the need to evaluate the status of HBV dispersion not only in large urban centers, but also in the hinterland, to enable the implementation of effective control and treatment measures. Studies involving population samples from wide geographic areas and hard-to-access regions are difficult to perform, mainly due to the high costs and lack of specialized human recourses. Nevertheless, further investigations in isolated areas are needed because a better knowledge of HBV infection across the world is essential for the effective control of this infectious disease.

Acknowledgments

The authors thank the State Health Department of Maranhão – Epidemiological Surveillance Secretariat; Central Laboratory of Public Health- Maranhão (LACEN-MA)

as well as the municipal government of all participating Municipalities. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão – (FAPEMA) [grant: PPSUS-03348/13 and PPP-01263/12]; São Paulo Research Foundation (FAPESP) – [grant: 2009/53946-3]; Brazilian Ministry of Health [grant: 1/2013]. Max Diego Cruz Santos received a Ph.D. fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant: 141138/2012-2]. João Renato Rebello Pinho receives fellowship from CNPq (Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2).

References

Alvarado-Mora, M. V., Botelho, L., Gomes-Gouvea, M. S., de Souza, V. F., Nascimento, M. C., Pannuti, C. S., Carrilho, F. J. & Pinho, J. R. (2011). Detection of Hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhao, Brazil. *Virology journal* **8**, 415.

Amponsah-Dacosta, E., Lebelo, R. L., Rakgole, J. N., Selabe, S. G., Gededzha, M. P., Mayaphi, S. H., Powell, E. A., Blackard, J. T. & Mphahlele, M. J. (2015). Hepatitis B virus infection in post-vaccination South Africa: Occult HBV infection and circulating surface gene variants. *J Clin Virol* **63**, 12-17.

Andernach, I. E., Nolte, C., Pape, J. W. & Muller, C. P. (2009). Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerging infectious diseases* **15**, 1222-1228.

Araujo, N. M., Waizbort, R. & Kay, A. (2011). Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: how viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **11**, 1199-1207.

Baha, W., Ennaji, M. M., Lazar, F., Melloul, M., El Fahime, E., El Malki, A. & Bennani, A. (2012). HBV genotypes prevalence, precore and basal core mutants in Morocco. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **12**, 1157-1162.

Banerjee, P., Mondal, R. K., Nandi, M., Ghosh, S., Khatun, M., Chakraborty, N., Bhattacharya, S., RoyChoudhury, A., Banerjee, S., Santra, A., Sil, S., Chowdhury, A., Bhaumik, P. & Datta, S. (2014). A rare HBV subgenotype D4 with unique genomic signatures identified in north-eastern India--an emerging clinical challenge? *PloS one* **9**, e109425.

Barros, L. M., Gomes-Gouvea, M. S., Kramvis, A., Mendes-Correa, M. C., dos Santos, A., Souza, L. A., Santos, M. D., Carrilho, F. J., de Jesus Domicini, A., Pinho, J. R. & de Souza Paiva Ferreira, A. (2014). High prevalence of

hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhao state, Northeast Brazil. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **24**, 68-75.

Barros, L. M., Gomes-Gouvea, M. S., Pinho, J. R., Alvarado-Mora, M. V., Dos Santos, A., Mendes-Correa, M. C., Caldas, A. J., Sousa, M. T., Santos, M. D. & Ferreira, A. S. (2011). Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? *Virus Res* **160**, 333-339.

Becker, C. E., Mattos, A. A., Bogo, M. R., Branco, F., Sitnik, R. & Kretzmann, N. A. (2010). Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil. *Arquivos de gastroenterologia* **47**, 13-17.

Bertolini, D. A., Gomes-Gouvea, M. S., Guedes de Carvalho-Mello, I. M., Saraceni, C. P., Sitnik, R., Grazziotin, F. G., Laurino, J. P., Fagundes, N. J., Carrilho, F. J. & Pinho, J. R. (2012). Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **12**, 1295-1304.

Beutels, P. (2001). Economic evaluations of hepatitis B immunization: a global review of recent studies (1994-2000). *Health economics* **10**, 751-774.

Brichler, S., Lagathu, G., Chekaraou, M. A., Le Gal, F., Edouard, A., Deny, P., Cesaire, R. & Gordien, E. (2013). African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *The Journal of general virology* **94**, 2318-2329.

Carrilho, F. J., Moraes, C. R., Pinho, J. R., Mello, I. M., Bertolini, D. A., Lemos, M. F., Moreira, R. C., Bassit, L. C., Cardoso, R. A., Ribeiro-dos-Santos, G. & Da Silva, L. C. (2004). Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC public health* **4**, 13.

Centers for Disease, C. & Prevention (2003). Global progress toward universal childhood hepatitis B vaccination, 2003. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* **52**, 868-870.

Crispim, M. A., Fraiji, N. A., Campello, S. C., Schriefer, N. A., Stefani, M. M. & Kiesslich, D. (2014). Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC infectious diseases* **14**, 94.

Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* **7**, 214.

Ewing, B. & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research* **8**, 186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research* **8**, 175-185.

Gomes-Gouvêa, M. S. (2014). Prevalência de resistência primária aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite B entre pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B não submetidos a tratamento (PhD Thesis). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Gomes-Gouvea, M. S., Ferreira, A. C., Teixeira, R., Andrade, J. R., Ferreira, A. S., Barros, L. M., Rezende, R. E., Nastri, A. C., Leite, A. G., Piccoli, L. Z., Galvan, J., Conde, S. R., Soares, M. C., Kliemann, D. A., Bertolini, D. A., Kunyoshi, A. S., Lyra, A. C., Oikawa, M. K., de Araujo, L. V., Carrilho, F. J., Mendes-Correa, M. C. & Pinho, J. R. (2015). HBV carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naive patients. *Antiviral therapy* **20**, 387-395.

Gomes-Gouvea, M. S., Soares, M. C., Bensabath, G., de Carvalho-Mello, I. M., Brito, E. M., Souza, O. S., Queiroz, A. T., Carrilho, F. J. & Pinho, J. R. (2009). Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *The Journal of general virology* **90**, 2638-2643.

Hubschen, J. M., Mugabo, J., Peltier, C. A., Karasi, J. C., Sausy, A., Kirpach, P., Arendt, V. & Muller, C. P. (2009). Exceptional genetic variability of hepatitis B virus indicates that Rwanda is east of an emerging African genotype E/A1 divide. *Journal of medical virology* **81**, 435-440.

Hundie, G. B., Raj, V. S., Gebre Michael, D., Pas, S. D., Osterhaus, A. D., Koopmans, M. P., Smits, S. L. & Haagmans, B. L. (2015). Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus in Ethiopia. *Journal of medical virology*.

IBGE (2012). Censo demográfico 2010: Resultados gerais da amostra, p. 239: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Kramvis, A., Arakawa, K., Yu, M. C., Nogueira, R., Stram, D. O. & Kew, M. C. (2008). Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *Journal of medical virology* **80**, 27-46.

Kurbanov, F., Tanaka, Y., Kramvis, A., Simmonds, P. & Mizokami, M. (2008). When should "T" consider a new hepatitis B virus genotype? *Journal of virology* **82**, 8241-8242.

Kurbanov, F., Tanaka, Y. & Mizokami, M. (2010). Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **40**, 14-30.

Kwange, S. O., Budambula, N. L., Kiptoo, M. K., Okoth, F., Ochwoto, M., Oduor, M. & Kimotho, J. H. (2013). Hepatitis B virus subgenotype A1, occurrence of

subgenotype D4, and S gene mutations among voluntary blood donors in Kenya. *Virus genes* **47**, 448-455.

Loureiro, C. L., Aguilar, J. C., Aguiar, J., Muzio, V., Penton, E., Garcia, D., Guillen, G. & Pujol, F. H. (2015). HBV genotypic variability in Cuba. *PloS one* **10**, e0118959.

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., Bell, M. L., Benjamin, E. J., Bennett, D., Bhalla, K., Bikbov, B., Bin Abdulhak, A., Birbeck, G., Blyth, F., Bolliger, I., Boufous, S., Bucello, C., Burch, M., Burney, P., Carapetis, J., Chen, H., Chou, D., Chugh, S. S., Coffeng, L. E., Colan, S. D., Colquhoun, S., Colson, K. E., Condon, J., Connor, M. D., Cooper, L. T., Corriere, M., Cortinovis, M., de Vaccaro, K. C., Couser, W., Cowie, B. C., Criqui, M. H., Cross, M., Dabhadkar, K. C., Dahodwala, N., De Leo, D., Degenhardt, L., Delossantos, A., Denenberg, J., Des Jarlais, D. C., Dharmaratne, S. D., Dorsey, E. R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Erwin, P. J., Espindola, P., Ezzati, M., Feigin, V., Flaxman, A. D., Forouzanfar, M. H., Fowkes, F. G., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M. K., Gabriel, S. E., Gakidou, E., Gaspari, F., Gillum, R. F., Gonzalez-Medina, D., Halasa, Y. A., Haring, D., Harrison, J. E., Havmoeller, R., Hay, R. J., Hoen, B., Hotez, P. J., Hoy, D., Jacobsen, K. H., James, S. L., Jasrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Keren, A., Khoo, J. P., Knowlton, L. M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Lipnick, M., Lipshultz, S. E., Ohno, S. L., Mabweijano, J., MacIntyre, M. F., Mallinger, L., March, L., Marks, G. B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B. M., McAnulty, J. H., McDermott, M. M., McGrath, J., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Michaud, C., Miller, M., Miller, T. R., Mock, C., Mocumbi, A. O., Mokdad, A. A., Moran, A., Mulholland, K., Nair, M. N., Naldi, L., Narayan, K. M., Nasseri, K., Norman, P., O'Donnell, M., Omer, S. B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz, D., Pahari, B., Pandian, J. D., Rivero, A. P., Padilla, R. P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Phillips, D., Pierce, K., Pope, C. A., 3rd, Porrini, E., Pourmalek, F., Raju, M., Ranganathan, D., Rehm, J. T., Rein, D. B., Remuzzi, G., Rivara, F. P., Roberts, T., De Leon, F. R., Rosenfeld, L. C., Rushton, L., Sacco, R. L., Salomon, J. A., Sampson, U., Sanman, E., Schwebel, D. C., Segui-Gomez, M., Shepard, D. S., Singh, D., Singleton, J., Sliwa, K., Smith, E., Steer, A., Taylor, J. A., Thomas, B., Tleyjeh, I. M., Towbin, J. A., Truelsen, T., Undurraga, E. A., Venketasubramanian, N., Vijayakumar, L., Vos, T., Wagner, G. R., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weinstock, M. A., Weintraub, R., Wilkinson, J. D., Woolf, A. D., Wulf, S., Yeh, P. H., Yip, P., Zabetian, A., Zheng, Z. J., Lopez, A. D., Murray, C. J., AlMazroa, M. A. & Memish, Z. A. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2095-2128.

Martinez, A. A., Zaldivar, Y. Y., Group, C.-N., De Castillo, Z., Ortiz, A. Y., Mendoza, Y., Cristina, J. & Pascale, J. M. (2014). High diversity of hepatitis B virus genotypes in Panamanian blood donors: a molecular analysis of new variants. *PloS one* **9**, e103545.

Meireles, M. C. (2009). As conexões do Maranhão com a África no tráfico atlântico de escravos na segunda metade do século XVIII. *Outros Tempos* **6**, 130-144.

Mello, F. C., Souto, F. J., Nabuco, L. C., Villela-Nogueira, C. A., Coelho, H. S., Franz, H. C., Saraiva, J. C., Virgolino, H. A., Motta-Castro, A. R., Melo, M. M., Martins, R. M. & Gomes, S. A. (2007). Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC microbiology* **7**, 103.

Moura, I. F., Lopes, E. P., Alvarado-Mora, M. V., Pinho, J. R. & Carrilho, F. J. (2013). Phylogenetic analysis and subgenotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **14**, 195-199.

Norder, H., Courouce, A. M., Coursaget, P., Echevarria, J. M., Lee, S. D., Mushahwar, I. K., Robertson, B. H., Locarnini, S. & Magnius, L. O. (2004). Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* **47**, 289-309.

Orito, E., Ichida, T., Sakugawa, H., Sata, M., Horiike, N., Hino, K., Okita, K., Okanoue, T., Iino, S., Tanaka, E., Suzuki, K., Watanabe, H., Hige, S. & Mizokami, M. (2001). Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* **34**, 590-594.

Osiowy, C., Larke, B. & Giles, E. (2011). Distinct geographical and demographic distribution of hepatitis B virus genotypes in the Canadian Arctic as revealed through an extensive molecular epidemiological survey. *Journal of viral hepatitis* **18**, e11-19.

Ott, J. J., Stevens, G. A., Groeger, J. & Wiersma, S. T. (2012). Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* **30**, 2212-2219.

Pena, S. D., Di Pietro, G., Fuchshuber-Moraes, M., Genro, J. P., Hutz, M. H., Kehdy Fde, S., Kohlrausch, F., Magno, L. A., Montenegro, R. C., Moraes, M. O., de Moraes, M. E., de Moraes, M. R., Ojopi, E. B., Perini, J. A., Racciopi, C., Ribeiro-Dos-Santos, A. K., Rios-Santos, F., Romano-Silva, M. A., Sortica, V. A. & Suarez-Kurtz, G. (2011). The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PloS one* **6**, e17063.

Perbi, A. (2001). SLAVERY AND THE SLAVE TRADE IN PRE-COLONIAL AFRICA. *University of Illinois*, 1-13.

Pereira, L. M., Martelli, C. M., Merchan-Hamann, E., Montarroyos, U. R., Braga, M. C., de Lima, M. L., Cardoso, M. R., Turchi, M. D., Costa, M. A., de Alencar, L. C., Moreira, R. C., Figueiredo, G. M., Ximenes, R. A. & Hepatitis Study, G. (2009). Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **81**, 240-247.

Santos, A. O., Alvarado-Mora, M. V., Botelho, L., Vieira, D. S., Pinho, J. R., Carrilho, F. J., Honda, E. R. & Salcedo, J. M. (2010). Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. *Virology journal* **7**, 315.

Schaefer, S. (2007). Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **37**, S20-26.

Schweitzer, A., Horn, J., Mikolajczyk, R. T., Krause, G. & Ott, J. J. (2015). Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* **386**, 1546-1555.

Shi, W., Zhang, Z., Ling, C., Zheng, W., Zhu, C., Carr, M. J. & Higgins, D. G. (2013). Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **16**, 355-361.

Silva, D. B. D. d. (2008). The Atlantic Slave Trade to Maranhaão, 1680–1846: Volume, Routes and Organisation. *Slavery and Abolition* **29**, 477–501.

Sitnik, R., Pinho, J. R., Bertolini, D. A., Bernardini, A. P., Da Silva, L. C. & Carrilho, F. J. (2004). Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *Journal of clinical microbiology* **42**, 2455-2460.

Souto, F. J. (2015). Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. *Revista da Sociedade Brazileira de Medicina Tropical*.

Tatematsu, K., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Sugauchi, F., Mano, S., Maeshiro, T., Nakayoshi, T., Wakuta, M., Miyakawa, Y. & Mizokami, M. (2009). A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *Journal of virology* **83**, 10538-10547.

Tran, T. T., Trinh, T. N. & Abe, K. (2008). New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *Journal of virology* **82**, 5657-5663.

Victoria Fda, S., Oliveira, C. M., Victoria, M. B., Victoria, C. B. & Ferreira, L. C. (2008). Characterization of HBeAg-negative chronic hepatitis B in western Brazilian Amazonia. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* **12**, 27-37.

WHO (2015). Hepatitis B key facts. Fact sheet no. 204 http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/: World Health Organization.

Table 1

Table 1. Demographic characteristics of HBV-carriers and subgenotypes found in this study.

Variable	Subgenotype (%)			
	A1	D4	Total	*P*
N	8 (16)	42 (84)	50	
Male	5 (17.86)	23 (82.14)	28 (56)	1
Female	3 (82.14)	19 (17.86)	22 (44)	
Mean age (±SD)	41.5 (±18.7)	45.3 (±21.8)	44.7 (±21.2)	.647
Origin				
Axixá	1 (50)	1 (50)	2 (4)	**.015**
Morros	2 (16.7)	10 (83.3)	12 (24)	
Icatu	4 (50)	4 (50)	8 (16)	
Humberto de Campos	1 (4.55)	21 (95.4)	22 (44)	
Urbano Santos	0	6 (100)	6 (12)	
Sector				
Urban	3 (21.4)	12 (78.6)	15 (30)	.683
Rural	5 (13.9)	30 (86.1)	35 (70)	
Race*				
Afro-American	3 (25)	9 (75)	12 (24)	.32
Caucasian	0	5 (100)	5 (10)	
Brazilian Indian	2 (40)	3 (60)	5 (10)	
Mestizo/Mulatto	3 (11.5)	23 (88.5)	26 (52)	
Other/unknown	0	2 (100)	2 (4)	
Education level				
No education	0	12 (100)	12 (24)	.336
Incomplete Elementary education	5 (23.81)	16 (76.2)	21 (42)	
Complete Elementary education	0	4 (100)	4 (8)	
Incomplete High school education	1 (20)	4 (80)	5 (10)	
Complete High school education	2 (28.6)	5 (71.4)	7 (14)	
Higher education	0	0	-	
Not applied	0	1 (100)	1 (2)	
Family Income				
< 1 mw**	2 (6.3)	30 (93.7)	32 (64)	**.019**
1–3 mw	6 (33.3)	12 (66.7)	18 (36)	

*Self-declaration

** minimum wage

Figure 1

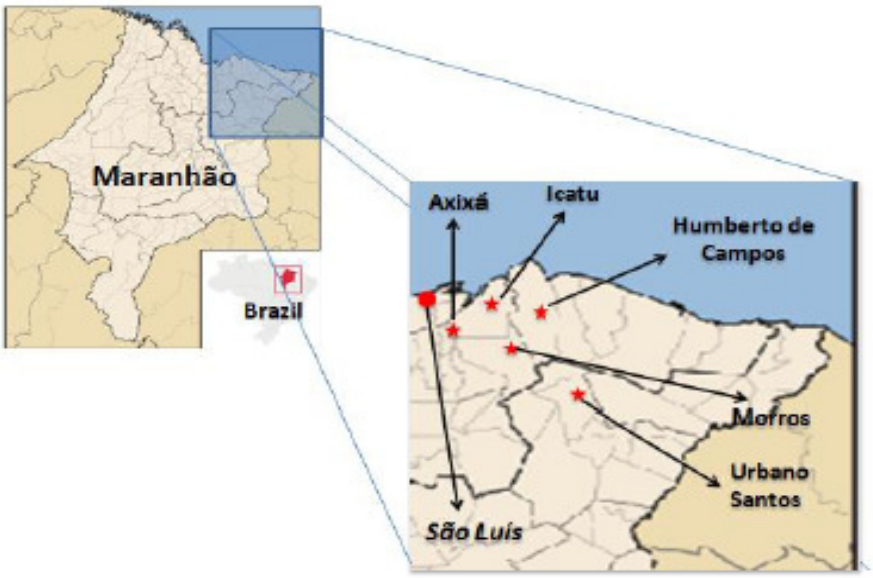
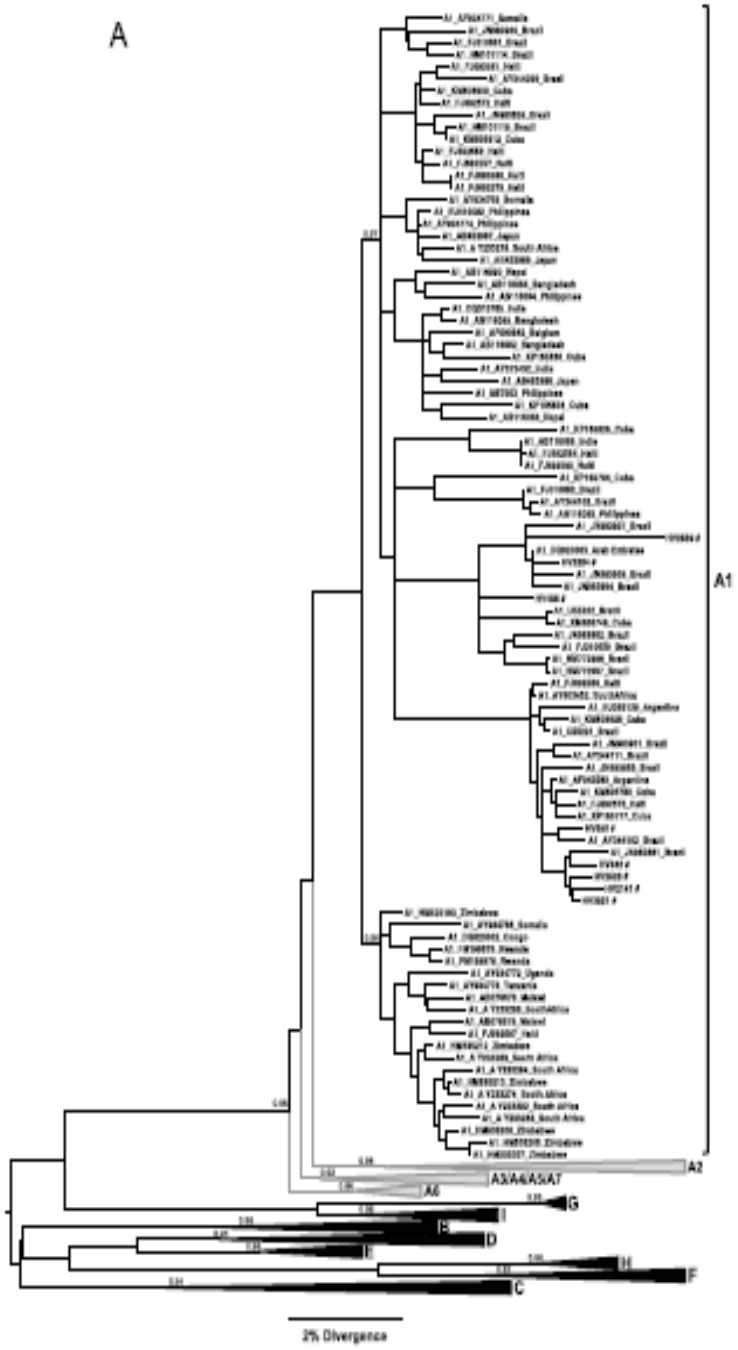
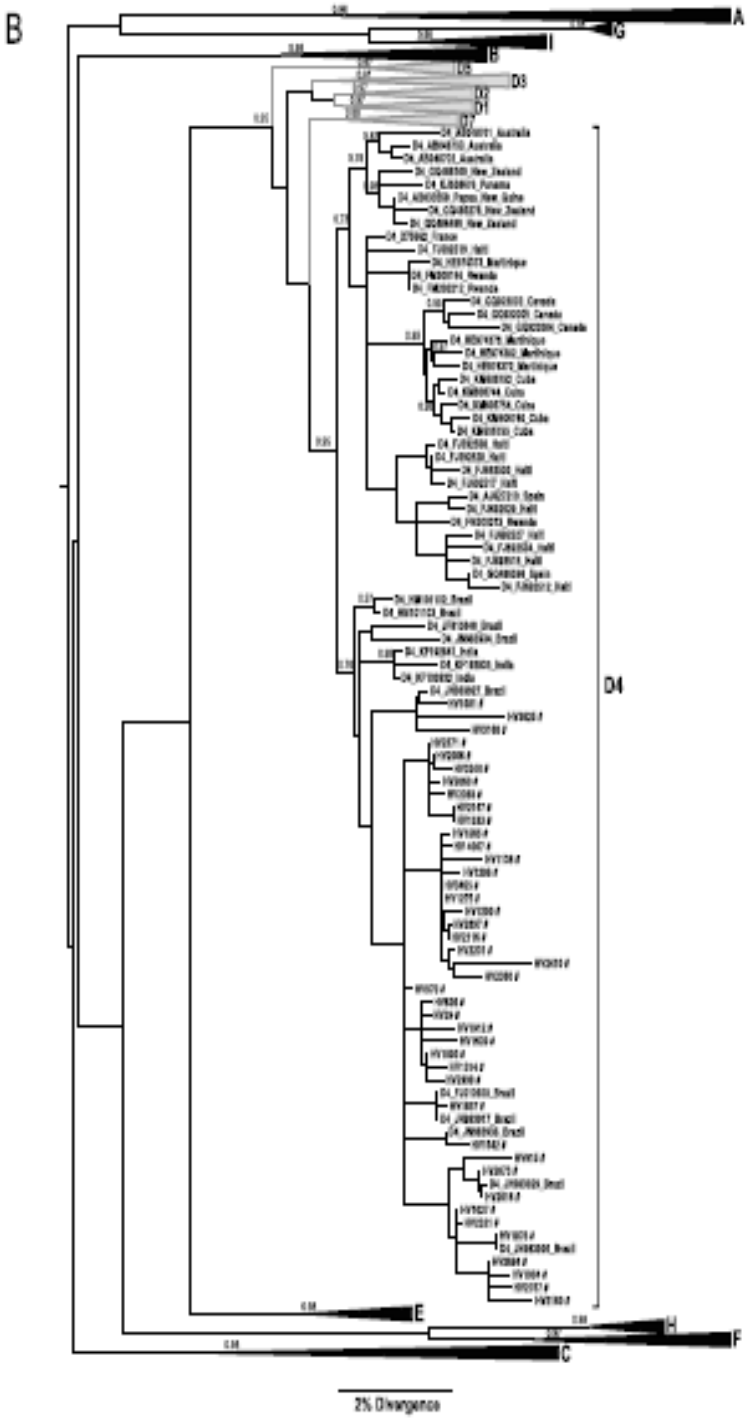

Maranhão
Brazil
Axixá
Icatu
Humberto de Campos
Morros
Urbano Santos
São Luís

Figure 2




B
A
G
I
H
D3
D2
D1
D7
D4
E
H
F
C
2% Divergence

Figure_captions

Figure 1. Geographic location of the five municipalities sampled in northeastern Maranhão, Brazil. Each star represents one municipality. The red circle indicates de state capital, São Luis.
Source. Modified from: Wikimedia Commons - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maranhao_MesoMicroMunicip.svg#/media/File:Maranhao_MesoMicroMunicip.svg

Figure 2. Phylogenetic analysis of HBV subgenotype isolates from different regions of Maranhão state, Brazil, detailing subgenotypes A1 (a) and D4 (b). Analyses were performed by Bayesian Inference using the Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) method. Sequences identified in this study are highlighted (#) and reference sequences from GenBank are indicated by their corresponding genotype/subgenotype accession number and origin. The posterior probability values are shown for key nodes.

APÊNDICE B- Artigo científico submetido-HDV

Manuscript Details

Manuscript number	VIRUS_2016_344
Title	The Hepatitis Delta genotype 8 in Northeast Brazil: The North Atlantic slave trade as the potential route for infection.
Article type	Research Paper

Abstract

Hepatitis D or Delta virus (HDV) is not well known, even though HDV and Hepatitis B virus (HBV) co-infection leads to severe forms of acute and chronic diseases. In the Western Amazon region, HDV is endemic. Recently, the HDV genotype 8 was found in chronic patients followed at the center for liver studies in the Northeast Brazil, Maranhão. Previous studies suggested that this genotype was introduced in Maranhão during the slave trade. The presence of HDV in that study, which was done outside the Amazon region, led us to investigate whether the virus is found infecting individuals in other Municipalities of Maranhão as well. Thus, we screened ninety-two HbsAg positive individuals from five Municipalities of Maranhão for anti-HD antibody and eight were found positive (8.7%). These eight positive individuals were submitted to polymerase chain reaction (PCR) to investigate active HDV infection. Half of them were positive for a fragment sequence of the delta antigen; their sequence samples were submitted to genotype characterization by phylogenetic analysis. All sequences clustered in a unique branch of the tree separated from the other branch described in Africa. Our study confirmed the presence of HDV-8 in Maranhão. These infected individuals had no evidence of contact with African people. Furthermore, we found individuals infected with HDV-8 in two more different municipalities. More studies like ours are urgent because the co-infection HBV/HDV is more difficult to treat. Identification of the endemic regions and implementation of healthy policies for preventing this infection are urgent in this region.

Keywords	HDV-8. Slave trade. Maranhão. Brazil

Corresponding Author	Max Diego Cruz Santos
Corresponding Author's Institution	São Paulo Institute of Tropical Medicine
Order of Authors	Max Diego Cruz Santos, Michele Soares Gomes-Gouvêa, Jomar Diogo Costa Nunes, Lena Maria Fonseca Barros, Flair José Carrilho, Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira, João Renato Rebello Pinho
Suggested reviewers	Anna Kramvis

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.docx [Cover Letter]

Highlights.docx [Highlights]

Manuscript.docx [Manuscript File]

figure 1.docx [Figure]

figure 2.docx [Figure]

table 1.docx [Table]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

The Hepatitis Delta genotype 8 in Northeast Brazil: The North Atlantic slave trade as the potential route for infection.

Max Diego Cruz Santos[1,+,*], Michele Soares Gomes-Gouvêa[1], Jomar Diogo Costa Nunes[2], Lena Maria Fonseca Barros[2], Flair José Carrilho[1], Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira[2], João Renato Rebello Pinho[1,3,+]

1 Laboratory of Tropical Gastroenterology and Hepatology "João Alves de Queiroz and Castorina Bittencourt Alves", LIM-07, São Paulo Institute of Tropical Medicine and Department of Gastroenterology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;

2 Center of Clinical Research, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

3 Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author. Address: Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, Instituto de Medicina Tropical, FMUSP, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar,500, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 1130618218.
E-mail address: maxdiegocs@usp.br

[+] Bolsista do CNpq – Brasil

Abstract

Hepatitis D or Delta virus (HDV) is not well known, even though HDV and Hepatitis B virus (HBV) co-infection leads to severe forms of acute and chronic diseases. In the Western Amazon region, HDV is endemic. Recently, the HDV genotype 8 was found in chronic patients followed at the center for liver studies in the Northeast Brazil, Maranhão. Previous studies suggested that this genotype was introduced in Maranhão during the slave trade. The presence of HDV in that study, which was done outside the Amazon region, led us to investigate whether the virus is found infecting individuals in other Municipalities of Maranhão as well. Thus, we screened ninety-two HbsAg positive individuals from five Municipalities of Maranhão for anti-HD antibody and eight were found positive (8.7%). These eight positive individuals were submitted to polymerase chain reaction (PCR) to investigate active HDV infection. Half of them were positive for a fragment sequence of the delta antigen; their sequence samples were submitted to genotype characterization by phylogenetic analysis. All sequences clustered in a unique branch of the tree separated from the other branch described in Africa. Our study confirmed the presence of HDV-8 in Maranhão. These infected individuals had no evidence of contact with African people. Furthermore, we found individuals infected with HDV-8 in two more different municipalities. More studies like ours are urgent because the co-infection HBV/HDV is more difficult to treat. Identification of the endemic regions and implementation of healthy policies for preventing this infection are urgent in this region.

Keywords. HDV-8. Slave trade. Maranhão. Brazil.

1 Introduction

Hepatitis D or Delta virus (HDV) is not well known like other hepatotrophic viruses such as Hepatitis B (HBV) and C (HCV). HDV antigen and antibody were discovered less than four decades ago when a group of physicians investigated serum and liver biopsy of positive HBsAg patients (Rizzetto *et al.*, 1977). HDV is the smallest virion to infect animal cells. The virus has a circular genome of around 1,700 base pairs that includes a ribozyme that plays an import role in HDV replication (Alves *et al.*, 2013; Rizzetto & Alavian, 2013; Taylor, 2014). This virus infects liver cells but differently than other known hepatotrophic viruses, it requires the surface antigen (HBsAg) of the HBV in order to enter liver cells and secrete new virions (Sureau, 2006; Taylor, 2014).

HDV is often found in the Mediterranean, Central Africa and Northern parts of South America (Radjef *et al.*, 2004). In the Amazon region of Brazil, HDV, together with HBV, are a major public health burden (Braga *et al.*, 2012; Crispim *et al.*, 2014). Furthermore, both HDV and HBV have genomes greatly diverse due to mutations that have occurred throughout millions of years of evolution and which have split them in at least 8 genotypes and several subgenotypes of HBV (Deny, 2006; Kay & Zoulim, 2007). With the exception of HDV-1, all genotypes are found in distinct geographic regions (Deny, 2006; Le Gal *et al.*, 2012; Radjef *et al.*, 2004). HDV-2 and 4 is found in the East Asia (Imazeki *et al.*, 1990; Ivaniushina *et al.*, 2001; Sakugawa *et al.*, 1999); the HDV-3 is mainly described in the Amazon Basin (Gomes-Gouvea *et al.*, 2008; Gomes-Gouvea *et al.*, 2009) and the HDV-5 to HDV-8 were found in African individuals (Deny, 2006; Francois-Souquiere *et al.*, 2015; Le Gal *et al.*, 2012; Radjef *et al.*, 2004).

Although the HDV is endemic in the Amazon, the HDV genotype 8 was found in the Northeast Brazil, Maranhão, which led some researchers to suggest that this genotype was introduced in this region during the slave trade (Barros *et al.*, 2011). The history of North Atlantic slave trade in the state of Maranhão corroborates with the same hypothesis of the introduction of the HDV genotype 8 through the slave trade (Silva, 2008). Additionally, high frequencies of D4 subgenotype of HBV have been found in Cuba and Haiti (Andernach *et al.*, 2009; Loureiro *et al.*, 2015). This subgenotype is often found in Africa (Hubschen *et al.*, 2009; Kwange *et al.*, 2013;

Norder *et al.*, 2004), has also been found in HDV-8 co-infections in Maranhão (Barros *et al.*, 2014).

The presence of HDV in Maranhão, and outside the Amazon region, led us to investigate whether the virus is found infecting individuals in other municipalities of Maranhão besides those already studied previously (Barros *et al.*, 2011), in order to certify if these findings were not only isolated cases as already found in some regions of Brazil (Mendes-Correa *et al.*, 2011; Strauss *et al.*, 1987). Thus, herein we describe the identification once again of genotype 8 of HDV in Brazil in the State of Maranhão.

2 Material and Methods

2.1 Samples and Ethical approval

Ninety-two individuals who were positive for HBsAg serological marker among 3,860 individuals, from five municipalities in Northeastern Maranhão, participated in this study (Figure 1). The research ethnics committee of University Hospital, Federal University of Maranhão (HUUFMA) approved this study and written informed consent was obtained from all individuals that agreed to participate. We screened the 92 samples for anti-HD using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (DiaSorin, Italy).

2.2 HDV RNA and HBV DNA amplification and sequencing

HDV RNA and HBV DNA were extracted using the QIAamp MiniElute kit (Qiagen®, Hilden, Germany). Fragments of 403 base pairs (bp) for HDV and 1306 bp for HBV were amplified by nested PCR (polymerase chain reaction) according to procedures described elsewhere (Gomes-Gouvea *et al.*, 2008; 2009). PCR fragments were purified using ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit (Life Technologies, USA). Sequencing procedures are described in a previous study (Gomes-Gouvea *et al.*, 2008; 2009). We performed carefully all procedures to avoid contamination or false-positive results (Kwok & Higuchi, 1989).

2.3 HDV and HBV genotyping

We used the Phred–Phrap software (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998) to evaluate the quality of the electropherogram. We obtained consensus sequences from the alignment of the sense and antisense sequences of each strain using CAP3 software available at the web page Eletropherogram quality analysis Phred (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/).

All HDV and HBV sequences were aligned and edited using the software BioEdit (v. 7.0.8) and the integrated CLUSTAL W program. HDV genotypes were classified by phylogenetic reconstructions using the published reference sequences from the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Phylogenetics analyses were performed using a Bayesian approach, which was done using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulation implemented in BEAST v.1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007). The analysis was performed using relaxed uncorrelated lognormal molecular clock and GTR + G + I as nucleotide substitution model; MCMC chains were run for 10 million states, and sampled every 1,000 runs to obtain the convergence of parameters. Maximum clade credibility tree was summarized after excluding 10% of burn-in using TreeAnnotator v.1.6.1 and the tree was visualized in FigTree v1.4.2. (Available at: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

3 Results

3.1 Demographical characteristics of HDV- RNA positive individuals

Among the 92 individuals screened for anti-HD antibody, eight were positive (8.7%). Samples from these eight positive individuals were submitted to PCR. Half of them were positive for a fragment sequence of the delta antigen and submitted to sequencing. Only two of them (50%) had detectable HBV DNA and had the HBV subgenotype determined. Among the four HDV-RNA carriers, just one was female. Their ages ranged from 23 to 49 years and they lived in three different municipalities (Table 1).

3.2 Genotype distribution

The four successful sequenced strains were submitted to phylogenetic analysis and showed that all sequences clustered, with high posterior probability, with the African genotype 8 together with other two strains found in Maranhão (Figure 2). All sequences clustered in a unique branch of the tree apart from all the other described in GenBank. Although there were two infected individuals from the same municipality of Humberto de Campos, these sequences did no relate with each other in the tree. The same was found for the sample from Urbano Santos with the ones from our previous study (JF 298899_MA_Brazil e JF 298898_MA_Brazil) (Barros *et al.*, 2011). The two individuals co-infected with HBV were classified into subgenotype D4.

4 Discussion

In Brazil, HDV is a major public health burden in the Western Amazon region, where co-infection with HBV leads to severe forms of acute and chronic diseases (Bensabath *et al.*, 1987; Viana *et al.*, 2005). Conversely, only some cases of HDV infection have been sparsely found in other regions of Brazil (Mendes-Correa *et al.*, 2011; Strauss *et al.*, 1987). The Northeastern region of Maranhão, according to our knowledge, was the first region outside Amazon where a modest frequency of anti-HD serological marker (3.8%; 5/133) was found among positive HBsAg individuals. Also, the African HDV-8 was first found in this region (Barros *et al.*, 2011). Thus, this finding led us to investigate whether this genotype could be found in five municipalities other than the metropolitan region of this state.

The HDV genotype 8 was firstly found infecting individuals in France who were born in West Africa and Central Africa (Le Gal *et al.*, 2006; Makuwa *et al.*, 2008; Makuwa *et al.*, 2009). In this study, four strains were successfully sequenced and classified into this African genotype 8, which was firstly reported in Brazil by Barros et al. (2011) in Maranhão. Although we have collected samples in the same state, Barros et al. (2011) studied samples that were mostly from the metropolitan region of capital city of Maranhão. The study of Barros et al. (2011) found only one individual from the capital São Luís who was infected with HDV-3. The study also found genotype 8 in two unrelated individuals in the municipality of Urbano Santos, which is a municipality outside the metropolitan region. Similarly to our findings, these infected individuals had no history of travel to other countries or contact with African people. Furthermore, we found individuals infected with HDV-8 in two additional municipalities located outside the metropolitan region. Thus, it is possible that the virus is endemic not only in this region of Urbano Santos but elsewhere in Maranhão. More studies are required to increase our knowledge on HDV in this region. Identification of endemic regions and implementation of healthy policies to prevent this infection are urgent measures to be taken.

HDV and HBV were discovered with around 10 years apart (Blumberg *et al.*, 1965; Rizzetto *et al.*, 1977). A plausible explanation for so few molecular epidemiology studies on HDV relies on the idea that HBV vaccination that occurred in the 1990s

would "send HDV off the match" (Ahan & Gish, 2014; Rizzetto & Ciancio, 2012). Thus, apart from few cases described in Brazil, care should be taken in order to avoid HDV spread a possible epidemics in the future.

The first strains of HDV-8 were identified in individuals from France, but because the study's authors did not identify any risk factor associated with the occurrence of chronic disease in the patients studied, they concluded the individuals were infected during childhood in Senegal and Ivory Coast (Le Gal *et al.*, 2006). Furthermore, a strain from Congo previously classified by Radjef et al. (2004) as HDV-7 was rectified as HDV-8 (Le Gal *et al.*, 2006). Other strains from Africa were isolated from Gabon (Francois-Souquiere *et al.*, 2016; Makuwa *et al.*, 2008; Makuwa *et al.*, 2009). Thus, with this information in mind, and adding the finding of HDV-8/D4 co-infection in two individuals, the theory of the origin of these strains in Africa is strongly supported, as proposed by Barros et al. (2011). The D4 subgenotype of HBV is rare in the world but more frequently found in Africa and in regions where there was greater contribution of Africans in the population formation of the modern world, according to history records (Andernach *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2011; Brichler *et al.*, 2013; Hubschen *et al.*, 2009; Kwange *et al.*, 2013; Loureiro *et al.*, 2015; Osiowy *et al.*, 2011; Perbi, 2001).

It is noteworthy that our samples infected with HDV-8 clustered, with the highest posterior probability, with a unique branch of the tree harboring only Maranhão strains. This pattern is different from that found in a recent study of Francois-Souquiere et al. (2016) where two divergent subgroups in their phylogenetics analysis with samples from Gabon were found. Other issue that drew our attention is the fact that the monophyletic pattern found in HDV-8 was also identified in individuals infected with HBV-D4 in mono or co-infection with HDV-8 (Barros et al., 2011; Barros et al., 2014). This indicates that this strain was introduced just once in this region along with HBV genotype D4.

Because only few studies are available that can contribute to the discussion about the origin of HDV-8 in Brazil (Francois-Souquiere *et al.*, 2016; Barros et al., 2011;; Makuwa *et al.*, 2009; Makuwa *et al.*, 2008; Le Gal *et al.*, 2006), the history in the region may explain the link between Brazil and Africa in regard to HDV. Thus, the history of Maranhão, Africa and Caribbean countries, regarding the trans-Atlantic slave trade, may explain the observations regarding these genotypes. In summary, the main cargos of enslaved Africans in Maranhão were from the West Africa (Meireles, 2009;

Silva, 2008) where the first HDV strains are from (Le Gal *et al.*, 2006). Some geographic features and navigation issues (wind and ocean currents) made Maranhão adopt the slave trading of North Atlantic countries (Silva, 2008). The identification of HDV-8 in Maranhão seems indeed to be related to the slavery trade (Barros *et al.*, 2011), since none of the individuals harboring theses strains reported to have had any contact with Africans. Furthermore, we observe that all HDV infected individuals in our study declared themselves as black or mestizo/mullato, which may relate to the great contribution of African ancestry in the past, during the trade of slaves from Africa to the New World, (Pena *et al.*, 2011).

Our findings indicate that HDV may be spreading to regions of Brazil other than Amazon. More studies must be done in order to identify the main strains spreading outside Amazon.

Acknowledgments

The authors thank the State Health Department of Maranhão – Epidemiological Surveillance Secretariat; Central Laboratory of Public Health- Maranhão (LACEN-MA) as well as the municipal government of all participating Municipalities. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão – (FAPEMA) [grant: PPSUS-03348/13 and PPP-01263/12]; São Paulo Research Foundation (FAPESP) – [grant: 2009/53946-3]; Brazilian Ministry of Health [grant: 1/2013]. Max Diego Cruz Santos received a PhD. fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant: 141138/2012-2]. João Renato Rebello Pinho receives fellowship from CNPq (Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq – Nível 2).

References

Ahan, J. & Gish, R. G. [2014]. Hepatitis D Virus: A Call to Screening. *Gastroenterology & Hepatology* **10**, 647-686.

Alves, C., Branco, C. & Cunha, C. [2013]. Hepatitis delta virus: a peculiar virus. *Advances in virology* **2013**, 560105.

Andernach, I. E., Nolte, C., Pape, J. W. & Muller, C. P. [2009]. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerging infectious diseases* **15**, 1222-1228.

Barros, L. M., Gomes-Gouvea, M. S., Kramvis, A., Mendes-Correa, M. C., dos Santos, A., Souza, L. A., Santos, M. D., Carrilho, F. J., de Jesus Domicini, A., Pinho, J. R. & de Souza Paiva Ferreira, A. [2014]. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhao state, Northeast Brazil. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **24**, 68-75.

Barros, L. M., Gomes-Gouvea, M. S., Pinho, J. R., Alvarado-Mora, M. V., Dos Santos, A., Mendes-Correa, M. C., Caldas, A. J., Sousa, M. T., Santos, M. D. & Ferreira, A. S. [2011]. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? *Virus research* **160**, 333-339.

Bensabath, G., Hadler, S. C., Soares, M. C., Fields, H., Dias, L. B., Popper, H. & Maynard, J. E. [1987]. Hepatitis delta virus infection and Labrea hepatitis. Prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon Basin. *Jama* **258**, 479-483.

Blumberg, B. S., Alter, H. J. & Visnich, S. [1965]. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Jama* **191**, 541-546.

Braga, W. S., Castilho Mda, C., Borges, F. G., Leao, J. R., Martinho, A. C., Rodrigues, I. S., Azevedo, E. P., Barros Junior, G. M. & Parana, R. [2012]. Hepatitis D virus infection in the Western Brazilian Amazon - far from a vanishing disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **45**, 691-695.

Brichler, S., Lagathu, G., Chekaraou, M. A., Le Gal, F., Edouard, A., Deny, P., Cesaire, R. & Gordien, E. [2013]. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *The Journal of general virology* **94**, 2318-2329.

Crispim, M. A., Fraiji, N. A., Campello, S. C., Schriefer, N. A., Stefani, M. M. & Kiesslich, D. [2014]. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC infectious diseases* **14**, 94.

Deny, P. [2006]. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? *Current topics in microbiology and immunology* **307**, 151-171.

Drummond, A. J. & Rambaut, A. [2007]. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* **7**, 214.

Ewing, B. & Green, P. [1998]. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research* **8**, 186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. & Green, P. [1998]. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research* **8**, 175-185.

Francois-Souquiere, S., Makuwa, M., Bisvigou, U. & Kazanji, M. [2016]. Epidemiological and molecular features of hepatitis B and hepatitis delta virus transmission in a remote rural community in central Africa. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **39**, 12-21.

Gomes-Gouvea, M. S., Pereira Soares Mdo, C., Guedes de Carvalho Mello, I. M., Brito, E. M., Pereira Mola Lde, J., Bensabath, G., Nunes, H. M., Carrilho, F. J. & Pinho, J. R. [2008]. Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin. *Acta tropica* **106**, 149-155.

Gomes-Gouvea, M. S., Soares, M. C., Bensabath, G., de Carvalho-Mello, I. M., Brito, E. M., Souza, O. S., Queiroz, A. T., Carrilho, F. J. & Pinho, J. R. [2009]. Hepatitis B virus and

Moraes, M. R., Ojopi, E. B., Perini, J. A., Racciopi, C., Ribeiro-Dos-Santos, A. K., Rios-Santos, F., Romano-Silva, M. A., Sortica, V. A. & Suarez-Kurtz, G. [2011]. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PloS one* **6**, e17063.

Peribi, A. [2001]. SLAVERY AND THE SLAVE TRADE IN PRE-COLONIAL AFRICA. *University of Illinois*, 1-13.

Radjef, N., Gordien, E., Ivaniushina, V., Gault, E., Anais, P., Drugan, T., Trinchet, J. C., Roulot, D., Tamby, M., Milinkovitch, M. C. & Deny, P. [2004]. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *Journal of virology* **78**, 2537-2544.

Rizzetto, M. & Alavian, S. M. [2013]. Hepatitis delta: the rediscovery. *Clinics in liver disease* **17**, 475-487.

Rizzetto, M., Canese, M. G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F. & Verme, G. [1977]. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* **18**, 997-1003.

Rizzetto, M. & Cianciio, A. [2012]. Epidemiology of hepatitis D. *Seminars in liver disease* **32**, 211-219.

Sakugawa, H., Nakasone, H., Nakayoshi, T., Kawakami, Y., Miyazato, S., Kinjo, F., Saito, A., Ma, S. P., Hotta, H. & Kinoshita, M. [1999]. Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. *Journal of medical virology* **58**, 366-372.

Silva, D. B. D. d. [2008]. The Atlantic Slave Trade to Maranhaão, 1680-1846: Volume, Routes and Organisation. *Slavery and Abolition* **29**, 477-501.

Strauss, E., Gayotto, L. C., da Silva, L. C., Alves, V. A., Carrilho, F., Chamone, D. A., da Silva, E. F., Porta, G., Granato, C. & Trepo, C. [1987]. Unexpected low prevalence of delta antibodies in the east Amazon region and Sao Paulo: evidence for regional differences in the epidemiology of delta hepatitis virus within Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **81**, 73-74.

Sureau, C. [2006]. The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle. *Current topics in microbiology and immunology* **307**, 113-131.

Taylor, J. M. [2014]. Host RNA circles and the origin of hepatitis delta virus. *World journal of gastroenterology: WJG* **20**, 2971-2978.

Viana, S., Parana, R., Moreira, R. C., Compri, A. P. & Macedo, V. [2005]. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **73**, 808-814.

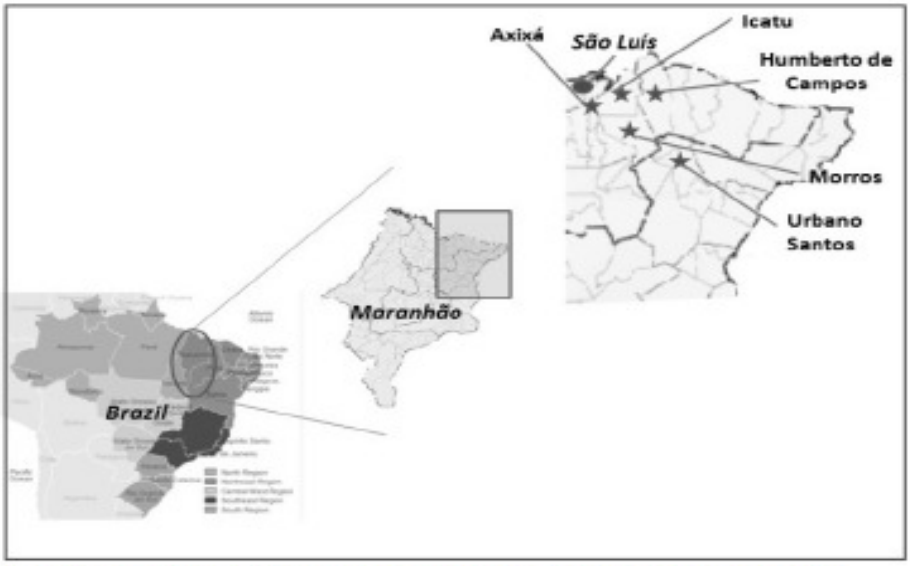


Figure 1. Geographic localization of the municipalities of this study (stars). The circle indicates the state capital, São Luís.
Source: modified from Wikimedia Commons https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maranhao_MesoMicroMunicip.svg#/media/File:Maranhao_MesoMicroMunicip.svg and https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Brazil_Labelled_Map.svg#/media/File:Brazil_Labelled_Map.svg.

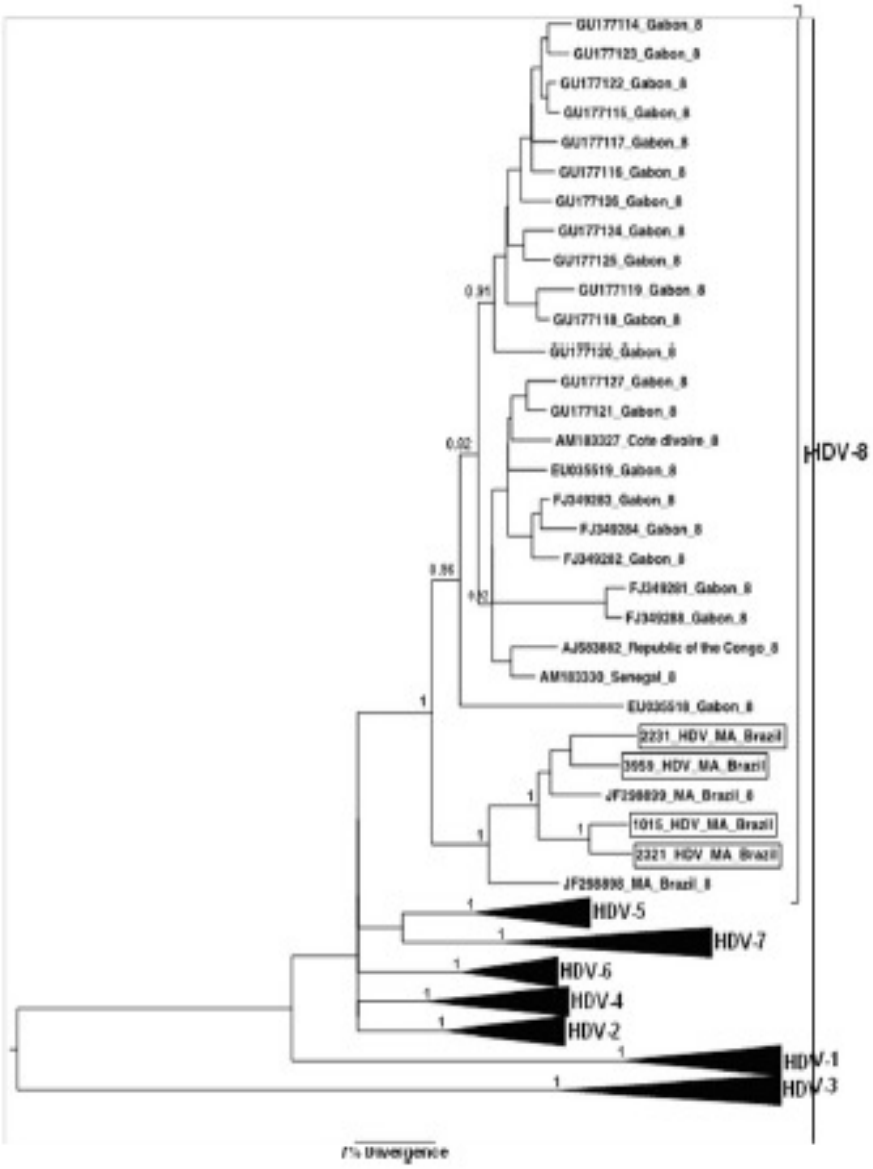


Figure 2 - Phylogenetic analysis of HDV isolates identified in this study (marked by rectangular shape). Sequences retrieved from GenBank are indicated by their corresponding accession number, genotype and geographic origin. The values of posterior probability are shown for key nodes.

Tabela 1- Demographical characteristic HBV/HDV co-infected individuals described in this study

ID	Gender	Race*	Age	Origin	Zone	Family Income (MW)	HDV-genotype	HBV-subgenotypepe
1015	M	Black	23	Morros	Rural	< 1 MW	HDV-8	ND
2231	M	Black	25	H. Campos	Rural	< 1 MW	HDV-8	D4
2321	M	Black	49	H. Campos	Rural	< 1 MW	HDV-8	D4
3959	F	Mestizo/Mullato	39	U. Santos	Urban	< 1 MW	HDV-8	ND

*self-declaration; M-Male; F-Female; MW- Minimum Wage; ND-Not determined

ANEXOS

ANEXO A- Termo de consentimento livre e esclarecido

As hepatites virais são doenças que afetam o fígado e que possuem grande importância na saúde pública. Estas doenças na maioria das vezes não têm sintomas e quando apresentam podem ser fatais. Por esta razão convidamos o Senhor (a), a participar da pesquisa "**Estudo das Hepatites B, C e D nos municípios de Urbano Santos, Humberto de Campos e da Região do Baixo Munim, Maranhão, Brasil,**" a ser realizada, nos municípios de Urbano Santos, Axixá, Morros, Icatu e Humberto de Campos, coordenada pela Professora Doutora Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira, residente à rua, Mitra, Ed. Maison Lafite Ap 1101. Renascença II, São Luís – MA. Telefone: (98) 3227-39.08; Fax-(98)32270131; e-mail adalgisa@terra.com.br. Este projeto tem como objetivo verificar o número de pessoas contaminadas com os vírus das Hepatites B (HBV), C (HCV) e D (HDV) na população dos municípios já citados. Também serão feitos exames de sangue para mostrar se há uma maior facilidade ou dificuldade para o aparecimento e desenvolvimentos dessas hepatites, de onde ela vem, (da África, Europa ou América) e se algum desses vírus tem alguma relação com as raças (branca, negra, indígena). Serão coletadas amostras de 15 mL de sangue. A coleta de sangue poderá causar um leve desconforto local, ou mesmo sensibilização e escurecimento do local de coleta, porém se o senhor (a) pressionar com algodão à parte puncionada, mantendo o braço estendido, sem dobrá-lo, a possibilidade de ficar roxo ou dolorido é muito pequena.

O material utilizado para coleta de sangue será descartado em recipientes apropriados para materiais pérfuro-cortante e todos os tubos de sangue serão mantidos em caixas térmicas com gelo. Todas as amostras de sangue serão utilizadas exclusivamente para este projeto. Ao término desta pesquisa o restante do material será descartado.

Em caso de dúvidas e/ou questionamentos relacionados com a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Universidade Federal do Maranhão-HUUFMA, situado na Rua Barão de Itapary, 227, Centro, CEP 65020-070, São Luis-MA, telefone: (98) 2109 1250, email: cep@huufma.br. Quaisquer outras dúvidas a respeito da pesquisa, entrar em contato com a Prof. Dra. Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira pelo telefone (98) 2109 1294.

Para realizar esta pesquisa, contamos com sua colaboração no sentido de responder as perguntas do formulário. Informamos que a pesquisa não lhe trará nenhum prejuízo, não afetará em nada se você tiver fazendo algum tratamento. Não haverá nenhum gasto com sua participação como também não receberá nenhum pagamento. Os exames serão totalmente gratuitos. Será garantido sigilo sobre as informações pessoais, tais como nome e RG. Sua participação não é obrigatória, mas é importante e, a qualquer momento poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, como também poderá se recusar a responder quaisquer das questões que lhes causar constrangimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com a instituição.

Caso o exame seja positivo para algum dos vírus das hepatites, entraremos em contato para devida orientação. O resultado será de fundamental importância para melhorar o atendimento à população acometida da Hepatite B, C e D como também será usado para fins científicos e será publicado para uso da comunidade acadêmico-científica. Se concordar em participar, favor assinar as duas vias desse documento no final página sendo uma sua e outra do pesquisador. Agradecemos pela sua participação e nos colocamos à sua disposição para quaisquer esclarecimentos.

NOME E ASSINATURA DO SUJEITO OU RESPONSÁVEL (menor de 21 anos):

São Luís (MA)____/____/____

_____ _____

(Nome por extenso) **(Assinatura)**

Assinatura do Pesquisador (a)_____

ANEXO B- Parecer do comitê de ética pela plataforma Brasil (prorrogação de prazo)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO/HU/UFMA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo das Hepatites B, C e D nos Municípios de Urbanos Santos, Humberto de Campos, e da Região do Baixo Munin, Maranhão, Brasil.

Pesquisador: Adalgisa de Souza Paiva Ferreira

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 20935413.5.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 448.731

Data da Relatoria: 01/11/2013

Apresentação do Projeto:

A hepatite viral é uma doença provocada por diferentes agentes etiológicos que apresentam particularidades importantes em suas características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões e 170 milhões de pessoas estejam infectadas com os vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV), respectivamente. A infecção pelo vírus da hepatite D (HDV) tem distribuição geográfica heterogênea, estimando-se cerca de 18 milhões de infectados pelo HDV entre os 350 milhões de portadores crônicos do HBV. Estudo transversal com 4000 participantes para conhecer a prevalencia de hepatites virais e caracterizar os genótipos e subgenótipos desses vírus nos municípios de Urbano Santos, Humberto de Campos e de municípios da região do Baixo Munim (Axixá, Morros e Icatú)-MA. Serão submetidos à coleta de 15 ml de sangue periférico para realização dos seguintes marcadores sorológicos: HBsAg, anti-HBc e anti-HBs, anti-HDV e anti-HCV que serão realizados no Laboratório Central do Estado do Maranhão (LACEN), através da técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA) sendo os os testes de biologia molecular no CEPEC (Com a orientação do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical da Faculdade de Medicina da USP LGHT-FM/USP). O DNA e RNA viral serão extraídos de soro ou plasma . Os dados serão analisados utilizando o programa EPI-INFO (2000) do CDC de

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227
Bairro: CENTRO **CEP:** 65.020-070
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250 **Fax:** (98)2109-1223 **E-mail:** cep@huufma.br

Atlanta/EUA e Excel (Windows 2007). A estimativa dos alelos será feitos a partir do método de contagem e também será utilizado o programa ADMIX.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Conhecer a prevalência das hepatites virais B, C e D e caracterizar os genótipos e subgenótipos desses vírus nos municípios de Urbano Santos, Humberto de Campos e de municípios da região do Baixo Munim (Axixá, Morros e Icatú)-MA e realizar estudos imunogenéticos e de ancestralidade nessa população.

Objetivo Secundário:

Identificar os indivíduos com sorologia positiva para os marcadores HBsAg, anti-HBc e/ou anti-HBs e anti-HCV. Identificar os indivíduos que apresentam o marcador sorológico para a hepatite D (anti-HDV) entre os portadores do HBsAg. Caracterizar os genótipos, subgenótipos (HBV) e subtipos (HCV) dos vírus da hepatite B, C e D através da técnica de sequenciamento direto. Estimar a ancestralidade genômica nessa população através de marcadores moleculares. Verificar a diversidade genética do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, genes KIR e IL28B.Verificar a existência de associação entre maior percentagem de marcadores africanos e portadores das hepatites comparadas com não portadores. Verificar a existência de associação entre maior percentagem de marcadores africanos e genótipos virais. Verificar a existência de associação entre os alelos de MHC, KIR e IL28B com a presença da infecção viral pelos HBV e HCV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Desconforto na coleta de sangue, assim como a possibilidade de formação de edema na área da punção venosa.

Benefícios:Os pesquisadores destacam que os benefícios estão vinculados às ações de saúde de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento além de informações precisas sobre as reais prevalências destas infecções trazendo impacto social de grande relevância.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Protocolo com temática com relevante com proposta de diagnóstico precoce e conhecimento da prevalência das hepatites na região estudada trazendo impacto social de grande relevância.Estudo aprovado anterior à plataforma Brasil e inserido com emenda solicitando inclusão de novos participantes, prorrogação de execução e substituição da palavra "prevalência para Estudo" do título do estudo, sendo justificado que a alteração não refete na metodologia. A inclusão de novos pesquisadores e prorrogação do tempo esta associada ao número da amostra(4.000 participantes.)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo cumpre com as exigências em relação aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Projeto de pesquisa, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) orçamento e currículo do(s) pesquisador(es). Apresenta justificativa para solicitação de emenda.Atende, portanto às exigências da Resolução CNS/MS nº 466/12.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado antes da plataforma Brasil com inserção de emenda com solicitações referente à prorrogação do tempo de coleta, inclusão de novos pesquisadores e modificações no título original. Documentos apresentados para justificativa da solicitação foram analisados sendo a emenda considerada aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PROTOCOLO APROVADO por atender aos requisitos fundamentais da Resolução CNS/MS nº 466/12). Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser inseridas à plataforma encaminhada ao CEP-HUUFMA de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO/HU/UFMA

Continuação do Parecer: 448.731

SAO LUIS, 06 de Novembro de 2013

Assinador por:
Rita da Graça Carvalhal Frazão Corrêa
(Coordenador)

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227
Bairro: CENTRO **CEP:** 65.020-070
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250 **Fax:** (98)2109-1223 **E-mail:** cep@huufma.br