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

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.

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).

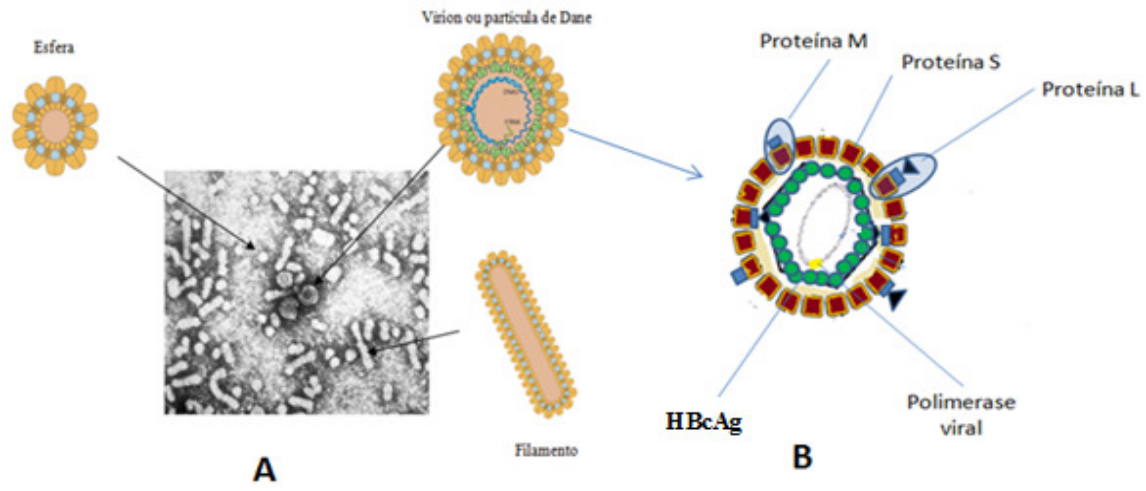

Figura 1-(A) Micrografia eletrônica mostrando as partículas de Dane, partículas esféricas e filamentosas. (B) Esquema representativo do vírion do HBV.
Fonte: Figura 1A-Modificado de *Center for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library* (Micrografia) e *Swiss Institute of Bioinformatics*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

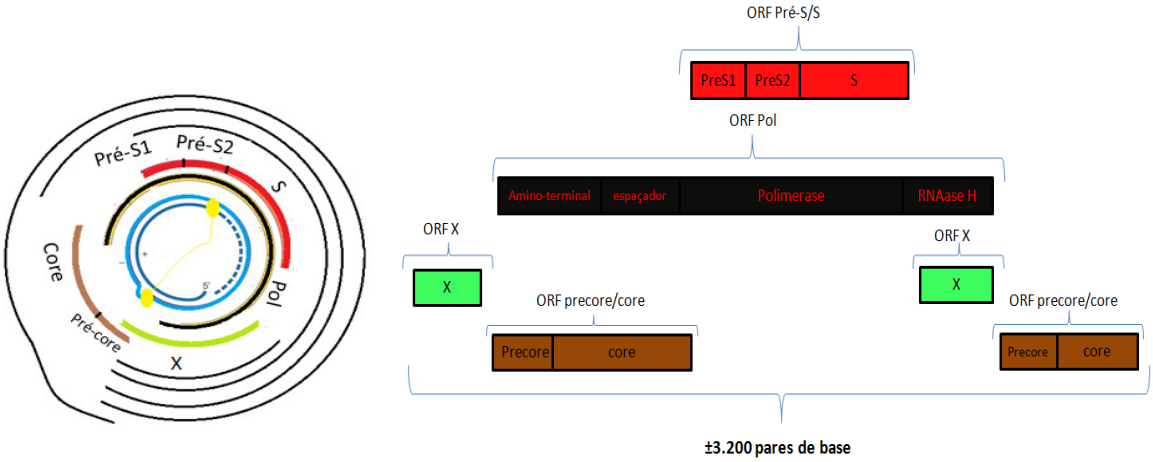

Figura 2-Esquema simplificado circular e horizontal da organização genômica do HBV. As quatro linhas pretas exteriores no esquema circular representam os RNAs mensageiros.
Fonte: Autoria própia

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).

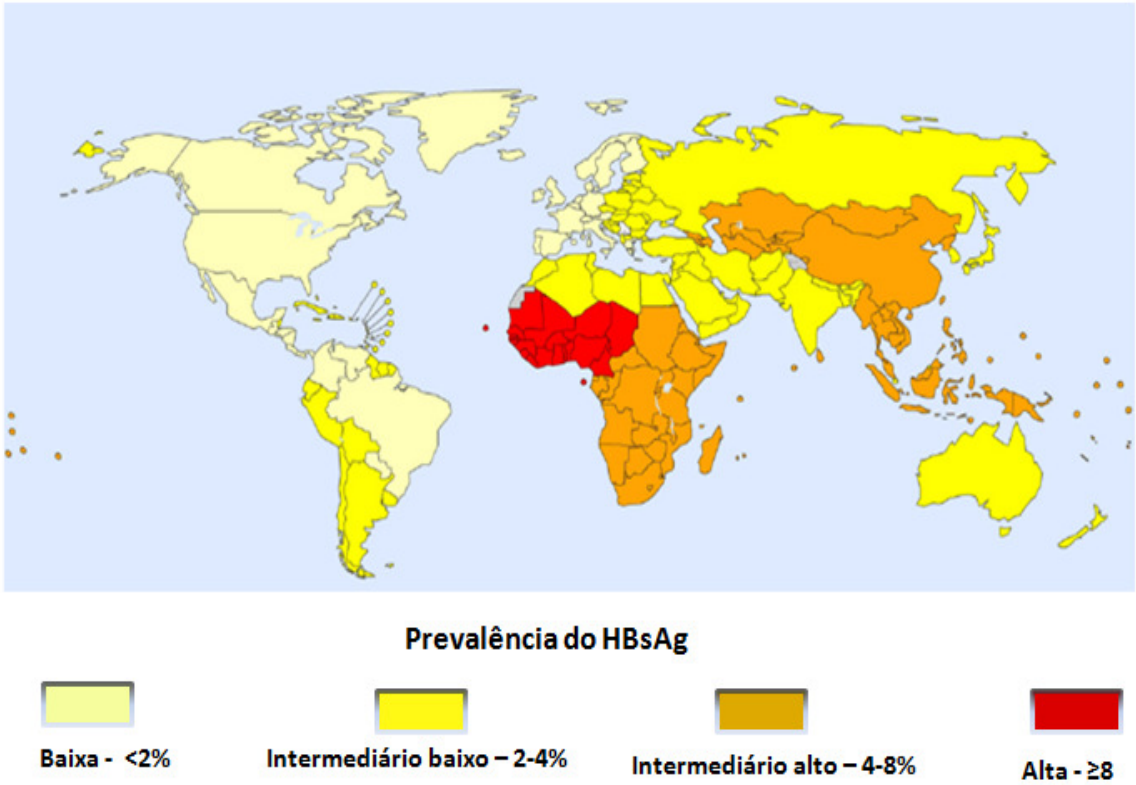

Figura 3 - Prevalência da infecção pela Hepatite B em indivíduos de 19 a 49 anos no ano de 2005.
Fonte: Modificado de Ott et al., 2012.

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).

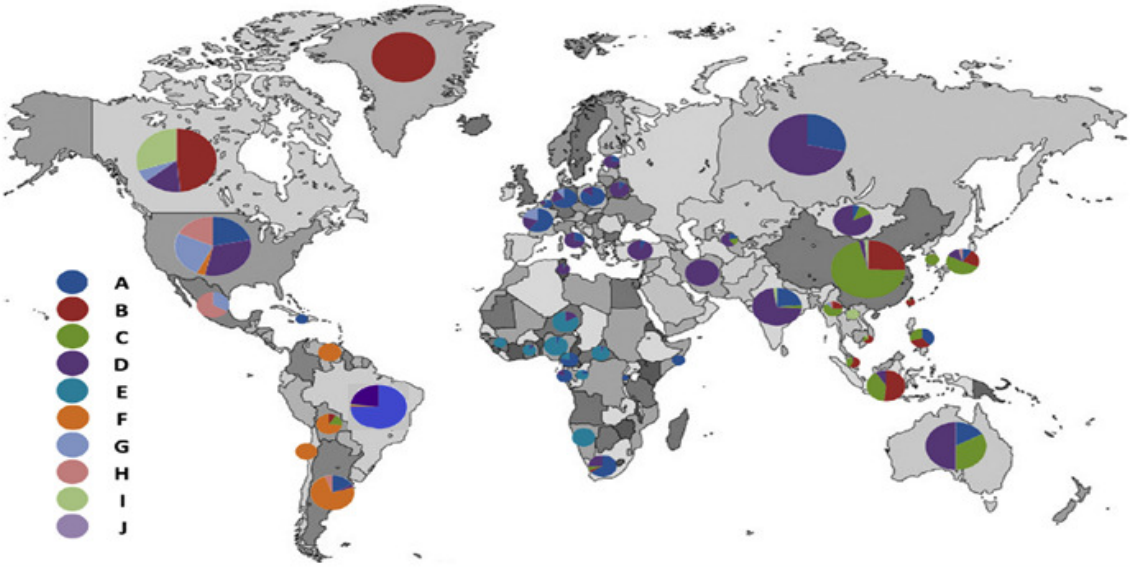

Figura 4 - Distribuição geográfica dos genótipos do HBV.
Fonte: Adaptado de Shi et al. 2013

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).

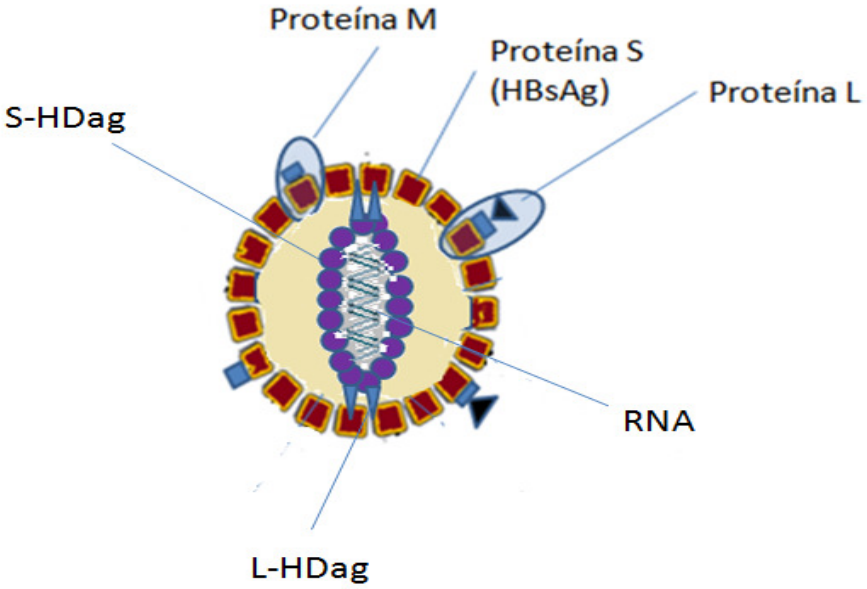

Figura 5 - Figura representativa do vírion do HDV com as proteínas de envelope do HBV.
Fonte: Autoria própia.

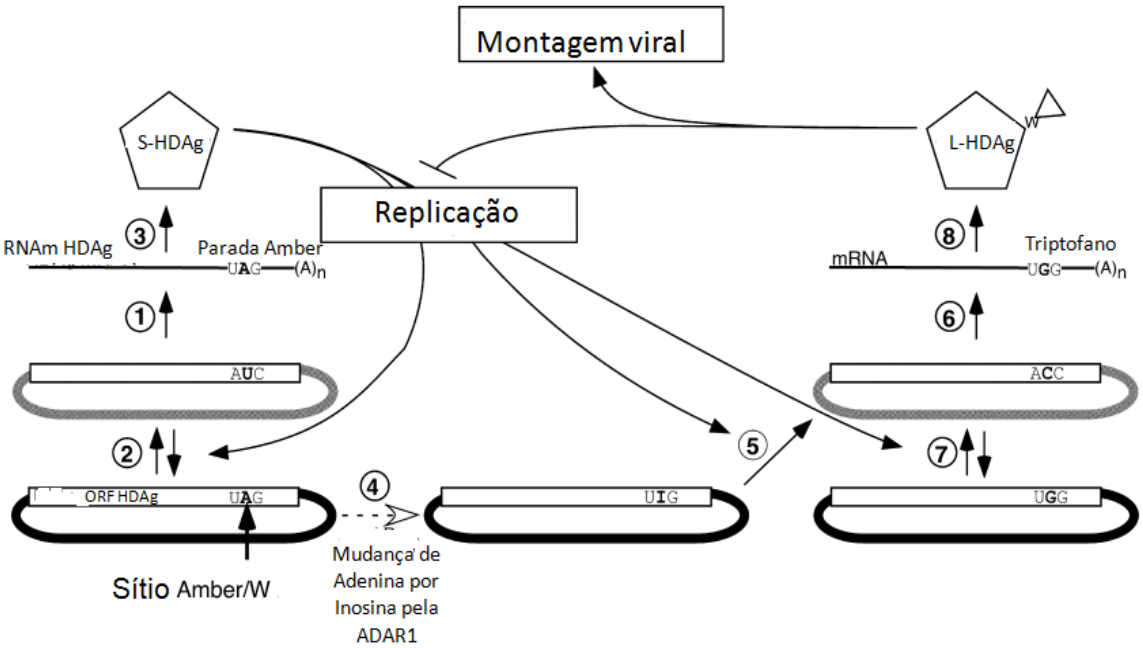

Figura 6-Processo de edição no RNAm do HDV. A linhas grossas e pretas representam os RNAs antigenômicos e as cinzas os genômicos. 1, síntese do RNA mensageiro codificante da proteína S-HDAg; 2, replicação do RNA genômico e antigenômico; 3 tradução da proteína S-HDAg; 4, edição do RNA; 5, RNA antigenômico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

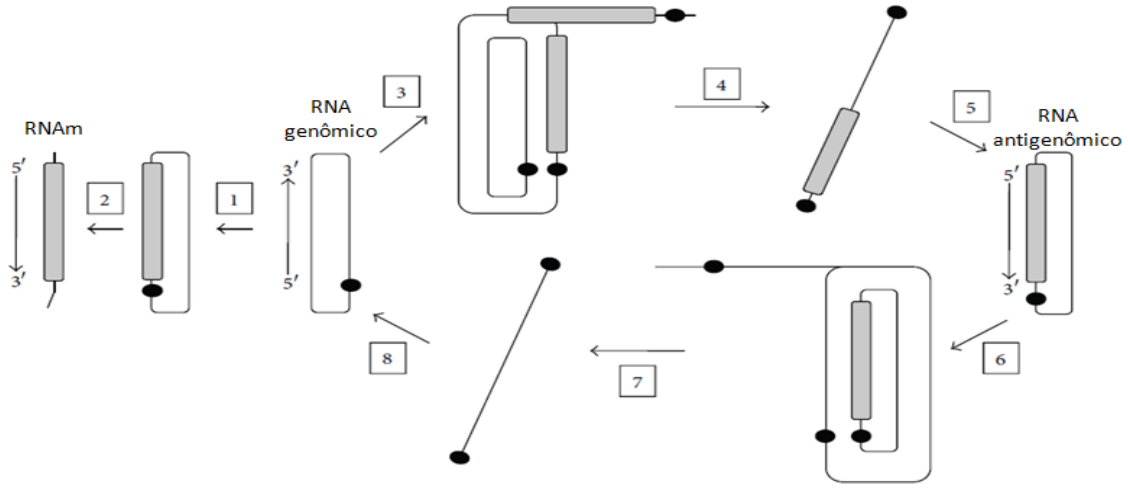

Figura 7 - Modelo replicativo do HDV. 1, 2 e 3, RNA genômico do HDV é utilizado como molde para os RNAm e para RNAs multiméricos de conformidade antigenômica; 4, Esses últimos contêm duas cópias de ribozimas que autoclivam o RNA, produzindo o RNA linear; 5, esses RNAs são ligados para a produção de RNA 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.

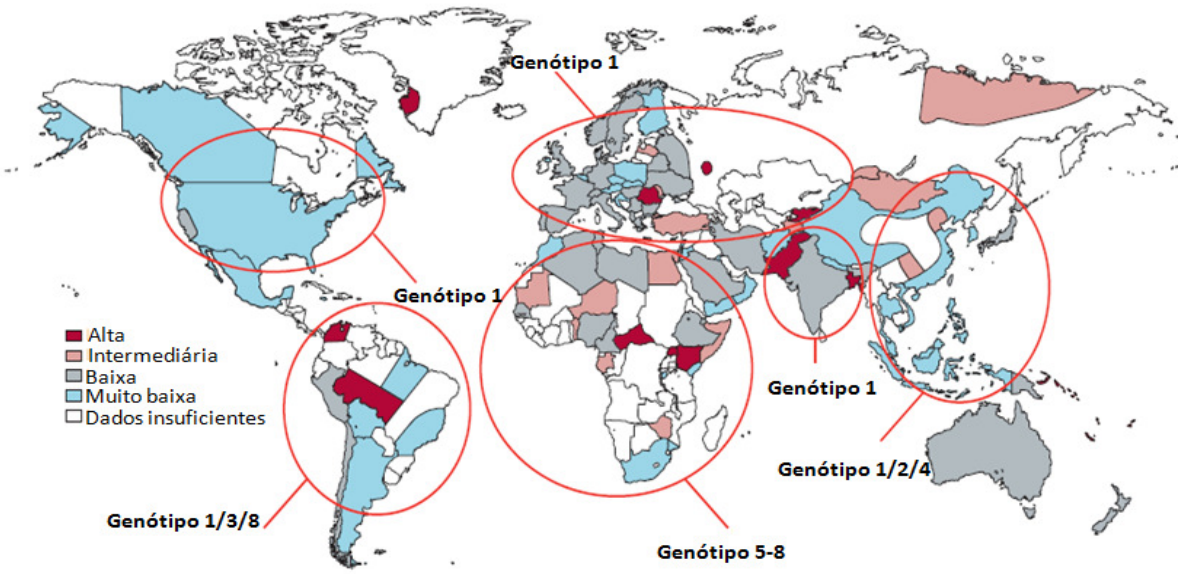

Figura 8 - Prevalência mundial do HDV e seus genótipos.
Fonte: Modificado de Hughes et al., 2011

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).

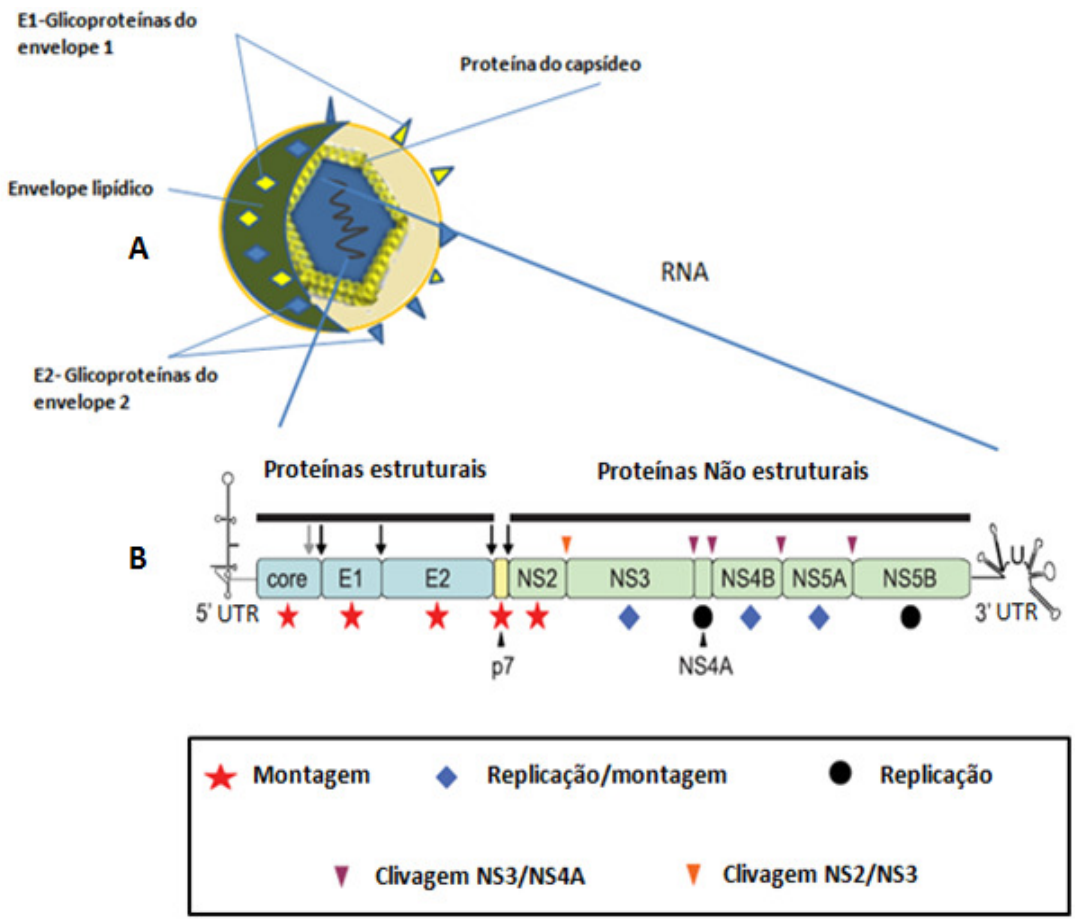

Figura 9 - Esquema estrutural e organização genômica do HCV. (A) ilustração evidenciando a superfície viral com o envelope lipídico e as glicoproteínas. (B) Genoma do HCV mostrando as regiões UTR e codificantes de proteínas estruturais e não estruturais, e suas principais funções. As setas cinza e preta 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).

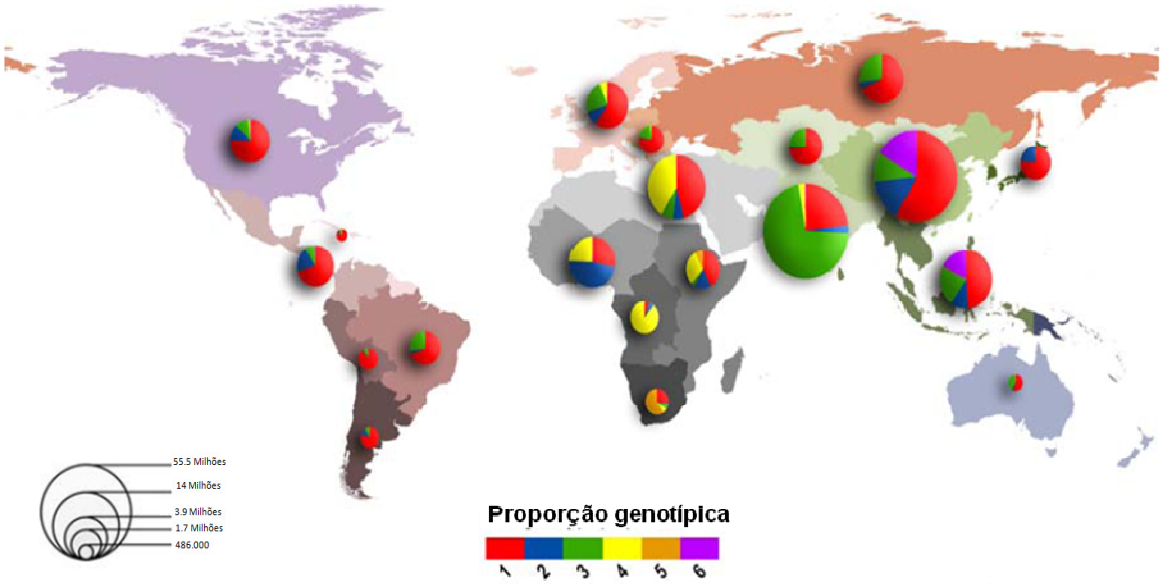

Figura 10 - Distribuição dos genótipos do HCV no mundo.
Fonte: Adaptado de Messina et al., 2015

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).

CONCLUSÕES

6 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.