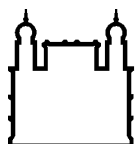


MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**ESTABELECIMENTO DO MODELO DE HEPATITE CRÔNICA PELO  
VÍRUS DA HEPATITE E GENÓTIPO 3 (HEV-3) EM MACACA  
FASCICULARIS**

**NOEMI ROVARIS GARDINALI**

Rio de Janeiro  
Março de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Noemi Rovaris Gardinali**

**ESTABELECIMENTO DO MODELO DE HEPATITE CRÔNICA PELO VÍRUS DA  
HEPATITE E (GENÓTIPO 3) EM *Macaca fascicularis***

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte  
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em  
2017

**Orientador:** Dr. Marcelo Alves Pinto.

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2017

Gardinali, Noemi Rovaris.

ESTABELECIMENTO DO MODELO DE HEPATITE CRÔNICA PELO  
VÍRUS DA HEPATITE E GENÓTIPO 3 (HEV-3) EM MACACA FASCICULARIS /  
Noemi Rovaris Gardinali. - Rio de Janeiro, 2017.

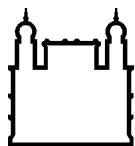
117 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia  
Parasitária, 2017.

Orientador: Marcelo Alves Pinto.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Vírus da Hepatite E. 2. macacos cinomolgos. 3. hepatite crônica. 4.  
tacrolimo. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: Noemi Rovaris Gardinali**

### **ESTABELECIMENTO DO MODELO DE HEPATITE CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE E (GENÓTIPO 3) EM *Macaca fascicularis***

**ORIENTADOR: Dr. Marcelo Alves Pinto**

**Aprovada em: 31/03/2017**

#### **EXAMINADORES:**

**Profa. Dra.** Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins - **Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

**Prof. Dr.** Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

**Prof. Dr.** Eurico de Arruda Neto (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo)

**Prof. Dr.** Eduardo de Mello Volotão (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

**Prof. Dr.** Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia (Universidade Federal Fluminense)

Rio de Janeiro, 31 de março de 2017

## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária pela formação acadêmica e científica;

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Alves Pinto pelo acolhimento, confiança, dedicação, ensinamentos e pela enorme paciência. Obrigada por me incentivar a buscar novos desafios e conhecimento muito além do trivial, a encarar as adversidades ao nosso lado com otimismo e sem medo, sem nunca desistir. Pela dedicação, compreensão, orientação e principalmente e pelo exemplo profissional;

Aos membros da comissão examinadora da banca de defesa: Dra. Patrícia Martins, Dr. Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto, Dr. Eduardo de Mello Volotão, e a Profa. Dra. Rita de Cássia Nasser Cubel;

À Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira pela co-orientação profissional e pessoal. Pela imensa dedicação na interpretação de dados, e correções do manuscrito e da tese. Pelo carinho, puxões de orelha, amizade, companheirismo e por torcer pelo meu sucesso. Obrigada por trazer um pouco de “mineirice” nos meus dias;

A Dra. Vanessa Salete de Paula pelas oportunidades, conhecimento e colaborações ao longo desses anos;

Ao diretor de Farmanguinhos/Fiocruz, Hayne Felipe da Silva, pela assistência técnica prestada;

Ao Dr. Edilson Uiechi da Libbs Indústria Farmacêutica pela assistência e apoio;

Aos colaboradores do Serviço de Equivalência e Farmacocinética (SEFAR);

Ao colaborador, amigo e sempre professor, Dr. Amauri Alfieri pela amizade, colaboração e auxílio. Ao Rodrigo Otonel pela amizade e colaboração;

Ao Oswaldo pelo gigantesco auxílio tardes a fio nas análises estatísticas, sempre acompanhadas de um bom café, paciência e conhecimento;

Ao Renato Marchevsky pela dedicação e pelas verdadeiras “aulas” de patologia. Ao carinho, amizade e paciência;

À professora Maria Cristina Carlan da Silva da Universidade Federal do ABC paulista pela colaboração;

Ao corpo técnico do Centro de Experimentação Animal do ICTB: Márcia, Javier, Marco, Alice, Igo, Paulo e Joelma. Obrigada pelo auxílio, aprendizado e suporte;

Às meninas da plataforma de citometria Cynthia Machado Cascabulho e Daniela Beghini pelas consultorias e pelo belo trabalho realizado na Plataforma de Citometria chefiada pela

Dra. Andrea Pons;

Às amigas e colaboradoras Juliana Melgaço e Juliana Guimarães pelo companheirismo, dedicação, auxílio, ensinamentos, conversas, risos e choros em conjunto. Vocês foram as primeiras cariocas a ganharem espaço no meu coração.

À colaboração da amiga Yasmine na execução e interpretação das análises moleculares;

Aos alunos Yohan e Fernanda Bottino pelo auxílio, companheirismo e colaboração;

À Libbs, Indústria Farmacêutica pela doação do medicamento utilizado no presente estudo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de doutorado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo financiamento do presente estudo;

Aos amigos de todas as horas Alexandre, Nat, Gentil, Diana, Fernanda e tantos outros que deixaram uma marquinha especial na minha vida;

Aos estagiários e demais discentes do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) e aos colegas da pós-graduação que sempre estiveram comigo, auxiliando, trabalhando, compartilhando conhecimentos e divertimentos;

Aos funcionários e amigos do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira (HPP). Aos cafés da Chica, papos de encorajamento, persistência e fé pelos corredores;

Aos secretários do apoio laboratorial Michele e Filipe pela ajuda com os trâmites e demais burocracias;

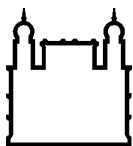
À minha família querida e única que me acompanha e vibra junto de mim, a cada conquista;

À minha tia do coração, Andréa Stevanatto que me acompanhou e me ajudou em todos os momentos;

Aos meus animais de estimação Luna e Pagu, que tornaram minha vida mais feliz mesmo a distância. À minha estrelinha Jeannie, que nos deixou em 2015, deixando saudade e boas lembranças;

Aos meus queridos pais, exemplos que seguirei pela vida, que me ensinaram tudo que sei e que sou. Que sempre acreditaram em mim, dando apoio e suporte em todos os momentos. Agradeço muito a coragem de deixar a única filha batalhar e buscar seus sonhos de vida longe deles. Agradeço a paciência, o amor incondicional, a dedicação, a sabedoria, a humildade e a honestidade desses dois seres amados comigo.

A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

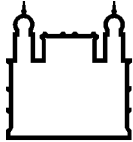
### ESTABELECIMENTO DO MODELO DE HEPATITE CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE E (GENÓTIPO 3) EM *Macaca fascicularis*.

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO/TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Noemi Rovaris Gardinali

A infecção pelo vírus da hepatite E (HEV) é hoje considerada a principal causa de hepatite viral aguda no mundo. Os genótipos 3 e 4 (HEV-3 e HEV-4) podem infectar várias espécies animais, tais como suínos, constituindo assim um risco para a cadeia alimentar humana em muitos países. Acreditava-se que o HEV causasse apenas hepatite aguda autolimitada. No entanto, já se reconhece que a infecção pelo HEV pode evoluir para hepatite crônica em pacientes imunossuprimidos, principalmente em receptores de órgãos sólidos. A infecção crônica pelo HEV pode evoluir para hepatite crônica e fibrose dentro de dois anos em aproximadamente 60% dos pacientes que recebem tratamento imunossupressor pós-transplante. O tacrolimo, medicamento de eleição para terapia imunossupressora de receptores de transplante sólidos, tem sido considerado um fator de risco potencial para o estabelecimento de uma infecção crônica pelo HEV-3. O presente estudo teve por objetivo investigar a patogênese da infecção persistente pelo HEV usando macacos cinomolgos como modelo animal para avaliar a relação entre a condição de imunossupressão do hospedeiro e a ocorrência e persistência da infecção pelo HEV com consequente evolução para hepatite crônica. Nesse estudo nós descrevemos o sucesso obtido na infecção experimental de macacos cinomolgos, previamente tratados com o imunossupressor tacrolimo, e inoculados com uma cepa brasileira do HEV-3 isolada de um suíno naturalmente infectado. Aos três meses após a infecção, três dos quatro macacos imunossuprimidos exibiram um padrão persistente de viremia, excreção viral nas fezes e presença do HEV RNA em todas as biópsias hepáticas, achados compatíveis com uma infecção crônica pelo HEV. Todos os animais soroconverteram para anti-HEV (IgA, IgM e IgG). O grupo de animais imunossuprimidos apresentou títulos mais baixos de IgM e soroconversão tardia para IgG, em comparação com os animais imunocompetentes. Todos os macacos cronicamente infectados exibiram picos baixos e intermitentes das aminotransferases hepáticas, ALT e AST, enquanto os animais imunocompetentes, com infecção aguda, apresentaram apenas um discreto pico de elevação. Ao final do experimento, a replicação viral foi evidenciada pela detecção de RNA de fita positiva e de fita negativa no tecido hepático, e pela presença do antígeno HEV nos hepatócitos e sinusóides. As amostras de tecido hepático obtidas na necropsia exibiram inflamação de interface. Nossos achados forneceram evidências de que macacos cinomolgos tratados com o imunossupressor tacrolimo e inoculados com a cepa brasileira do HEV-3 suíno (Genebank: KX578263/KX578267), foram persistentemente infectados. A infecção pelo HEV evoluiu com hepatite de interface, achado característico de hepatite crônica.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **ESTABLISHMENT OF A CHRONIC HEPATIS MODEL BY HEPATITIS E VIRUS (genotype 3) IN *Macaca fascicularis*.**

#### **ABSTRACT**

#### **PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY**

**Noemi Rovaris Gardinali**

Hepatitis E virus (HEV) infection is a major cause of acute viral hepatitis worldwide. HEV genotypes 3 and 4 can infect a variety of animal species, such pigs, and can be found in the human food chain of a number in many countries. HEV was believed to cause only self-limiting acute hepatitis. However, it is now accepted that HEV may lead to chronic hepatitis in immunosuppressed patients, mainly in solid organ transplant (SOT) recipients. Chronic HEV infection may evolve to chronic hepatitis and fibrosis within the first two years of infection in approximately 60% of the patients receiving immunosuppressive treatment following solid-organ transplantation (SOT). Tacrolimus, the immunosuppressive therapy of choice for treatment of SOT recipients, has been considered a potential risk factor related to HEV-3 chronic infection. The present study aimed to investigate the pathogenesis of HEV persistent infection by using cynomolgus monkeys as an animal model for evaluating the relationship between the host immunosuppressive status and the occurrence and persistence of a HEV infection leading to chronic hepatitis. Here we describe a successful experimental study to investigate the pathogenesis of HEV chronic infection by using cynomolgus monkeys, previously immunosuppressed with tacrolimus, and inoculated with a Brazilian HEV-3 strain isolated from a naturally infected pig. Three months post infection three out of four immunosuppressed monkeys exhibited a persistent pattern of viremia, faecal shedding and presence of HEV RNA in all liver biopsies, that is compatible with a chronic HEV infection. All animals seroconverted to anti-HEV (IgA, IgM and IgG). The immunosuppressed group showed lower IgM titres, and later IgG seroconversion in comparison with immunocompetent animals. Of note, all chronically infected monkeys exhibited low and intermittent peaks of ALT and AST levels while the immunocompetent, acutely infected monkeys showed only a discrete elevation peak. At the end of the experiment, viral replication was evidenced by the detection of positive- and negative-stranded RNA in the liver tissue, and by the presence of HEV antigen in hepatocytes and hepatic sinusoids. Liver sections obtained at necropsy showed interface inflammation. Our findings provided the evidence that immunosuppressed cynomolgus monkeys treated with tacrolimus and inoculated with swine HEV-3 (Genebank: KX578263/KX578267) can be persistently infected. HEV infection was associated with interface hepatitis, which may evolve to the beginning of a chronic hepatitis.



# ÍNDICE

RESUMO	VII	
ABSTRACT	VIII	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Virologia molecular .....	2
1.1.1	Estrutura viral .....	2
1.1.2	Genoma viral.....	3
1.1.3	Proteínas virais.....	4
1.2	Classificação e filogenia.....	6
1.3	Replicação viral.....	10
1.4	Epidemiologia.....	13
1.4.1	Genótipos de interesse humano .....	13
1.4.2	Outras espécies animais infectadas pelo HEV .....	16
1.4.3	Transmissão zoonótica do HEV .....	17
1.5	Modelos experimentais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	18
1.5.1	Modelos animais .....	18
1.5.2	Cultivo celular .....	22
1.6	Patogênese e resposta imune.....	23
1.6.1	Resposta imune inata.....	25
1.6.2	Resposta imune adaptativa .....	26
1.6.3	Resposta imune humoral.....	27
1.6.4	Mecanismos patogênicos da lesão hepática induzida pela infecção pelo HEV.....	28
1.6.5	Patogênese da infecção crônica em indivíduos imunocomprometidos .....	29
1.6.6	Manifestações extra-hepáticas da infecção pelo HEV .....	32
1.7	Diagnóstico .....	33
1.8	Tratamento .....	35
1.9	Prevenção.....	36
1.9.1	Vacina .....	36
1.10	HEV no Brasil .....	37
1.11	Justificativa .....	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>40</b>

2.1	Objetivo Geral.....	40
2.2	Objetivos Específicos .....	40
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>41</b>
3.1	Etapa pré-experimental.....	41
3.1.1	Triagem da colônia de cinomolgos e obtenção do inóculo .....	41
3.1.2	Desenho experimental .....	42
3.2	Etapa experimental.....	43
3.3	Metodologia laboratorial .....	47
3.3.1	Tratamento com tacrolimo .....	47
3.3.2	Preparo do inóculo.....	47
3.3.3	Ensaio sorológicos .....	47
3.3.4	Deteção e quantificação do RNA viral por qRT-PCR.....	48
3.3.5	Deteção das fitas positivas e negativas do vírus pela nested RT-PCR.....	48
3.3.6	Reação de sequenciamento e análise filogenética .....	49
3.3.7	Análises bioquímicas e hematológicas .....	49
3.3.8	Análise histopatológica.....	50
3.3.9	Reação de imunofluorescência direta .....	50
3.3.10	Bioequivalência do tacrolimo .....	51
3.3.11	Análise estatística .....	52
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
4.1	Triagem da colônia de cinomolgos e obtenção do inóculo .....	53
4.2	Monitoramento da concentração plasmática do tacrolimo .....	53
4.3	Perfil da infecção pelo HEV nos macacos imunocompetentes e imunossuprimidos.....	54
4.3.1	Deteção, identificação e quantificação do RNA viral .....	54
4.3.2	Soroconversão e alterações clínicas.....	58
4.3.3	Achados histopatológicos e deteção do antígeno viral.....	61
4.3.4	Análise estatística comparativa entre os grupos de animais imunocompetentes (G1) e imunossuprimidos (G2) infectados com HEV- 364	
4.4	Perfil clínico e histopatológico dos macacos imunossuprimidos, não infectados.....	65

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>90</b>
<b>9.1</b>	<b>Anexo 1 .....</b>	<b>90</b>
<b>9.2</b>	<b>Anexo 2 .....</b>	<b>91</b>
<b>9.3</b>	<b>Anexo 3 .....</b>	<b>92</b>
<b>9.4</b>	<b>Anexo 4 .....</b>	<b>93</b>
<b>9.5</b>	<b>Anexo 5 .....</b>	<b>95</b>

## Índice de figuras

Figura 1.1 - Modelos da estrutura viral do HEV.....	3
Figura 1.2 - Representação do genoma do HEV (a).....	4
Figura 1.3 - Diagrama esquemático comparando a organização genômica do HEV de mamíferos, aves e peixes. ....	7
Figura 1.4 - Árvore filogenética dos membros representativos da família <i>Hepeviridae</i> . ...	8
Figura 1.5 - Representação esquemática do ciclo de replicação do HEV.....	11
Figura 1.6 - Distribuição geográfica dos genótipos 1, 2, 3 e 4 do HEV.....	14
Figura 1.7 – Transmissões experimentais interespecie dos genótipos 1 a 4 do HEV. ....	19
Figura 1.8 - Curso da infecção aguda pelo HEV. ....	24
Figura 1.9 - Curso da infecção crônica pelo HEV. ....	30
Figura 1.10 - Padrões histológicos de biópsias hepáticas realizadas em pacientes com infecção crônica pelo HEV.....	32
Figura 3.1– Representação esquemática do desenho experimental e seus respectivos períodos para os grupos 1 (A), 2 (B) e 3 (C).....	44
Figura 4.1 – Concentração plasmática determinada por LC-MS/MS nas amostras de sangue total dos macacos cinomolgos antes da infecção (dia zero) e após a infecção. ....	53
Figura 4.2 - Dinâmica da infecção pelo HEV com base na carga viral detectada por qRT-PCR no soro, fígado e suspensão fecal nos 3 grupos. ....	56
Figura 4.3 - Análise filogenética de cepas do HEV de origem humana e animal. ....	57
Figura 4.4 – Comparação dos níveis anticorpos anti-HEV, ALT, AST, e CHOL e do número de plaquetas entre os grupos inoculados (G1 e G2). ....	59
Figura 4.5 – Alterações clínicas observadas nos animais imunossuprimidos e inoculados. ....	60
Figura 4.6 – Concentração plasmática do tacrolimo determinada por LC-MS/MS, carga viral do HEV e nível de glicose no sangue do macaco AC7. ....	61
Figura 4.7 - Análise histopatológica do parênquima hepático do macaco AC7 .....	61
Figura 4.8 - Análise histopatológica tempo-dependente de biópsias hepáticas de macacos cynomolgus inoculados com o vírus da hepatite E (G1) e inoculados com HEV e imunossuprimidos com tacrolimus (G2 e G3) corados pela hematoxilina e eosina (H&E). ....	63
Figura 4.9 - Detecção do antígeno do HEV por imunofluorescência nos fragmentos hepáticos dos macacos cinomolgos obtidos no final do experimento.....	64
Figura 4.10- Fatores preditivos associados à infecção crônica pelo HEV. ....	65

## **Lista de tabelas**

<b>Tabela 3.1 Descrição dos macacos cinomolgos (<i>Macaca fascicularis</i>) .....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 3.2 Coletas de espécimes e testes laboratoriais realizados após a inoculação do HEV. ....</b>	<b>46</b>
<b>Tabela 9.1 Regressão logística univariada em função da carga viral detectada nos soros dos animais. ....</b>	<b>91</b>
<b>Tabela 9.2 Regressão logística univariada em função da carga viral detectada nas fezes dos animais. ....</b>	<b>92</b>
<b>Tabela 9.3 Análise tempo-dependente da evolução das alterações histopatológicas dos fragmentos hepáticos realizadas nos macacos imunocompetentes infectados com HEV (G1). ....</b>	<b>93</b>
<b>Tabela 9.4 Análise tempo-dependente da evolução das alterações histopatológicas dos fragmentos hepáticos realizadas nos macacos imunossuprimidos infectados com HEV (G2). ....</b>	<b>94</b>
<b>Tabela 9.5 Análise tempo-dependente da evolução das alterações histopatológicas dos fragmentos hepáticos realizadas nos macacos imunossuprimidos com tacrolimo (G3). .</b>	<b>94</b>

## **Lista de siglas e abreviaturas**

aa – aminoácidos

ALB – albumina

ALT – Alanina transaminase

ANVISA – Agência nacional de Vigilância Sanitária

AST – Aspartato transaminase

A549 – células de adenocarcinoma pulmonar

BUN – nitrogênio ureico sanguíneo

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

cDNA – DNA complementar

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CHOL – colesterol

CHOP – do inglês, “CCAAT/Enhancer-binding protein homologous Protein”

CID – coagulação intravascular disseminada

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

dpi – dias após inoculação

CRE – do inglês, “cis-reactive element” (elemento cis-reativo)

CREA – creatinina

Ct – do inglês, “Cycle threshold” (limiar da fase exponencial)

dNTP – trifosfatos nucleotídicos de DNA

ELISA – do inglês, “Enzyme Linked Immunonorbent Assay” (ensaio imunoenzimático)

ELL – extração líquido-líquido

ESI –do inglês, “electrospray ionization in the positive mode” (ionização por eletronebulização positiva por electrospray)

GLU – glicose

G1 – grupo 1

G2 – grupo 2

G3 – grupo 3

HCV – vírus da hepatite C

HE – Hepatite E

Hel – RNA helicase

HEV – vírus da hepatite E

HEV-like – do inglês, vírus do tipo HEV

HepG2 e HepaRG – células de hepatoma humano

HF – hepatite fulminante

HIV – vírus da imunodeficiência adquirida

HPLC – do inglês, “High performance liquid chromatography” (cromatografia líquida de alta eficiência)

HVR – do inglês, “Hypervariable region” (região hipervariável)

ICTB – Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

ICTV – do inglês, “International Committee on Taxonomy of Viruses” (Comitê Internacional de Taxonomia Viral)

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

IHF – insuficiência hepática fulminante

IL – interleucina

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

ISGs – do inglês, “interferon-stimulated genes” (genes estimuladores de IFN)

Kb – do inglês, “kilobase” (quilobase)

Kernow-C1 p6 – células semelhantes à hepatócitos e derivadas de células troncos pluripotentes

kg – quilograma

L – litro

LC-MS/MS – cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas em série (MS/MS)

LCR – líquido cefaloraquidiano

LLC/PK1 – células de rim de suíno

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MeT – metiltransferase

mL – mililitro

mg – miligrama

min – minutos

MRM – monitoramento de reações múltiplas

NB2 – nível de biossegurança 2

NCR – do inglês, “noncoding regions” (regiões não codificantes)

NFAT – fator nuclear de células T ativadas

nm – nanômetros

nt – nucleotídeos

NK – do inglês, células “natural killer”

OMS – organização mundial da saúde

ORF – do inglês, “open Reading frame” (fase aberta de leitura)

P – do inglês, “protrusion” (protrusão)

pb – pares de base

PBMC – do inglês, “peripheral blood mononuclear cell” (células mononucleares do sangue periférico)

PBS – tampão fosfato-salino

PCP – do inglês, “papain-like cysteine protease” (cisteíno protease do tipo papaína)

pi – pós inoculação

PI – padrão interno

PICM-19 – células-tronco de embriões de origem suína

PLC/PRF/5 – células de hepatocarcinoma humano

PNH – primatas não humanos  
pORF1 – proteína da ORF1  
pORF2 – proteína da ORF2  
pORF3 – proteína da ORF3  
PPR – poliprolina  
p/v – peso/volume  
qPCR – técnica quantitativa de PCR em tempo real  
RBC – do inglês, “red blood cells”, glóbulos vermelhos  
RdRp – RNA polimerase dependente de RNA  
RE – retículo endoplasmático  
RNA – Ácido ribonucleico  
RNAm – RNA mensageiro  
rNTP – trifosfatos nucleotídicos de RNA  
Rpm – rotações por minuto  
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa  
s – segundos  
S – do inglês, “shell” (concha)  
SCPrim – Serviço de Primatologia  
SEFAR – Serviço de Equivalência e Farmacocinética  
SF-1 – superfamília das helicases virais  
SNC – sistema nervoso central  
SPF – do inglês, “specific pathogen free” (livres de patógenos específicos)  
TBIL – bilirrubina total  
TBME – Terc-butil-metil-éter  
TLRs – do inglês “Toll-Like Receptors” (receptores do tipo Toll)  
UTRs – do inglês, “untranslated regions” (regiões não traduzidas)  
UI/L – unidades internacionais/litro  
VLPs – do inglês, “virus-like particles”(partículas semelhantes aos vírus)  
WBC – do inglês, “White blood cells”, glóbulos brancos  
 $\mu\text{m}$  – micrômetro  
 $\mu\text{L}$  – microlitro  
UV – luz ultravioleta



# 1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite E (HEV), agente causador da hepatite E (HE) em humanos, é responsável por epidemias e casos esporádicos de hepatite aguda em todo o mundo. A infecção pelo HEV é geralmente associada a quadros de hepatite aguda e autolimitada com taxas de mortalidade inferiores a 2% em indivíduos imunocompetentes (1). Em pacientes imunocomprometidos, mais especificamente em pós-transplantados, a infecção crônica pelo HEV tem sido associada à elevação persistente de transaminases com rápida progressão para hepatite crônica e, em alguns casos, cirrose (2). O HEV tem sido, também, associado a manifestações extra-hepáticas — neurológicas, hematológicas, nefrológicas — importantes (3).

Em recém-transplantados, a infecção persistente pelo HEV é mais frequentemente observada em receptores de rim e fígado (2, 4). Aproximadamente 60% dos receptores de órgãos que desenvolvem hepatite E aguda evoluem para infecção persistente pelo HEV (2). A evolução da infecção pelo HEV para cronicidade parece estar associada à intensidade da terapia imunossupressora. Atualmente o inibidor da ativação de células T e transcrição de interleucina tipo 2 (IL-2), tacrolimo é apontado como importante fator de risco para a persistência do HEV no organismo de recém-transplantados (2, 3).

O HEV é capaz de infectar, além do homem, várias espécies animais incluindo porcos, javalis, veados, mangustos, camelos, coelhos, galinhas, ratos, ferretes, morcegos e trutas. Os genótipos 1 e 2 infectam exclusivamente humanos e são frequentemente associados a surtos de hepatite veiculada por água em países em desenvolvimento, onde a doença é hiperendêmica. Os genótipos 3 e 4 são de natureza zoonótica e são, ocasionalmente, transmitidos ao homem mediante o consumo de carnes ou vísceras cruas ou malcozidas provenientes de mamíferos reservatórios infectados com o vírus (5).

Embora o HEV tenha sido descoberto no início da década de 1980, foi apenas nos últimos 10-15 anos que se intensificaram os estudos utilizando modelos animais e sistemas *in vitro* para expressão de antígenos e propagação viral em cultura celular, que culminaram no desenvolvimento de uma vacina recombinante, a única vacina de hepatite E humana atualmente disponível. Tais pesquisas possibilitaram a geração de conhecimentos sobre a biologia e a estratégia de replicação do vírus; relações vírus-hospedeiro e patogenia. Além disso, contribuíram para tais avanços: a identificação de vírus do “tipo HEV” (do inglês “HEV-like”) numa ampla variedade de vertebrados (incluindo mamíferos, aves e peixes) e a

descoberta de novas rotas de disseminação do vírus, como a transmissão zoonótica pelo consumo de alimentos de origem animal sem cocção adequada, transfusão de sangue e hemoderivados e transplante de órgãos sólidos.

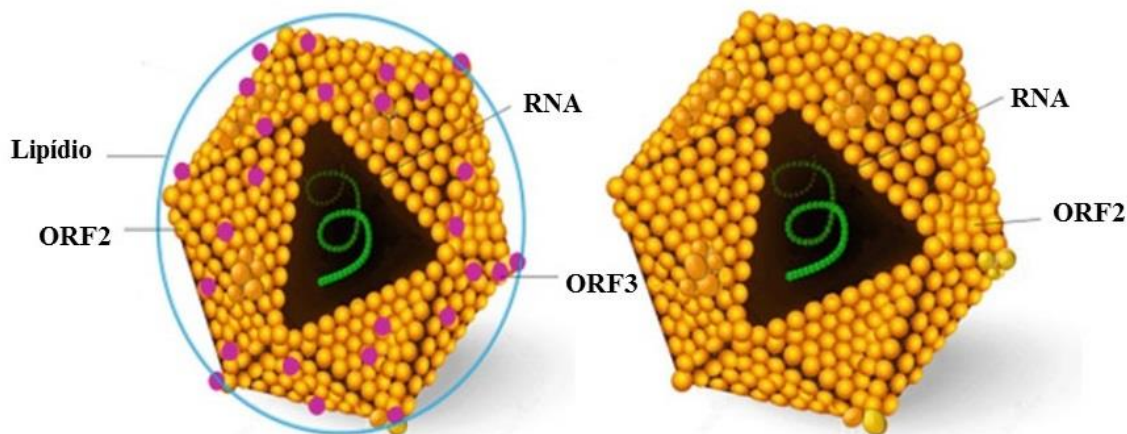
Macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) têm sido utilizados como modelo experimental de infecção pelo HEV para estudos de patogênese e resposta imune (6, 7). A suscetibilidade deste modelo é comprovada pelos achados virológicos, bioquímicos, imunológicos e histopatológicos semelhantes aos observados em humanos com infecção aguda por HEV (6, 8). Entretanto, até o momento não há relatos de infecção persistente em primatas não humanos similares aos casos observados em pacientes imunossuprimidos infectados pelo genótipo 3 do HEV (9).

## **1.1 Virologia molecular**

### **1.1.1 Estrutura viral**

A partícula viral do HEV é composta pelo genoma RNA (ácido ribonucleico) e por um capsídeo icosaédrico, não envelopado, com 27 a 34 nanômetros (nm) de diâmetro (8). A proteína truncada do capsídeo, correspondente à região compreendida entre os aminoácidos (aa) 112 e 608, consiste de três domínios: S (do inglês “shell”, aa 112 - 313), P1 (do inglês “protrusion”, aa 314 - 454) e P2 (aa 455 - 606). O domínio P2 (também referido como E2S) forma homodímeros que podem se montar em partículas semelhantes a vírus (VLP, do inglês “virus-like particles”) de 27 nm, de simetria icosaédrica com número de triangulação igual a 1 (T=1), constituída de 30 dímeros. A dimerização do domínio E2S (aa 454 – 606) parece ser essencial para a interação vírus-hospedeiro (10). VLPs recombinantes mimetizam, em estrutura, os vírions nativos, sendo assim reconhecidos pelo sistema imune. São altamente imunogênicas, não apenas pelo seu tamanho como também pelo padrão repetitivo de epítomos para células B dispostos na superfície da partícula (11).

Formas envelopadas e não envelopadas do vírus podem ser encontradas em diferentes espécimes clínicos. Os vírus excretados pelas fezes de pessoas infectadas não apresentam envelope, enquanto que, vírus circulantes na corrente sanguínea durante a fase aguda da infecção pelo HEV e aqueles obtidos em cultivo celular são envolvidos por um envelope lipídico derivado da membrana da célula hospedeira (Figura 1.1). As partículas envelopadas são altamente resistentes à ação de anticorpos neutralizantes e influenciam na interação do vírus com o hospedeiro tanto em nível celular, quanto em nível sistêmico (12).



**Figura 1.1 - Modelos da estrutura viral do HEV.**

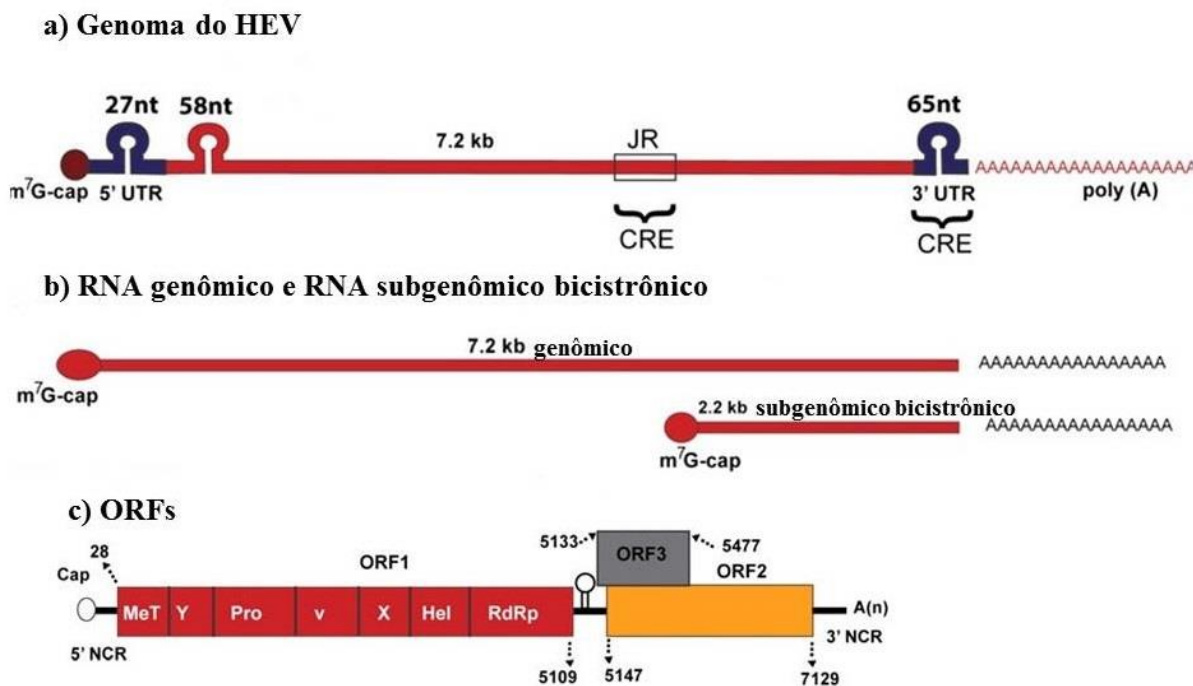
Modelo estrutural baseado nas observações resultantes de cultura celular (figura a esquerda, vírus com envelope lipoproteico) e de amostras fecais (figura a direita, vírus não envelopado). Adaptado (13).

### 1.1.2 Genoma viral

O genoma do HEV é composto por uma molécula de RNA de fita simples e polaridade positiva, com 7.200 nucleotídeos (nt) (ou 7,2 kilobases (kb)), poliadenilada na extremidade 3' e com uma estrutura cap 7-metil-guanina ligado à extremidade 5'. A molécula de RNA contém regiões codificadoras de proteínas distribuídas em três fases de leitura aberta (ORF, do inglês “Open Reading Frame”), denominadas ORF1, ORF2, e ORF3, sendo que as ORF2 e ORF3 são parcialmente sobrepostas (14). Além disso, o genoma viral apresenta regiões não traduzidas (UTR, do inglês “untranslated region”), também denominadas de regiões não codificantes (NCR, do inglês “noncoding regions”) nas extremidades 5'e 3' e uma região conservada de 58 nt dentro da ORF1. Estas regiões se dobram em estruturas em formas de grampo e de laço e parecem ser de grande importância para a replicação do HEV (15). No genoma das cepas de HEV oriundas de mamíferos e de aves existe uma região de junção entre as ORF1 e ORF3, que contém uma estrutura em haste e um elemento cis-reativo (CRE, do inglês “cis-reactive element”) (16).

Um estudo realizado em macacos cinomolgos inoculados com HEV identificou três tipos de RNA, de aproximadamente 7,2 kb (RNA genômico) e de 3,7 kb e 2 kb (RNA subgenômicos) (14). Neste modelo experimental, enquanto o segmento de 7,2 kb seria traduzido na poliproteína da ORF1, os RNAs subgenômicos de 3,7 e 2 kb seriam utilizados para traduzir as proteínas das ORF3 e ORF2, respectivamente. Entretanto, o segmento de 3,7 kb não foi detectado em outros modelos de replicação do HEV utilizando outras espécies animais ou cultivo celular, sugerindo que um único RNA, subgenômico de 2,2 kb e

bicistrônico para a tradução das ORF2 e ORF3, é gerado durante a replicação do HEV (17). Na figura 1.2 pode-se observar uma representação esquemática do genoma do HEV.



**Figura 1.2 - Representação do genoma do HEV (a).**

Em (b) nota-se o RNA bicistrônico subgenômico do vírus. Em (c) as ORF1, ORF2 e ORF3. Adaptado (18).

### 1.1.3 Proteínas virais

O genoma do HEV codifica três proteínas, a pORF1 (poliproteína multifuncional não estrutural), a pORF2 (proteína estrutural do capsídeo) e a pORF3 (proteína multirreguladora). A ORF1 do HEV, situada na extremidade 5' do genoma e com 5.082 pares de base (pb), é traduzida em uma poliproteína de 1.693 aa, que é clivada em proteínas individuais com funções não-estruturais. Os domínios funcionais identificados na poliproteína (Figura 1.2(c)) incluem o da metiltransferase (MeT), RNA helicase (Hel), RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), protease (Pro) e da região hipervariável (HVR ou V) também chamada de poliprolina (PPR), que apresenta altos níveis de variabilidade nucleotídica e de aminoácidos entre os isolados de HEV. Estas enzimas possuem extrema importância durante a replicação viral. Os domínios não caracterizados X e Y, denominados atualmente como macro domínios também são encontrados dentro da ORF1 (19).

O alinhamento da poliproteína codificada pela ORF1 sugere que os aa de 60 a 240 são traduzidos como a MeT viral (19). A MeT é a enzima responsável por catalisar o capeamento do genoma viral (tanto do RNA genômico, como do RNA subgenômico) (20). O cap é uma

estrutura requerida para a ligação eficiente do RNAm (RNA mensageiro) ao ribossomo durante a síntese proteica. Neste caso, os RNA genômico e subgenômico do HEV atuam como RNAm. Estudos demonstraram que a presença do cap no RNA genômico é necessária para a infecciosidade viral (21) e, além disso, o cap evita a ativação da imunidade inata, mediada por IFN (interferon), do hospedeiro (22).

A protease do HEV, localizada entre os aa 433 a 592, era considerada uma cisteíno protease do tipo papaína (PCP, do inglês “papain-like cysteine protease”) com possível atuação no combate à atividade antiviral da célula hospedeira (23). No entanto, um estudo recente sugeriu que a protease do HEV, situada entre os aa 440 e 520, é do tipo quimiotripsina ou cisteíno protease classe-específica (19, 24). As possíveis funções desta proteína são: atividade lítica e não apoptótica; provável envolvimento na maturação do capsídeo viral; e atuação no processamento da poliproteína ORF1 durante a replicação viral clivando preferencialmente segmentos protéicos não estruturados, como a região inter-domínios da poliprolina (24).

As enzimas Hel e RdRp codificadas pela ORF1 são essenciais para a replicação do HEV. A Hel corresponde a região da ORF1 compreendida entre os aa 960 e 1204 e pertence à classe 5'→3' da superfamília das helicases virais (SF-1) (25). A Hel hidrolisa todos os trifosfatos nucleotídicos de RNA (rNTP) e de DNA (dNTP) com menor eficiência, além de possuir domínios de ligação de RNA (19). A RdRp é uma enzima essencial codificada por todos os vírus RNA, capaz de replicar o RNA genômico a partir do RNA intermediário de sentido antígenômico. A RdRp utiliza a extremidade 3' do RNA do HEV como alvo específico para a síntese da fita complementar do genoma viral durante a replicação (26).

A região hipervariável, também chamada de região da PPR, é classificada como uma região intrinsecamente desordenada, e atua na regulação da replicação viral através de interações proteína-proteína. Já foi demonstrado que a taxa de mutação da PPR é semelhante às demais enzimas da ORF1, porém a alta taxa de substituição dentro da PPR resulta em uma maior desordem entre os primeiros e segundos códonos. A região da PPR, em cepas do genótipo 1 do HEV, apresenta uma sequência mais conservada e menor taxa de substituição de nucleotídeos quando comparada com a dos genótipos 3 e 4, o que poderia explicar a necessidade de adaptação desses genótipos zoonóticos a uma ampla gama de hospedeiros (27).

A pORF2, de aproximadamente 660 aa, é traduzida a partir do RNA subgenômico de 2,2 kb na proteína do capsídeo viral e, além da montagem do vírus, desenvolve importante papel na adsorção viral e imunogenicidade (28). Existe uma estrutura conservada na ORF2,

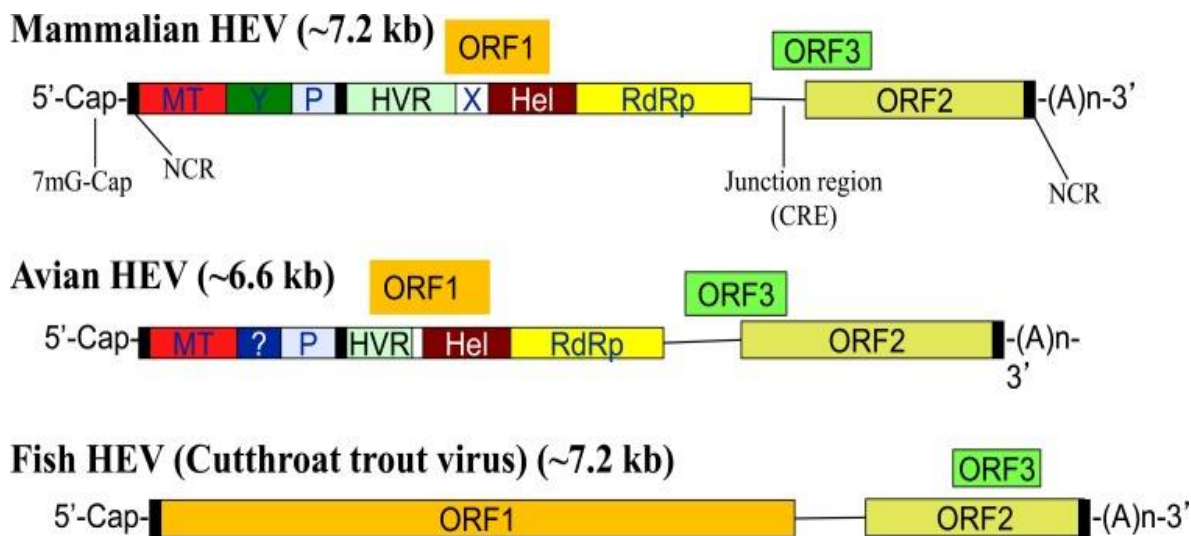
em forma de laço, que pode estar relacionada aos estágios iniciais da replicação (29). Além disso, sabe-se que a ORF2 pode se ligar especificamente à extremidade 5' do genoma do HEV e desempenhar um papel importante no processo de empacotamento do vírus (30). Essa proteína tem uma sequência sinal N-terminal que é traduzida no retículo endoplasmático (RE), onde é sequencialmente glicosilada em três locais (Asn 132, Asn 310 e Asn 562) quando expressa em células de mamíferos (31, 32). Como a sequência C-terminal da pORF2 possui um domínio rico em arginina quando dentro do RE, espera-se que a mesma desempenhe um papel chave na ligação ao RNA genômico e montagem do vírus. Essa região C-terminal de 52 aa está, também, envolvida no empacotamento do genoma e na estabilização das partículas do capsídeo (33).

A pORF3 codifica uma fosfoproteína com 113 ou 114 aa, dependendo do genótipo viral. Essa proteína é dispensável para a replicação do HEV em sistemas *in vitro*, porém é essencial para a infecção em modelos experimentais animais. Ela está associada ao citoesqueleto celular, mais especificamente com os microtúbulos, e parece interagir com várias proteínas do hospedeiro (34). Acredita-se que essa proteína desempenhe um papel na replicação viral, promovendo a sobrevivência e a proliferação das células infectadas, reduzindo a resposta imune do hospedeiro (35, 36). Além do mais, a pORF3 parece desempenhar um papel importante durante o egresso viral a partir da célula hospedeira (37). A estrutura e a função da pORF3 ainda não foram totalmente elucidadas.

## 1.2 Classificação e filogenia

Embora a organização genômica de todos os vírus “tipo HEV” seja semelhante, há diferenças entre as cepas com relação à extensão total do genoma e a disposição da ORF1 com a ORF3. As diferenças mais notáveis entre as cepas do HEV são: o tamanho da região que corresponde ao espaço intermediário entre ORF1 e ORF2/3; e a posição do códon de iniciação da ORF3 em relação a ORF2, isto é, se o códon de iniciação da ORF3 está situado antes ou depois daquele da ORF2 (38), como podemos observar na figura 1.3. Além de humanos, já foi demonstrado que diferentes cepas do HEV são capazes de infectar uma ampla variedade de mamíferos, incluindo javalis, porcos, mangustos, veados, camelos, coelhos, ratos, ferretes, primatas não humanos e morcegos. Em aves, como galinhas e perus, um vírus de semelhante organização genômica contendo aproximadamente 600 pb a menos tem sido relatado nos últimos anos (39, 40). Recentemente, um tipo de vírus relacionado ao HEV foi

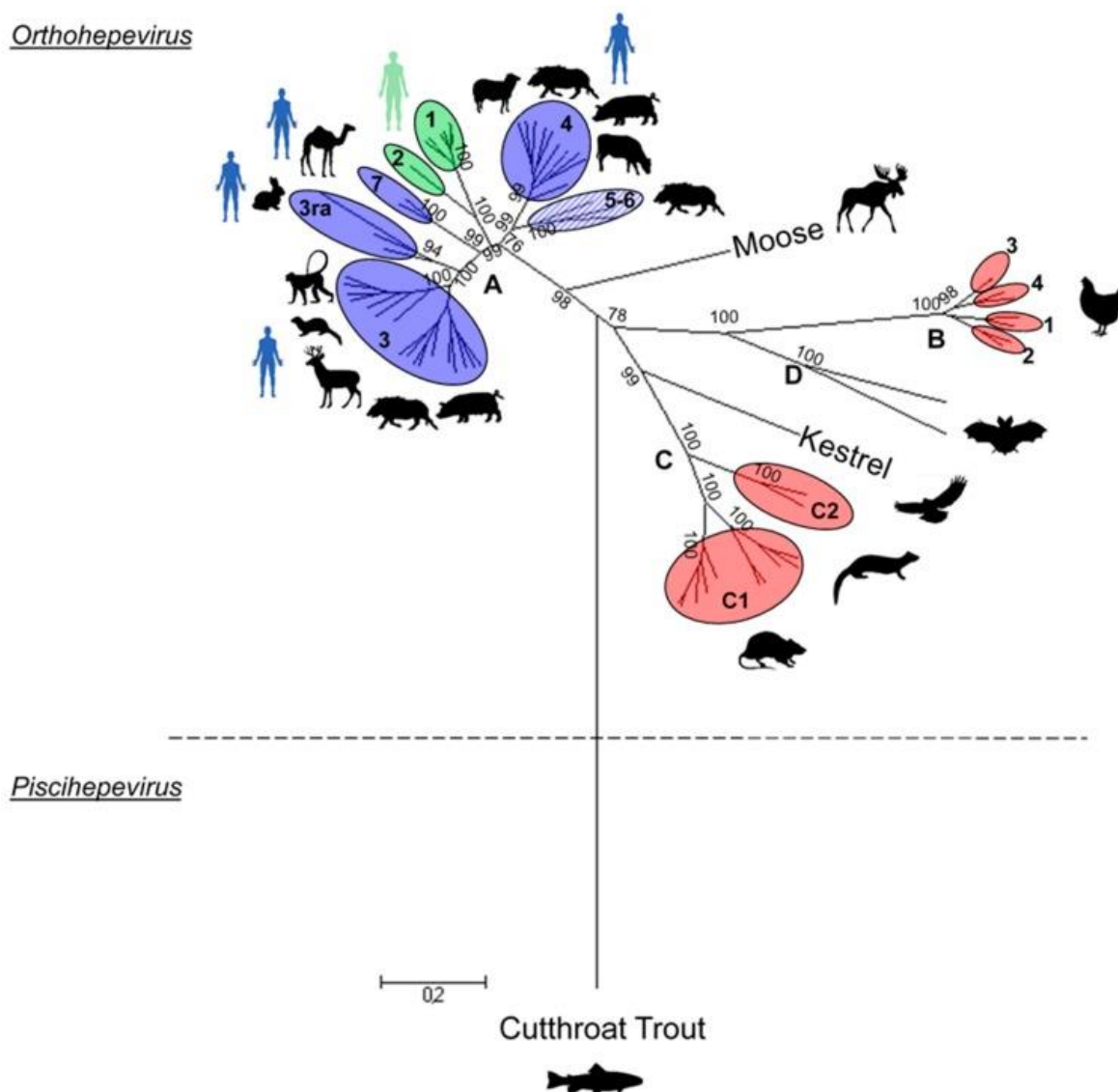
identificado em várias espécies de trutas, e compartilha apenas de 18 a 27% de similaridade com as sequências do HEV aviário ou de mamíferos (40).



**Figura 1.3 - Diagrama esquemático comparando a organização genômica do HEV de mamíferos, aves e peixes.**  
Adaptado (16).

O Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) (41) recentemente reestruturou a classificação taxonômica do HEV em virtude de sua marcada heterogeneidade genética, evidenciada pelos inúmeros isolados semelhantes ao HEV, e por sua capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros. Smith e colaboradores em 2014 (42) propuseram três níveis de classificação para a família *Hepeviridae*: gênero, espécie e genótipo. Na nova reestruturação, a família *Hepeviridae* passou a ser dividida em dois gêneros, *Orthohepevirus* e *Piscihepevirus*. A maioria das cepas identificadas até o momento pertence ao gênero *Orthohepevirus* que por sua vez se divide em quatro espécies, nomeadas de A a D. Os *Orthohepevirus A* compreendem todos os vírus que infectam humanos, suínos, veados, javalis, mangustos, coelhos, camelos, e alguns dos vírus que infectam ratos. Os *Orthohepevirus B* incluem os vírus que infectam aves, enquanto que os *Orthohepevirus C* incluem vírus que infectam ratos e ferretes. Os isolados encontrados em morcegos foram agrupados no gênero *Orthohepevirus D*. O gênero *Piscihepevirus* é formado por uma única espécie, *Piscihepevirus A*, e compreende todos os isolados identificados em trutas. A figura 1.4 ilustra os diferentes membros da família *Hepeviridae* associados a seus respectivos hospedeiros.

Orthohepevirus



**Figura 1.4 - Árvore filogenética dos membros representativos da família Hepeviridae.**

A árvore foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo Tamura-Nei. A análise foi realizada com 67 genomas completos do HEV, representativos de cada genótipo, disponíveis na base de dados GenBank. O tamanho das sequências varia entre 6.543 e 7.318 nt. As sequências foram alinhadas usando Clustal W. Valores de bootstraps foram obtidos a partir de 1000 repetições e valores acima de 70% estão indicados no nível do genótipo. Os genótipos correspondentes às espécies não zoonóticas do HEV estão representados em vermelho; genótipos que incluem cepas provenientes de animais e humanos estão representados em azul; genótipos que infectam exclusivamente humanos estão em verde; e genótipos que infectam apenas javalis estão representados em azul listrado. Adaptado (43).

A obtenção de sequências de genoma completo tem auxiliado na classificação e análise de filogenia do HEV. No entanto, sequências nucleotídicas parciais das regiões mais conservadas das ORF1 e ORF2 do genoma viral demonstraram classificação similar àquelas obtidas a partir do genoma completo (44). Com base nas sequências genômicas completas e parciais obtidas foi possível classificar as diferentes espécies dos *Orthohepevirus* e seus respectivos genótipos.



A espécie *Orthohepevirus A* é a mais bem caracterizada e compartilha entre 52,44% e 59,11% de identidade nucleotídica com as outras espécies de *Orthohepevirus*, com exceção da cepa obtida de alce (64,5%), que permanece sem classificação exata. As cepas de HEV que infectam humanos são classificadas em quatro genótipos (HEV-1 a 4). Os genótipos 1 e 2 são geneticamente relacionados entre si e apresentam quase 76% de identidade de nts. O genótipo 1 (HEV-1) foi o primeiro a ser descrito sendo dividido em seis subtipos (1a a 1f) enquanto o genótipo 2 (HEV-2) é menos frequente e dividido em dois subtipos (2a e 2b) (Figura 4) (45). Cepas do HEV-1 compartilham entre 88,53% e 94,05% de identidade nucleotídica entre si e circulam em países subtropicais da Ásia e África (46). Já as cepas do HEV-2 já foram descritas no México e oeste da África (47, 48).

Dentro da espécie *Orthohepevirus A*, o genótipo 3 (HEV-3) é o mais bem descrito e documentado no Genbank. A maioria das sequências foi obtida de humanos, suínos ou javalis (figura 4). O HEV-3 é dividido em 10 subtipos (a - j) separado em dois clados (3abchij and 3efg) que compartilham entre 78,74% e 82,46% identidade de nts (Figura 4) (45, 49). Esse genótipo inclui algumas cepas não classificadas (45) e o HEV de coelho, cuja genotipagem permanece sob consideração.

Considerando a evolução do HEV, estudos sugerem que o ancestral comum mais recente do genótipo 3 apareceu no início do século 19 (50) ou até mesmo no final do século 18, com base nas descrições de surtos de hepatite (51). As árvores filogenéticas construídas com cepas recentes para estimar a história evolutiva do HEV usam a abordagem Bayesiana (50). A clade dos subtipos 3abchij pode ser separada em dois subclados, 3abj e 3chi, compartilhando de 81,16% a 85,33% de identidade nucleotídica entre elas (49). Já as cepas que se agrupam na subclade 3chi compartilham de 84,7% a 96,46% identidade nucleotídica e se originárias da Europa (França e Alemanha) e Mongólia. As cepas dentro da subclade 3abj compartilham mais de 83,75% de identidade nucleotídica, foram isoladas na Ásia, Europa e América do Norte, e circulam predominantemente na Ásia e América do Norte. A outra clade é composta pelos subtipos 3efg (com 82,75% a 90,57% de identidade nucleotídica), e três subtipos ainda não classificados. Os subtipos 3e e 3f são encontrados principalmente na Ásia e Europa (52, 53). Os estudos evolutivos trabalham com a hipótese de que as cepas de HEV surgiram na Europa por volta de 1871 (44). O subtipo 3g é o mais divergente dessa clade, e o subtipo 3d não pertence a nenhuma clade até agora.

O genótipo 4 (HEV-4) é encontrado principalmente na Ásia e compartilha entre 71,79% a 77,38% de identidade nucleotídica com os outros genótipos. Ele é dividido em nove subtipos (de a a j) isolados principalmente de suínos, javalis e humanos. Esse genótipo

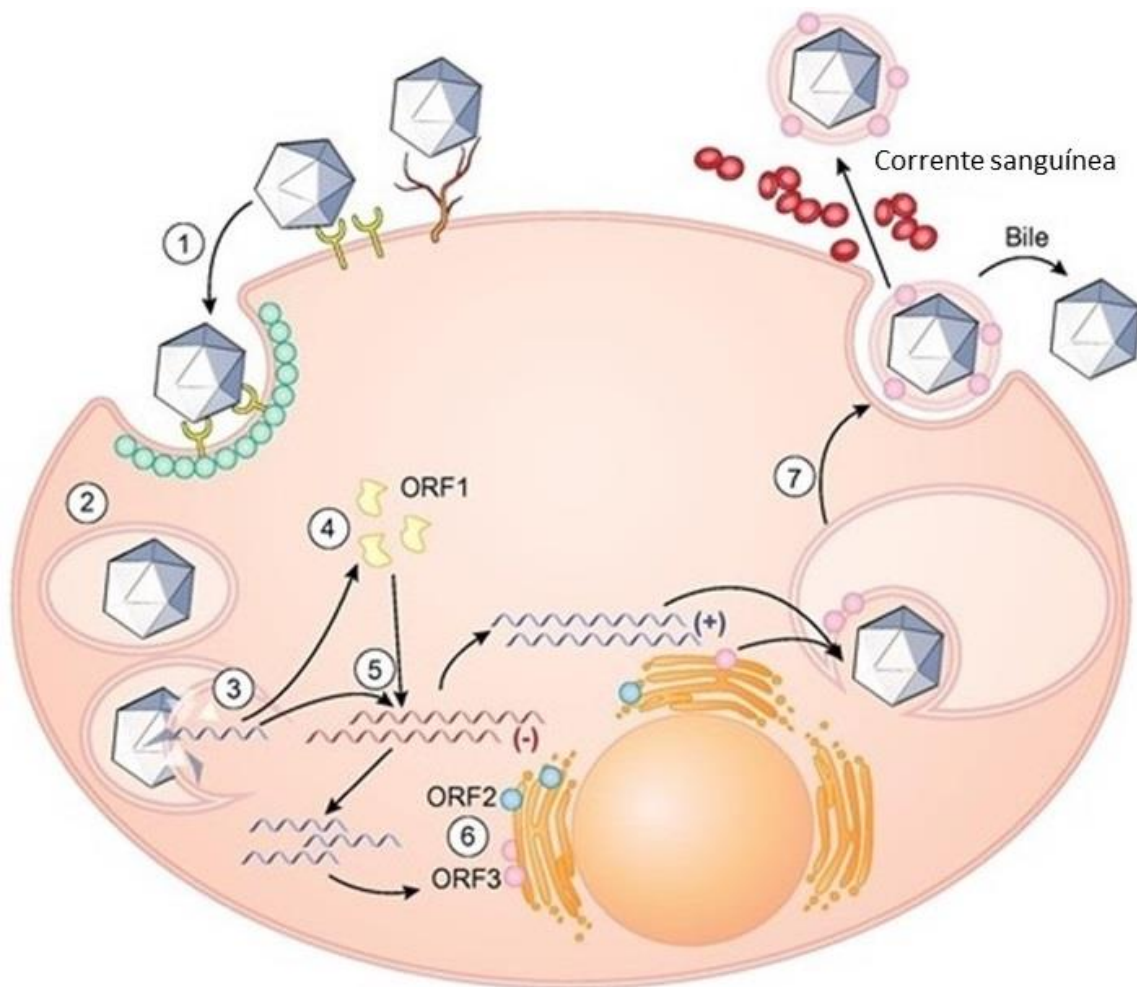
também já foi descrito em outros animais como ovelhas, vacas e cabras na China (54, 55). Não se sabe ao certo se essas últimas espécies são reservatórios naturais ou hospedeiros acidentais do HEV-4. Três genótipos adicionais foram propostos, sendo dois isolados de javalis no Japão (genótipos HEV-5 e HEV-6) e um único isolado de um camelo em Dubai (genótipo HEV-7) (42).

Os *Orthohepevirus B* compreendem vírus com genoma menor, de aproximadamente 6,6 kb, e apresentam 50% de identidade com a sequência de nts dos vírus identificados em mamíferos. Os vírus dessa espécie, atualmente denominados como HEV aviário, foram obtidos inicialmente em galinhas afetadas por uma síndrome denominada hepatoesplenomegalia (39). Até o momento, apenas quatro genótipos foram descritos em diferentes regiões do mundo, e compartilham uma baixa divergência (<6%) (56). O risco de transmissão interespecie do HEV aviário parece ser baixo, como demonstrado em um estudo de infecção experimental de macacos rhesus (57).

Vírus do “tipo HEV” isolados a partir de ratos (HEV-C1) e ferretes (HEV-C2) compõem a espécie *Orthohepevirus C*, sendo que o HEV-C1 compartilha uma identidade nucleotídica entre 49 a 55,9% com as variantes do HEV aviário e os genótipos 1 a 4 (58). Já os vírus isolados de ferretes, apresentam uma identidade de 72,3% com os isolados de ratos (59). O potencial zoonótico e de transmissão interespecie do HEV identificado em ratos ainda é discutido, mas até o momento não há evidências de que tal vírus seja capaz de infectar macacos rhesus e suínos (60, 61). Os *Orthohepevirus D* são compostos por vírus isolados em morcegos que possuem identidade nucleotídica de apenas 48,1-52,3% com os *Orthohepevirus A, B* e *C*. Sua identificação é recente e até o momento não se sabe do potencial de transmissão desse vírus para outros mamíferos (62).

### **1.3 Replicação viral**

O ciclo replicativo do HEV ainda não foi completamente elucidado. Os modelos experimentais e os poucos sistemas de cultivo celular eficazes permitiram uma limitada compreensão sobre os mecanismos de replicação utilizados pelo vírus. Baseando-se na analogia com outros vírus, o ciclo replicativo do HEV se divide em: adsorção, penetração, replicação, montagem e liberação da célula hospedeira (figura 1.5).



**Figura 1.5 - Representação esquemática do ciclo de replicação do HEV.**

O ciclo é dividido nos seguintes passos: 1) ligação do vírus a proteoglicanos de sulfato de heparina e entrada através de receptor (es) ainda não identificados (s); 2) endocitose mediada por clatrina; 3) liberação do RNA de cadeia positiva viral no citosol; 4) tradução da pORF1; 5) replicação através de um intermediário de RNA de cadeia negativa e síntese dos RNAs subgenômicos de 7,2 e 2,2 kb; 6) tradução do RNA subgenômico para produzir as pORF2 e pORF3; 7) empacotamento do genoma, montagem e liberação do vírus recém-formado. A proteína ORF3 está provavelmente associada às membranas intracelulares que compõem o envelope e pode desencadear a liberação de vírions através dos complexos de triagem endossomal necessários para a via de transporte. Partículas envelopadas atingem a corrente sanguínea e não envelopadas a bile. Adaptado (63).

Os hepatócitos representam o sítio primário de replicação do HEV. Sabe-se que os genótipos 3 e 4 possuem sítios extra-hepáticos de replicação, como intestino, células do sistema nervoso, rins e pâncreas (64). Ainda não foi possível identificar se os genótipos 1 e 2 também são capazes de replicar em tecidos extra-hepáticos humanos. Não se sabe ao certo quais receptores dos hepatócitos o HEV utiliza para se ligar e conduzir a entrada do vírus na célula hospedeira. Já foi demonstrado que as proteoglicanas como sulfato de heparana e particularmente as sindecanas podem se ligar às proteínas da ORF2 expressas em VLPs. No entanto, a ligação entre a ORF2 e o sulfato de heparana é resultante de uma adsorção inespecífica. Evidências adicionais sugerem que a internalização do vírus em cultura celular

envolve a endocitose mediada por clatrina (65, 66). Além disso, a remodelagem do citoesqueleto é crucial para a endocitose do HEV (67). Após internalização, o RNA genômico é liberado no citoplasma, onde ocorre a síntese proteica e a replicação do genoma viral.

O ciclo replicativo do HEV parece envolver tanto o segmento genômico inteiro de RNA como os segmentos subgenômicos (35, 36). A fita positiva de RNA serve para dois propósitos. Primeiro, ela atua como RNAm para a tradução da poliproteína não-estrutural pORF1, que será clivada pelas proteases citoplasmáticas do hospedeiro em inúmeras proteínas com diferentes domínios funcionais e atividades. Os papéis propostos para cada uma das proteínas resultantes incluem: a Met que é responsável por catalisar o capeamento do RNA; a PCP que faz a clivagem do polipeptídeo pORF1; a Hel que é responsável pelo enovelamento do RNA viral além de auxiliar a Met no capeamento do mesmo; a RdRp que realiza a replicação do RNA genômico a partir do RNA intermediário replicativo (fita negativa de RNA). A segunda função do RNA genômico é atuar como molde para a síntese da fita negativa complementar, que por sua vez atua como um molde intermediário para a síntese de inúmeras cópias de RNA genômicos (fita simples de polaridade positiva que irão formar a progênie viral). O intermediário replicativo também atua como molde para a síntese de fitas positivas de RNA subgenômicos (de 2,2 kb), que depois irão atuar como RNAm para a síntese das pORF2 e pORF3.

Após replicação e síntese proteica, as proteínas do capsídeo viral se dirigem ao retículo endoplasmático e passam a empacotar as recém-produzidas fitas de RNA genômicos. As partículas do HEV são liberadas da célula do hospedeiro pelo sistema exossomal celular (68). Essas partículas recém-montadas são liberadas dos hepatócitos e podem infectar novas células localmente ou após a passagem pela circulação sanguínea.

Além do fígado, os vírions também podem atingir o intestino via bile e a circulação sanguínea. As partículas virais que são liberadas dos hepatócitos através da membrana canalicular para a bile serão eliminadas, sem envelope, no meio ambiente através das fezes. Já os vírions liberados através da membrana basolateral para os sinusóides hepáticos carregam um envelope, que parece ser adquirido durante o brotamento da célula hospedeira. Nesse caso, os vírions ganham a corrente sanguínea na forma envelopada, podendo “enganar” o sistema imunológico dessa maneira. O envelope viral é composto principalmente da membrana celular hospedeira, mas também contém a proteína pORF3 (12). Não se sabe ao certo se a liberação dessas duas formas virais é diferente ou se a ação detergente dos sais biliares é responsável pela perda do envelope. É provável que a maioria dos vírus eliminados pelas fezes tenham sido replicados dentro dos hepatócitos alcançando o duodeno pelo sistema

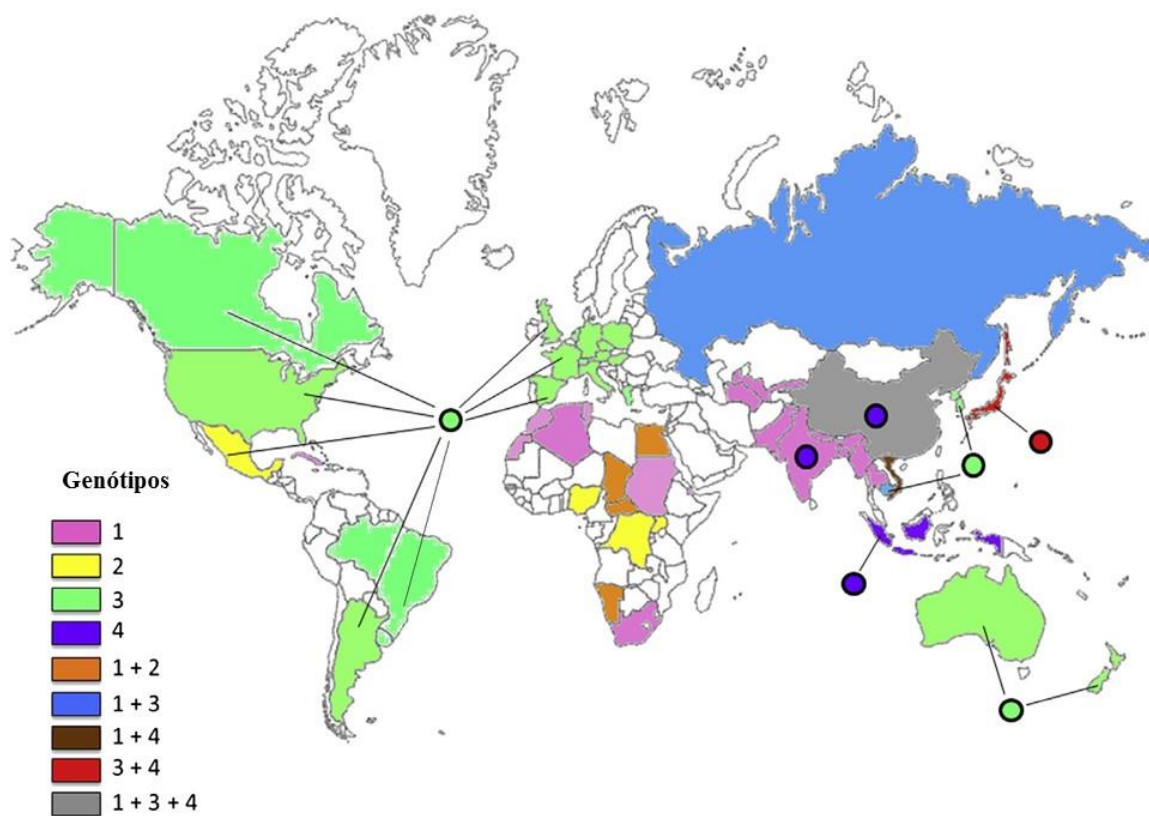
hepatobiliar (12). Embora o mecanismo do envelopamento do HEV, assim como a natureza e a composição desse envelope ainda permanecem indefinidos, a pORF3 parece estar associada à secreção de partículas envelopadas e possivelmente à formação do envelope. É importante notar que a proteína ORF3 está presente no vírion envelopado, como demonstrado pela captura de partículas de HEV por anticorpos anti-ORF3 em sobrenadante de cultura celular e soro, mas não em fezes (69).

## **1.4 Epidemiologia**

### **1.4.1 Genótipos de interesse humano**

A infecção pelo HEV é considerada a principal causa de hepatite viral de transmissão fecal-oral em todo o mundo. Grandes epidemias são atribuídas à presença do vírus em áreas hiperendêmicas, e casos esporádicos de HE são cada vez mais frequentes em regiões de baixa endemicidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que anualmente, áreas hiperendêmicas onde prevalecem os genótipos 1 e 2, ocorra mais de 20 milhões de infecções pelo HEV, dentre as quais tem-se 3,4 milhões de casos sintomáticos de HE, 70.000 óbitos e 3.000 natimortos (70). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, EUA), são considerados hiperendêmicos para o HEV os países em que a prevalência de hepatite viral aguda não A não B é maior ou igual a 25%, ou então, países que já relataram um grande surto de HE veiculado por água (71). Dentre estes países destacam-se a Índia, Bangladesh e o Egito. Em contrapartida, o HEV é considerado endêmico em locais onde a prevalência de todos os casos de hepatite viral aguda não A não B seja menor do que 25% (72). A maioria dos países do oeste europeu, América do Norte, Nova Zelândia, e diversos países da América do Sul, Ásia e Oriente Médio são considerados endêmicos para o HEV. Nestes locais a infecção pelo vírus é de baixa frequência e ocorre ocasionalmente como casos esporádicos.

Como descrito acima, dois padrões epidemiológicos distintos da infecção pelo HEV em humanos têm sido observados (73). Esses padrões estão correlacionados com a distribuição dos genótipos (Figura 1.6), prevalência da doença, fonte de infecção do vírus, rotas de transmissão, características demográficas, e, em alguns casos, apresentações clínicas. A epidemiologia e as características clínicas da infecção pelo HEV são determinadas basicamente pelo genótipo predominante na região e seus respectivos hospedeiros.



**Figura 1.6 - Distribuição geográfica dos genótipos 1, 2, 3 e 4 do HEV.**  
Adaptado (74).

Em países hiperendêmicos, a HE ocorre em forma de surtos e casos esporádicos veiculados por água e causados pela infecção pelos genótipos 1 ou 2 (75). Desde o primeiro surto do genótipo 1 descrito em Nova Déli, na Índia (1956-1957), muitos outros já ocorreram na Índia (Caxemira), Nepal (Catmandu) e China (Província de Xinjiang, 1986-1988) (76). O genótipo 1 se encontra amplamente distribuído em algumas regiões da Ásia (regiões central, sul e sudeste) e da África, onde a doença é frequente (figura 1.6). O genótipo 2 foi descrito apenas em um surto no México (1986-1987) e em poucas regiões do oeste africano (77). Surtos de HE têm sido documentados exclusivamente em países com recursos limitados ou que estejam passando por emergências humanitárias, onde haja superlotação, e acesso restrito à água potável, saneamento adequado e higiene. A transmissão alimentar pode ocorrer, mas é rara, e a transmissão pessoa-pessoa parece incomum nesses casos (78). A transmissão via transfusão de sangue e hemoderivados é uma realidade em áreas hiperendêmicas e endêmicas para o HEV, ainda que o risco de transmissão por essa via seja baixo (79).

Os surtos decorrentes da infecção pelos HEV-1 e -2 atingem mais de milhares de pessoas e até 15% da população infectada manifesta a forma sintomática da doença (75, 80). A taxa de ataque da doença é maior entre adolescentes e jovens adultos (entre 10 e 40 anos de

idade) e menor em crianças e idosos (81). A doença clínica é caracterizada por hepatite aguda autolimitada, clinicamente e bioquimicamente indistinguível das demais hepatites virais. Até o momento há apenas um relato de infecção crônica pelo genótipo 1 do HEV (82). Mais estudos serão necessários para avaliar a real possibilidade de doença hepática crônica decorrente da infecção por esse genótipo.

Durante os surtos de HE, a taxa de ataque da doença e a mortalidade são particularmente mais elevadas entre mulheres grávidas, principalmente aquelas entre o segundo e terceiro trimestre de gestação. Além disso, o risco da evolução para insuficiência hepática fulminante (IHF) entre aqueles com sintomas da hepatite E é maior entre as gestantes (22%) do que entre os homens (2,8%) e mulheres não grávidas (0%) (83). A transmissão vertical do vírus já foi relatada podendo ocasionar aborto espontâneo, problemas congênitos e até morte do recém-nascido (84).

Os reservatórios do HEV nas regiões hiperendêmicas permanecem incertos. Estudos realizados em macacos cinomolgos experimentalmente infectados com HEV-1 revelaram que a infecção neste modelo produz hepatite subclínica com viremia e eliminação viral prolongada pelas fezes (7, 85). Sugere-se que, a eliminação viral pelas fezes por pessoas assintomáticas pode levar a contaminação dos reservatórios de água. Além disso, a detecção dos HEV-1 e 2 no esgoto indica que o mesmo atua como reservatório ambiental destes genótipos (86). A transmissão zoonótica dos genótipos 1 e 2 não ocorre, visto que os mesmos não infectam animais domésticos que poderiam atuar como reservatórios (87).

Em diversos países da Europa, Leste da Ásia, América do Norte e América do Sul a HE apresenta um perfil epidemiológico de baixa endemicidade, a doença é muito menos frequente e ocorre na forma de casos esporádicos (88). Os casos de infecção autóctone pelo HEV nessas áreas parecem estar associados à transmissão zoonótica ocasional dos genótipos 3 e 4 de origem animal, mais frequentemente de suínos para humanos. Essa transmissão pode ocorrer pela ingestão de carnes ou vísceras cruas e/ou malcozidas ou pelo contato íntimo com mamíferos infectados pelos vírus, com destaque para os suínos. Os genótipos 3 e 4 também circulam em países onde os genótipos 1 e 2 são presentes, mas não costumam ser observados em função do predomínio dos HEV-1 e 2.

Os genótipos 3 e 4 do HEV infectam naturalmente diversas espécies animais e possuem a capacidade de cruzar a barreira interespecíes. O suíno é considerado o principal reservatório desses genótipos sendo que a transmissão entre os animais dessa espécie é altamente eficaz e amplamente documentada (89). A infecção no suíno é assintomática e o vírus é eliminado em alta concentração nas fezes (aproximadamente  $10^6$  cópias genômicas por

grama de fezes). O HEV-3 também tem sido detectado em javali (90) e veado (91), porém estes representam reservatórios de menor importância quando comparado ao suíno visto que o consumo de carne proveniente destas espécies é mais raro.

Os genótipos 3 e 4 parecem ser menos virulentos do que os genótipos 1 e 2. Em indivíduos imunocompetentes, a maioria das infecções pelos HEV-3 e 4 é assintomática. Os casos sintomáticos acometem com mais frequência homens mais velhos (> 60 anos) com doenças coexistentes, ou doença hepática pré-existente (92). Não há relatos de alta mortalidade em gestantes infectadas por estes genótipos (93).

Convencionalmente, a infecção sintomática pelo HEV determina quadros de hepatite aguda autolimitada em humanos. Porém, nos últimos anos tem sido descrito a ocorrência de hepatite crônica pela infecção com o genótipo 3 (e em baixa frequência o genótipo 4) do HEV em pacientes imunossuprimidos, especialmente em pós-transplantados (4, 94, 95). A evolução da doença nesses indivíduos pode resultar rapidamente em cirrose (94). Como a maioria dos relatos de casos de infecção persistente pelo HEV em imunossuprimidos são atribuídos à infecção pelo HEV-3, a transmissão zoonótica deve constituir a principal rota. Transfusão de sangue e hemoderivados, transplante de órgãos (96) e células tronco (97) constituem risco de infecção, principalmente para indivíduos imunossuprimidos, podendo ser evitadas através de ações preventivas pelo rastreamento do vírus nesses espécimes clínicos. O aumento no número de infecções pelo HEV em países desenvolvidos e a descoberta da HE crônica em pacientes imunossuprimidos tem sido foco de pesquisas relacionadas ao HEV em todo o mundo.

#### **1.4.2 Outras espécies animais infectadas pelo HEV**

Até o presente momento, apenas as cepas pertencentes aos genótipos do HEV-3, 4 e recentemente o 7 são consideradas zoonóticas. Porém, o crescente número de cepas detectadas em diferentes espécies animais tem dificultado a separação entre as cepas zoonóticas e não zoonóticas. A lista de espécies animais sabidamente susceptíveis à infecção pelo HEV é longa e continua em expansão à medida que novas espécies animais são investigadas. Dentre as espécies animais susceptíveis à infecção pelo HEV tem-se: primatas não humanos (PNH) como chimpanzé, macaco cinomolgo, macaco rhesus, macaco verde africano, macaco noturno, sagui e saimiri (*Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, *Chlorocebus aethiops*, *Aotus trivirgatus*, *Saguinus mystax tamarins* e *Saimiri sciureus*); javali (*Sus scrofa*); esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*); cinco espécies de morcegos de três famílias diferentes (*Hipposideridae*, *Vespertilionidae* e *Phyllostomidae*);



diversas espécies de ratos (*Rattus spp*); bandicota indica (*Bandicota indica*); musaranho asiático (*Suncus murinus*); tupaia (*Tupaia belangeri chinensis*); corça (*Capreolus capreolus*), veado vermelho (*Cervus elaphus*); mangusto (*Herpestes javanicus*); alce (*Alces alces*); veado japonês (*Cervus nippon*); coelho (*Oryctolagus cuniculus*); furão (*Mustela putorius*); marta (*Neovison vison*); camelo (*Camelus dromedaries*); falcão (*Falco tinnunculus* e *F. vespertinus*); abutre (*Gyps himalayensis*); galinha (*Gallus domesticus*); peru (*Meleagris gallopavo*) e truta (*Oncorhynchus clarkii*) (98). Outras espécies animais são consideradas potenciais hospedeiras como, por exemplo, o urso-negro-asiático (*Selenarctos thibetanus*), o leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*), cão (*Canis lupus*), gato (*Felis catus*), raposa (*Vulpes vulpes*), cavalo (*Equus caballus*), boi (*Bos taurus*), iaque (*Bos grunniens*), cabra (*Capra aegagrus*) e ovelha (*Ovis aries*) (98). Entretanto, mais estudos precisam ser realizados com diferentes metodologias e diferentes amostragens para confirmar tais descrições. O mesmo deve ser realizado nas espécies animais em que apenas achados sorológicos foram constatados, como o caso de cães, gatos e raposas.

### **1.4.3 Transmissão zoonótica do HEV**

A capacidade dos HEV- 3 e 4 em cruzar barreiras interespecies é determinante para a disseminação e manutenção desses genótipos em regiões consideradas de baixa endemicidade. A hipótese de transmissão zoonótica fundamenta-se na habilidade de transmissão interespecie e na alta semelhança genômica (mais de 90% de identidade de nts) entre as cepas de origem animal (principalmente suínos) e humanas (87). Estudos confirmaram que, em condições experimentais, cepas dos genótipos 3 e 4 de origem humana são capazes de infectar suínos, e cepas de origem suína são capazes de infectar PNH, os quais atuam como o modelo experimental mais próximo do humano (99, 100). Os HEV-3 e 4 de suínos não requerem adaptação alguma para atravessar a barreira entre as duas espécies.

A transmissão zoonótica dos HEV-3 e 4 para o homem pelo consumo de carne ou vísceras contaminadas provenientes de suínos (linguiça crua), javalis (carne grelhada) e veados (sashimi de fígado) foi comprovada (91, 101, 102). Recentemente, o consumo de produtos alimentares derivados de camelos (carne e leite) foi relacionado à um caso crônico de HE pós-transplante. A cepa proveniente do paciente apresentou 100% de identidade com a cepa proveniente dos alimentos derivados do animal, comprovando assim o potencial zoonótico do HEV-7 descrito em camelos (103).

Apesar da transmissão zoonótica dos HEV-3 e 4 ser um fato já estabelecido, ainda não está claro se cepas destes genótipos quando presentes em outras espécies animais são capazes

cruzar a barreira interespecie e infectar humanos. Por exemplo, a infecção experimental bem sucedida de macacos cinomolgos com cepas de coelho já foi demonstrada (104). Porém, a real capacidade do HEV-3 de coelho infectar humanos e seu papel zoonótico na infecção da HE permanecem indeterminados. Outros estudos também são necessários para determinar o risco de transmissão zoonótica de outras cepas da espécie *Orthohepevirus A* como os genótipos HEV-5 e 6 de javalis.

Os genótipos 3 e 4 estão disseminados na cadeia de alimentos de origem suína em todo o mundo. Estudos recentes têm demonstrado a presença do HEV em 3% a 11% das amostras de fígado provenientes de abatedouros da França, EUA, Brasil, Japão, Reino Unido, Holanda, Itália, Espanha e República Checa (43). O genoma do vírus também já foi detectado em amostras de fígado de javalis, veados e coelhos selvagens caçados no sul da França (105). Estes genótipos também têm sido detectados em alimentos de origem suína comercializados que são consumidos sem cocção prévia. A transmissão zoonótica pelo consumo de vísceras in natura ou na forma de embutidos frescais como algumas linguças que são apenas defumadas e não cozidas, tem sido relacionada a casos de infecção pelo HEV-3 na Europa (106, 107).

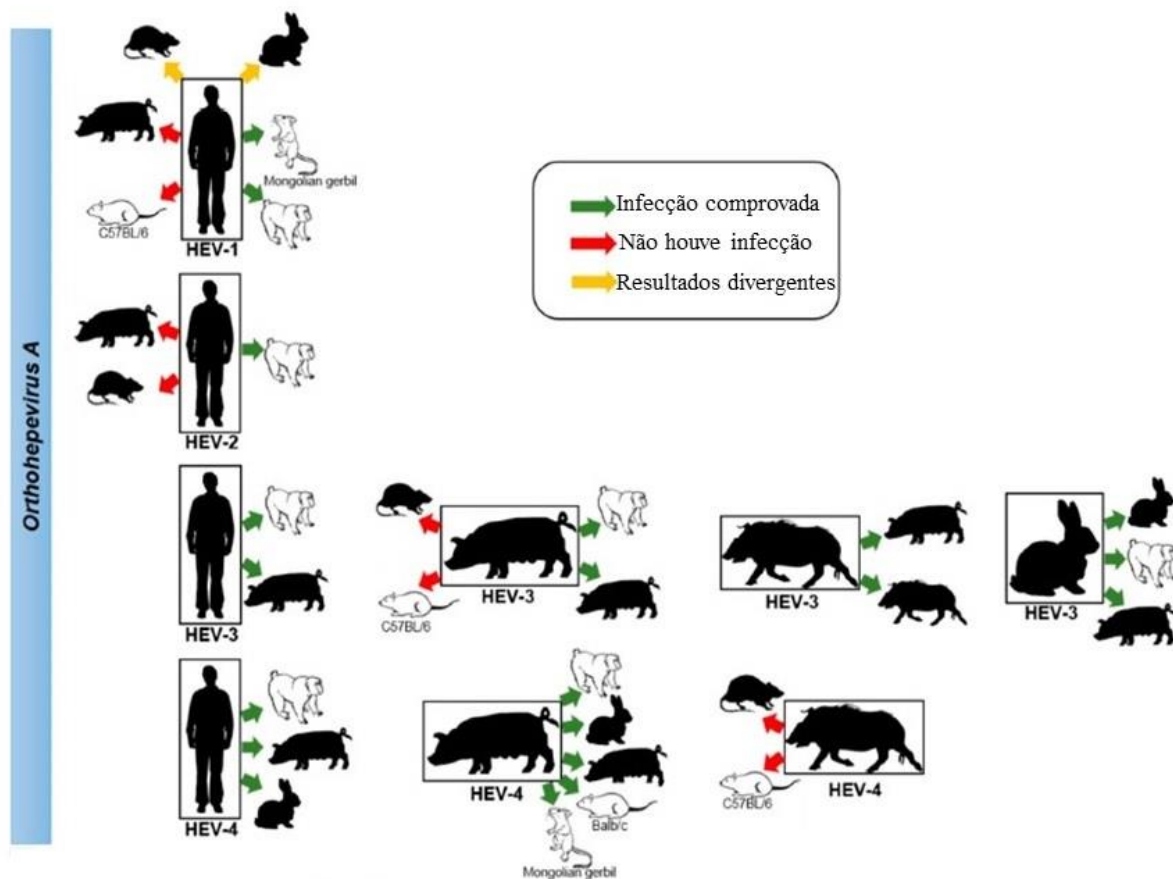
A bioacumulação dos genótipos 3 e 4 em ostras, mariscos e mexilhões também vem sendo associada a surtos de hepatite E em cruzeiros marítimos (108). O genoma do vírus tem sido, também, detectado em morangos no Canadá (109), em framboesas congeladas vendidas na Europa (110) e na cadeia de fornecimento de vegetais na Europa (111), sugerindo que frutas e vegetais moles também podem ser contaminados com o HEV. A presença do vírus em bivalves, frutas e vegetais está associada à contaminação de águas superficiais e de irrigação por dejetos de origem animal. O HEV também está presente nos dejetos e adubos de origem suína (112, 113). O escoamento ou tratamento inadequado destes dejetos de origem suína que podem ser utilizados como fertilizantes ou que alcançam correntes de água podem ocasionar a contaminação do solo e de águas vizinhas (114). Portanto frutas, vegetais, fontes de abastecimento de água e redes de esgoto representam possíveis fontes de infecção para humanos dos genótipos 3 e 4 também.

## **1.5 Modelos experimentais *in vivo* e *in vitro***

### **1.5.1 Modelos animais**

Os reservatórios naturais do HEV e os modelos animais de infecção têm auxiliado na compreensão dos mecanismos de transmissão, infecção, replicação, patogênese, resposta

imune e as consequências da infecção no hospedeiro. Além disso, tais modelos possibilitam o desenvolvimento e testes de medicamentos antivirais específicos, bem como de vacinas antivirais. A figura 1.7 ilustra resumidamente os resultados dos estudos de infecção experimental pelo HEV em modelos animais, caracterizando a transmissão interespecie dos genótipos HEV-1 a 4 capazes de infectar humanos. O genótipo 7 não está incluso na figura.



**Figura 1.7 – Transmissões experimentais interespecie dos genótipos 1 a 4 do HEV.**

As setas indicam a transmissão interespecie das diferentes cepas pertencentes aos genótipos 1 a 4 do HEV determinada pela infecção experimental de reservatórios animais (silhueta preta) ou modelos animais (silhueta branca). Adaptado (43).

Como descrito anteriormente, algumas espécies de PNH são susceptíveis à infecção pelo HEV, tais como chimpanzés, macaco-da-noite, micos, rhesus, cinomolgus e o macaco verde africano (115). Macacos rhesus e cinomolgus são susceptíveis aos 4 genótipos de HEV que infectam humanos, sendo, portanto, os principais modelos experimentais para a infecção pelo vírus (7, 116). Macacos cinomolgus têm sido utilizados como modelo experimental desde a primeira descrição de VLPs do HEV em 1983 (8). Além disso, recentemente a infecção natural e transmissão do genótipo 3 do HEV foi relatada em uma colônia de

cinomolgos no Japão, consolidando essa espécie como o modelo experimental mais promissor (117).

Nos primeiros estudos realizados em animais, a infecção experimental de macacos cinomolgos com suspensão fecal proveniente de um paciente humano resultou em excreção de VLPs e desenvolvimento de hepatite, caracterizado por elevação das enzimas hepáticas, viremia e soroconversão (8, 118, 119). O curso da infecção em PNH experimentalmente infectados é similar ao observado em humanos, com períodos de incubação variáveis (6). Cinomolgos e rhesus desenvolvem alterações bioquímicas e histopatológicas típicas de hepatite viral após a inoculação intravenosa do vírus, associadas à excreção de partículas virais e VLPs nas fezes e soroconversão específica anti-HEV (120, 121). Os cinomolgos desenvolvem uma forma subclínica da doença não acompanhada por icterícia ou outras manifestações clínicas (7). As alterações histopatológicas relatadas nessa espécie também são mais moderadas do que aquelas observadas em humanos (7, 121). Poucos trabalhos têm relatado infecção crônica pelo HEV em modelos experimentais animais. Em PNH, macacos rhesus já reproduziram infecção persistente pelo HEV-4, com resposta humoral fraca e transitória (122). Entretanto, até o momento não há relatos de infecção persistente evoluindo para hepatite crônica em cinomolgos.

O potencial zoonótico de cepas provenientes de diferentes espécies animais tem sido comumente avaliado e confirmado em PNH. A infecção de macacos cinomolgos com o HEV de coelhos levou ao desenvolvimento de hepatite aguda autolimitada, sugerindo que coelhos também podem atuar como reservatórios do vírus (123). Já as tentativas de transmissão de cepas de HEV aviário, de ratos ou ferretes para PNH sob condições experimentais não obtiveram sucesso (124, 125). Além disso, outra importante aplicação dos estudos realizados em PNH é a avaliação da eficácia de potenciais vacinas para o HEV (126).

O HEV suíno foi descrito pela primeira vez em 1997 e demonstrou ser geneticamente e antigenicamente relacionado aos HEV-3 e 4 humano e substancialmente diferente dos genótipos 1 e 2 (127). Suínos são hospedeiros naturais e considerados os principais reservatórios dos genótipos 3 e 4 do HEV (128). Experimentalmente, suínos livres de patógenos específicos (SPF, do inglês “specific pathogen free”), têm sido infectados com sucesso pela via intravenosa com os genótipos 3 e 4 humano e 3 de coelho (61, 100, 128). Essa espécie quando infectada desenvolve lesões hepáticas macroscópicas leves, viremia, soroconversão, sítios extra-hepáticos de replicação e elimina partículas virais infecciosas pelas fezes (64, 128). Apesar de desenvolverem infecção natural seguida de resposta imune protetora, suínos com infecção pelo HEV não apresentam dano hepático significativo (128).

Além disso, suínos não se infectam com os genótipos 1 e 2 do HEV nem com cepas provenientes de ratos (61).

Coelhos SPF infectados com cepas de HEV de coelho criados comercialmente eliminam vírus pelas fezes, apresentam viremia e desenvolvem hepatite, com elevação sérica dos níveis de ALT e alterações histopatológicas (129). Nas mesmas condições experimentais, coelhos também são capazes de desenvolver hepatite crônica, caracterizada por inflamação hepática acompanhada por fibrose, além da replicação em tecidos extra-hepáticos (130). Transmissão vertical para os fetos e alta mortalidade em coelhas gestantes também foram observados (131). No entanto as cepas de HEV de coelho induzem apenas infecção subclínica com pouco ou nenhum sinal de doença. O coelho como modelo experimental pode ser útil para estudos de infecção e patogênese decorrentes da cepa de coelho e para estudos vacinais. A infecção pelo HEV-1 de origem humana nesse modelo experimental não obteve sucesso (132). Já o HEV-4 de origem humana e suína foi capaz de infectar com sucesso coelhos SPF (132, 133).

A utilização de roedores como modelo experimental de infecção para cepas humanas do HEV ainda vem sendo demonstrada embora com pouco sucesso. No entanto, a infecção de ratos da linhagem Wistar com HEV originário de ratos selvagens foi bem-sucedida, culminando em soroconversão e eliminação viral nas fezes, sem alterações de peso e enzimas hepáticas (134). Essa espécie de roedores também foi capaz de reproduzir com sucesso a infecção pelo HEV-1 culminando em viremia, excreção viral e alterações histopatológicas no fígado, baço e linfonodos (135).

Camundongos Balb/c nude foram infectados com sucesso pelo genótipo suíno HEV-4, culminando na detecção de antígenos virais no fígado e sítios extra-hepáticos, elevação de enzimas hepáticas, e alterações histopatológicas no fígado e baço (136). No entanto, os camundongos não apresentaram sinais clínicos da infecção pelo HEV. Recentemente, camundongos quiméricos UPA/SCID, que possuem células de fígado humano, foram infectados com amostras clínicas provenientes de pacientes com quadros agudos e crônicos de hepatite E. Os genótipos 1 e 3 se mostraram capazes de infectar estes roedores e de reproduzir diversos elementos observados na infecção em humanos (137). Este estudo também confirmou transmissão do HEV para camundongos contactantes provavelmente pelas via fecal-oral, injúrias ou contato físico direto.

## 1.5.2 Cultivo celular

Embora muitos estudos tenham sido realizados, poucos sistemas de cultivo celular são considerados eficazes suficientes para uso. O sistema de cultivo celular tem sido essencial para os estudos que buscam elucidar os mecanismos de replicação do HEV e para obtenção de progênie viral. A concentração dos estoques de vírus, as células hospedeiras e os componentes de meio são fatores essenciais que determinam o sucesso do sistema de cultura de células.

Altas concentrações de vírus podem conter uma determinada população de variantes, o que aumenta a possibilidade de se obter uma cepa de HEV que possa ser cultivada *in vitro*. Com base em resultados anteriores, estima-se que para se obter sucesso na infecção do HEV em cultura de células o inóculo deve conter carga viral superior a  $1,5 \times 10^4$  cópias/poço (138). Portanto, as concentrações e as proporções de variantes contidas nos estoques de vírus são fatores importantes que afetam o sucesso da cultura de células HEV.

A seleção de células hospedeiras é outro fator chave para o sucesso da cultura de células de vírus. Embora o HEV consiga se replicar em vários órgãos e tecidos além de fígado, poucas linhagens celulares conseguem suportar a replicação do vírus. Recentemente, dois sistemas de cultura celular foram desenvolvidos e são considerados eficientes para uso. A primeira tentativa bem-sucedida de cultivo celular foi realizada com células das linhagens PLC/PRF/5 (células de hepatocarcinoma humano) e A549 (células de adenocarcinoma pulmonar). Essas células foram infectadas com amostras fecais provenientes de pacientes com hepatite aguda decorrente da infecção pelos genótipos 1, 3 e 4 (139, 140). O segundo foi o cultivo estabelecido em HepG2/C3A (células de hepatoma humano) e LLC/PK1 (células de rim de suíno) para os genótipos 1 e 3 (138). Um estudo demonstrou que o genótipo 3 do HEV infecta mais eficientemente as células LLC/PK1 de origem suína quando comparada as células HepG2/C3A de origem humana (141).

Recentemente, duas linhagens celulares, nomeadas HepaRG (células de hepatoma humano, assim como a HEPG2/C3A), e PICM-19 (células-tronco de embriões de origem suína), demonstraram suportar a replicação pelo vírus, porém, com uma menor produção de vírions (142). Adicionalmente, um estudo recente descreveu a eficácia da replicação de uma cepa do HEV-3 em células semelhantes à hepatócitos e derivadas de células troncos pluripotentes, denominadas Kernow-C1 p6 (143).

Inúmeras dificuldades limitam o uso do sistema de cultivo celular principalmente com relação à expressão dos genes virais. Como um método alternativo à cultura de células tradicional, clones infecciosos de cDNA do vírus foram desenvolvidos para gerar progênies virais geneticamente modificadas (144). As mudanças fenotípicas resultantes destas progênies

virais permitem inferir as funções dos genes virais e suas respectivas proteínas. Usando clones infecciosos, os pesquisadores construíram uma variedade de vírus mutantes do HEV para estudos de função de proteínas virais e estrutura genômica viral, além de ensaios de neutralização. Estes clones infecciosos desempenharam um papel importante nos estudos de virologia do HEV. Sendo assim, os sistemas de cultura celular e de clones infecciosos de cDNA são complementares no que diz respeito a pesquisa relacionada ao HEV.

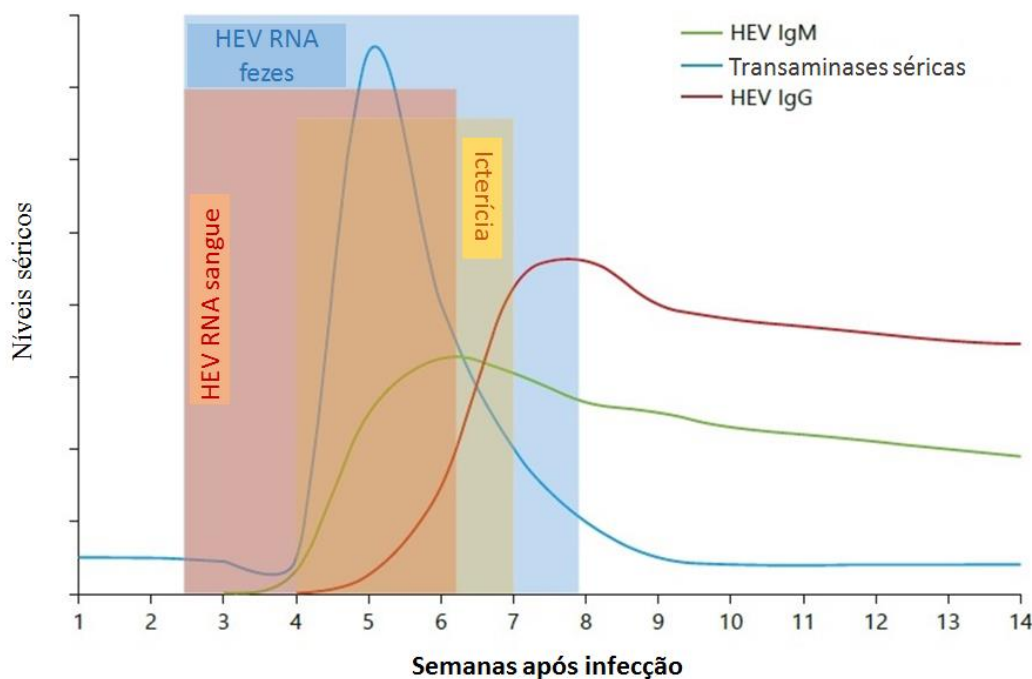
## **1.6 Patogênese e resposta imune**

Aspectos virológicos, sorológicos e patológicos da infecção pelo HEV tornaram-se conhecidos a partir de raros estudos realizados em voluntários (8, 145) e inquéritos epidemiológicos obtidos de pacientes afetados em surtos de HE (85). Os maiores avanços nos estudos de patogênese se devem em grande parte pelas infecções experimentais bem-sucedidas em PNH e outras espécies animais, como descrito no item 1.5.1. A patogênese da infecção pelo HEV parece ser predominantemente mediada pelas respostas do sistema imunológico do hospedeiro, que podem eliminar o vírus e proporcionar imunidade específica ao mesmo.

Como já descrito anteriormente, a infecção pelo HEV ocorre principalmente pela via fecal-oral. Durante o período de incubação (3-10 semanas) o vírus atravessa a mucosa intestinal e cai na circulação sanguínea. Não se sabe exatamente se neste primeiro momento o vírus se replica nos enterócitos e nem como ele atinge o fígado. Após atingir o fígado, o HEV infecta e se multiplica nos hepatócitos, iniciando assim o processo de injúria hepática (9). O aparecimento de sinais clínicos é consequente ao dano hepático contínuo, e ocorre após um período de incubação de aproximadamente três semanas. A viremia se inicia poucos dias antes do aparecimento dos sintomas, atinge o pico junto à elevação das transaminases (ALT e AST), e se mantém por poucas semanas acompanhada de eliminação viral nas fezes (146). Em geral, o pico das transaminases ocorre seis semanas após a infecção (147). Os picos de ALT são tipicamente mais elevados do que os picos de AST. Um período prodromico curto com sintomas inespecíficos, tais como mialgia, artralgia, fraqueza e vômitos, é seguido por sinais específicos de doença hepática como icterícia, prurido, fezes incolor e urina escurecida (148).

A soroconversão se inicia com uma resposta de curta duração de IgM anti-HEV, que atinge o pico um pouco antes ou concomitante aos sinais clínicos. Os níveis de IgM permanecem elevado por até 6 meses. Já os níveis de IgG começam a se elevar concomitante

aos primeiros sintomas, atingem o pico cerca de 4 semanas após o aparecimento, e permanecem em níveis elevados por até um ano (149). A figura 1.8 ilustra resumidamente o transcorrer de um quadro de hepatite aguda sintomática e autolimitada decorrente da infecção pelo HEV em um indivíduo imunocompetente.



**Figura 1.8 - Curso da infecção aguda pelo HEV.**

O curso de uma infecção pelo HEV sintomática típica é composto por sinais que incluem icterícia e lesão hepática (evidenciada pelo aumento de ALT), viremia, excreção viral pelas fezes e soroconversão. Adaptado (150).

Em estudos realizados em voluntários infectados pelo HEV, o vírus foi detectado nas fezes aproximadamente uma semana antes do aparecimento dos sintomas e permaneceu durante outras duas semanas (8, 145). Excreção fecal prolongada, por até 52 dias, também foi relatada (85). Em modelos animais, o RNA viral foi detectado em amostras de soro, fezes e bile, alguns dias antes da elevação da ALT (151, 152). Em macacos inoculados pela via endovenosa, a replicação viral nos hepatócitos se inicia cerca de sete dias após a inoculação afetando de 70% a 90% dos hepatócitos. Os antígenos virais são detectados nos hepatócitos simultaneamente com a aparecimento do vírus nas fezes e bile, antes ou concomitantemente com o início da elevação da ALT e alterações morfológicas no fígado (118). Após replicação nos hepatócitos o HEV é então liberado para a bile, e conseqüentemente para as fezes, antes do pico das alterações morfológicas que ocorrerem no fígado e conseqüentemente dos sinais clínicos.



### 1.6.1 Resposta imune inata

Os eventos envolvidos na resposta imune inata antiviral são basicamente três: produção de IFN dos tipos I e III; destruição das células infectadas pelas células NK (do inglês “natural killer”); e produção de outras citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias que podem eliminar o vírus diretamente além de promover a maturação e recrutamento de células da resposta imune adaptativa (153).

Há evidências de que a infecção pelo HEV possa estar sujeita ao reconhecimento imune inato de receptores do tipo Toll (do inglês “Toll Like Receptors” - TLRs). Os níveis de TLRs 4, 7 e 8 são elevados em pacientes com HE aguda. Após a eliminação viral na fase convalescente, os níveis desses receptores se tornam semelhantes aos dos indivíduos saudáveis, enquanto o nível de TLR2 declina. Níveis elevados de TLR3 e resposta robusta ao IFN $\gamma$  foram associados à infecção autolimitada e convalescência sem intercorrências. Por outro lado, pacientes com menor expressão de TLR3 e IFN $\gamma$  progridem para falência hepática aguda (154).

Sabe-se que o IFN-I possui atividade anti-HEV *in vitro* sendo eficiente na depuração viral em pacientes com hepatite E crônica (155, 156). A produção de IFN-I promove um estado antiviral, de forma autócrina ou parácrina, através da indução transcricional de centenas de genes estimuladores de IFN (ISGs, do inglês “interferon-stimulated genes”) (157). Um estudo recente demonstrou que poucos ISGs possuem potentes efeitos anti-HEV. Dentre eles, o RIG-I é considerado um membro-chave que efetivamente restringe a replicação HEV. Entretanto, a ligação mecânica entre o receptor tipo RIG-I e o HEV, ativa a resposta antiviral celular inata, inesperadamente dispensável da produção de IFN, mas requer os elementos-chave da sinalização JAK-STAT. Portanto, o RIG-I pode estimular uma resposta antiviral independente da produção de IFN (158).

As células NK atuam como sentinelas importantes do sistema imunológico, iniciando respostas de defesa à certas infecções virais. Pacientes com HE aguda, apresentam uma menor proporção de células NK na circulação periférica quando comparadas à indivíduos saudáveis (159, 160). No entanto, a proporção de células NK com marcadores de ativação é superior àquela encontrada em indivíduos saudáveis (160). A redução das células NK totais na circulação periférica pode ser atribuída ao deslocamento destas células para o fígado, visto que se observa um aumento significativo do número de células NK CD56<sup>+</sup> no fígado de pacientes que vieram a óbito por insuficiência hepática associada à infecção pelo HEV (161).

Análises de biópsias hepáticas seriadas obtidas de chimpanzés infectados com HEV mostraram que vários genes associados à imunidade são ativados pela infecção por HEV.

Dentre estes, destacam-se três genes de quimiocinas indutoras de IFN- $\gamma$ , CXCL9, CXCL10 e CXCL11, além das citocinas estimuladoras ISGs 15 e 20 (162). Todos esses genes estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos, sendo que o ISG-15 pode inclusive ativar e atrair neutrófilos. Achados patológicos corroboram tais estudos, visto que alguns pacientes com HE aguda apresentam inflamação portal caracterizada por numerosos neutrófilos (163).

Embora a infecção por HEV seja quase sempre autolimitada, a infecção persistente pode ser observada em pacientes imunossuprimidos. Nestes casos, o vírus pode persistir no fígado na ausência de uma resposta imune adaptativa eficiente. Tal observação sugere que a imunidade inata por si só não é suficiente para eliminar a infecção viral, sendo necessário, portanto, uma ação conjunta entre as imunidades inata e adaptativa.

### **1.6.2 Resposta imune adaptativa**

As respostas de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> potentes e multiespecíficas desempenham papéis críticos na eliminação de infecções virais. As células T CD4<sup>+</sup> produzem citocinas, que são necessárias para o desenvolvimento das células efetoras T CD8<sup>+</sup> e produção de anticorpos por células B. O desenvolvimento da potente resposta de anticorpos anti-HEV durante o curso precoce da infecção pelo HEV sugere que as células T específicas são ativadas para facilitar a produção de anticorpos específicos. Em geral, respostas de células T específicas para a pORF2 foram demonstradas na maioria dos estudos relatados, enquanto que a detecção de respostas de células T específicas para a pORF3 parece variar em diferentes estudos (164).

Como característica comum, as proporções de monócitos e macrófagos no sangue periférico de pacientes com HE aguda são mais elevadas do que aquelas em controles saudáveis (165). Pacientes com HE aguda também apresentam uma elevação na proporção de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> multiespecíficas quando comparados com indivíduos controle. Um estudo recente sugerem que não existe uma ativação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específica para a ORF2 na circulação periférica de pacientes com HE aguda (159). O aumento da produção de IFN- $\gamma$ , sem respostas de células CD8<sup>+</sup> específicas detectáveis, indica que mecanismos inespecíficos da resposta inata (células NK ou NKT) estão envolvidos na patogênese da HE e eliminação do HEV. No entanto, a ausência de detecção de células CD8<sup>+</sup> produtoras de citocinas específicas para o HEV na circulação periférica não exclui a participação de células T citotóxicas específicas, uma vez que a resposta imunitária ocorre predominantemente no fígado e que o estudo utilizou apenas a proteína ORF2 expressa, ao invés de peptídeos sintéticos para estimular os PBMCs (do inglês, “peripheral blood mononuclear cell”). Além disso, o fígado contém um grande número de células CD8<sup>+</sup>. A falha

na detecção de células CD8<sup>+</sup> específicas na circulação não indica necessariamente que não existe uma resposta específica das células CD8<sup>+</sup> no fígado.

Estudos recentes sugerem que a infecção crônica pelo HEV está associada a resposta ineficiente das células T específicas do HEV e que o reforço da imunidade celular adaptativa contra o vírus pode prevenir infecções persistentes pelo mesmo. Em outras palavras, a recuperação da infecção pelo HEV parece estar correlacionada com as respostas das células T específicas (166).

### **1.6.3 Resposta imune humoral**

A resposta sorológica anti-HEV é, geralmente, detectada nos pacientes no início da doença clínica, junto da elevação da ALT e das alterações histopatológicas notadas no fígado. As imunoglobulinas (Ig) da classe IgM são detectadas na fase inicial da doença clínica, e podem persistir por meses (média de 4 a 6 meses) sendo detectadas em 80-100% dos indivíduos infectados durante surtos de HE aguda (167). O pico dos títulos de IgM pode ser perdido devido ao intervalo de tempo entre o início da doença e os testes laboratoriais. As imunoglobulinas da classe IgG aparecem simultaneamente ou pouco após o aparecimento da IgM. Os títulos dos anticorpos IgG se elevam durante a fase aguda e convalescente, e permanecem altos por 1 a 4,5 anos após a fase aguda da doença (168). Pacientes com infecção subclínica também soroconvertem e são capazes de manter anticorpos do tipo IgG por longos períodos após a infecção (169). Há relatos de indivíduos imunocomprometidos, em que a resposta de anticorpos anti-HEV pode ser tardia (53). Uma vez que os anticorpos anti-HEV IgG possuem uma potente atividade neutralizante, o desenvolvimento precoce de uma resposta IgG específica desempenha um papel importante na eliminação de HEV, em conjunto com as respostas imunes celulares inata e adaptativa.

O risco de reinfeção pelo vírus permanece incerto. Estudos em humanos e PNH indicam que anticorpos anti-HEV da classe IgG induzem proteção (170). A concentração mínima de anticorpos protetores ainda não foi definida. Sabe-se, porém, que pacientes pós-transplantados podem se reinfetar quando a concentração de anticorpos está abaixo de 7 unidades/mililitro (OMS) (171). A proteção cruzada entre os 4 genótipos que infectam humanos pode ocorrer devido a existência de um único sorotipo (172). Estudos recentes demonstraram que respostas de anticorpos IgG aos determinantes antigênicos imunodominantes da ORF2 do HEV são protetoras contra os 4 diferentes genótipos do HEV humano (173, 174).

Em macacos infectados experimentalmente com HEV, uma resposta imune específica anti-HEV IgM desenvolve-se dentro de 3-4 semanas pós-infecção. Concomitante ou ligeiramente mais tarde também ocorre uma resposta específica anti-HEV IgG. Anticorpos anti-HEV IgM desaparecem após várias semanas nos animais experimentalmente infectados, enquanto anticorpos da classe IgG anti-HEV persistem durante pelo menos os períodos dos estudos desenvolvidos, variando de 15 a 86 semanas (6, 175). Provavelmente anticorpos IgG devem permanecer por mais tempo do que os observados nesses estudos.

Ao contrário da infecção experimental de animais, é difícil definir o tempo exato em que os seres humanos são expostos ao vírus no processo de infecção natural. Embora o HEV seja geralmente transmitido pela via fecal-oral, o mesmo pode ser transmitido por transfusão de sangue (105). Anticorpos anti-HEV podem ser detectados em indivíduos imunocompetentes entre 4 e 14 semanas após transfusão com produtos sanguíneos contaminados. Achados semelhantes foram relatados em PNH inoculados com o HEV pela via endovenosa (6, 121).

Em raros casos, pacientes imunocompetentes sintomáticos com detecção do RNA viral podem ser negativos para os anticorpos anti-HEV IgM e IgG (176). Não está claro se este resultado negativo em detectar anticorpos anti-HEV é verdadeiro ou se é função da baixa sensibilidade dos testes realizados uma vez que os reagentes utilizados nos ensaios podem não conter o polipeptídeo imunodominante.

#### **1.6.4 Mecanismos patogênicos da lesão hepática induzida pela infecção pelo HEV**

A infecção pelo HEV, assim como outras infecções virais, induz as células a usarem a sua habilidade inata em se submeterem à morte celular programada (apoptose) a fim de encerrar a replicação viral. Sabe-se que a pORF2 do HEV é capaz de ativar o gene pró-apoptótico CHOP e algumas proteínas de choque térmico (177). Corroborando tais fatos, durante a fase aguda da HE é possível observar com certa frequência apoptose de hepatócitos (163).

Como o HEV é um vírus não citopático, o dano hepático decorrente da infecção deve ser imunomediado por células T citotóxicas e NK (178). Um fígado normal é habitado com células efetoras do sistema imune como os macrófagos, células NK e NKT. As células NK do fígado possuem uma habilidade citotóxica maior do que as NK da circulação periférica e parecem desempenhar um papel importante na eliminação viral. Porém, ao que tudo indica a depuração do HEV depende principalmente das células T. No entanto, evidências desse efeito

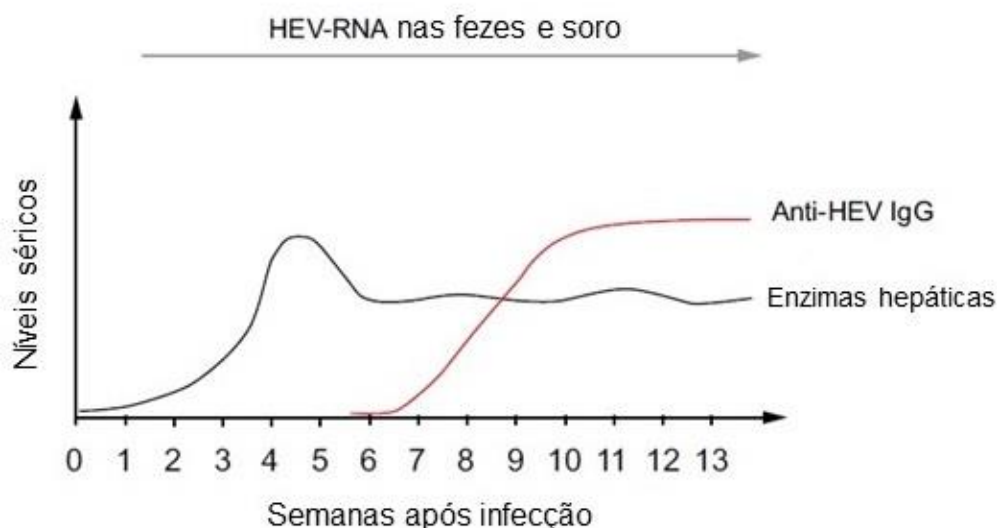
imunomediado ainda são raras tanto nos pacientes infectados, quanto nos modelos experimentais animais.

Em alguns casos a infecção pelo HEV pode evoluir para hepatite fulminante (HF), porém, as razões do porque isso acontece permanecem obscuras. Fatores virais podem ser importantes, como sugerido pela observação de que a infecção pelo genótipo 4 tende a ser mais severa quando comparada com os demais genótipos. Entretanto, estudos recentes sugerem que fatores do hospedeiro são os principais responsáveis pelo curso fulminante da infecção (179). Em gestantes, a HF é acompanhada por coagulação intravascular disseminada (CID), que pode estar relacionada com alterações imunológicas e hormonais comuns da gestação, ou ainda com fatores genéticos do hospedeiro e ambientais (9).

### **1.6.5 Patogênese da infecção crônica em indivíduos imunocomprometidos**

A maioria dos estudos de patogênese da infecção crônica pelo HEV tem sido relatada em pacientes receptores de transplantes de órgãos sólidos que fazem uso de medicação imunossupressora. A incidência da infecção nesses pacientes varia de 0,9% a 3,5% baseando-se na detecção do genoma viral. Nestes casos, a infecção aguda pode se tornar crônica em aproximadamente 60% dos infectados (2). A doença clínica na infecção crônica geralmente não é grave, há viremia prolongada por mais de seis meses, associada à elevação moderada e persistente das transaminases, soroconversão que pode ser tardia e evidência histológica de inflamação hepática com fibrose que pode evoluir para cirrose em 10 % dos pacientes dentro de 2 a 3 anos (2, 94, 180).

A infecção crônica pelo HEV é definida atualmente como persistência da replicação do vírus por mais de três meses nos hepatócitos (181). Esses casos crônicos têm sido observados quase que exclusivamente em indivíduos infectados com o genótipo 3 do vírus e são acompanhados ou não de discreta elevação de transaminases (2). Recentemente, relatos de infecção crônica pelo genótipo 4 também têm sido descritos, em menor escala (182). A figura 1.9 ilustra resumidamente o curso da infecção crônica pelo HEV em indivíduos imunossuprimidos.



**Figura 1.9 - Curso da infecção crônica pelo HEV.**

O curso crônico é caracterizado por moderada elevação de enzimas hepáticas ao longo da infecção, acompanhada por viremia, excreção viral pelas fezes e soroconversão tardia. Adaptado (183).

O uso do imunossupressor tacrolimo em pacientes transplantados é o principal fator de risco independente associado à persistência do HEV nestes pacientes (2). O tacrolimo é utilizado na maioria das unidades de transplantes renais e hepáticos, pois resulta em menor rejeição celular aguda e melhor sobrevida quando comparado a ciclosporina por exemplo (184). Tanto o tacrolimo quanto a ciclosporina são inibidores da calcineurina e bloqueiam a translocação do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) para o núcleo da célula, que por sua vez, impede a transcrição de IL-2 e outras citocinas. Como resultado da inibição da produção de IL-2, a proliferação de células T citotóxicas (como TCD4<sup>+</sup> e NK) que contribuem para a destruição do tecido alvo, como enxertos, é suprimida (185, 186).

Sabe-se, no entanto, que o tacrolimo é mais potente que a ciclosporina, além de atuar reduzindo a resposta específica das células T à infecção pelo HEV de modo mais eficiente (187). Estudos *in vitro* demonstraram que os dois inibidores de calcineurina promovem a replicação do HEV à medida que inibem as ciclofilinas A e B. Por outro lado, o ácido micofenólico, outro imunossupressor que atua inibindo a inosina 5' monofostato desidrogenase, parece inibir a replicação do HEV (188).

A resposta imune do hospedeiro conseqüentemente também contribui para o desenvolvimento da infecção persistente. A infecção tende a se tornar crônica em pacientes profundamente imunossuprimidos, como observado naqueles com baixa contagem de células

T CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, e CD4<sup>+</sup> (94). Infecção crônica pelo HEV também vem sendo descrita em pacientes coinfetados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e que apresentam baixa contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>) (189).

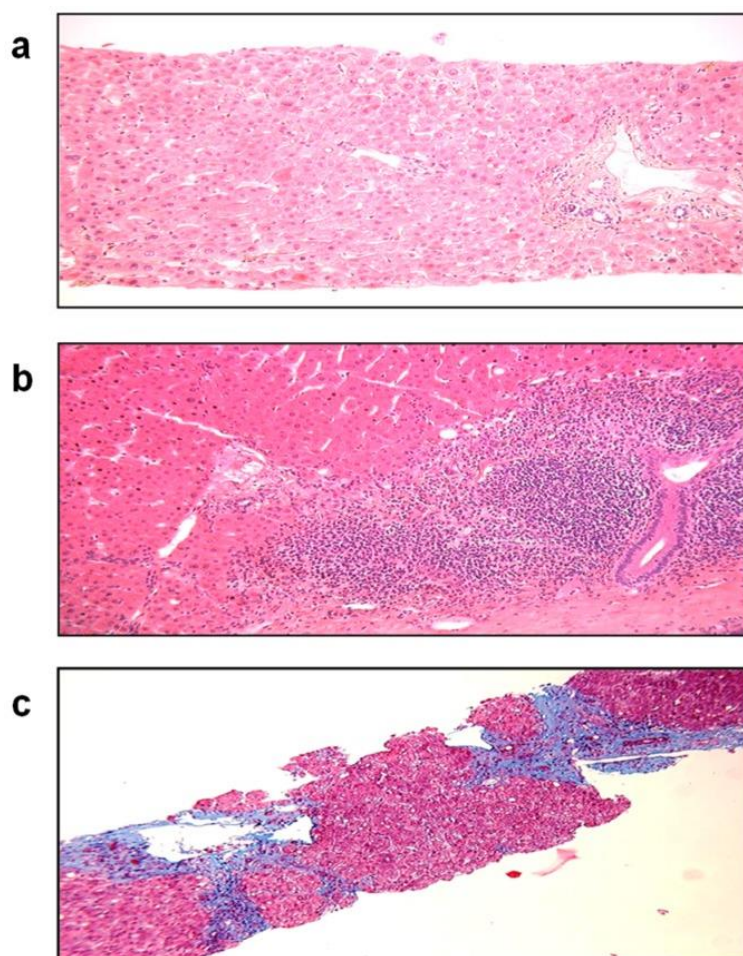
Outro fator de risco associado à infecção crônica pelo HEV é a baixa contagens de plaquetas, porém tal fator de risco foi descrito em um único estudo e precisa de mais estudos para maiores conclusões (2). Fatores virais também podem estar associados à infecção crônica pelo HEV. Nenhuma correlação entre carga viral do HEV e progressão da fibrose hepática tem sido descrita (190). *Quasispécies* de HEV que apresentam grande heterogeneidade nas regiões das ORF1e ORF2 durante a fase aguda da infecção têm sido associadas à persistência viral (54).

Apenas 32% dos pacientes transplantados que se infectam com o HEV são sintomáticos (2). Nestes pacientes, a fadiga é o principal sintoma, e icterícia clinicamente aparente é incomum (191). O quadro de HE crônica é frequentemente associado com moderada elevação das enzimas hepáticas, não excedendo de 100 a 300 UI/L (unidades internacionais/litro), níveis muito menores do que os comumente observados em pacientes imunocompetentes, que variam de 1000 a 3000 UI/L. Soroconversão tardia ou ausente tem sido relatada, porém como não há um teste sorológico padrão para o diagnóstico do HEV, tais relatos precisam ser melhor investigados.

A fibrose hepática progride rapidamente nos pacientes transplantados, com casos descritos de doença hepática em estágio final, possivelmente resultante da infecção crônica pelo HEV (192). A fibrose hepática parece evoluir mais rapidamente nesses pacientes do que em transplantados infectados com o vírus da hepatite C (HCV), pode levar à cirrose apenas 2 ou 3 anos após a infecção (180).

As lesões histológicas dominantes em pacientes com hepatite aguda resultante da infecção pelo HEV-3 consistem de: inflamação lobular, expansão do trato portal por infiltrados inflamatórios compostos principalmente por linfócitos, poucas áreas de balonização, necrose focal com corpos acidófilos associados, hepatite de interface moderada a grave e colangiólite (94, 163, 193). Na infecção crônica estabelecida, espécimes de biópsia hepática evidenciam características de hepatite viral crônica. As características típicas incluem fibrose, hepatite lobular leve a moderada, e hepatite de interface (com infiltrado linfocítico portal que passa a atingir os hepatócitos do lóbulo hepático e necrose em sacabocado) (94, 192, 194). No entanto, os padrões histológicos decorrentes da infecção crônica pelo HEV variam entre diferentes pacientes e entre biopsias obtidas do mesmo

paciente durante o curso da infecção (193). A figura 1.10 ilustra a evolução histológica decorrente da infecção crônica pelo HEV em pacientes pós-transplantados imunossuprimidos.



**Figura 1.10 - Padrões histológicos de biópsias hepáticas realizadas em pacientes com infecção crônica pelo HEV**

Em (a) biópsia hepática inicial de um fígado saudável; em (b) hepatite de interface após 15 meses de infecção pelo HEV; em (c) cirrose hepática após 38 meses de infecção pelo HEV. Adaptado (178).

A infecção crônica pelo HEV em transplantados hepáticos pode levar a necessidade de um novo transplante. Caso o paciente não atinja o *clearance* viral antes do novo transplante, um novo quadro de infecção persistente com hepatite crônica e fibrose pode se estabelecer (191).

### 1.6.6 Manifestações extra-hepáticas da infecção pelo HEV

Relatos de infecção em outros órgãos além do fígado quase sempre estão associados ao sistema nervoso, pâncreas, rins e manifestações hematológicas e autoimunes (3). Em muitos casos, as manifestações extra-hepáticas acompanham uma doença hepática primária e predominante. Permanece incerto se sintomatologia extra-hepática é devido a replicação do



HEV nestes tecidos, ou se as lesões são mediadas pela formação de imunocomplexos secundários ao envolvimento hepático.

Uma variedade de alterações no sistema nervoso central (SNC) ou periférico têm sido relatadas em pessoas infectadas pelo HEV e associadas com infecções agudas e crônicas, acometendo imunocompetentes e imunocomprometidos. A maioria dos casos relatos é relacionada à infecção pelo HEV-3. Em alguns casos, o RNA viral foi detectado no líquido cefalorraquidiano (LCR) das pessoas afetadas reforçando o papel do HEV nas manifestações neurológicas (195). Também foi demonstrado que amostras de soro e LCR de um mesmo paciente apresentava diferenças com relação às suas sequências genômicas, indicando a compartimentalização de *quasispécies* entre esses fluidos corpóreos, e sugerindo o neurotropismo do vírus (3).

Há relatos de uma série de casos de pancreatite em pacientes com infecção pelo HEV. A maioria dos casos tem sido descritos onde o genótipo 1 é prevalente. Tal manifestação parece ser mais comum entre homens, e ocorre na segunda ou terceira semana da doença hepática. A patogenia exata permanece incerta (75).

Os rins também podem ser afetados na infecção pelo HEV. O desenvolvimento de glomerulonefrite membranosa tem sido descrito (196). A maioria dos relatos de infecção por HEV acompanhada de envolvimento renal são associados ao genótipo 3.

Poucos relatos de caso têm associado a infecção pelo HEV à trombocitopenia. A maioria dos pacientes mostrou recuperação espontânea. Essa condição está relacionada provavelmente à destruição imunomediada das plaquetas, um fato comum em infecções viriais. Ocasionalmente hemólise severa pode vir a ocorrer, e casos de anemia aplástica também têm sido descritos (75).

## **1.7 Diagnóstico**

Atualmente, os principais testes indiretos disponíveis para o diagnóstico da infecção pelo HEV são baseados na detecção de anticorpos pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Esses testes têm como alvo a detecção de anticorpos contra a proteína do capsídeo (pORF2) e ocasionalmente a pORF3 (197). Assim como observado em outras infecções virais, a interpretação destes testes depende da classe de anticorpos detectados. Anticorpos IgM aparecem simultaneamente ou logo após o aparecimento da icterícia, e permanecem detectáveis por aproximadamente cinco meses, indicando, portanto, um quadro de infecção aguda. Os anticorpos da classe IgG aparecem aproximadamente junto a IgM, e permanecem

detectáveis por anos. Portanto, numa sorologia pareada a detecção apenas de anticorpos da classe IgG sugere infecção recente ou passada.

O grande problema dos testes sorológicos disponíveis atualmente para a detecção de anticorpos anti-HEV é que eles não apresentam uma boa concordância entre si. Isso dificulta a comparação entre diferentes estudos baseados nos resultados sorológicos. Além disso, o título de anticorpos IgG anti-HEV decai com o tempo podendo eventualmente desaparecer em um subconjunto de pessoas infectadas no passado. Isso pode levar a uma subestimação da prevalência da infecção pelo HEV em determinada população, interferindo assim na utilização desse tipo de teste como ferramenta epidemiológica (198).

Outro problema dos testes sorológicos são os frequentes resultados falso-positivos para os anticorpos anti-HEV IgM, sendo que o teste de IgM anti-HEV sozinho pode por vezes levar a erros de diagnóstico (199, 200). Quando um indivíduo possui anticorpos anti-HEV IgM mas é anti-HEV IgG negativo, a positividade de IgM pode ser verdadeira ou falsa, portanto um novo teste após 1-2 semanas deve ser realizado. Se anticorpos IgG aparecerem positiva, a positividade de IgM no primeiro teste é verdadeira. No entanto, se a detecção de IgG anti-HEV permanecer negativa, a positividade de IgM é provavelmente falsa. Portanto, a detecção simultânea de IgM e IgG anti-HEV e o reteste após 1-2 semanas, se necessário, permitirá o diagnóstico mais preciso e confiável de infecção aguda.

Os testes diretos disponíveis podem detectar vírions intactos ou componentes específicos do HEV. Partículas virais podem ser detectadas por eletro imunomicroscopia. No entanto, essa técnica apresenta limitada aplicação clínica pois a excreção viral nas fezes dura poucos dias após o aparecimento da icterícia, o que determina baixa sensibilidade além da necessidade de equipamentos específicos (85). A eletro imunomicroscopia foi extensivamente utilizada nos primeiros anos pós-identificação do HEV, mas atualmente foi substituída pela detecção do HEV RNA.

A detecção do HEV RNA no soro ou fezes é atualmente o método mais específico para determinar a presença do HEV na infecção. A detecção do genoma viral é feita frequentemente através da amplificação de sequências genômicas virais específicas, seguida de confirmação por uma sonda pangênômica ou genótipo específica. As técnicas mais utilizadas são: a técnica qualitativa da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) e a técnica quantitativa de PCR em tempo real (qPCR) (146). O RNA viral pode ser detectado nos espécimes clínicos durante a fase inicial da HE. O genoma viral frequentemente se torna indetectável em 2 a 3 semanas após o aparecimento da icterícia. Como esses testes são laboriosos, de custo elevado e exigem equipamento especializado e

técnicos treinados, o uso das técnicas de RT-PCR e qRT-PCR tem utilidade limitada no diagnóstico da HE aguda, principalmente nos países com piores condições sócio econômicas.

Nos países desenvolvidos as técnicas de detecção do genoma viral citadas anteriormente têm sido amplamente utilizadas em estudos científicos e também nas seguintes situações clínicas: pessoas com suspeita de infecção crônica pelo HEV com resultados sorológicos negativos; diagnóstico de infecção aguda ou crônica pelo HEV em pacientes imunocomprometidos que podem não desenvolver anticorpos específicos; como uma ferramenta para a definição do genótipo; para monitorar a resposta do indivíduo ao tratamento antiviral; em pessoas com apresentação extra-hepática nas quais a sorologia positiva para o vírus não é confiável suficiente como evidência da infecção pelo HEV. Nos casos de suspeita clínica de infecção crônica pelo HEV, a detecção do genoma viral por três meses consecutivos ou mais em amostras de soro, fezes ou biópsia hepática, acompanhada de discreta elevação das transaminases hepáticas, deve ser considerada.

Testes rápidos baseados na detecção de IgM por imunocromatografia foram desenvolvidos para facilitar e agilizar o diagnóstico clínico da HE (201). Esses testes utilizam um formato de captura de IgM e permitem uma leitura visual rápida. O teste comercial (ASSURE® HEV IgM Rapid Test; MP Biomedical, Singapore) tem apresentado sensibilidade e especificidade de 93% e 99,7%, respectivamente em soros de pacientes com hepatite aguda na Indonésia, onde o genótipo 1 é predominante. O mesmo teste apresentou sensibilidade e especificidade de 82% e 100%, respectivamente em pacientes com hepatite aguda na França, onde o genótipo 3 é predominante (199).

## **1.8 Tratamento**

A maioria dos pacientes com HE aguda se recuperam espontaneamente sem a necessidade de tratamento específico. Nesses casos apenas um tratamento suporte com o propósito de evitar complicações é aplicado. Alguns casos relatados mostraram que a ribavirina tem sido utilizada no tratamento de pacientes com HE severa, resultando numa melhora dos parâmetros laboratoriais acompanhados pela queda da carga viral (202). Nos pacientes com HE crônica duas abordagens terapêuticas podem ser utilizadas: o restabelecimento do estado imunológico do paciente pela redução ou remoção do tratamento imunossupressor se possível, e a administração da ribavirina ou interferon  $\alpha$  peguilado. A ribavirina, terapia de escolha para tratar infecção pelo HEV, tem se mostrado altamente eficaz no tratamento da infecção crônica pelo vírus na dose de 8,1 miligramas/quilo (mg/kg) por três

meses (203). Ambos os fármacos demonstraram inibir a replicação de HEV *in vitro*. Curiosamente, foi observado um efeito sinérgico moderado mas significativo decorrente da combinação de ribavirina e IFN- $\alpha$  *in vitro* (204).

Um estudo *in vitro* demonstrou que o sofosbuvir pode inibir a replicação do HEV além de aumentar o efeito antiviral quando combinado com ribavirina (205). No entanto, o seu efeito na replicação HEV *in vivo* não foi estabelecido.

## **1.9 Prevenção**

A presença do HEV em produtos alimentares derivados dos reservatórios naturais animais, no caso dos genótipos zoonóticos, ou de alimentos contaminados pela irrigação com águas contaminadas implicam em preocupações com a saúde pública e a segurança alimentar em todo o mundo. A prevenção dos genótipos zoonóticos do HEV baseia-se principalmente em evitar o consumo de carne crua ou malcozida, mariscos e cozer adequadamente os produtos à base de carne. A partícula do HEV é relativamente resistente ao calor, sendo que temperaturas de cozimento de 71°C por 20 minutos são requeridas para inativação da mesma (206). Entretanto, quando amostras de fígado são incubadas por 30 minutos a 56°C, temperatura equivalente às condições de um restaurante, as partículas virais permanecem infecciosas, representando um risco para os consumidores (207).

Medidas de higiene adequadas, como a limpeza frequente das mãos e superfície, também devem ser seguidas quando se manipula carne não cozida. Além disso, os resíduos de suínos devem ser devidamente eliminados e o uso de estrume de suínos como fertilizante para o solo deve ser regulado para reduzir o risco de contaminação pelo HEV de frutas, verduras e vegetais e de águas superficiais.

### **1.9.1 Vacina**

Uma vez que os epítomos de neutralização da pORF2 do HEV são também os determinantes antigênicos imunodominantes (208) e a IgG anti-HEV persiste durante um longo período de tempo, a resposta IgG, induzida por infecção natural ou vacinação, pode proteger contra a subsequente exposição ao HEV. A vacina recombinante Hecolin demonstrou uma eficácia de 95,5% contra a HE por até 4 anos após esquema de vacinação completo. Essa vacina foi regulamentemente aprovada e se encontra comercialmente disponível na China (209). A vacinação deve ser de ampla utilidade em inúmeras situações, incluindo: grupos com maior risco de desenvolver doença severa e/ou mortalidade diante de uma

infecção pelo HEV, como pessoas com doença hepática crônica e mulheres grávidas em áreas endêmicas para a doença; pessoas imunossuprimidas, incluindo pós-transplantados em regiões de baixa endemicidade que possuem o risco de desenvolver HE crônica; viajantes provenientes de áreas de baixa endemicidade para áreas altamente endêmicas; para o controle de surtos em áreas endêmicas; e residentes de áreas onde o HEV é altamente endêmico. No entanto, a vacina precisa ser licenciada em outras regiões do mundo.

### **1.10 HEV no Brasil**

Atualmente no Brasil, as hepatites virais de A-E são doenças de notificação compulsória e, portanto, todos os casos suspeitos devem ser comunicados ao Sistema Nacional de Notificação de Agravos (SINAN) e encaminhados ao órgão responsável pela vigilância epidemiológica (Brasília, 2016). De acordo com o Ministério da Saúde (MS), a maioria dos casos de hepatite aguda sintomática se deve a infecção pelos vírus da hepatite A, B e C (Brasília, 2016). Por outro lado, a hepatite E é a menos notificada na população brasileira, sendo que 967 casos acumulados foram notificados até o ano 2012 (ano do último boletim epidemiológico que incluiu a notificação de infecção pelo HEV) (Brasil, 2010). Devido ao uso de diferentes técnicas diagnósticas com diferente sensibilidade para detecção do vírus e à diferentes características das populações avaliadas, a real prevalência da infecção em diversos países não é precisa, e no Brasil a situação não é diferente.

O genótipo 3b do HEV se encontra circulante tanto em populações de suínos quanto de seres humanos no Brasil (210, 211). Além disso, os genótipos 3c e 3f também foram identificados em amostras provenientes de suínos abatidos na região leste da Amazônia (212). Levantamentos sorológicos realizados para a detecção de IgG anti-HEV indicam que o vírus circula entre a população brasileira, com taxas variando de 1 a 17,7% (213, 214). Além disso, evidências sorológicas demonstrando a circulação do HEV em diferentes espécies animais também foram relatadas no país (215). Portanto, a epidemiologia da HE no Brasil é semelhante à dos países não endêmicos para o HEV sendo que, a transmissão zoonótica do vírus é provavelmente a responsável pela prevalência de anticorpos anti-HEV em humanos no nosso país.

Um estudo retrospectivo foi realizado em 96 amostras de soro relativas aos anos de 1998 a 2007 e provenientes de pacientes receptores de transplante renal com inexplicável elevação das enzimas hepáticas. O HEV RNA foi encontrado em 3,1% desses pacientes, e foi caracterizado filogeneticamente como HEV-3. Porém, nenhum paciente apresentou anticorpos

anti-HEV IgG, e não foi possível acompanhar os pacientes para saber se os mesmos apresentaram infecção crônica pelo HEV. O que se sabe, é que dois desses pacientes apresentaram elevação das enzimas hepáticas por mais de seis meses (216). Uma outra pesquisa, realizada em 192 pacientes pós-transplantados renais, e o HEV RNA foi detectado em 20 pacientes (10%) (217). Entretanto, nenhuma evidência de hepatite crônica induzida pela infecção pelo HEV foi relatada nesse estudo. O primeiro caso de hepatite crônica pela infecção pelo HEV-3 no Brasil e América Latina foi relatado em 2014 (218). O caso foi relatado em uma paciente pediátrica, receptora de transplante hepático. O vírus identificado como HEV-3 apresentou maior homologia (95% a 97% de identidade) com uma cepa identificada recentemente no sul do Brasil (211). Tal relato demonstrou que infecção crônica pelo HEV também pode ocorrer em pacientes imunocomprometidos no Brasil.

### **1.11 Justificativa**

A hepatite E, infecção causada pelo HEV, é um problema de saúde pública em países industrializados e em desenvolvimento. Suínos domésticos são reservatórios assintomáticos dos genótipos 3 e 4 do vírus em regiões não endêmicas propiciando casos de HE por transmissão zoonótica. No Brasil, o genótipo 3 do HEV encontra-se circulante tanto na população de suínos quanto de seres humanos, com destaque para os recém-transplantados (211, 216, 218, 219).

Convencionalmente, a infecção pelo HEV determina quadros de hepatite aguda e autolimitada em humanos. Porém, nos últimos anos tem sido relatado a ocorrência de hepatite crônica pela infecção com o genótipo 3 do HEV em pacientes imunossuprimidos, especialmente em recém-transplantados (94, 220). A infecção crônica pelo HEV é definida como a persistência da replicação viral por mais de três meses (181). Aproximadamente 60% dos receptores de órgãos, em especial transplantados renais e hepáticos que desenvolvem hepatite E aguda evoluem para a forma crônica da doença (2, 4, 94). A baixa contagem de linfócitos T CD4+, uma baixa resposta de células T HEV-específica e uma potente terapia imunossupressora têm sido, de fato, associadas a infecção crônica pelo HEV (181). O uso do tacrolimo no lugar da ciclosporina A foi identificado como um fator preditivo independente para infecção crônica pelo HEV (2).

O tacrolimo é utilizado na maioria das unidades de transplantes renais e hepáticos, pois resulta em menor rejeição celular aguda e melhor sobrevida quando comparado à ciclosporonina (184). O tacrolimo é um potente imunossupressor derivado macrolídeo, que

atua inibindo a atividade enzimática da calcineurina. A inibição da calcineurina bloqueia a translocação do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) para o núcleo da célula que por sua vez impede a transcrição de IL-2 e outras citocinas. Como resultado da inibição da produção de IL-2, a proliferação de células T citotóxicas que contribuem para a destruição do tecido alvo, como enxertos, é suprimida (186).

Com base nos estudos de transmissão, primatas não humanos como macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) são os mais suscetíveis à infecção pelo HEV e, considerados, portanto, um dos mais adequados modelos para estudos de patogênese e resposta imune (7, 121). Um modelo animal que possa mimetizar a infecção crônica pelo HEV é criticamente necessário para estudar o mecanismo que conduz a cronicidade em indivíduos imunossuprimidos.

O presente trabalho busca investigar os aspectos clínicos e imunológicos de macacos cinomolgos induzidos à imunossupressão com tacrolimo e posteriormente infectados com o genótipo 3 do HEV. Os resultados obtidos neste modelo animal ajudaram a elucidar os mecanismos de injúria hepática, resposta imune humoral, persistência viral e repercussões clínicas da infecção pelo HEV em macacos tratados com o imunossupressor tacrolimo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar através de dados clínicos, virológicos, imunológicos e patológicos a cronicidade da infecção pelo vírus da hepatite E em macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) submetidos à imunossupressão com o medicamento tacrolimo e inoculados com amostras do genótipo 3 do HEV circulantes no Brasil.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a possibilidade de infecção crônica pelo HEV-3 de origem suína em cinomolgos imunossuprimidos com o medicamento tacrolimo;

Avaliar a possibilidade de reativação da infecção pelo HEV após *clearance* viral espontâneo em animais imunocompetentes que foram posteriormente imunossuprimidos;

Comparar a resposta imune humoral (imunoglobulinas de classe IgA, IgM e IgG anti-HEV) nos grupos de animais infectados;

Avaliar o risco potencial de evolução para cronicidade em situações de imunossupressão em macacos cinomolgos;

Avaliar comparativamente a função hepática nos três grupos: imunocompetentes inoculados, imunossuprimidos inoculados e no grupo controle (imunossuprimidos não inoculados).



### **3 METODOLOGIA**

O presente estudo foi realizado em duas etapas: uma pré-experimental e uma experimental. Na etapa pré-experimental foram realizadas a triagem dos animais da colônia de cinomolgos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz), a obtenção do inóculo HEV-3 e a divisão dos grupos de animais com base no desenho experimental. Durante a etapa experimental foram executadas a adaptação dos animais nos contêineres, a imunossupressão, a infecção e o monitoramento dos macacos cinomolgos, além das coletas de espécimes biológicos e testes laboratoriais.

#### **3.1 Etapa pré-experimental**

##### **3.1.1 Triagem da colônia de cinomolgos e obtenção do inóculo**

A triagem dos macacos cinomolgos foi realizada em amostras de soro de 72 animais provenientes do Serviço de Primatologia (SCPrim) do ICTB/Fiocruz. As amostras foram submetidas a testes sorológicos e molecular para a detecção do HEV (descrição metodológica nos itens 3.3.3 e 3.3.4). Com base na triagem sanitária, biométrica e clínica, foram selecionados para o presente estudo 12 animais clinicamente saudáveis, jovens, de ambos os sexos, prezando um padrão homogêneo entre eles. Apenas animais negativos para os marcadores sorológicos e molecular do HEV foram selecionados.

Para a obtenção do inóculo, foram coletadas amostras de fezes de suínos provenientes de duas suinoculturas comerciais, Santarém e Peru, localizadas no município de Arapongas no estado do Paraná. Foram coletadas 15 amostras provenientes da suinocultura Santarém, uma granja pequena de pequeno porte e com manejo sanitário precário, não atendendo aos padrões sanitários preconizados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Dezesesseis amostras foram coletadas na suinocultura Peru, uma granja de grande porte e com manejo sanitário adequado. Nosso colaborador, o Dr. Amauri Alcindo Alfieri, cedeu gentilmente às instalações do laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, para a realização dos testes de detecção e identificação do HEV. A detecção e quantificação do RNA viral foram realizadas pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) descrita no item 3.3.4. As amostras positivas foram submetidas à técnica de nested RT-PCR para as ORFs 1 e 2 (item 3.3.5) e então sequenciadas para genotipagem do vírus obtido (item 3.3.6).

### 3.1.2 Desenho experimental

O experimento com os PNH teve início em 06 de maio de 2014 e foi encerrado em 10 de fevereiro de 2015. Foram incluídos no presente estudo 12 macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*), seis machos e seis fêmeas, com idade variando entre um e oito anos, e peso entre 1,300 kg e 3,600 kg (Tabela 3.1). Os animais foram alojados em dois contêineres com nível de biossegurança 2 (NB2) no Centro de Experimentação de Primatas não Humanos do ICTB/Fiocruz nas condições ideais preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC, licença LW-17/13, Anexo 1). O experimento foi conduzido em estrita conformidade com as recomendações do Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

**Tabela 3.1** Descrição dos macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*)

Identificação do macaco	Gênero*	Idade (anos)	Peso (kg)
AB17	M	4,8	3,66
AD7	M	2,4	2,24
Z2	F	6,8	2,75
AE2	F	1,11	1,62
AD4	F	2,4	1,85
AE3	M	1,5	1,55
V12	F	8,4	3,1
AC11	M	3,4	3,07
AE6	F	1,2	1,3
AB19	M	4,11	3,5
AD8	F	2,3	1,83
AC7	M	3,6	2,94

\*M= macho; F= fêmea.

Nos contêineres, os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável com parede interna corrediça (*squeeze-back* - sistema para facilitar a contenção do animal), com temperatura ambiente de 25°C e período de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, alimentados diariamente com ração comercial para PNH, frutas, vegetais e água fornecida *ad libitum*. Durante todo o experimento houve acompanhamento clínico dos animais por nossa equipe composta por médicos veterinários. Um programa de enriquecimento ambiental foi realizado ao longo do estudo sob a forma de enriquecimento alimentar, audiovisual e tátil.

Os animais foram divididos em três grupos contendo quatro macacos cada, agrupados com base na idade, gênero e peso. O grupo 1 (G1) foi composto por quatro macacos (dois machos e duas fêmeas), clinicamente saudáveis e imunocompetentes que foram inoculados com o HEV-3. Após o *clearance* viral, observado aos 91 dpi (dias após a infecção), os animais foram submetidos ao tratamento com o medicamento imunossupressor tacrolimo até os 149 dpi para avaliar a hipótese de reativação da infecção. O grupo 2 (G2), foi composto por 4 macacos (dois machos e duas fêmeas), tratados com o imunossupressor tacrolimo e posteriormente inoculados com o mesmo inóculo do grupo 1. O grupo 3 (G3), também foi composto por 4 animais (dois machos e duas fêmeas) tratados com tacrolimo ao longo do experimento, porém não foram inoculados (controle negativo).

### **3.2 Etapa experimental**

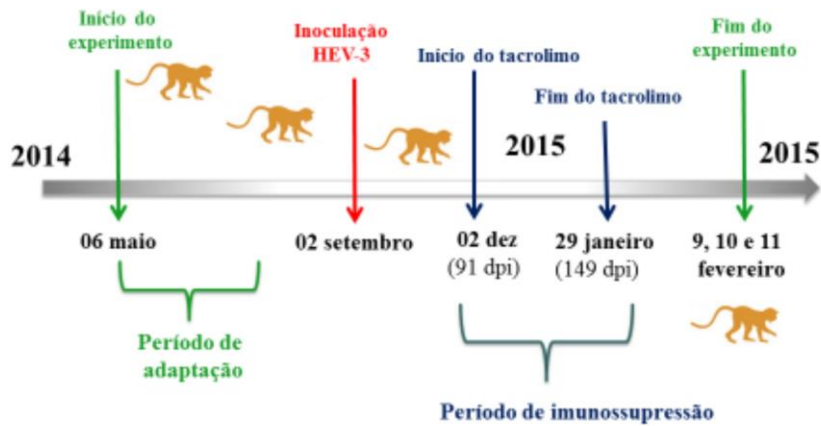
A etapa experimental com os macacos cinomolgos foi composta por três períodos: o período inicial de adaptação, o período de imunossupressão e o período de infecção e monitoramento dos animais.

O período de adaptação, de 06 de maio a 21 de julho de 2014, foi essencial para a aclimatação dos animais e realização dos seguintes procedimentos: exames coproparasitológicos e vermifugações; coletas de sangue para obtenção dos valores basais sorológicos, bioquímicos e hematológicos (três coletas seriadas); uma biópsia hepática para avaliação histopatológica inicial; e o condicionamento dos animais para que se alimentassem diariamente com frutas utilizadas para a veiculação do medicamento tacrolimo.

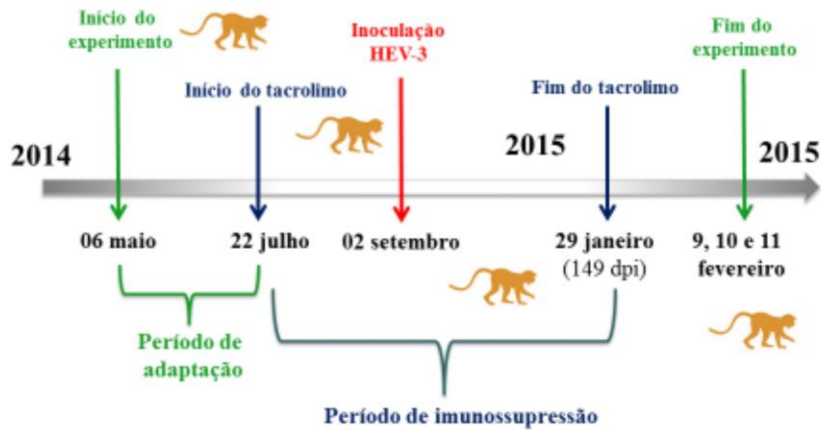
Após a adaptação, deu-se início ao período de imunossupressão dos animais dos grupos 2 e 3 em 22 de julho de 2014 (42 dias antes da infecção). Os animais desses grupos foram mantidos em regime imunossupressor até 29 de janeiro de 2015 (149 dpi) totalizando em 191 dias de imunossupressão. Os animais do grupo 1 foram imunossuprimidos durante 59 dias, tendo início aos 91 dpi (após o *clearance* viral em 02 de dezembro) e fim aos 149 dpi (junto aos grupos 2 e 3).

No dia 02 de setembro de 2014 foi realizada a inoculação dos cinomolgos dos grupos 1 e 2 pela via endovenosa com o inóculo de HEV-3. Os animais de todos os grupos foram monitorados diariamente por 160 dpi. Ao final dos 160 dpi, os animais foram submetidos a eutanásia. A figura 3.1 ilustra esquematicamente o desenho experimental.

A) Grupo 1: animais imunocompetentes, inoculados com HEV-3



B) Grupo 2: animais imunossuprimidos, inoculado com HEV-3



C) Grupo 3: animais imunossuprimidos, não inoculados

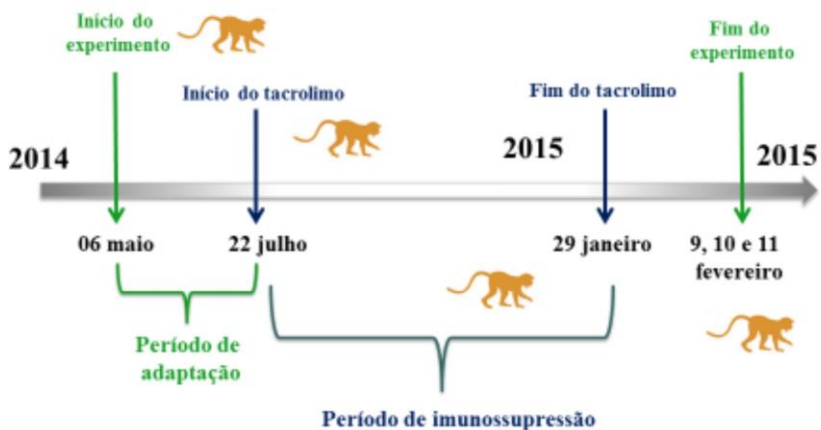


Figura 3.1– Representação esquemática do desenho experimental e seus respectivos períodos para os grupos 1 (A), 2 (B) e 3 (C).

Ao longo do período de adaptação e após a infecção, os macacos foram inspecionados diariamente através das gaiolas (sem efeitos de anestésico) a procura de alterações clínicas. O exame físico (para obtenção de peso e temperatura retal; palpação e inspeção corporal) foram realizados nos dias de coleta de sangue sob anestesia, uma vez que os animais não foram treinados para tais procedimentos. Foram estabelecidos parâmetros basais hematológicos, bioquímicos e sorológicos para cada animal utilizando três amostras individuais coletadas em série durante o período de adaptação. Foram coletadas amostras de sangue total e de fezes nos dias 0, 7, 14, 28, 42, 57, 69, 99, 141 e 160 após infecção para determinação virológica, sorológica, bioquímica e hematológica e para a concentração plasmática de tacrolimo. As biópsias hepáticas para análises virológicas e histopatológicas foram obtidas nos dias 0, 14, 42, 69, 99, 141 e 160 após a infecção. A tabela 3.2 ilustra os espécimes biológicos coletados e os respectivos testes laboratoriais que foram realizados.

Todas as coletas de sangue e biópsias hepáticas foram realizadas sob anestesia, visando minimizar procedimentos dolorosos. O seguinte protocolo anestésico foi adotado: associação do cloridrato de ketamina a 20 mg/kg (Vetanarcol, König, Argentina) com cloridrato de xilazina a 0,1 mg/kg (Syntec Brasil, São Paulo, Brasil). Como analgesia local, 0,1-0,2 ml de lidocaína a 2% foi injetado no tecido subcutâneo no local da biópsia para reduzir a dor pós-operatória na fase de recuperação da anestesia geral. A biópsia hepática guiada por ultrassom foi realizada com os animais na posição de decúbito dorsal após tricotomia e desinfecção da pele. Um ultrassom transabdominal foi conduzido para identificar o local adequado da biópsia do fígado, livre de grandes vasos, vesícula biliar e órgãos adjacentes. As amostras foram retiradas do lobo lateral direito ou mediano. Uma agulha de Menghine estéril (n.16) avançou lentamente sob a pele até ser visualizada no local apropriado para a biópsia. Ao final, fragmentos hepáticos de aproximadamente 4 a 8 mg foram obtidos.

Aos 160 dpi, os animais foram submetidos a eutanásia sob anestesia profunda com tiopental sódico 2,5% a 25 mg/kg (Thiopentax, Cristalia, São Paulo, Brasil), administrado por via intravenosa. Subsequentemente, os animais foram submetidos a punção cardíaca e depois eutanizados por exsanguinação. Fezes, soro, bile, LCR e diferentes tipos de tecidos, incluindo fígado, vesícula biliar, duodeno, jejuno, íleo, cólon, baço, gânglios linfáticos mesentéricos, pâncreas e cérebro foram coletados de todos os animais na necropsia.

**Tabela 3.2 Coletas de espécimes e testes laboratoriais realizados após a inoculação do HEV.**

<b>Data</b>	<b>Dpi*</b>	<b>Espécimes coletados</b>	<b>Testes laboratoriais realizados</b>
09/09/2014	<b>7</b>	Sangue total Soro Fezes	Hemograma, dosagem tacrolimo, extração de PBMC**; Bioquímicos, detecção do RNA viral; Detecção do RNA viral;
16/09/2014	<b>14</b>	Sangue total Soro Fezes Fígado	Hemograma, dosagem tacrolimo, extração de PBMC; Bioquímicos, detecção do RNA viral, anti-HEV IgM e IgG; Detecção do RNA viral; Detecção do RNA viral, histopatologia;
23/09/2014	<b>21</b>	Sangue total Soro Fezes	Hemograma, dosagem tacrolimo, extração de PBMC; Bioquímicos, detecção do RNA viral; Detecção do RNA viral;
30/09/2014	<b>28</b>	Sangue total Soro Fezes	Hemograma, dosagem tacrolimo, extração de PBMC; Bioquímicos, detecção do RNA viral, anti-HEV IgM e IgG; Detecção do RNA viral;
14/10/2014	<b>42</b>	Sangue total Soro Fezes Fígado	Hemograma, dosagem tacrolimo, extração de PBMC; Bioquímicos, detecção do RNA viral; anti-HEV IgM e IgG; Detecção do RNA viral; Detecção do RNA viral, histopatologia;
29/10/2014	<b>56</b>	Sangue total Soro Fezes	Hemograma, dosagem tacrolimo, extração de PBMC; Bioquímicos, detecção do RNA viral; Detecção do RNA viral;
10/11/2014	<b>69</b>	Sangue total Soro Fezes Fígado	Hemograma, dosagem tacrolimo, extração de PBMC; Bioquímicos, detecção do RNA viral; Detecção do RNA viral; Detecção do RNA viral e histopatologia;
10/12/2014	<b>99</b>	Sangue total Soro Fezes Fígado	Hemograma, dosagem tacrolimo, extração de PBMC; Bioquímicos, detecção do RNA viral, anti-HEV IgM e IgG; Detecção do RNA viral; Detecção do RNA viral, histopatologia;
21/01/2014	<b>141</b>	Sangue total Soro Fezes Fígado	Hemograma, dosagem tacrolimo, extração de PBMC; Bioquímicos, detecção do RNA viral, anti-HEV IgM e IgG; Detecção do RNA viral; Detecção do RNA viral, histopatologia;
10/02/2014	<b>160</b>	Sangue total Soro Fezes Fígado Demais tecidos	Hemograma, dosagem tacrolimo, extração de PBMC; Bioquímicos, detecção do RNA viral, anti-HEV IgM e IgG; Detecção do RNA viral; Detecção RNA viral, imunofluorescência e histopatologia; Detecção do RNA viral

\*dpi: dias após infecção

\*\*PBMC (do inglês “peripheral blood mononuclear cell”, células mononucleares do sangue periférico). As seguintes marcações foram realizadas na fenotipagem dos leucócitos do sangue periférico: CD3, CD4, CD8, CD29, CD44 e CD49d. Estes resultados ainda estão sob análise e não foram incluídos na tese.

### **3.3 Metodologia laboratorial**

#### **3.3.1 Tratamento com tacrolimo**

O tratamento com o imunossupressor tacrolimo foi realizado com base na dose terapêutica utilizada em modelos de macacos cinomolgos para transplante de órgãos humanos (221). Quarenta e dois dias antes da inoculação, os macacos dos G2 e G3 foram tratados com 3,5 mg/kg/dia de tacrolimo pela via oral até o 71º dpi, e com 2,0 mg/kg/dia até o 149º dpi. Os macacos do grupo 1, imunocompetentes infectados receberam o tratamento do 91º aos 149º dpi na dose de 2,0 mg/kg/dia. O medicamento tacrolimo utilizado no presente estudo foi gentilmente doado pela Libbs Farmacêutica Ltda/Farmanguinhos/Fiocruz.

#### **3.3.2 Preparo do inóculo**

O inóculo foi preparado a partir de uma amostra de fezes de suíno sequenciada e caracterizada como genótipo 3 do HEV (número de acesso do GenBank: ORF1 KX578263, ORF2 KX578267). A amostra fecal foi diluída em tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,4) para a obtenção de uma suspensão a 10% peso/volume (p/v). Após a diluição, as amostras foram centrifugadas a 4700 rotações por minuto (rpm) durante 30 minutos. A suspensão clarificada foi então filtrada em filtros de 0,45 µm e 0,22 µm, e tratada com gentamicina e penicilina. O inóculo continha uma carga de 6,4 log<sub>10</sub> cópias/mL, como determinado pelo qRT-PCR.

#### **3.3.3 Ensaio sorológicos**

A triagem sorológica dos animais provenientes da colônia do ICTB foi realizada com o kit de ELISA recomWell HEV IgG e IgM com conjugado anti-humano (Mickrogen, Alemanha). Na etapa experimental, amostras de soro pré e pós-inoculação (obtidas com 0, 14, 28, 56, 99, 141 e 160 dpi) foram submetidas à detecção de anticorpos IgA, IgM e IgG anti-HEV com o kit DiaCheck anti-HEV humano comercialmente disponível (Fitzgerald Industries International, Inc., Massachusetts, EUA). O protocolo modificado foi realizado pelo colaborador do projeto Dr. Julio Moran (Dr. Julio Moran Laboratories, Zurique, Suíça) e adaptado com um conjugado de imunoglobulina de cabra anti-macaca. O ponto de corte foi calculado para cada animal como a média de absorvâncias de amostras negativas mais três vezes o desvio padrão de amostras negativas.

### **3.3.4 Detecção e quantificação do RNA viral por qRT-PCR**

O RNA viral foi extraído a partir de 200 µl de amostras de soro, LCR e suspensões fecais e biliares a 10% p/v com o Kit de extração de RNA High Pure RNA Isolation (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Amostras de 30 mg de tecido foram extraídas com o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Cinco µl de RNA foram submetidos à reação de PCR em tempo real precedida pela transcrição reversa em um único passo (one-step qRT-PCR) utilizando o "AgPath-ID one-step RT-PCR kit" (Applied Biosystems, EUA). A reação foi realizada com oligonucleotídeos iniciadores e sonda descritos previamente (222). Todos os ensaios foram realizados em duplicata com uma curva padrão obtida por diluição seriada (variando de  $10^1$  a  $10^7$ ) de um clone de plasmídeo previamente caracterizado como genótipo 3 do HEV (210). As reações foram realizadas nas seguintes condições: transcrição reversa a 45°C por 30 minutos (min) e 95°C durante 15 min, seguida de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos (s) e 55°C por 1 min. A carga viral obtida em cópias do genoma/mL foi calculada com base nos valores obtidos de Ct (do inglês, "Cycle threshold") em relação à curva padrão.

### **3.3.5 Detecção das fitas positivas e negativas do vírus pela nested RT-PCR**

As amostras de soro, fezes e de tecido obtidas ao longo do experimento e no momento da necropsia também foram testadas pela técnica de nested RT-PCR com o propósito de detectar e caracterizar a cadeia positiva do genoma viral. Foram realizados dois ensaios de nested RT-PCR para amplificação de fragmentos parciais das ORF1 (metiltransferase) e ORF2 (proteína do capsídeo), contendo 287 pares de bases (pb) e 342 pb, respectivamente (223, 224).

A síntese do DNA complementar (cDNA) e amplificação do genoma foram realizadas pelo sistema de RT-PCR em um único passo com o kit "SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase" (Invitrogen Life Technology, CA, EUA) utilizando os oligonucleotídeos externos das ORF1 e 2. As condições de ciclagem foram as seguintes: transcrição reversa a 55°C por 30 min e 94°C por 2 min; seguida por 40 ciclos da etapa de PCR: 94°C por 15 s, 50°C (ORF1) /42°C (ORF2) por 30 s, 68°C por 1 min e um último passo a 68°C por 5 min. A nested foi realizada nas seguintes condições: um passo inicial de 2 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 42°C (ORF2)/50°C (ORF1), 1 min a 72°C e um passo final de 7 min a 72 ° C.



Amostras de tecido previamente positivas para a cadeia positiva de RNA foram submetidas à nested RT-PCR (ORF1 e ORF2) para detecção da cadeia negativa (intermediário replicativo) e identificação dos locais de replicação do vírus. A síntese do cDNA foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores externos de polaridade positiva de ambas as regiões do genoma. A transcrição reversa foi realizada com a enzima SuperScript III (Invitrogen Life Technology, CA, EUA) a 42°C por 60 min. Em seguida, PCR e nested foram realizadas para amplificar os fragmentos parciais de ORF1 e ORF2 como descrito acima. Os produtos amplificados com os tamanhos esperados de 287 pb (ORF1) e 342 pb (ORF2) foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

### **3.3.6 Reação de sequenciamento e análise filogenética**

Os produtos das ORF1 e ORF2, amplificados a partir do inóculo e amostras de fígado dos macacos AE6, AB19 e AC7 obtidos na necropsia, foram purificados utilizando reagentes e protocolos do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen®) e sequenciados utilizando reagentes e protocolos do Kit Big Dye® Terminator. Sequências genéticas de cepas do HEV de origem humana e demais mamíferos, correspondentes às mesmas regiões do genoma (Met e pORF2) foram obtidas em base pública de dados (GenBank). Posteriormente, uma árvore filogenética bayesiana foi reconstruída utilizando as sequências nucleotídicas parciais e concatenadas das ORF1 e ORF2 (546 nt) do HEV. O alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas foi analisado utilizando o método “Markov Chain Monte Carlo” implementado no programa MrBayes versão 3.1.2 sob o modelo de substituição de nucleotídeos GTR + G + I, selecionado anteriormente pelo programa jModeltest. As sequências genômicas parciais obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank sob os números de acesso: inóculo ORF1/ORF2-KX578263/KX578267; fígado AE6 ORF1/ORF2-KX57826/KX578268; fígado AB19 ORF1/ORF2-KX578265/KX578269; fígado AC7 ORF1/ORF2-KX578266/KX578270.

### **3.3.7 Análises bioquímicas e hematológicas**

Os testes hematológicos e bioquímicos foram realizados pela plataforma Análises Clínicas de Animais de Laboratório do ICTB. As análises hematológicas foram realizadas no analisador automático de hematologia Sysmex XT-2000iv (Sysmex Corporation, Kobe, Japão). As análises bioquímicas foram realizadas utilizando o sistema químico Vitros DT60 II (Johnson & Johnson's, Minnesota, EUA). Os seguintes parâmetros foram avaliados: contagem de glóbulos vermelhos e brancos (RBC e WBC), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total (TBIL), creatinina (CREA), nitrogênio ureico

sanguíneo (BUN), glicose (GLU), albumina (ALB) e colesterol (CHOL). Os níveis séricos de hemoglobina glicosilada foram determinados pelo sistema de química integrado da Dimension RxL Max (Siemens Healthineers, Muenchen Alemanha). Os níveis basais de cada um dos parâmetros foram determinados para cada animal a partir de amostras de sangue obtidas no período pré-inoculação. Evidência bioquímica de hepatite foi considerada quando os níveis séricos de ALT pi excederam em mais de 2 vezes os níveis basais de pré-inoculação.

### **3.3.8 Análise histopatológica**

Os fragmentos de fígado foram obtidos por punção hepática guiada por ultrassom no decorrer do experimento, como descrito anteriormente (Marcelo e Renato, 2001), e no momento da necropsia. Os fragmentos teciduais foram armazenados em formalina tamponada a 10% (pH 7,0), embebidos em parafina histológica, seccionados em cortes de 4 µm e corados com hematoxilina-eosina. As fotomicrografias foram realizadas no microscópio DMRXA (Leica®) acoplado a câmera DFC300FX Leica® utilizando o software Qwin Standard. Os fragmentos hepáticos foram analisados cegamente e as lesões foram classificadas com base na classificação de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) descrita anteriormente (Kleiner, 2005).

### **3.3.9 Reação de imunofluorescência direta**

Os fragmentos de fígado foram recobertos com resina Tissue-Tek® (Miles Inc. Diagnostic Division, Elkhart, Estados Unidos) e armazenados em nitrogênio líquido. Os blocos contendo os fragmentos foram seccionados em criostato de bancada modelo MTC (Slee Mainz, Alemanha) a -27 °C, para a obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura. As lâminas com fragmentos de fígado foram confeccionadas em duplicata para cada animal, fixadas com acetona gelada (-10°C) por 3 minutos e posteriormente lavadas com PBS (pH 7,2) para retirada da resina que recobre o tecido. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 100 µL de solução bloqueio (BSA 4%, Tween® 20 0,1% e 50 mL PBS pH 7,2 (*q.s.p*) em câmara úmida durante 3 horas em estufa à 37°C.

Após o término do bloqueio, as lâminas foram realizadas três lavagens sucessivas com PBS durante 5 minutos. Em seguida, foram aplicados 100 µL do anticorpo primário por corte e as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida vedada com parafilm e incubadas *overnight* à 4°C em geladeira. O anticorpo primário utilizado na diluição de 1:150 foi o anticorpo monoclonal de camundongo (clone 4B2) que reconhece a ORF2 do HEV. Após o

tempo de incubação, as lâminas foram novamente lavadas com PBS, com três lavagens sucessivas para a retirada do excesso de anticorpos que não se ligaram.

Após as lavagens, foram aplicados então 100 µL de anticorpo secundário por corte (burro anti-camundongo conjugado a Alexa Fluor® 488 – na diluição de 1:1.500), repetindo-se a incubação das lâminas, mas agora em câmara úmida por 3 horas à 37°C. Logo após o término da incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com imersão em PBS pH 7,2. Posteriormente, foram adicionados aos cortes cerca de 100 µL do reagente SlowFade Gold Antifade com DAPI (Life Technologies Corporation, USA) na diluição de 1:5.000 durante 5 minutos para marcação dos núcleos. Procedeu-se uma lavagem com PBS pH 7.2 para eliminar o excesso de DAPI. Por fim, aplicou-se 1 gota de glicerol sobre cada corte e, cuidadosamente, as lamínulas foram colocadas sobre as lâminas e seladas nas bordas com esmalte incolor. As lâminas prontas foram então armazenadas no freezer à -20 °C até a realização da leitura no microscópio de fluorescência AxioImager M1 (Carl Zeiss, Alemanha) no Laboratório de Ultraestrutura Celular do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. As imagens foram capturadas com o auxílio do software Zen 2012 (Carl Zeiss, Alemanha).

### **3.3.10 Bioequivalência do tacrolimo**

A concentração plasmática do tacrolimo foi determinada por cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas em série (MS/MS) - LC-MS/MS - a partir das amostras de sangue total dos macacos cinomolgos. O método foi validado de acordo com os critérios da RDC27, 17/05/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As análises foram realizadas pelo Serviço de Equivalência e Farmacocinética (SEFAR) da Fiocruz/RJ. O padrão de referência do tacrolimo foi fornecido pela United States Pharmacopeia (Rockville, MD, EUA) e o padrão interno (PI) diazepam, pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, RJ, BRA). O acetato de amônia a 98% foi adquirido pela J.T.Baker (Phillipsburg, MT, EUA) e o ácido fórmico 98% pela Scharlau (Sentmenat, BCN, ESP). O metanol foi adquirido pela Merck (KGoA, TUD, GER) e o Terc-butil-metil-éter (TBME) pela Tedia (Fairfield, OH, EUA). Todos os solventes utilizados foram graduados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O tacrolimo e o padrão interno diazepam foram extraídos do sangue de macaco por extração líquido-líquido (ELL) empregando TBME 100% como solvente de extração, onde os resíduos concentrados foram diluídos com 300 µL de solução de diluição (Fase móvel A (água tipo milli Q contendo ácido fórmico 0.1% (v/v) e 10 mM de acetato de amônio): Fase móvel B (metanol) – (5:95 % v/v). Uma alíquota foi analisada por cromatografia líquida

acoplada à espectrometria e massas em série com ionização por eletronebulização positiva (ESI+) usando modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). As análises foram realizadas como descrito: cromatografia líquida Prominence LC-20AB (Shimadzu, Kyoto, JP) acoplada a espectrometria de massa em tandem API 4000 (ABSCIEX, Foster City, CA, EUA). Os dados foram processados pelo software Analyst (versão 1.6.2).

A espectrometria de massa foi operada com ionização ESI+, e as transições foram de 822,69 > 769,59 m/z para o tacrolimo e 284,99 > 192,77 m/z para o PI. O nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador e auxiliar.

### **3.3.11 Análise estatística**

Foram aplicados dois modelos logísticos estatísticos com base na carga viral detectada nas fezes (modelo 1, Anexo 2) e no soro (modelo 2, Anexo 3). Para cada modelo, realizou-se uma regressão logística univariada prévia, a fim de selecionar as variáveis a serem incluídas na análise multivariada final. Foram incluídas as seguintes variáveis: níveis de enzimas hepáticas (AST, ALT e TBIL), CREA, BUN, GLU, ALB e CHOL, parâmetros hematológicos, regime imunossupressor (dose e concentração sanguínea do tacrolimo), idade, sexo, peso, temperatura, e níveis dos anticorpos anti-HEV (IgM, IgG e IgA). Apenas as variáveis com valor de  $P < 0,40$  foram incluídas na análise logística multivariada final, calculando-se então o valor de odds ratio para as variáveis finais. Todas as análises foram realizadas usando o programa estatístico R Project for Statistical Computing (<http://www.r-project.org/>). Para estas análises, descartamos o grupo de controle (G3), uma vez que o mesmo não foi exposto ao HEV.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Triagem da colônia de cinomolgos e obtenção do inóculo

Dos 72 animais testados, 1 macaco (1,4%) apresentou anticorpos anti-HEV IgM e 3 (4,17%) anticorpos anti-HEV IgG, sendo que nenhum deles apresentou os dois marcadores ao mesmo tempo. O genoma viral não foi detectado em nenhum animal da colônia.

Em 100% das amostras de fezes proveniente da granja Peru e 93,3% das amostras da granja Santarém foi possível detectar o RNA do HEV pela técnica de qPCR com cargas virais variando entre  $3,3 \times 10^1$  e  $7,6 \times 10^7$  cópias genômicas/mL. A análise do sequenciamento dos amplicons permitiu identificar o genótipo 3 do HEV em todas as amostras obtidas.

### 4.2 Monitoramento da concentração plasmática do tacrolimo

A concentração plasmática do tacrolimo foi determinada antes e após a infecção (Figura 4.1). Os animais de G1, que receberam o medicamento a partir de 91 dpi, obtiveram uma menor concentração plasmática do medicamento (entre 7 e 3,43 ng/mL) quando comparados aos animais de G2 (entre 4,78 e 18,83 ng/mL) e G3 (entre 10,13 e 29,89 ng/mL).

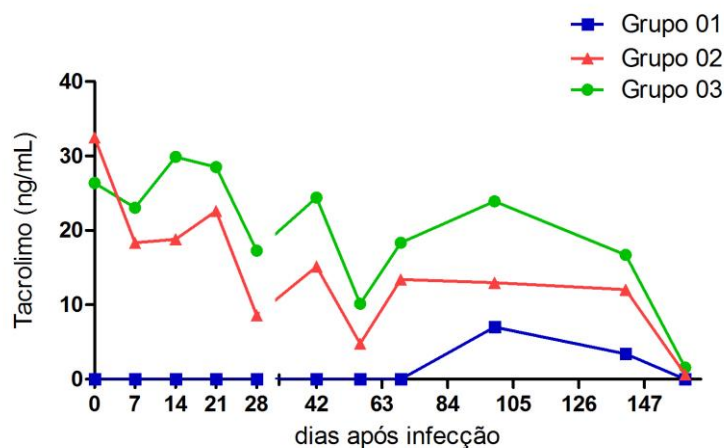


Figura 4.1 – Concentração plasmática determinada por LC-MS/MS nas amostras de sangue total dos macacos cinomolgos antes da infecção (dia zero) e após a infecção.

### **4.3 Perfil da infecção pelo HEV nos macacos imunocompetentes e imunossuprimidos**

Todos os macacos dos grupos 1 e 2 se infectaram com o inóculo do HEV de origem suína. A infecção pelo vírus foi evidenciada e monitorada pela detecção do RNA do HEV nas amostras de soro, fezes e fígado; detecção de anticorpos anti-HEV; flutuação das aminotransferases ALT e AST (Tabela 4.1); e pelas características histopatológicas (Anexo 4) descritas ao longo do experimento.

#### **4.3.1 Detecção, identificação e quantificação do RNA viral**

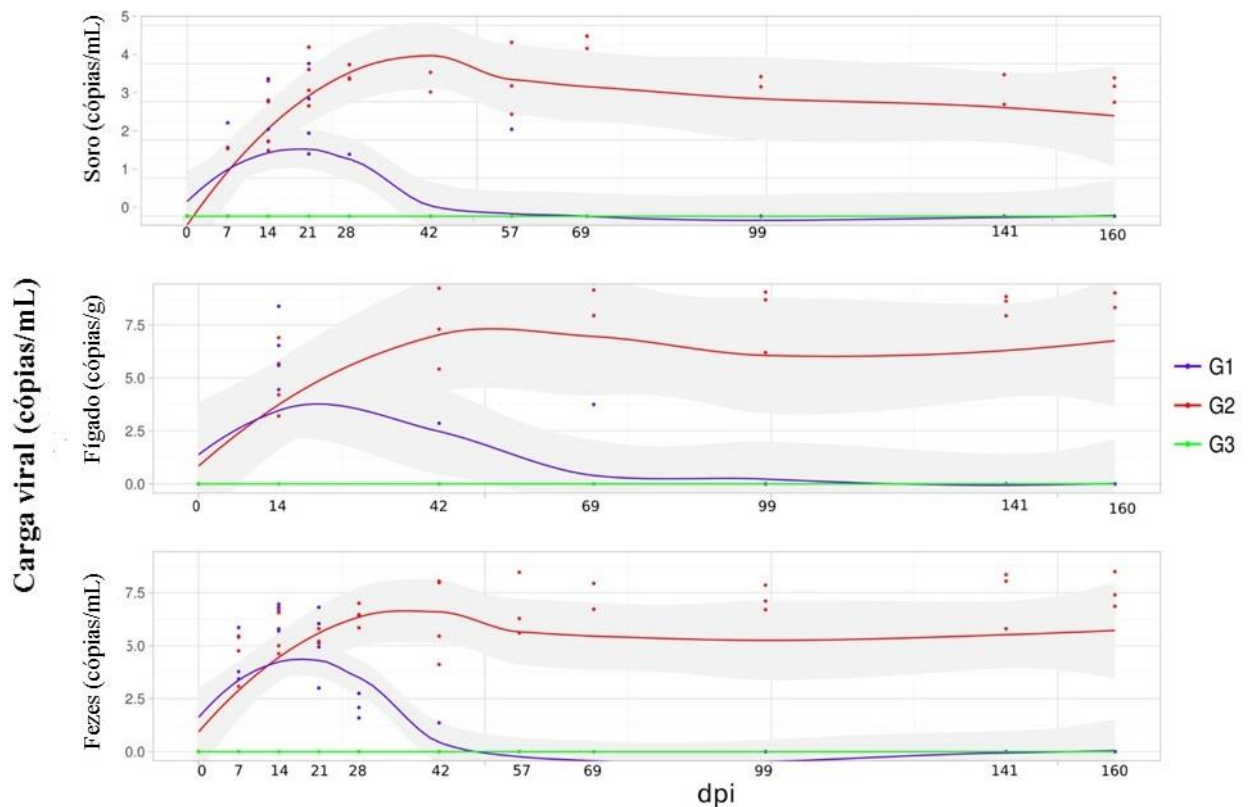
O RNA do HEV foi detectado por qRT-PCR no soro, fezes e fígado dos macacos infectados evidenciando um padrão de infecção diferente entre os animais imunocompetentes e imunossuprimidos (Tabela 4.1; Figura 4.2). Nos quatro macacos imunocompetentes do G1, a viremia teve início entre 7-14 dpi encerrando-se entre 21-28 dpi. A única exceção foi o macaco AC11, que exibiu uma nova viremia aos 56 dpi. A eliminação fecal do vírus apresentou um padrão similar ao da viremia, com exceção do macaco AE3 que permaneceu eliminando o vírus pelas fezes por pelo menos 42 dpi. O genoma viral também foi detectado no fígado dos quatro animais na primeira biópsia após a infecção (14º dpi) e permaneceu detectável por pelo menos 69 dpi em um animal (AD4). O macaco AD4 foi eutanasiado antes do final do experimento, aos 71 dpi, por motivos não relacionados à infecção pelo HEV. Os demais animais deste grupo, AE3, V12 e AC11, exibiram *clearance* viral dentro de 69 dpi ou menos. O genoma do vírus permaneceu indetectável nos espécimes analisados mesmo após a administração do tacrolimo dos 91 aos 149 dpi, não havendo, portanto, indícios de reativação viral nesses animais.

Durante a fase aguda da infecção, os macacos do G2 apresentaram cargas virais semelhantes nas amostras de sangue, fígado e fezes, quando comparados aos macacos do G1 (Figura 4.2). No entanto, após três meses de infecção, três dos quatro macacos imunossuprimidos (AE6, AB19 e AC7) exibiram um padrão persistente de viremia, eliminação fecal e presença do RNA viral em todas as biópsias hepáticas (Tabela 4.1), compatível com os relatos de infecção crônica pelo HEV em pacientes imunossuprimidos. Apenas o macaco AD8 exibiu *clearance* viral espontâneo antes dos 69 dpi, padrão similar ao observado nos animais imunocompetentes.

**Tabela 4.1** – Síntese da detecção do RNA HEV, soroconversão e picos de aminotransferasases após a infecção nos macacos cinomolgos de G1, G2 e G3.

Identificação		Detecção HEV RNA dpi*			Soroconversão anti-HEV dpi*			Picos das aminotransferasases** dpi* (valores correspondentes em UI/L)	
Macacos	Grupo	Soro	Fezes	Fígado	IgA	IgM	IgG	ALT	AST
<b>AD4</b>	<b>1</b>	7-28	7-28	14-69	28	28	28	21, 28 (125, 173)	21 (127)
<b>AE3</b>		7-21	7-42	14	57	28	28	-	-
<b>V12</b>		14-21	7-28	14	57	28	28	21 (67)	21; 99 (97; 96)
<b>AC11</b>		14-21; 56	7-21	14	28	28	28	-	-
<b>AE6</b>	<b>2</b>	7-160	7-160	14-160	141	99	57	42; 56; 160 (82; 89; 84)	21 (93)
<b>AB19</b>		14-160	7-160	14-160	57	14	57	141; 160 (76; 120)	7; 14; 21; 42; 99 (106; 76; 84; 88; 95)
<b>AD8</b>		14-42	7-42	14-42	57	28	28	-	-
<b>AC7</b>		14-160	7-160	14-160	99	14	57	28; 42; 56; 99; 141; 160 (69; 122; 145; 71; 149; 90)	21; 42; 56; 69 (107; 74; 125; 80)
<b>AB17</b>	<b>3</b>	---	---	---	---	---	---	---	---
<b>AD7</b>		---	---	---	---	---	---	---	---
<b>Z2</b>		---	---	---	---	---	---	---	---
<b>AE2</b>		---	---	---	---	---	---	---	---

\*dpi: dias após inoculação; \*\* Picos das aminotransferasases: níveis séricos de ALT/AST superiores ao dobro dos níveis de base individuais.



**Figura 4.2 - Dinâmica da infecção pelo HEV com base na carga viral detectada por qRT-PCR no soro, fígado e suspensão fecal nos 3 grupos.**

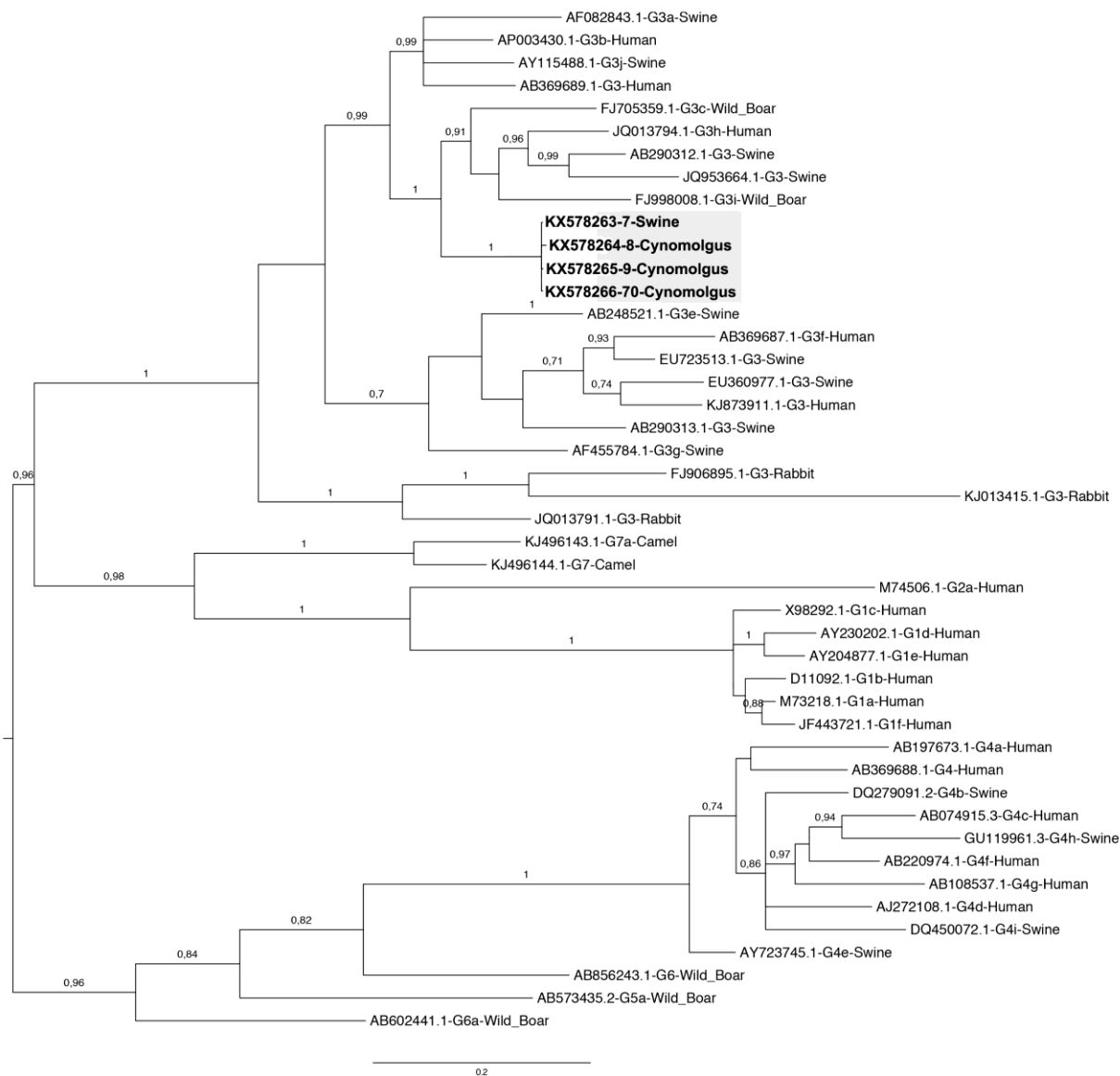
A área sombreada em cinza representa o intervalo de confiança de cada um dos grupos.

Tanto a fita positiva quanto a fita negativa (correspondente ao intermediário replicativo) do RNA do HEV foram detectadas em tecidos hepáticos (fígado e vesícula biliar) e extra-hepáticos (baço, duodeno, cólon, linfonodos e pâncreas) dos três macacos persistentemente infectados, indicando replicação viral nesses tecidos. Também foi possível detectar a fita positiva do HEV nas amostras de bile, jejuno e íleo. Porém, a fita negativa não foi detectada nestas amostras. Além disso, não houve detecção do genoma viral em nenhuma das amostras de LCR, timo e SNC oriundas dos três animais. O genoma viral não foi detectado em nenhum espécime biológico proveniente do animal AD8. Portanto baço, duodeno, cólon, linfonodos e pâncreas foram determinados como sítios extra-hepáticos de replicação nos animais cronicamente infectados.

A análise filogenética bayesiana revelou que as cepas detectadas nos fragmentos hepáticos dos três animais cronicamente infectados corresponderam à cepa do inóculo original, sendo idênticas entre si. A reconstrução filogenética utilizando as sequências nucleotídicas parciais das ORF1 e ORF2 concatenadas (546 nt) agrupou todas as amostras no genótipo 3, clado dos subtipos abchij e subclado dos subtipos chi (Figura 4.3). As fitas



negativas obtidas dos fragmentos hepáticos e extra-hepáticos também foram sequenciadas e identificadas como HEV-3. Apenas as sequências nucleotídicas obtidas a partir da fita positiva foram incluídas na reconstrução filogenética, pois as sequências obtidas a partir do intermediário replicativo (fita negativa) apresentaram qualidade inferior.



**Figura 4.3 - Análise filogenética de cepas do HEV de origem humana e animal.**

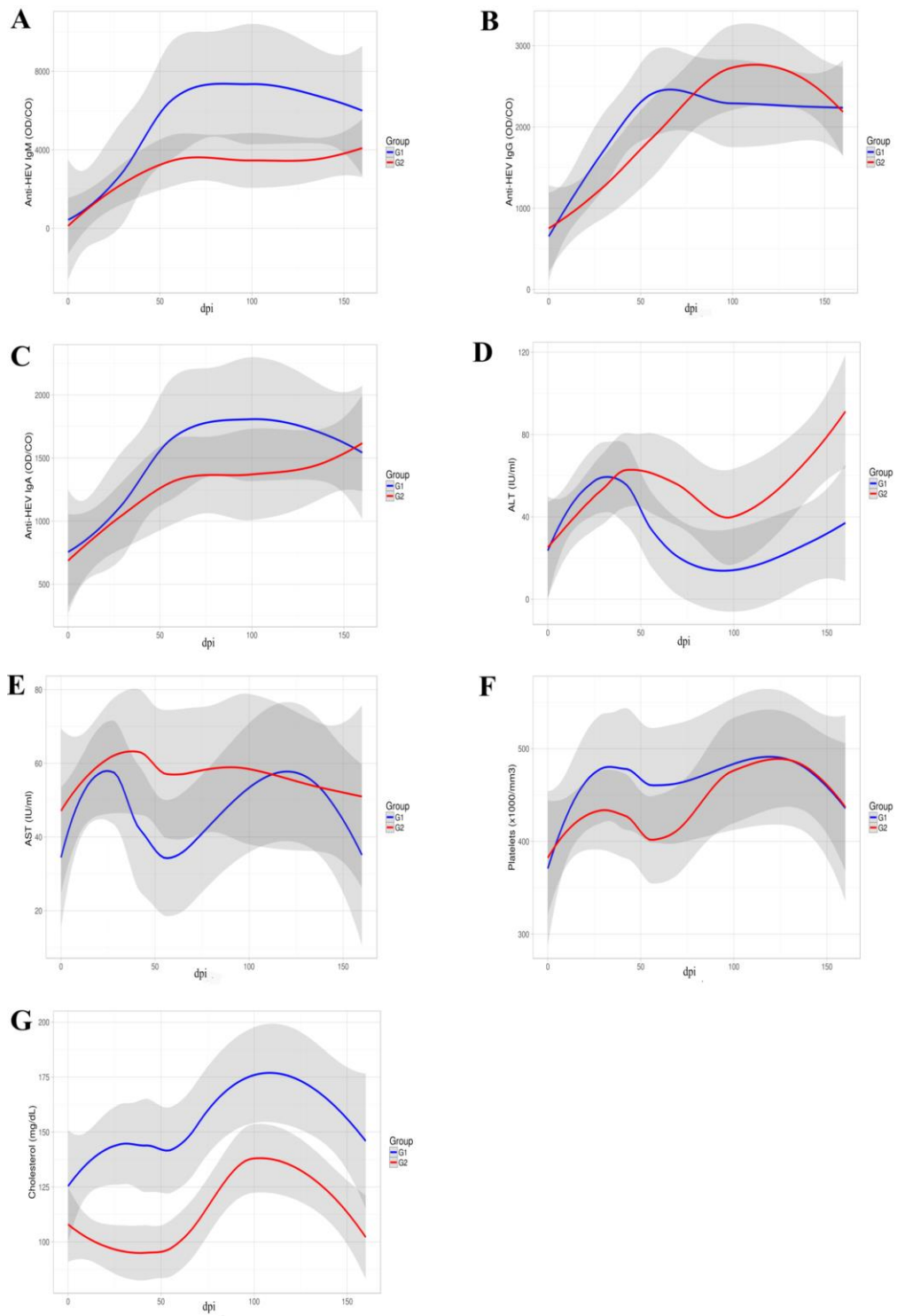
Árvore filogenética bayesiana reconstruída com sequências de nts parciais concatenadas das ORF1 e ORF2 (546 nt) do HEV. Para cada sequência utilizada, tem-se o número de acesso do GenBank, a espécie animal da qual o vírus foi isolado e o genótipo correspondente. A árvore foi enraizada no ponto médio. Os valores de probabilidade posterior (pp) estão descritos no início do clado, sendo os valores  $\geq 0,7$  indicam as repetições de pp que dão suporte ao clado. As sequências descritas nesse estudo estão destacadas na área sombreada a figura (Swine = inóculo; Cynomolgus = sequências obtidas a partir dos fragmentos hepáticos dos três macacos cronicamente infectados). A barra de escala indica a distância evolutiva de 0,2 substituições por posição na sequência.

### 4.3.2 Soroconversão e alterações clínicas

O aparecimento das imunoglobulinas anti-HEV IgM e IgG foram observadas nos macacos imunocompetentes do G1 dentro de 28 dpi enquanto que as imunoglobulinas anti-HEV IgA apareceram entre 28-57 dpi (Tabela 4.1). Diferente do observado no G1, os macacos imunossuprimidos do G2 soroconverteram para as imunoglobulinas em diferentes períodos, com notável variação individual entre os animais. Curiosamente, o G2 exibiu títulos de IgM mais baixos em comparação ao G1, embora não tenha sido observada diferença estatística significativa pela análise multivariada (Figura 4.4 A). Além disso, o aparecimento e o pico das imunoglobulinas da classe IgG foram um pouco tardios quando comparado ao G1 (Figura 4.4 B).

A infecção pelo HEV nos macacos do G1 não resultou em sinais clínicos evidentes. Entretanto, dois animais desse grupo - AD4 e V12 - apresentaram uma elevação transitória e significativa dos níveis de ALT/AST aos 21 dpi (Tabela 4.1). O número médio de plaquetas, glóbulos vermelhos e brancos, e os valores dos demais parâmetros bioquímicos não se alteraram nesse grupo ao longo do estudo.

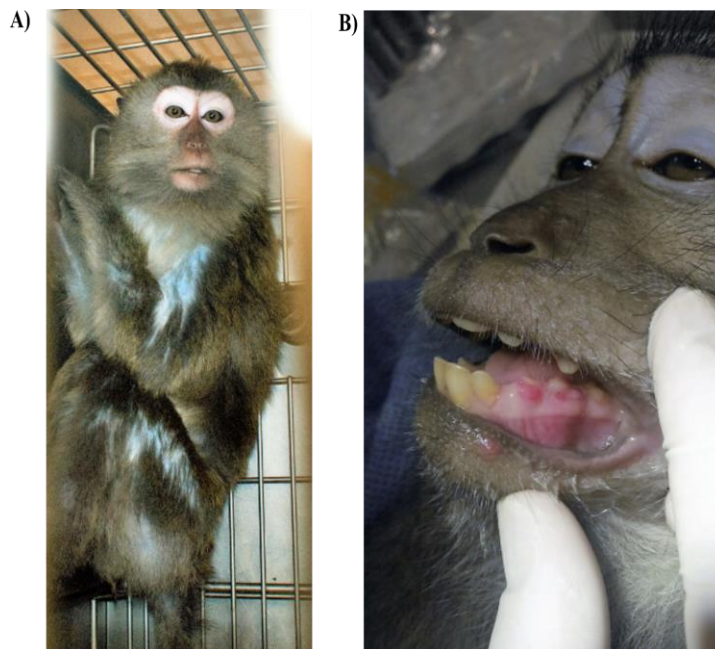
Os três macacos cronicamente infectados de G2 exibiram elevação intermitente dos níveis de ALT e AST (Figura 4.4 D-E). O macaco AD8 foi o único que não apresentou alterações de enzimas hepáticas. Níveis significativamente inferiores de CHOL foram observados no G2 em comparação com G1, como podemos observar na figura 4.4G. Assim como observado no G1, o número médio de plaquetas, glóbulos vermelhos e brancos, e os valores dos demais parâmetros bioquímicos não se alteraram nesse grupo. Na fase aguda da infecção (primeiros 60 dpi) a contagem de plaquetas apresentou-se um pouco mais baixa nos animais imunossuprimidos em comparação aos imunocompetentes. No entanto, os valores se mantiveram dentro da normalidade e nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos (Figura 4.4 F).



**Figura 4.4 – Comparação dos níveis anticorpos anti-HEV, ALT, AST, e CHOL e do número de plaquetas entre os grupos inoculados (G1 e G2).**

Os níveis de anti-HEV IgM, IgG e IgA podem ser observadas em A, B e C, respectivamente. As amostras com razão DO/cutoff acima de 1,0 são consideradas positivas para as Ig anti-HEV. Os níveis de ALT e AST são mostrados em D e E, e os níveis de plaquetas e colesterol em F e G, respectivamente. A área sombreada em cinza representa o intervalo de confiança de cada um dos grupos.

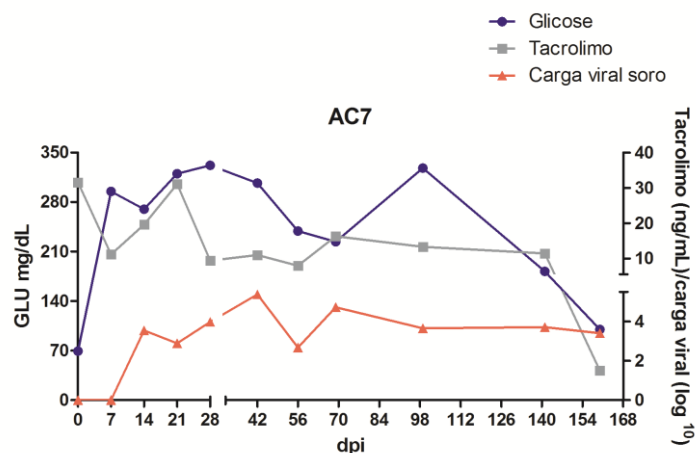
Diferente do G1, todos os animais do G2 apresentaram alterações clínicas notáveis como: alopecia bilateral nos membros anteriores e posteriores (Figura 4.5 A), perda moderada de peso ao longo do experimento (dados não mostrados), e lesões herpéticas (macacos AC7 e AB19) na mucosa oral e lábios (Figura 4.5 B) confirmadas por PCR.



**Figura 4.5 – Alterações clínicas observadas nos animais imunossuprimidos e inoculados.**

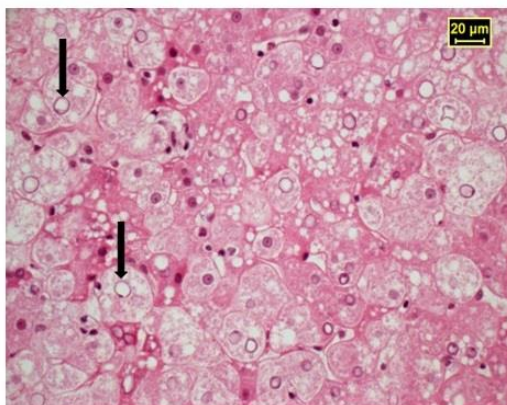
(A) Alopecia nos membros anteriores e posteriores. Note as áreas bem circunscritas de perda de pelos sem inflamação da pele subjacente. (B) Lesão no lábio inferior causada por reativação do herpesvírus.

Adicionalmente, o macaco AC7 desenvolveu um quadro de diabetes mellitus, após a infecção viral, caracterizado por poliúria e polidipsia, elevação dos níveis glicêmicos (variando de 181 a 327 mg/dL) e de hemoglobina glicada (8,8% aos 78 dpi). A hiperglicemia foi notificada pela primeira vez aos 49 dias após o início do tratamento com o tacrolimo e aos 7 dpi (Figura 4.6). Após o fim da administração do tacrolimo, os níveis glicêmicos começaram a decair até a normalidade.



**Figura 4.6 – Concentração plasmática do tacrolimo determinada por LC-MS/MS, carga viral do HEV e nível de glicose no sangue do macaco AC7.**

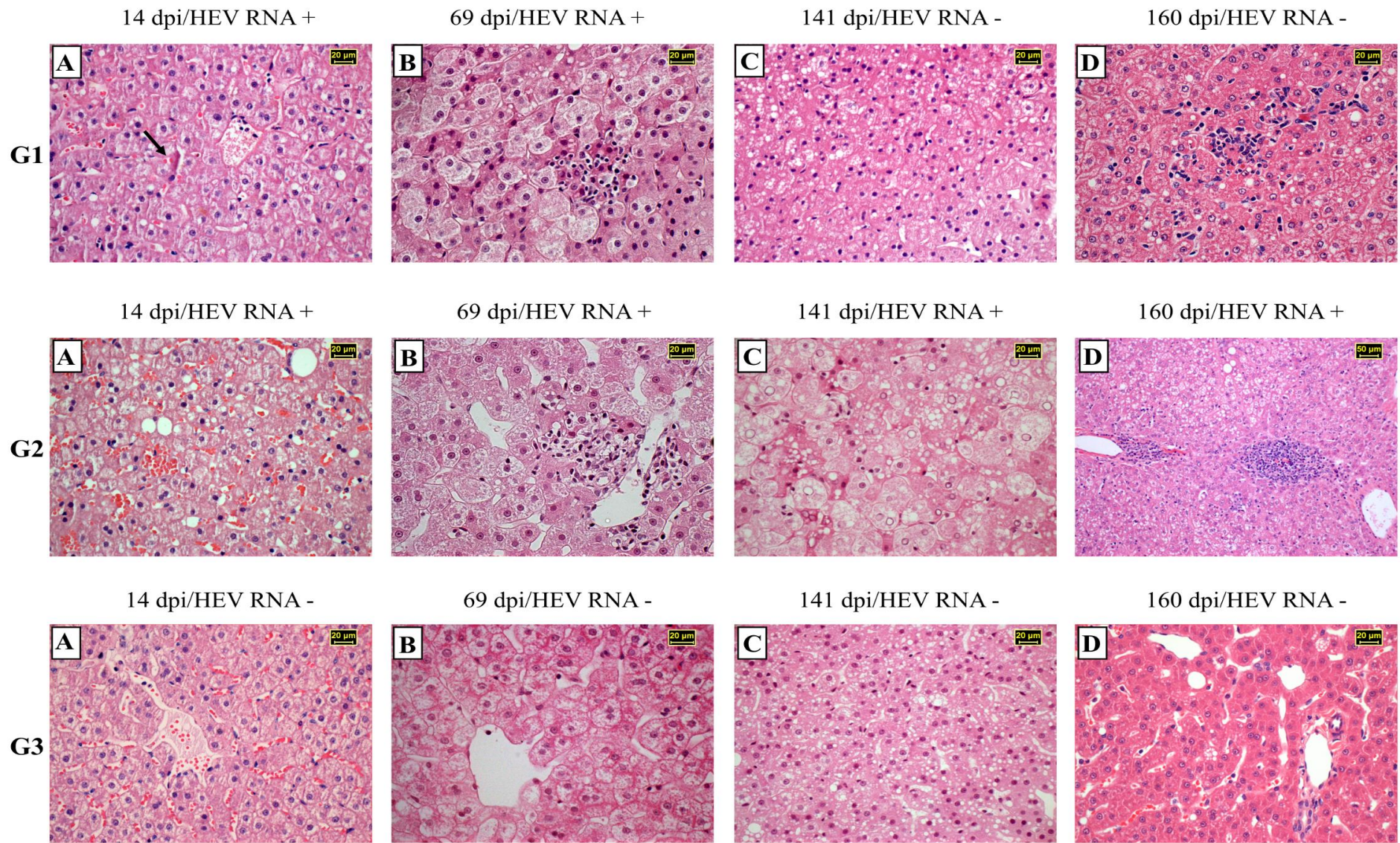
Achados histopatológicos indicativos de *diabetes mellitus* foram evidenciados pela presença maciça do acúmulo de glicogênio nos núcleos de hepatócitos como podemos observar no fragmento hepático do macaco AC7 obtido após 183 dias de tratamento com o imunossupressor tacrolimo (Figura 4.7).



**Figura 4.7 - Análise histopatológica do parênquima hepático do macaco AC7**  
 Note (setas) a maciça presença de acúmulo glicogênico nos núcleos dos hepatócitos (x640).

### 4.3.3 Achados histopatológicos e detecção do antígeno viral

Os achados histopatológicos dos fragmentos hepáticos dos macacos do G1 obtidos durante a fase aguda da infecção (aos 14, 42 e 69 dpi) revelaram de pouca a moderada macro/microesteatose (predominate na zona 1), comprometimento por degeneração (balonização) predominante na zona 3, inflamação intra-acinar, e pouca apoptose hepatocelular (Figuras 4.8 G1A e G1B). Balonização, esteatose moderada a grave, apoptose e poucos infiltrados inflamatórios continuaram sendo observados nos fragmentos hepáticos coletados até final do experimento (Figuras 4.8 G1C e G1D).



**Figura 4.8 - Análise histopatológica tempo-dependente de biópsias hepáticas de macacos cynomolgus inoculados com o vírus da hepatite E (G1) e inoculados com HEV e imunossuprimidos com tacrolimus (G2 e G3) corados pela hematoxilina e eosina (H&E).**

(G1A) Arquitetura lobular alterada, hepatócitos tumefeitos, citoplasma claro, de aspecto espumoso (balonizados) e comprometimento lítico de núcleos. Note (seta) a presença de agregados citoplasmáticos eosinofílicos - corpúsculo hialino de Mallory (x400).

(G1B) Arquitetura lobular alterada, comprometimento por degeneração (balonização) dos hepatócitos, necrose lítica nuclear e microesteatose. Note (seta) a presença de foco inflamatório lobular (linfohistio-plasmocitário) (x400).

(G1C) Comprometimento grave dos hepatócitos, que exibem micro e macroesteatose e células balonizadas (x400).

(G1D) Coleção focal de linfócitos e macrófagos intra-acinares envolvidos por hepatócitos com degeneração balonizante e núcleos com necrose lítica (x400).

(G2A) Parênquima hepático com balonização e cariólise. Presença de esteatose micro e macrovacuolares (x400).

(G2B) Arquitetura lobular preservada, pequena quantidade de hepatócitos balonizados e moderada esteatose. Observe (seta) a inflamação periportal constituída por células mononucleares (linfócitos e histiócitos) (x400).

(G2C) Parênquima hepático com arquitetura lobular alterada, balonização com necrose lítica, esteatose micro e macrovacuolares. Note a maciça presença de acúmulo glicogênico nos núcleos dos hepatócitos (x640).

(G2D) Infiltrado inflamatório linfohistiocítico provoca a destruição da placa limitante do espaço porta e invade a área intra-acinar (inflamação de interface). Micro e macroesteatose hepatocitária (x160).

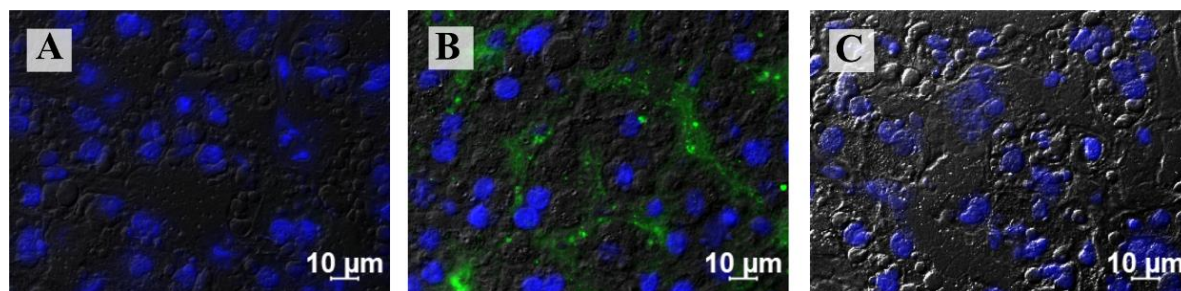
(G3A) Parênquima hepático sem alterações histológicas. Placas de hepatócitos direcionadas à veia centrolobular (x400).

(G3B) Arquitetura lobular alterada, balonização hepatocelular predominante na zona 3 (x640).

(G3C) Presença multizonal de hepatócitos com inúmeros pequenos vacúolos de lipídeos cujos núcleos mantem a posição central (x400).

(G3D) Arquitetura lobular preservada. Note espaço porta circundado por placas de hepatócitos com discreta microesteatose (x640).

Aos 160 dpi, mesmo após o desafio com tacrolimo, os animais do G1 não apresentaram nenhuma evidência histológica de hepatite crônica nem antígeno viral detectável nos fragmentos hepáticos (Figura 4.9 A).



**Figura 4.9 - Detecção do antígeno do HEV por imunofluorescência nos fragmentos hepáticos dos macacos cinomolgos obtidos no final do experimento.**

(A) Imunofluorescência negativa dos macacos do G1 após *clearance* viral. (B) Detecção do antígeno HEV (marcado em verde) nos sinusóides hepáticos dos macacos cronicamente infectados do G2. (C) Resultados negativos nos macacos controle do G3. Os núcleos celulares foram contra-corados com DAPI (azul).

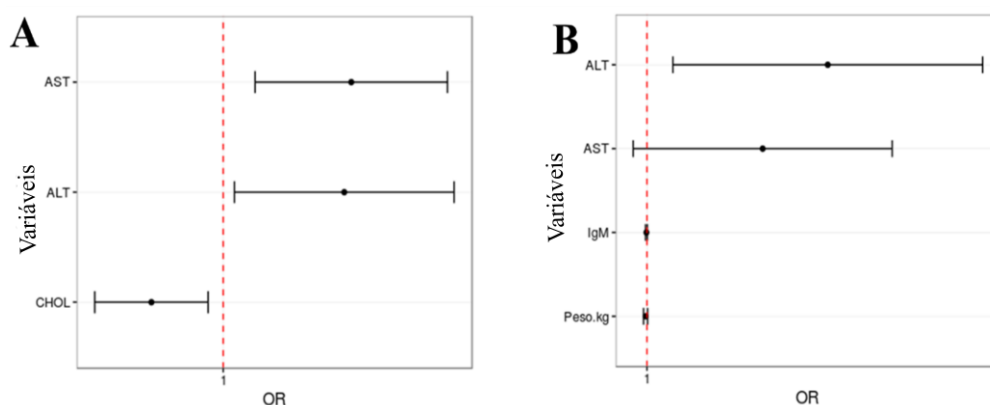
Aos 14 e 42 dpi, os macacos do G2 exibiram pouca balonização, moderada esteatose, apoptose hepatocelular dispersa e inflamação lobular (Figura 4.8 G2A). Aos 69 dpi, foram evidenciadas nos fragmentos hepáticos dos animais desse grupo esteatose moderada a severa (predominante na zona 1), marcada balonização (predominante na zona 3) e pouca apoptose hepatocelular acompanhadas de inflamação portal e lobular leve (Figura 4.8 G2B). Na fase crônica da infecção, aos 160 dpi, os fragmentos hepáticos dos macacos imunossuprimidos AE6, AB19 e AC7 revelaram áreas de inflamação provocando a destruição da placa limitante do espaço porta e invasão da área intra-acinar (necrose em sacabocado), caracterizada como hepatite de interface (Figura 4.8 G2D). Além disso, o antígeno viral do HEV foi detectado nos fragmentos hepáticos dos mesmos animais (Figura 4.9 B). O animal AD8 foi o único do grupo que não desenvolveu infecção crônica pelo HEV, apresentando um quadro de hepatite aguda autolimitada caracterizada por ausência de infiltrados de células inflamatórias no parênquima hepático ao final do experimento.

#### **4.3.4 Análise estatística comparativa entre os grupos de animais imunocompetentes (G1) e imunossuprimidos (G2) infectados com HEV-3**

Os modelos de análise univariada e multivariada foram realizados para identificar as possíveis variáveis associadas à infecção crônica pelo HEV. No modelo 1, a análise univariada apontou as seguintes variáveis para serem incluídas na análise multivariada: idade,



sexo, peso, IgM, IgG, IgA, dose do tacrolimo, ALT, AST, TBIL, GLU, CREA, CHOL, BUN. Após os ajustes para o modelo 1, a análise multivariada revelou os seguintes fatores preditivos independentes associados à infecção crônica pelo HEV em G2: ALT (odds ratio = 1,0432; 95% intervalo de confiança, 1,00392 – 1,0840; P = 0,030781), e AST (odds ratio = 1,0457; 95% intervalo de confiança, 1,01120 – 1,0815; P = 0,009062) como fatores de risco; e o CHOL como fator de proteção (odds ratio = 0,9752; 95% intervalo de confiança, 0,95612 – 0,9947; P = 0,012968) (Figura 4.10 A). No modelo 2, a análise univariada apontou as seguintes variáveis: idade, peso, IgM, IgA, dose do tacrolimo, ALT, AST, TBIL, GLU, CREA e CHOL. Após os ajustes para o modelo 2, as variáveis IgM, ALT, AST e peso permaneceram no modelo final, mas apenas a ALT foi considerada um fator de risco para infecção crônica pelo HEV (odds ratio = 1,05453; 95% intervalo de confiança, 1,007643 – 1,1036; P = 0,02213). Já as variáveis IgM (odds ratio = 0,99983; 95% intervalo de confiança, 1,0001 – 0,999567; P = 0,999567), AST (odds ratio = 1,03456; 95% intervalo de confiança, 1,0747 – 0,995963; P = 0,07987) e peso (odds ratio = 0,99959; 95% intervalo de confiança, 1,0002 – 0,998998; P = 0,16941) não foram consideradas fatores de risco (Figura 4.10 B).



**Figura 4.10- Fatores preditivos associados à infecção crônica pelo HEV.**

(A) Fatores preditivos obtidos com base na carga viral das fezes. (B) Fatores preditivos obtidos com base na carga viral dos soros.

#### 4.4 Perfil clínico e histopatológico dos macacos imunossuprimidos, não infectados

De forma semelhante ao G2, todos os animais do G3 apresentaram perda moderada de peso e alopecia bilateral nas mesmas regiões do corpo. Os macacos AD7 e Z2 apresentaram graves lesões resultantes de infecção oportunista pelo herpes vírus e foram eutanizados aos 45 dpi e 71 dpi, respectivamente. Todos os animais do G3 apresentaram níveis normais de glóbulos brancos e vermelhos, parâmetros bioquímicos (incluindo ALT e AST) e ausência de

anticorpos anti-HEV IgM, IgG e IgA. O genoma viral não foi detectado em nenhum espécime biológico proveniente dos animais deste grupo.

As características histológicas dos macacos controle do G3 revelaram áreas de degeneração hepatocelular, binucleação dos hepatócitos acompanhados de necrose lítica (Figuras 4.8 G3A-D). O antígeno viral não foi detectado nos fragmentos hepáticos dos animais desse grupo (Figura 4.9 C).

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou êxito em estabelecer um modelo experimental de infecção crônica pelo HEV em macacos cinomolgos imunossuprimidos e infectados com uma cepa brasileira do HEV-3 de origem suína. Aproximadamente 60% dos pacientes pós-transplantados que fazem uso do imunossupressor tacrolimo e são expostos ao HEV-3 evoluem para a forma crônica da infecção (2). Proporcionalmente, uma taxa semelhante de infecção crônica (75% dos animais) foi reproduzida no modelo experimental estabelecido neste trabalho. Até o momento apenas o genótipo 3 do HEV foi descrito no Brasil tanto em humanos quanto em suínos (210, 219), sendo que mais da metade dos casos humanos de HEV foram descritos em pacientes imunossuprimidos que fazem uso do tacrolimo (216-218). A escolha da terapia imunossupressora, bem como do inóculo de origem zoonótica foram realizados com base nas informações descritas acima.

Casos de infecção e transmissão natural pelo HEV já foram descritos em colônias de macacos rhesus no Japão (117). Considerando tais informações, a triagem sorológica dos animais provenientes da colônia do ICTB/Fiocruz foi realizada. Dos 72 cinomolgos provenientes da colônia, 1 macaco (1,4%) apresentou anticorpos anti-HEV IgM e 3 (4,17%) anticorpos anti-HEV IgG, sendo que nenhum deles apresentou os dois marcadores ao mesmo tempo. O genoma viral não foi detectado em nenhum animal. Não foram realizados novos testes de ELISA (IgM e IgG) no macaco identificado como positivo para os anticorpos anti-HEV IgM dentro de 1 a 2 semanas após o primeiro teste. Entretanto, como o mesmo macaco foi negativo na detecção do genoma pelo qPCR, é provável que o teste tenha gerado um resultado falso-positivo. Os quatro animais que foram positivos em pelo menos um dos marcadores sorológicos foram excluídos da seleção.

O inóculo utilizado na infecção experimental foi obtido a partir de amostras de fezes de suínos provenientes da região norte do Paraná, visto que o HEV se encontra amplamente disseminado nas granjas suinícolas daquela região (211). As amostras foram coletadas de animais em fase inicial de terminação (entre 60 e 90 dias de idade), que corresponde a faixa etária de maior infecção pelo vírus (224, 225). Em 100% das amostras da granja Peru e 93,3% das amostras da granja Santarém foi possível detectar o RNA do HEV pela técnica de qPCR. A análise do sequenciamento dos amplicons permitiu identificar o genótipo 3 do HEV em todas as amostras obtidas. Nossos resultados corroboram com os resultados publicados anteriormente em granjas suínas brasileiras (226, 227), visto que o HEV foi detectado tanto na

granja com manejo sanitário adequado, quanto naquela com condições mais precárias. Provavelmente a taxa de infecção pelo HEV em suínos é maior na fase inicial de terminação devido ao declínio dos anticorpos passivos que ocorre nesse período, como demonstrado anteriormente por nosso grupo (226), somado ao estresse da mudança de manejo (animais passam da creche para a terminação), fazendo com que os mesmos fiquem vulneráveis a infecção pelo vírus.

Durante a etapa experimental com os macacos cinomolgos, o período de adaptação foi essencial para determinação de valores fisiológicos basais e medidas de controle sanitário, visto que os animais foram submetidos a um regime imunossupressor. Os animais foram treinados para receber a dose calculada de tacrolimo no primeiro alimento do dia, “oculto” no interior de frutas (as mais palatáveis) utilizadas para veicular o medicamento, permitindo assim a sua ingestão. Duas apresentações comerciais do medicamento tacrolimo se encontram disponíveis no mercado: uma de administração pela via oral e outra pela via intramuscular. Neste estudo, a administração oral do medicamento foi escolhida como via de eleição com o intuito de evitar o estresse diário decorrente da dor local provocada pela administração intramuscular, além de mimetizar a condição comumente observada em pacientes transplantados. Devido à dificuldade em controlar a ingestão do medicamento pelos cinomolgos, controlamos a intensidade da imunossupressão pela determinação da concentração plasmática do tacrolimo, sendo esta realizada pelos colaboradores do SEFAR/Fiocruz. Foi preconizada uma dose para manutenção da concentração plasmática do tacrolimo acima de 10 ng/ $\mu$ L nos animais tratados, mimetizando a concentração plasmática do medicamento utilizadas em cinomolgos para prevenir a rejeição de aloenxertos (228, 229).

Sabe-se que o uso do tacrolimo em PNH resulta numa redução transitória dos glóbulos brancos, mais especificamente de linfócitos T (230). Fator que foi considerado parâmetro para comprovação da eficácia do tratamento em nosso estudo. Três semanas após o início do tratamento com o tacrolimo (período de carência para a ação do medicamento) na dose de 3,5 mg/kg VO, os animais dos G2 e G3 não apresentaram linfopenia. Diante de tais resultados o período de carência do medicamento foi prolongado por mais uma semana. Mesmo assim, não foi possível observar uma linfopenia aparente em nenhum dos animais tratados, contudo sinais de infecção oportunista foram observados, como nos animais do G2 que apresentaram lesões causadas por herpesvírus na mucosa oral, confirmadas pela detecção do genoma do vírus nas lesões coletadas. Dois animais tratados ficaram gravemente doentes em virtude de infecções oportunistas ao longo do experimento, e foram eutanasiados aos 45 e 71 dpi. Diante disso, a dose do medicamento foi reduzida para 2 mg/kg VO nos grupos 2 e 3 aos 72 dpi.

Macacos cinomolgos têm sido amplamente utilizados como modelo experimental de infecção pelo HEV para estudos de patogênese e resposta imune pela sua similaridade com a forma humana da doença (6, 121). O curso da infecção pelo HEV observado neste modelo animal é caracterizado por um curto período de incubação seguido por viremia e eliminação viral nas fezes, com replicação do HEV nos hepatócitos, aparecimento de anticorpos anti-HEV com discreta elevação de transaminases e alterações histológicas, embora sem presença de icterícia ou qualquer elevação dos níveis séricos de bilirrubina total. Alta replicação viral é notada antes do pico das transaminases. O aparecimento de anticorpos, que geralmente acompanha a eliminação do vírus nas fezes e a presença do mesmo no soro, está relacionado com a resolução da doença, que em geral não determina lesões hepáticas graves (6). No presente estudo, tanto os animais imunocompetentes quanto os imunossuprimidos que foram infectados pelo HEV-3 desenvolveram um quadro de hepatite subclínica. Os animais imunocompetentes do G1, que mimetizaram o curso agudo da infecção pelo HEV, apresentaram as mesmas características descritas acima. A duração exata da viremia e da eliminação viral pelas fezes em relação ao início da infecção é desconhecida, pois os pontos de coleta foram espaçados.

A hipótese de reativação da infecção foi avaliada nos animais do G1. Mesmo após o desafio com tacrolimo, os animais deste grupo não apresentaram nenhuma evidência histológica de hepatite crônica nem antígeno viral detectável nos fragmentos hepáticos. A concentração plasmática do tacrolimo obtida nos primatas G1 durante os 59 dias de tratamento foi menor do que a observada nos animais de G2 e G3. Tal fato pode ter interferido com a hipótese de reativação do HEV no G1.

A infecção crônica pelo HEV em humanos é definida como persistente replicação do vírus por mais de três meses — identificada pela detecção do HEV em fragmentos hepáticos, soro e fezes — acompanhada de discreta elevação das enzimas hepáticas ALT e AST, resultado frequentemente em um quadro assintomático (181). No nosso estudo, os macacos imunossuprimidos AE6, AB19 e AC7 se tornaram cronicamente infectados, conforme hipotetizado. Assim como observado em pacientes pós-transplantados (190), os resultados obtidos no presente estudo revelaram que a carga viral do vírus (no soro, fezes e fragmentos hepáticos) e os níveis de anticorpos anti-HEV IgM e IgG detectados na fase aguda da infecção não foram capazes de prever a progressão para hepatite crônica.

Curiosamente, apesar do tratamento com tacrolimo, um dos quatro macacos imunossuprimidos (AD8) desenvolveu uma hepatite aguda autolimitada - caracterizada pela ausência de infiltrados de células inflamatórias no parênquima hepático, normalidade nos

níveis das enzimas hepáticas, *clearance* viral espontâneo e soroconversão específica para o HEV. Do mesmo modo, 40% dos pacientes transplantados imunossuprimidos e infectados com HEV são capazes de eliminar o vírus (2). A ativação da resposta imune inata e o desenvolvimento de uma resposta multiespecífica de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> à ORF2 parecem ser críticos para a depuração do vírus em pacientes com HE (166). Além disso, uma resposta inflamatória fraca e elevadas concentrações séricas de quimiocinas na fase aguda da doença têm sido associadas à persistência da infecção pelo HEV (231). Diante disso, quadros de hepatite aguda autolimitada decorrentes da infecção pelo HEV têm sido associados a uma resposta de células T forte e multiespecífica.

Além da infecção persistente em 3 dos 4 animais tratados do grupo 2, também foi observado o aparecimento um pouco tardio da resposta imune humoral dos mesmos quando comparados aos animais que desenvolveram o quadro agudo da HE. Tal fenômeno também tem sido descrito em pacientes imunossuprimidos pós-transplantados que chegam a soroconverter até oito meses após a viremia (192, 194). A ausência de anticorpos anti-HEV já foi descrita anteriormente em pacientes imunossuprimidos, embora haja controvérsias com relação a sensibilidade dos kits de diagnóstico utilizados em tais estudos (182, 232). Contrariando tais resultados, todos os animais imunossuprimidos do presente estudo soroconverteram para todas as imunoglobulinas pesquisadas (IgA, IgM e IgG) embora em tempo distintos. Adicionalmente, os primatas tratados com o imunossupressor apresentaram títulos mais baixos de IgM e IgA durante todo o experimento quando comparados com os primatas não tratados, embora não se tenha observado diferença estatística significativa.

Pacientes com quadro de hepatite autolimitada frequentemente apresentam picos elevados de enzimas hepáticas em fase aguda da infecção (190). No entanto, níveis moderadamente elevados de transaminases ao invés de altos picos têm sido descritos como um fator associado ao desenvolvimento de cronicidade (2). O mesmo foi observado nos três animais cronicamente infectados que apresentaram discreta elevação das transaminases hepáticas, porém intermitente no decorrer da infecção. Os níveis persistentemente elevados (mesmo que moderadamente) de ALT e AST foram considerados fatores preditivos de progressão para infecção crônica pelo HEV, assim como observado em pacientes cronicamente com HBV infectados (233). Nota-se que os animais que desenvolveram um quadro de infecção aguda - animais do grupo 1 e AD8 do grupo 2 - também apresentaram discreta elevação de transaminases no período infeccioso. Assim como observado em trabalhos anteriores, os macacos do presente experimento demonstraram permitir uma boa replicação do HEV antes da elevação das enzimas hepáticas (152).

A ciclosporina, que também é um inibidor da calcineurina, tem sido frequentemente associada com hiperlipidemia em pacientes em pós-transplantados (234). Em contraste, no nosso estudo, níveis plasmáticos reduzidos de colesterol foram significativamente associados com a infecção crônica pelo HEV no grupo tratado com tacrolimo. Tal fato pode ser explicado pelo evidente depósito anormal de gordura (macro e micro esteatose) no parênquima hepático observado principalmente nos animais imunossuprimidos.

Com relação às características hematológicas, a contagem de leucócitos não decaiu frente ao tratamento com tacrolimo, como esperado (230). Ainda assim, três dos quatro macacos tratados com tacrolimo tornaram-se persistentemente infectados pelo HEV-3. Além disso, baixa contagem de plaquetas não pôde ser associada à cronicidade da infecção pelo HEV, como relatado anteriormente em pacientes pós-transplantados (2). Trombocitopenia leve a moderada após transplante pode ser observada devido a muitos fatores, como redução da produção de trombopoietina hepática, sequestro de aloenxertos, hiperesplenismo, hemorragia, trombocitopenia induzida por heparina, reações imunológicas, hemólise, drogas, infecções e septicemia (235, 236). Entretanto, no presente estudo, o modelo animal não foi submetido aos procedimentos cirúrgicos que poderiam resultar em trombocitopenia leve a moderada em pacientes pós-transplantados. Trombocitopenia severa induzida por drogas e imunomediada têm sido associadas ao uso do tacrolimo (237) e infecção pelo HEV (238, 239), respectivamente. No nosso estudo, todos os animais infectados apresentaram contagem de plaquetas dentro da normalidade tanto no momento da infecção quanto ao longo do experimento.

As alterações histológicas mais comumente observadas na hepatite aguda decorrente da infecção pelo HEV são: balonização dos hepatócitos acompanhada de esteatose macro e microvesicular podendo ocasionar pontos de necrose. Também podem ser observados leve inflamação portal linfocítica e ligeira proliferação dos ductos biliares em áreas portais (193). A infecção crônica pelo HEV evolui rapidamente para fibrose em 60% dos pacientes pós-transplantados. Destes pacientes crônicos, 10% podem tornar-se cirróticos num curto período de tempo (cerca 2 a 3 anos) (180, 181). Portanto, a hepatite E crônica é tipicamente mais agressiva que as hepatites crônicas decorrentes pela infecção por HBV ou HCV (150). No presente estudo, a hepatite crônica foi diagnosticada de acordo com características histológicas típicas, como hepatite de interface aos 160 dpi nos macacos cronicamente infectados. A fibrose hepática não foi observada, provavelmente devido ao período limitado do estudo. Resultados semelhantes — infiltrados portais linfocíticos com necrose em

sacabocado (hepatite de interface) — foram observados em pacientes receptores de coração e fígado, evidenciando forte atividade de interface (94, 192, 194).

Estudos anteriores demonstraram que o HEV pode replicar em outros órgãos e tecidos além do fígado tanto em humanos quanto em macacos cinomolgos (64, 123). A infecção aguda ou crônica pelo HEV também pode determinar manifestações extra-hepáticas incluindo distúrbios neurológicos, lesões renais, pancreatite aguda e anormalidades hematológicas (196). A fita negativa de RNA do HEV, indicativa de replicação, foi detectada no fígado, vesícula biliar, baço, duodeno, cólon, linfonodo e pâncreas dos três macacos cronicamente infectados. Recentemente, foram identificadas diferentes *quasiespécies* de HEV a partir de soro e LCR do mesmo paciente com infecção crônica, sugerindo que a persistência viral no mesmo paciente poderia promover a emergência de variantes neurotrópicas do HEV (3). No curto período deste estudo, não foi possível detectar o genoma do HEV SNC dos animais crônicos, em contraste ao descrito anteriormente em coelhos cronicamente infectados (240). Não foram observadas alterações da função renal nem alterações histopatológicas nos tecidos renais (dados não apresentados). Como os fragmentos renais foram estocados apenas em formalina a 10%, sem estoques em baixas temperaturas, o genoma do HEV não foi testado nesse órgão.

Os efeitos colaterais comuns decorrentes do tratamento com o tacrolimo incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade e diabetes mellitus pós-transplante (DMPT) (241, 242). Para avaliar os possíveis efeitos tóxicos do tacrolimo, optou-se por incluir um grupo controle de macacos não infectados tratados com tacrolimo (G3). No entanto, nenhum animal deste grupo apresentou sinais de neurotoxicidade, nefrotoxicidade ou DMTP. A DMTP é uma condição clínica comumente observada em seres humanos e, recentemente, foi relatada em um estudo experimental com cinomolgos tratados com o medicamento tacrolimo (228). No presente estudo, o macaco AC7, cronicamente infectado pelo HEV, desenvolveu diabetes mellitus tipo 2 sob terapia imunossupressora, quando os níveis sanguíneos diários de tacrolimus variaram entre 6,5 e 30 ng / ml e após a inoculação com HEV. A hiperglicemia foi observada pela primeira vez após 49 dias de tratamento imunossupressor (294 mg/dl), uma semana após a infecção. Ao longo do experimento a glicemia atingiu níveis elevados (327 mg/dl) associados ao aumento dos níveis de hemoglobina glicada (8,8). Curiosamente, o nível glicêmico voltou ao normal (99 mg/dl) assim que o tratamento com tacrolimo foi descontinuado, embora a infecção pelo HEV ainda estivesse ativa. Estes achados foram semelhantes aos descritos em cinomolgos transplantados,



submetidos a terapia imunossupressora diária, incluindo o uso do tacrolimo, que apresentava concentrações plasmáticas de 20-30 ng/ml (228).

A relação entre os inibidores da calcineurina, como o tacrolimo e a ciclosporina, e o desenvolvimento de DMPT é amplamente reconhecido na medicina humana. Pacientes com tratamento com ciclosporina têm demonstrado menor risco de desenvolver DMPT comparado aqueles que fazem uso do tacrolimo (243). O mecanismo da DMPT é multifatorial e apresenta alta incidência no primeiro ano após transplante e tratamento imunossupressor. Além da exposição a agentes farmacológicos, outros eventos como a hepatite C em receptores pós-transplantados também conferem um risco elevado do desenvolvimento de DMPT (243, 244). Entretanto, até o momento não há relatos associando pacientes cronicamente infectados pelo HEV com o desenvolvimento de DMPT.

A análise filogenética das sequências concatenadas (ORF 1 e 2) obtidas a partir do inóculo e do fígado dos animais cronicamente infectados revelou que as sequências, idênticas entre si, formam um cluster isolado dentro da clade 3 abchij, subclade 3chi. Embora as sequências estejam dentro do cluster chi, as mesmas apresentam maior identidade nucleotídica com uma cepa japonesa humana do subtipo 3b (87,7%). As cepas da subclade 3abj foram isoladas na Ásia, Europa e América do Norte e circulam predominantemente na Ásia e América do Norte. Já as cepas da subclade chi provêm da Europa (França e Alemanha) e Mongólia (245, 246). A classificação do genótipo 3 em subtipos é extremamente controversa e de preferência realizada com sequências de genomas completos do HEV. Até o momento não há nenhuma análise de genoma completo de cepas brasileiras do HEV de origem humana ou animal. Portanto, a análise completa do genoma será realizada futuramente a fim de classificar adequadamente as sequências obtidas no presente estudo em um novo subtipo ou em um subtipo já existente. Além disso, a análise do genoma completo das cepas detectadas no fígado dos animais do G2 permitirá identificar *quasispécies* que possam ter emergido durante a infecção crônica.

Em conclusão, este estudo forneceu a evidência de que macacos cinomolgos imunossuprimidos tratados com tacrolimo e infectados com o HEV-3 de origem suína podem evoluir para um quadro crônico de infecção. A infecção pelo HEV foi associada à hepatite de interface, caracterizando o início de uma hepatite crônica. Além disso, a transmissão entre espécies aqui relatada reforça o papel zoonótico das cepas do genótipo 3 do HEV oriundas de suínos na epidemiologia da infecção pelo HEV no Brasil.

## 6 PERSPECTIVAS

1. Análise da caracterização qualitativa e quantitativa do perfil de células T CD3<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, T CD29<sup>+</sup>, T CD44<sup>+</sup> e T CD49d<sup>+</sup>, executada pela técnica de citometria de fluxo, a partir de amostras de sangue periférico obtidas dos animais imunossuprimidos e dos imunocompetentes, para avaliação de fenótipos de ativação, migração e adesão dos linfócitos T;
2. Caracterização do perfil de células inflamatórias infiltradas no parênquima hepático, pela técnica de imunofluorescência, em fragmentos de fígado criopreservados.
3. Amplificação e sequenciamento do genoma completo do vírus detectado no fígado dos animais imunossuprimidos persistentemente infectados e da cepa HEV-3 utilizada como inóculo, visando à identificação de *quasispécies* do inóculo que possam ter emergido durante a infecção crônica e a classificação das sequências em subtipos.

## 7 CONCLUSÕES

1- No presente estudo foi possível estabelecer um quadro de imunossupressão nos macacos cinomolgos, mesmo na ausência de linfopenia, comprovado pela concentração plasmática da droga e pela presença de infecções oportunistas.

2- Três dos quatro animais imunossuprimidos desenvolveram infecção crônica pelo HEV3, caracterizada por viremia persistente, com concomitante eliminação viral nas fezes e persistência hepática do vírus por mais de três meses pós infecção.

3- A imunossupressão após a cura da infecção aguda não foi capaz de provocar a reativação viral-

4- A imunossupressão induzida pelo tacrolimo, além de determinar o desenvolvimento da forma crônica de infecção, determinou um padrão tardio de soroconversão para as imunoglobulinas da classe IgG e títulos séricos mais baixos de IgM quando comparados com os animais que apresentaram cura espontânea da infecção.

5- A análise multivariada comparativa realizada entre os grupos de animais infectados revelou que a flutuação dos níveis de ALT e AST, e os baixos níveis de colesterol são fatores preditivos para a cronicidade da infecção pelo HEV no modelo cinomolgo.

6- Ao final do experimento, a identificação da hepatite de interface nos achados histopatológicos permitiu a caracterização do quadro de hepatite crônica nos cinomolgos imunossuprimidos.

7- Embora seja evidente ação hepatotóxica do imunossupressor observada nos achados histopatológicos, este fato isoladamente não se refletiu em alterações das enzimas hepáticas ao longo do experimento.

8- A imunossupressão determinou o aumento da replicação viral nos hepatócitos, que foi evidenciada pela detecção do genoma viral e respectivo intermediário replicativo associados à detecção do antígeno viral (nos hepatócitos e sinusóides).

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol.* 2008;48(3):494-503.
2. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, et al. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology.* 2011;140(5):1481-9.
3. Kamar N, Izopet J, Cintas P, Garrouste C, Uro-Coste E, Cointault O, et al. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am J Transplant.* 2010;10(5):1321-4.
4. Gerolami R, Moal V, Colson P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med.* 358. United States 2008. p. 859-60.
5. Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 10):2223-32.
6. Tsarev SA, Emerson SU, Tsareva TS, Yarbough PO, Lewis M, Govindarajan S, et al. Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *J Infect Dis.* 1993;167(6):1302-6.
7. Aggarwal R, Kamili S, Spelbring J, Krawczynski K. Experimental studies on subclinical hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques. *J Infect Dis.* 2001;184(11):1380-5.
8. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology.* 1983;20(1):23-31.
9. Krawczynski K, Meng XJ, Rybczynska J. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. *Virus Res.* 2011;161(1):78-83.
10. Li S, Tang X, Seetharaman J, Yang C, Gu Y, Zhang J, et al. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction. *PLoS Pathog.* 2009;5(8):e1000537.
11. Li S, Zhang J, Xia N. Lessons from hepatitis E vaccine design. *Curr Opin Virol.* 2015;11:130-6.
12. Feng Z, Lemon SM. Peek-a-boo: membrane hijacking and the pathogenesis of viral hepatitis. *Trends Microbiol.* 2014;22(2):59-64.
13. Wang Y, Zhao C, Qi Y, Geng Y. Hepatitis E Virus. *Adv Exp Med Biol.* 2016;948:1-16.
14. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology.* 1991;185(1):120-31.
15. Purdy MA, Tam AW, Huang C-C, Yarbough PO, Reyes GR. Hepatitis E virus: a non-enveloped member of the 'alpha-like' RNA virus supergroup? *Seminars in Virology.* 1993;4(5):319-26.
16. Meng XJ. Expanding Host Range and Cross-Species Infection of Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.* 2016;12(8):e1005695.
17. Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol.* 2006;80(12):5919-26.
18. Khuroo MS. Hepatitis E: an emerging global disease - from discovery towards control and cure. *J Viral Hepat.* 2016;23(2):68-79.
19. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of

- hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(17):8259-63.
20. Emerson SU, Zhang M, Meng XJ, Nguyen H, St Claire M, Govindarajan S, et al. Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: importance of capping and discovery of a cis-reactive element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(26):15270-5.
  21. Zhang M, Purcell RH, Emerson SU. Identification of the 5' terminal sequence of the SAR-55 and MEX-14 strains of hepatitis E virus and confirmation that the genome is capped. *J Med Virol*. 2001;65(2):293-5.
  22. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006;314(5801):997-1001.
  23. Karpe YA, Lole KS. Deubiquitination activity associated with hepatitis E virus putative papain-like cysteine protease. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 9):2088-92.
  24. Paliwal D, Panda SK, Kapur N, Varma SP, Durgapal H. Hepatitis E virus (HEV) protease: a chymotrypsin-like enzyme that processes both non-structural (pORF1) and capsid (pORF2) protein. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 8):1689-700.
  25. Karpe YA, Lole KS. NTPase and 5' to 3' RNA duplex-unwinding activities of the hepatitis E virus helicase domain. *J Virol*. 2010;84(7):3595-602.
  26. Agrawal S, Gupta D, Panda SK. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Virology*. 2001;282(1):87-101.
  27. Purdy MA, Lara J, Khudyakov YE. The hepatitis E virus polyproline region is involved in viral adaptation. *PLoS One*. 2012;7(4):e35974.
  28. Jameel S, Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J Virol*. 1996;70(1):207-16.
  29. Vitral CL, da Silva-Nunes M, Pinto MA, de Oliveira JM, Gaspar AM, Pereira RC, et al. Hepatitis A and E seroprevalence and associated risk factors: a community-based cross-sectional survey in rural Amazonia. *BMC Infect Dis*. 2014;14:458.
  30. Mittal S, Sada YH, El-Serag HB, Kanwal F, Duan Z, Temple S, et al. Temporal trends of nonalcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma in the veteran affairs population. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(3):594-601.e1.
  31. Jang JW, Choi JY, Kim YS, Woo HY, Choi SK, Lee CH, et al. Long-term effect of antiviral therapy on disease course after decompensation in patients with hepatitis B virus-related cirrhosis. *Hepatology*. 2015;61(6):1809-20.
  32. Torresi J, Li F, Locarnini SA, Anderson DA. Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells. *J Gen Virol*. 1999;80 ( Pt 5):1185-8.
  33. Gonwong S, Chuenchitra T, Khantapura P, Islam D, Sirisopana N, Mason CJ. Pork consumption and seroprevalence of hepatitis E virus, Thailand, 2007-2008. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(9):1531-4.
  34. Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol*. 1997;71(12):9045-53.
  35. Holla RP, Ahmad I, Ahmad Z, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis*. 2013;33(1):3-14.
  36. Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res*. 2011;161(1):47-58.
  37. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, et al. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 12):2838-48.
  38. Johne R, Dremsek P, Reetz J, Heckel G, Hess M, Ulrich RG. Hepeviridae: an expanding family of vertebrate viruses. *Infect Genet Evol*. 2014;27:212-29.

39. Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol*. 2001;82(Pt 10):2449-62.
40. Batts W, Yun S, Hedrick R, Winton J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res*. 2011;158(1-2):116-23.
41. International Committee on Taxonomy of Viruses [cited 2016 October 14]. Available from: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>;
42. Smith DB, Simmonds P, International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study G, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 10):2223-32.
43. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses*. 2016;8(10).
44. Abravanel F, Lhomme S, Rostaing L, Kamar N, Izopet J. Protracted fecal shedding of HEV during ribavirin therapy predicts treatment relapse. *Clin Infect Dis*. 2015;60(1):96-9.
45. Laperche S, Izopet J, Lefrère JJ. Safety measures to prevent hepatitis E virus transmission by blood transfusion. *Transfusion*. 2014;54(8):2134-5.
46. Elefsiniotis I, Vezali E, Vrachatis D, Hatzianastasiou S, Pappas S, Farmakidis G, et al. Post-partum reactivation of chronic hepatitis B virus infection among hepatitis B e-antigen-negative women. *World J Gastroenterol*. 2015;21(4):1261-7.
47. Gorham MW, Smith CR, Smith SK, Wong L, Kreze O. Vaccinations in sickle cell disease: An audit of vaccination uptake in sickle cell patients attending Newham University Hospital. *Vaccine*. 2015;33(38):5005-11.
48. Chen H, Gao N, Wu J, Zheng X, Li J, Fan D, et al. Variable effects of the co-administration of a GM-CSF-expressing plasmid on the immune response to flavivirus DNA vaccines in mice. *Immunol Lett*. 2014;162(1 Pt A):140-8.
49. Oshiro Y, Yasue H, Takahashi K, Hattori S, Ideno S, Urayama T, et al. Mode of swine hepatitis E virus infection and replication in primary human hepatocytes. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 12):2677-82.
50. Brouwer WP, Sonneveld MJ, Tabak F, Simon K, Cakaloglu Y, Akarca US, et al. Polymorphisms of HLA-DP are associated with response to peginterferon in Caucasian patients with chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(7):811-8.
51. Liu C, Chen S, Wang X, Chen Y, Tang N. 15d-PGJ<sub>2</sub> decreases PGE<sub>2</sub> synthesis in HBx-positive liver cells by interfering EGR1 binding to mPGES-1 promoter. *Biochem Pharmacol*. 2014;91(3):337-47.
52. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, et al. HLA-DP genes polymorphisms associate with hepatitis B surface antigen kinetics and seroclearance during nucleos(t)ide analogue therapy. *Liver Int*. 2015;35(4):1290-302.
53. Fuse K, Matsuyama Y, Moriyama M, Miyakoshi S, Shibasaki Y, Takizawa J, et al. Late onset post-transfusion hepatitis E developing during chemotherapy for acute promyelocytic leukemia. *Intern Med*. 2015;54(6):657-61.
54. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Sandres-Saune K, Mansuy JM, Rostaing L, et al. Characterization of the polyproline region of the hepatitis E virus in immunocompromised patients. *J Virol*. 2014;88(20):12017-25.
55. Li J, Huang B, Li Y, Zheng D, Zhou Z, Liu J. Hepatitis B virus reactivation in patients with multiple myeloma receiving bortezomib-containing regimens followed by autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(6):1710-7.
56. Lee TY, Lin JT, Zeng YS, Chen YJ, Wu MS, Wu CY. Association between nucleos(t)ide analog and tumor recurrence in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Hepatology*. 2016;63(5):1517-27.

57. El Bouzidi K, Elamin W, Kranzer K, Irish DN, Ferns B, Kennedy P, et al. Hepatitis delta virus testing, epidemiology and management: a multicentre cross-sectional study of patients in London. *J Clin Virol.* 2015;66:33-7.
58. Johne R, Heckel G, Plenge-Bonig A, Kindler E, Maresch C, Reetz J, et al. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(9):1452-5.
59. Raj VS, Smits SL, Pas SD, Provacia LB, Moorman-Roest H, Osterhaus AD, et al. Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1369-70.
60. Purcell RH, Engle RE, Rood MP, Kabrane-Lazizi Y, Nguyen HT, Govindarajan S, et al. Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(12):2216-22.
61. Cossaboom CM, Cordoba L, Sanford BJ, Pineyro P, Kenney SP, Dryman BA, et al. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt 8):1687-95.
62. Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbinati R, et al. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol.* 2012;86(17):9134-47.
63. Debing Y, Moradpour D, Neyts J, Gouttenoire J. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *J Hepatol.* 2016.
64. Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3040-6.
65. Kapur N, Thakral D, Durgapal H, Panda SK. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J Viral Hepat.* 2012;19(6):436-48.
66. Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol.* 2009;83(24):12714-24.
67. Holla P, Ahmad I, Ahmed Z, Jameel S. Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic.* 2015;16(4):398-416.
68. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, et al. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 10):2166-75.
69. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, et al. Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1112-25.
70. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology.* 2012;55(4):988-97.
71. Aggarwal R. The global prevalence of hepatitis E virus infection and susceptibility: a systematic review.: Geneva: World Health Organization; 2010; 2010 [Available from: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO\\_IVB\\_10.14\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO_IVB_10.14_eng.pdf)].
72. Yugo DM, Meng XJ. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(10):4507-33.
73. Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E. *Hepatology.* 2011;54(6):2218-26.
74. Aggarwal R. Hepatitis e: epidemiology and natural history. *J Clin Exp Hepatol.* 2013;3(2):125-33.
75. Goel A, Aggarwal R. Advances in hepatitis E- II: Epidemiology, clinical manifestations, treatment and prevention. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016.
76. Dalton HR, Hunter JG, Bendall RP. Hepatitis E. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(5):471-8.

77. Velazquez O, Stetler HC, Avila C, Ornelas G, Alvarez C, Hadler SC, et al. Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987. *Jama*. 1990;263(24):3281-5.
78. Khuroo MS. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res*. 2011;161(1):3-14.
79. Geng Y, Wang Y. Transmission of Hepatitis E Virus. *Adv Exp Med Biol*. 2016;948:89-112.
80. Naik SR, Aggarwal R, Salunke PN, Mehrotra NN. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull World Health Organ*. 1992;70(5):597-604.
81. Aggarwal R. Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res*. 2011;161(1):15-22.
82. Singh A, Seth R, Gupta A, Shalimar, Nayak B, Acharya SK, et al. Chronic hepatitis E - an emerging disease in an immunocompromised host. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2016.
83. Khuroo MS, Teli MR, Skidmore S, Sofi MA, Khuroo MI. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med*. 1981;70(2):252-5.
84. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet*. 1995;345(8956):1025-6.
85. Aggarwal R, Kini D, Sofat S, Naik SR, Krawczynski K. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet*. 356. England2000. p. 1081-2.
86. Ramdasi AY, Arya RP, Arankalle VA. Effect of pregnancy on anti-HEV antibody titres, plasma cytokines and the corresponding gene expression levels in the PBMCs of patients presenting with self-recovering clinical and subclinical hepatitis E. *PLoS One*. 2014;9(8):e103257.
87. Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, et al. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol*. 1998;143(7):1405-15.
88. Dalton HR, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E in developed countries: current status and future perspectives. *Future Microbiol*. 2014;9(12):1361-72.
89. Backer JA, Berto A, McCreary C, Martelli F, van der Poel WH. Transmission dynamics of hepatitis E virus in pigs: estimation from field data and effect of vaccination. *Epidemics*. 2012;4(2):86-92.
90. Hillen ME, Cook SD, Samanta A, Grant E, Quinless JR, Rajasingham JK. Fatal acute liver failure with hepatitis B virus infection during natalizumab treatment in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015;2(2):e72.
91. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. 2003;362(9381):371-3.
92. Dalton HR, Stableforth W, Thurairajah P, Hazeldine S, Remnarace R, Usama W, et al. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20(8):784-90.
93. Anty R, Ollier L, Peron JM, Nicand E, Cannavo I, Bongain A, et al. First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. *J Clin Virol*. 2012;54(1):76-8.
94. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Peron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2008;358(8):811-7.
95. Geng Y, Zhang H, Huang W, T JH, Geng K, Li Z, et al. Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Hepat Mon*. 2014;14(1):e15618.
96. Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, Pahl S, Ramez B, Kruger DH, et al. Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol*. 2012;56(2):500-2.



97. Koenecke C, Pischke S, Beutel G, Ritter U, Ganser A, Wedemeyer H, et al. Hepatitis E virus infection in a hematopoietic stem cell donor. *Bone Marrow Transplant.* 49. England 2014. p. 159-60.
98. Kodani M, Mixson-Hayden T, Drobeniuc J, Kamili S. Rapid and sensitive approach to simultaneous detection of genomes of hepatitis A, B, C, D and E viruses. *J Clin Virol.* 2014;61(2):260-4.
99. Erker JC, Desai SM, Schlauder GG, Dawson GJ, Mushahwar IK. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol.* 1999;80 ( Pt 3):681-90.
100. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, et al. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol.* 1998;72(12):9714-21.
101. Renou C, Roque-Afonso AM, Afonso AM, Pavio N. Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1945-7.
102. Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(12):1958-60.
103. Lee GH, Tan BH, Chi-Yuan Teo E, Lim SG, Dan YY, Wee A, et al. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology.* 2016;150(2):355-7.e3.
104. Galun D, Basaric D, Zuvella M, Bulajic P, Bogdanovic A, Bidzic N, et al. Hepatocellular carcinoma: From clinical practice to evidence-based treatment protocols. *World J Hepatol.* 2015;7(20):2274-91.
105. Hewitt PE, Ijaz S, Brailsford SR, Brett R, Dicks S, Haywood B, et al. Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet.* 2014;384(9956):1766-73.
106. García-Comas L, Ordobás M, Sanz JC, Ramos B, Arce A, Barranco D. [Population study of seroprevalence of antibodies against hepatitis A virus in the Community of Madrid, 2008-2009]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34(1):33-8.
107. Murali AR, Kotwal V, Chawla S. Chronic hepatitis E: A brief review. *World J Hepatol.* 2015;7(19):2194-201.
108. Luca AS, Dorobăț C, Ursu RG, Luca MC, Vâță A, Iancu LS. Epidemiological and laboratory features of chronic hepatitis B cases in the interval 2010-2013. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2014;118(2):479-84.
109. Casanova YS, Boeira TaR, Sisti E, Celmer Á, Fonseca AS, Ikuta N, et al. A complete molecular biology assay for hepatitis C virus detection, quantification and genotyping. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(3):287-94.
110. Li TC, Kataoka M, Takahashi K, Yoshizaki S, Kato T, Ishii K, et al. Generation of hepatitis E virus-like particles of two new genotypes G5 and G6 and comparison of antigenic properties with those of known genotypes. *Vet Microbiol.* 2015;178(1-2):150-7.
111. Fernández-Rodríguez A, Berenguer J, Rallón N, Jiménez-Sousa MA, López JC, Soriano V, et al. PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala polymorphism is associated with sustained virological response in HIV/HCV-coinfected patients under HCV therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2014;67(2):113-9.
112. Ghaleh Baghi S, Alavian SM, Mehrnoush L, Salimi S. Impact of the IL-10 Promoter Gene Polymorphisms in the Severity of Chronic Hepatitis B Infection. *Hepat Mon.* 2015;15(7):e28287.
113. Wu C, Dunn W. Is it worthy of switching to PegIFN alfa-2a in patients achieving virological suppression with entecavir? *J Hepatol.* 2015;62(6):1439-40.
114. Utsunomiya T, Shimada M, Kudo M, Ichida T, Matsui O, Izumi N, et al. A comparison of the surgical outcomes among patients with HBV-positive, HCV-positive, and

- non-B non-C hepatocellular carcinoma: a nationwide study of 11,950 patients. *Ann Surg.* 2015;261(3):513-20.
115. Vitral CL, Yoshida CF, Gaspar AM. The use of non-human primates as animal models for the study of hepatitis viruses. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(8):1035-48.
116. Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):256-65.
117. Yamamoto H, Suzuki J, Matsuda A, Ishida T, Ami Y, Suzaki Y, et al. Hepatitis E virus outbreak in monkey facility, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(12):2032-4.
118. Krawczynski K, Bradley DW. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *J Infect Dis.* 1989;159(6):1042-9.
119. Bradley DW, Krawczynski K, Cook EH, Jr., McCaustland KA, Humphrey CD, Spelbring JE, et al. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm viruslike particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(17):6277-81.
120. Purcell RH, Emerson SU. Animal models of hepatitis A and E. *Ilar j.* 2001;42(2):161-77.
121. de Carvalho LG, Marchevsky RS, dos Santos DR, de Oliveira JM, de Paula VS, Lopes LM, et al. Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. *BMC Infect Dis.* 2013;13:495.
122. Huang F, Yang C, Zhou X, Yu W, Pan Q. Rhesus macaques persistently infected with hepatitis E shed virus into urine. *J Hepatol.* 2016.
123. Liu P, Bu QN, Wang L, Han J, Du RJ, Lei YX, et al. Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(4):559-65.
124. Huang FF, Sun ZF, Emerson SU, Purcell RH, Shivaprasad HL, Pierson FW, et al. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 6):1609-18.
125. Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yang T, Takeda N, et al. Monkeys and Rats Are Not Susceptible to Ferret Hepatitis E Virus Infection. *Intervirology.* 2015;58(3):139-42.
126. Li TC, Suzaki Y, Ami Y, Dhole TN, Miyamura T, Takeda N. Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine.* 2004;22(3-4):370-7.
127. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(18):9860-5.
128. Halbur PG, Kasorndorkbua C, Gilbert C, Guenette D, Potters MB, Purcell RH, et al. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):918-23.
129. Cheng X, Wang S, Dai X, Shi C, Wen Y, Zhu M, et al. Rabbit as a novel animal model for hepatitis E virus infection and vaccine evaluation. *PLoS One.* 2012;7(12):e51616.
130. Han J, Lei Y, Liu L, Liu P, Xia J, Zhang Y, et al. SPF rabbits infected with rabbit hepatitis E virus isolate experimentally showing the chronicity of hepatitis. *PLoS One.* 2014;9(6):e99861.
131. Xia J, Liu L, Wang L, Zhang Y, Zeng H, Liu P, et al. Experimental infection of pregnant rabbits with hepatitis E virus demonstrating high mortality and vertical transmission. *J Viral Hepat.* 2015;22(10):850-7.
132. Ma H, Zheng L, Liu Y, Zhao C, Harrison TJ, Ma Y, et al. Experimental infection of rabbits with rabbit and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses. *PLoS One.* 2010;5(2):e9160.

133. Liu L, Wang L, Xia J, Zhang Y, Zeng H, Liu P, et al. Mix-breeding with HEV-infected swine induced inapparent HEV infection in SPF rabbits. *J Med Virol.* 2016;88(4):681-5.
134. Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzuki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, et al. Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet Microbiol.* 2013;163(1-2):54-61.
135. Maneerat Y, Clayson ET, Myint KS, Young GD, Innis BL. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol.* 1996;48(2):121-8.
136. Zeng LY, Lian JS, Chen JY, Jia HY, Zhang YM, Xiang DR, et al. Hepatitis B surface antigen levels during natural history of chronic hepatitis B: a Chinese perspective study. *World J Gastroenterol.* 2014;20(27):9178-84.
137. Allweiss L, Gass S, Giersch K, Groth A, Kah J, Volz T, et al. Human liver chimeric mice as a new model of chronic hepatitis E virus infection and preclinical drug evaluation. *J Hepatol.* 2016;64(5):1033-40.
138. Shukla P, Nguyen HT, Torian U, Engle RE, Faulk K, Dalton HR, et al. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(6):2438-43.
139. Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 3):903-11.
140. Tanaka T, Takahashi M, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, Nagashima S, et al. Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1906-10.
141. Shukla P, Nguyen HT, Faulk K, Mather K, Torian U, Engle RE, et al. Adaptation of a Genotype 3 Hepatitis E Virus to Efficient Growth in Cell Culture Depends on an Inserted Human Gene Segment Acquired by Recombination. *Journal of Virology.* 2012;86(10):5697-707.
142. Rogee S, Talbot N, Caperna T, Bouquet J, Barnaud E, Pavio N. New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *J Gen Virol.* 2013;94(Pt 3):549-58.
143. Helsen N, Debing Y, Paeshuyse J, Dallmeier K, Boon R, Coll M, et al. Stem cell-derived hepatocytes: A novel model for hepatitis E virus replication. *J Hepatol.* 2016;64(3):565-73.
144. Huang YW, Haqshenas G, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Emerson SU, Meng XJ. Capped RNA Transcripts of Full-Length cDNA Clones of Swine Hepatitis E Virus Are Replication Competent When Transfected into Huh7 Cells and Infectious When Intrahepatically Inoculated into Pigs. *Journal of Virology.* 2005;79(3):1552-8.
145. Chauhan A, Jameel S, Dilawari JB, Chawla YK, Kaur U, Ganguly NK. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet.* 1993;341(8838):149-50.
146. Aggarwal R, Goel A. Advances in hepatitis E - I: Virology, pathogenesis and diagnosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016.
147. Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology.* 2012;142(6):1388-97.e1.
148. Hartl J, Wehmeyer MH, Pischke S. Acute Hepatitis E: Two Sides of the Same Coin. *Viruses.* 2016;8(11).
149. Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, et al. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One.* 2010;5(10):e13560.
150. Dalton HR, Webb GW, Norton BC, Woolson KL. Hepatitis E Virus: Time to Change the Textbooks. *Dig Dis.* 2016;34(4):308-16.

151. Arankalle VA, Ticehurst J, Sreenivasan MA, Kapikian AZ, Popper H, Pavri KM, et al. Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet*. 1988;1(8585):550-4.
152. Ticehurst J, Rhodes LL, Jr., Krawczynski K, Asher LV, Engler WF, Mensing TL, et al. Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *J Infect Dis*. 1992;165(5):835-45.
153. Grimm D, Heeg M, Thimme R. Hepatitis B virus: from immunobiology to immunotherapy. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(2):77-85.
154. Majumdar M, Ratho RK, Chawla Y, Singh MP. Role of TLR gene expression and cytokine profiling in the immunopathogenesis of viral hepatitis E. *J Clin Virol*. 2015;73:8-13.
155. Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Esposito L, Cardeau-Desangles I, et al. Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis*. 2010;50(5):e30-3.
156. Todt D, Francois C, Anggakusuma, Behrendt P, Engelmann M, Knegendorf L, et al. Antiviral Activities of Different Interferon Types and Subtypes against Hepatitis E Virus Replication. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2132-9.
157. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:513-45.
158. Xu L, Wang W, Li Y, Zhou X, Yin Y, Wang Y, et al. RIG-I Is A Key Antiviral Interferon-Stimulated Gene Against Hepatitis E Virus Dispensable Of Interferon Production. *Hepatology*. 2017.
159. Srivastava R, Aggarwal R, Jameel S, Puri P, Gupta VK, Ramesh VS, et al. Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. *Viral Immunol*. 2007;20(1):56-65.
160. Srivastava R, Aggarwal R, Bhagat MR, Chowdhury A, Naik S. Alterations in natural killer cells and natural killer T cells during acute viral hepatitis E. *J Viral Hepat*. 2008;15(12):910-6.
161. Prabhu SB, Gupta P, Durgapal H, Rath S, Gupta SD, Acharya SK, et al. Study of cellular immune response against Hepatitis E virus (HEV). *J Viral Hepat*. 2011;18(8):587-94.
162. Yu C, Boon D, McDonald SL, Myers TG, Tomioka K, Nguyen H, et al. Pathogenesis of hepatitis E virus and hepatitis C virus in chimpanzees: similarities and differences. *J Virol*. 2010;84(21):11264-78.
163. Malcolm P, Dalton H, Hussaini HS, Mathew J. The histology of acute autochthonous hepatitis E virus infection. *Histopathology*. 2007;51(2):190-4.
164. Zhou Y. Immunobiology and Host Response to HEV. *Adv Exp Med Biol*. 2016;948:113-41.
165. Sehgal R, Patra S, David P, Vyas A, Khanam A, Hissar S, et al. Impaired monocyte-macrophage functions and defective Toll-like receptor signaling in hepatitis E virus-infected pregnant women with acute liver failure. *Hepatology*. 2015;62(6):1683-96.
166. Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, Grabowski J, Fytilli P, Gronert A, et al. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology*. 2012;55(3):695-708.
167. Favorov MO, Khudyakov YE, Mast EE, Yashina TL, Shapiro CN, Khudyakova NS, et al. IgM and IgG antibodies to hepatitis E virus (HEV) detected by an enzyme immunoassay based on an HEV-specific artificial recombinant mosaic protein. *J Med Virol*. 1996;50(1):50-8.
168. Favorov MO, Fields HA, Purdy MA, Yashina TL, Aleksandrov AG, Alter MJ, et al. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol*. 1992;36(4):246-50.

169. Gu G, Huang H, Zhang L, Bi Y, Hu Y, Zhou YH. Hepatitis E virus seroprevalence in pregnant women in Jiangsu, China, and postpartum evolution during six years. *BMC Infect Dis.* 2015;15:560.
170. Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, Yao X, et al. Protection against hepatitis E virus infection by naturally acquired and vaccine-induced immunity. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(6):O397-405.
171. Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy JM, Muscari F, Sallusto F, et al. Hepatitis E virus reinfections in solid-organ-transplant recipients can evolve into chronic infections. *J Infect Dis.* 2014;209(12):1900-6.
172. Emerson SU, Purcell RH. Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends Mol Med.* 2001;7(10):462-6.
173. Engle RE, Yu C, Emerson SU, Meng XJ, Purcell RH. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2002;40(12):4576-80.
174. Arankalle VA, Lole KS, Deshmukh TM, Chobe LP, Gandhe SS. Evaluation of human (genotype 1) and swine (genotype 4)-ORF2-based ELISAs for anti-HEV IgM and IgG detection in an endemic country and search for type 4 human HEV infections. *J Viral Hepat.* 2007;14(6):435-45.
175. Zhang J, Ge SX, Huang GY, Li SW, He ZQ, Wang YB, et al. Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model. *J Med Virol.* 2003;71(4):518-26.
176. Boccia D, Guthmann JP, Klovstad H, Hamid N, Tatay M, Ciglenecki I, et al. High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. *Clin Infect Dis.* 2006;42(12):1679-84.
177. John L, Thomas S, Herchenroder O, Putzer BM, Schaefer S. Hepatitis E virus ORF2 protein activates the pro-apoptotic gene CHOP and anti-apoptotic heat shock proteins. *PLoS One.* 2011;6(9):e25378.
178. Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses.* 2016;8(8).
179. Smith DB, Simmonds P. Hepatitis E virus and fulminant hepatitis--a virus or host-specific pathology? *Liver Int.* 2015;35(4):1334-40.
180. Kamar N, Abravanel F, Selves J, Garrouste C, Esposito L, Lavayssiere L, et al. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation.* 2010;89(3):353-60.
181. Kamar N, Rostaing L, Legrand-Abravanel F, Izopet J. How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? *Am J Transplant.* 2013;13(7):1935-6.
182. Geng Y, Zhao C, Huang W, Harrison TJ, Zhang H, Geng K, et al. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *J Hepatol.* 2016;64(1):37-43.
183. Behrendt P, Steinmann E, Manns MP, Wedemeyer H. The impact of hepatitis E in the liver transplant setting. *J Hepatol.* 2014;61(6):1418-29.
184. Rodriguez-Peralvarez M, Germani G, Darius T, Lerut J, Tsochatzis E, Burroughs AK. Tacrolimus trough levels, rejection and renal impairment in liver transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant.* 2012;12(10):2797-814.
185. Ozawa T. Effects of FK506 on Ca release channels (review). *Perspect Medicin Chem.* 2008;2:51-5.
186. Therivet E, Zuber J, Sberro R, Canaud G, Anglicheau D, Snanoudj R, et al. [Immunosuppressive treatments: mechanisms of action and clinical use]. *Nephrol Ther.* 2011;7(7):566-81.
187. McAlister VC, Haddad E, Renouf E, Malthaner RA, Kjaer MS, Gluud LL. Cyclosporin versus tacrolimus as primary immunosuppressant after liver transplantation: a meta-analysis. *Am J Transplant.* 2006;6(7):1578-85.

188. Wang Y, Zhou X, Debing Y, Chen K, Van Der Laan LJ, Neyts J, et al. Calcineurin inhibitors stimulate and mycophenolic acid inhibits replication of hepatitis E virus. *Gastroenterology*. 2014;146(7):1775-83.
189. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med*. 361. United States 2009. p. 1025-7.
190. Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Garrouste C, Dubois M, Mansuy JM, et al. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis*. 2010;202(6):835-44.
191. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(1):116-38.
192. Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C, Barg-Hock H, Heim A, Kamar N, et al. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2010;16(1):74-82.
193. Protzer U, Böhm F, Longerich T, Seebach J, Heidary Navid M, Friemel J, et al. Molecular detection of hepatitis E virus (HEV) in liver biopsies after liver transplantation. *Mod Pathol*. 2015;28(4):523-32.
194. Pischke S, Stiefel P, Franz B, Bremer B, Suneetha PV, Heim A, et al. Chronic hepatitis e in heart transplant recipients. *Am J Transplant*. 2012;12(11):3128-33.
195. Cheung MC, Maguire J, Carey I, Wendon J, Agarwal K. Review of the neurological manifestations of hepatitis E infection. *Ann Hepatol*. 2012;11(5):618-22.
196. Kamar N, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Dalton HR. Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus. *Liver Int*. 2016;36(4):467-72.
197. Aggarwal R. Diagnosis of hepatitis E. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(1):24-33.
198. Myint KS, Endy TP, Shrestha MP, Shrestha SK, Vaughn DW, Innis BL, et al. Hepatitis E antibody kinetics in Nepalese patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100(10):938-41.
199. Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Peron JM, Alric L, Rostaing L, et al. Performance of a new rapid test for detecting anti-hepatitis E virus immunoglobulin M in immunocompetent and immunocompromised patients. *J Clin Virol*. 2015;70:101-4.
200. Fogeda M, de Ory F, Avellon A, Echevarria JM. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol*. 2009;45(3):259-61.
201. Myint KS, Guan M, Chen HY, Lu Y, Anderson D, Howard T, et al. Evaluation of a new rapid immunochromatographic assay for serodiagnosis of acute hepatitis E infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(5):942-6.
202. Robbins A, Lambert D, Ehrhard F, Brodard V, Hentzien M, Lebrun D, et al. Severe acute hepatitis E in an HIV infected patient: Successful treatment with ribavirin. *J Clin Virol*. 2014;60(4):422-3.
203. Kamar N, Izopet J, Tripon S, Bismuth M, Hillaire S, Dumortier J, et al. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1111-20.
204. Debing Y, Emerson SU, Wang Y, Pan Q, Balzarini J, Dallmeier K, et al. Ribavirin inhibits in vitro hepatitis E virus replication through depletion of cellular GTP pools and is moderately synergistic with alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):267-73.
205. Dao Thi VL, Debing Y, Wu X, Rice CM, Neyts J, Moradpour D, et al. Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Additive Effect When Combined With Ribavirin. *Gastroenterology*. 2016;150(1):82-5.e4.

206. Barnaud E, Rogee S, Garry P, Rose N, Pavio N. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(15):5153-9.
207. Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 3):912-7.
208. Zhou YH, Purcell RH, Emerson SU. A truncated ORF2 protein contains the most immunogenic site on ORF2: antibody responses to non-vaccine sequences following challenge of vaccinated and non-vaccinated macaques with hepatitis E virus. *Vaccine.* 2005;23(24):3157-65.
209. Zhang J, Shih JW, Xia NS. Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine. *N Engl J Med.* 2015;372(23):2265-6.
210. dos Santos DR, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol.* 2011;149(1-2):236-41.
211. Gardinali NR, Barry AF, da Silva PF, de Souza C, Alfieri AF, Alfieri AA. Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds. *Res Vet Sci.* 2012;93(3):1515-9.
212. de Souza AJ, Gomes-Gouveia MS, Soares Mdo C, Pinho JR, Malheiros AP, Carneiro LA, et al. HEV infection in swine from Eastern Brazilian Amazon: evidence of co-infection by different subtypes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012;35(5):477-85.
213. Trinta KS, Liberto MI, de Paula VS, Yoshida CF, Gaspar AM. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(1):25-9.
214. Silva SM, Oliveira JM, Vitral CL, Vieira Kde A, Pinto MA, Souto FJ. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(3):338-41.
215. Vitral CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, dos Santos DR, Gaspar AM. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(2):117-22.
216. Passos AM, Heringer TP, Medina-Pestana JO, Ferraz ML, Granato CF. First report and molecular characterization of hepatitis E virus infection in renal transplant recipients in Brazil. *J Med Virol.* 2013;85(4):615-9.
217. Hering T, Passos AM, Perez RM, Bilar J, Fragano D, Granato C, et al. Past and current hepatitis E virus infection in renal transplant patients. *J Med Virol.* 2014;86(6):948-53.
218. Passos-Castilho AM, Porta G, Miura IK, Pugliese RP, Danesi VL, Porta A, et al. Chronic hepatitis E virus infection in a pediatric female liver transplant recipient. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4425-7.
219. Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MF, de Sousa PS, Gaspar AM, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol.* 2010;47(3):276-9.
220. Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, et al. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res.* 2007;37(2):113-20.
221. Kinugasa F, Nagatomi I, Ishikawa H, Nakanishi T, Maeda M, Hirose J, et al. Efficacy of oral treatment with tacrolimus in the renal transplant model in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Sci.* 2008;108(4):529-34.
222. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods.* 2006;131(1):65-71.

223. Wang Y, Ling R, Erker JC, Zhang H, Li H, Desai S, et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol.* 1999;80 ( Pt 1):169-77.
224. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, et al. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1326-32.
225. Freitas NR, Santana EB, Silva AM, Silva SM, Teles SA, Gardinali NR, et al. Hepatitis E virus infection in patients with acute non-A, non-B, non-C hepatitis in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016:0.
226. dos Santos DR, Vitral CL, de Paula VS, Marchevsky RS, Lopes JF, Gaspar AM, et al. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J.* 2009;182(3):474-80.
227. da Costa Lana MV, Gardinali NR, da Cruz RA, Lopes LL, Silva GS, Caramori Junior JG, et al. Evaluation of hepatitis E virus infection between different production systems of pigs in Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2014;46(2):399-404.
228. Matthews KA, Tonsho M, Madsen JC. New-Onset Diabetes Mellitus After Transplantation in a *Cynomolgus* Macaque (*Macaca fascicularis*). *Comp Med.* 2015;65(4):352-6.
229. Kisu I, Mihara M, Banno K, Hara H, Masugi Y, Araki J, et al. Uterus allotransplantation in cynomolgus macaque: a preliminary experience with non-human primate models. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40(4):907-18.
230. Mahalingam R, Traina-Dorge V, Wellish M, Deharo E, Singletary ML, Ribka EP, et al. Latent simian varicella virus reactivates in monkeys treated with tacrolimus with or without exposure to irradiation. *J Neurovirol.* 2010;16(5):342-54.
231. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Sandres-Saune K, Rostaing L, Kamar N, et al. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J Virol.* 2012;86(18):10006-14.
232. Haagsma EB, Niesters HG, van den Berg AP, Riezebos-Brilman A, Porte RJ, Vennema H, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2009;15(10):1225-8.
233. Krogsgaard K, Wantzin P, Mathiesen L, Ring-Larsen H. Chronic evolution of acute hepatitis B: the significance of simultaneous infections with hepatitis C and D. Copenhagen Hepatitis Acuta Programme. *Scand J Gastroenterol.* 1991;26(3):275-80.
234. Ciftci HS, Ayna TK, Caliskan YK, Turkmen A, Gurtekin M. Lipid parameters, doses and blood levels of calcineurin inhibitors in renal transplant patients. *Indian J Clin Biochem.* 2013;28(2):164-8.
235. Chin JL, Hisamuddin SH, O'Sullivan A, Chan G, McCormick PA. Thrombocytopenia, Platelet Transfusion, and Outcome Following Liver Transplantation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2016;22(4):351-60.
236. Diaz GC, Prowda J, Lo IJ, Arepally GM, Evans N, Wheelless Y, et al. Transplantation-mediated alloimmune thrombocytopenia: Guidelines for utilization of thrombocytopenic donors. *Liver Transpl.* 2008;14(12):1803-9.
237. Arai K, Kuramitsu K, Fukumoto T, Kido M, Takebe A, Tanaka M, et al. A Case Report of Drug-Induced Thrombocytopenia after Living Donor Liver Transplantation. *Kobe J Med Sci.* 2016;62(1):E9-e12.
238. Colson P, Payraudeau E, Leonnet C, De Montigny S, Villeneuve L, Motte A, et al. Severe thrombocytopenia associated with acute hepatitis E virus infection. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2450-2.
239. Fourquet E, Mansuy JM, Bureau C, Recher C, Vinel JP, Izopet J, et al. Severe thrombocytopenia associated with acute autochthonous hepatitis E. *J Clin Virol.* 48. Netherlands 2010. p. 73-4.



240. Han J, Zeng H, Wang L, Liu P, Liu L, Xia J, et al. Hepatitis E virus infection in farmed rabbits and swine in the Eastern Chinese city Lianyungang: showing no potential interspecies transmission. *J Med Virol*. 2014;86(11):1898-904.
241. Griffin SP, Nelson JE. Impact of a Clinical Solid Organ Transplant Pharmacist on Tacrolimus Nephrotoxicity, Therapeutic Drug Monitoring, and Institutional Revenue Generation in Adult Kidney Transplant Recipients. *Prog Transplant*. 2016.
242. Marchetti P, Navalesi R. The metabolic effects of cyclosporin and tacrolimus. *J Endocrinol Invest*. 2000;23(7):482-90.
243. Muduma G, Saunders R, Odeyemi I, Pollock RF. Systematic Review and Meta-Analysis of Tacrolimus versus Ciclosporin as Primary Immunosuppression After Liver Transplant. *PLOS ONE*. 2016;11(11):e0160421.
244. Bloom RD, Rao V, Weng F, Grossman RA, Cohen D, Mange KC. Association of hepatitis C with posttransplant diabetes in renal transplant patients on tacrolimus. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(5):1374-80.
245. Mirazo S, Mir D, Bello G, Ramos N, Musto H, Arbiza J. New insights into the hepatitis E virus genotype 3 phylodynamics and evolutionary history. *Infect Genet Evol*. 2016;43:267-73.
246. Zehender G, Ebranati E, Lai A, Luzzago C, Paladini S, Tagliacarne C, et al. Phylogeography and phylodynamics of European genotype 3 hepatitis E virus. *Infect Genet Evol*. 2014;25:138-43.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Anexo 1

Certificado de aprovação do uso de macacos cinomolgos no projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética  
no Uso de Animais**

### LICENÇA

**LW-17/13**

**Certificamos que o protocolo (P-35/12-5), intitulado "Estabelecimento do modelo de hepatite crônica pelo vírus da hepatite E (genótipo 3) em Macaca fascicularis", sob a responsabilidade de Marcelo Alves Pinto, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.**

**Esta licença tem validade até 25/03/2017 e inclui o uso total de :**

***Macaca fascicularis***  
**- 12 Machos.**

**Rio de Janeiro, 25 de março de 2013**

**Octavio Augusto França Presgrave**  
**Coordenador da CEUA**

## 9.2 Anexo 2

**Tabela 9.1 Regressão logística univariada em função da carga viral detectada nos soros dos animais.**

Variáveis	Odds ratio	Limite inferior	Limite superior	P valor	Significância	Análise multivariada	Nº de dados ausentes
<b>Sexo</b>	1,51E+14	0.634216164746198	3,60E+14	0.351240596308159		MANTER	0
<b>Idade (anos)</b>	0.890044368978547	0.730764346568836	1,08E+14	0.246926929578385		MANTER	0
<b>Peso (kg)</b>	0.999821834791002	0.999427452631835	1,00E+14	0.376061998447066		MANTER	0
<b>Temperatura (°C)</b>	0.93692518648934	0.511113856977847	1,72E+14	0.833110123781852		REMOVER	0
<b>IgA</b>	0.998684654386224	0.9975097580337	0.999860934566252	0.0284136193838572	*	MANTER	47
<b>IgG</b>	0.999725426337864	0.999096787768857	1,00E+14	0.392176604272688		MANTER	47
<b>IgM</b>	0.999816839532298	0.999617851647574	1,00E+14	0.0712745088216875		MANTER	47
<b>Concentração Tacrolimo</b>	1,10E+12	1,02E+14	1,19E+14	0.0106954733039029	*	MANTER	12
<b>Hematócrito</b>	0.988579426572327	0.900982855660873	1,08E+14	0.808285095639729		REMOVER	0
<b>Leucócitos</b>	0.99943166335531	0.996512179669431	1,00E+14	0.703291653638523		REMOVER	0
<b>Basófilos</b>	0.125069322757128	4320000	3,62E+14	0.784198251842217		REMOVER	5
<b>Eosinófilos</b>	0.978856850281078	0.83359864259049	1,15E+14	0.794290011511069		REMOVER	5
<b>Bastões</b>	0.595331966466354	0.0577152930526082	6,14E+14	0.663129075802021		REMOVER	5
<b>Segmentados</b>	0.999167573220502	0.995074852774128	1,00E+14	0.690881965294157		REMOVER	5
<b>Linfócitos</b>	0.997929156346562	0.98861216058821	1,01E+14	0.664908934415332		REMOVER	5
<b>Monócitos</b>	2,02E+14	2,07E+14	1,98E+13	0.00967544127432061	**	MANTER	5
<b>Plaquetas</b>	0.998966473382692	0.99419467676864	1,00E+12	0.67209368927347		REMOVER	0
<b>ALT</b>	1,05E+14	1,02E+14	1,08E+14	0.00227903050618103	**	MANTER	4
<b>AST</b>	1,04E+14	1,01E+14	1,07E+14	0.00300204209661879	**	MANTER	9
<b>TBILL</b>	0.000843646249306466	282000000	0.252497553027321	0.0149697676973788	*	MANTER	3
<b>GLU</b>	1,02E+14	1,00E+14	1,04E+14	0.0277192020997437	*	MANTER	5
<b>BUN</b>	1,03E+14	0.987267030948031	1,07E+14	0.187074190866688		MANTER	3
<b>CREA</b>	0.247343496230898	0.0420734170559773	1,45E+14	0.12217281705471		MANTER	2
<b>ALB</b>	0.888953334796494	0.438448483308349	1,80E+14	0.744113065832457		REMOVER	2
<b>CHOL</b>	0.977600871177566	0.962560686070308	0.99287606190196	0.00418657787250209	**	MANTER	2

□ não significativo; \*significativo; \*\* bastante significativo.

### 9.3 Anexo 3

Tabela 9.2 Regressão logística univariada em função da carga viral detectada nas fezes dos animais.

Variáveis	Odds ratio	Limite inferior	Limite superior	P valor	Significância	Análise multivariada	Nº de dados ausentes
<b>Sexo</b>	125.999.999.965.142	0.537080167323017	29.559.832.883.696	0.595275332141159		REMOVER	0
<b>Idade (anos)</b>	0.834595140743563	0.678415378180904	102.672.945.124.046	0.0871869547087485		MANTER	0
<b>Peso (kg)</b>	0.999770626515663	0.999370654318985	100.017.075.879.084	0.261168407467394		MANTER	0
<b>Temperatura (°C)</b>	0.967539424066234	0.532900002458921	175.667.579.809.137	0.913645319474916		REMOVER	0
<b>IgA</b>	0.999457546486564	0.998428118576649	100.048.803.578.668	0.302079467768227		MANTER	47
<b>IgG</b>	0.999777491895853	0.999151171705912	100.040.420.469.603	0.486424935380768		REMOVER	47
<b>IgM</b>	0.999888514252996	0.99970332226055	100.007.374.055.169	0.238109585489034		MANTER	47
<b>Concentração Tacrolimo</b>	110.364.979.059.527	103.043.727.800.794	118.206.404.822.205	0.00486074164289929	**	MANTER	12
<b>Hematócrito</b>	0.968587193222572	0.881800370939218	106.391.557.748.556	0.505163098346461		REMOVER	0
<b>Leucócitos</b>	0.999414673526526	0.995768728478336	100.307.396.797.495	0.753528743747825		REMOVER	0
<b>Basófilos</b>	0.00699342064840063	1,62E+05	302.672.304.618.368	0.524417541655423		REMOVER	5
<b>Eosinófilos</b>	0.8561573761802	0.269001947571278	272.490.760.533.821	0.792617126940713		REMOVER	5
<b>Bastões</b>	105.746.919.014.324	0.103372431393127	108.175.949.141.557	0.962434067250025		REMOVER	5
<b>Segmentados</b>	0.999140792465111	0.993965840188919	100.434.268.744.897	0.745609673441195		REMOVER	5
<b>Linfócitos</b>	0.997813406113217	0.985321260935731	101.046.392.977.833	0.733448264652058		REMOVER	5
<b>Monócitos</b>	116.708.251.194.611	153.613.283.280.338	886.695.187.163.409	0.017555280879234	*	MANTER	5
<b>Plaquetas</b>	0.999677099940899	0.994975715148176	100.440.069.936.523	0.89318465755755		REMOVER	0
<b>ALT</b>	105.120.319.435.498	101.976.681.555.103	108.360.866.324.622	0.00126611472044495	**	MANTER	4
<b>AST</b>	103.176.381.957.752	100.897.824.420.514	105.506.395.752.648	0.00606150473599601	**	MANTER	9
<b>TBILL</b>	0.00388952391814601	1,64E+09	0.924337970563217	0.0467949962736393	*	MANTER	3
<b>GLU</b>	101.068.146.383.665	100.089.560.522.903	102.056.299.978.384	0.0323307931060858	*	MANTER	5
<b>BUN</b>	101.433.374.024.308	0.97735451193495	105.271.211.626.021	0.452593133158146		REMOVER	3
<b>CREA</b>	0.296390590503537	0.0504332276881891	174.185.524.436.716	0.178363743100663		MANTER	2
<b>ALB</b>	0.79470167637947	0.39130745094522	161.395.024.018.786	0.524971308872005		REMOVER	2
<b>CHOL</b>	0.972406816492929	0.956206399347175	0.988881707346322	0.00109733739476075	**	MANTER	2

□ não significativo; \*significativo; \*\* bastante significativo.

#### 9.4 Anexo 4

**Tabela 9.3 Análise tempo-dependente da evolução das alterações histopatológicas dos fragmentos hepáticos realizadas nos macacos imunocompetentes infectados com HEV (G1).**

<b>Achados histopatológicos</b>	<b>17/06/2014</b>	<b>16/09/2014</b>	<b>14/10/2014</b>	<b>10/11/2014</b>	<b>10/12/2014</b>	<b>21/01/2015</b>	<b>10/02/2015</b>
<b>Grupo 1</b>	<b>0 dpi</b>	<b>14 dpi</b>	<b>42 dpi</b>	<b>69 dpi</b>	<b>99 dpi</b>	<b>141 dpi</b>	<b>160 dpi</b>
Esteatose <b>(0,1,2,3)</b>	02/03 <b>(1)</b>	03/04 <b>(0-2)</b>	02/03 <b>(0-2)</b>	03/04 <b>(0-2)</b>	03/03 <b>(1-2)</b>	03/03 <b>(2-3)</b>	02/03 <b>(0-3)</b>
Balonização <b>(0,1,2)</b>	0/03	01/04 <b>(0-1)</b>	0/03	03/04 <b>(0-2)</b>	02/03 <b>(0-2)</b>	01/03 <b>(0-1)</b>	0/03
Fibrose <b>(0,1,2,3,4)</b>	0/03	0/04	0/03	0/04	0/03	0/03	0/03
Infl. Lobular <b>(0,1,2,3)</b>	0/03	0/04	0/03	0/04	0/03	0/03	01/03 <b>(0-1)</b>
Infl. Portal/Intra-acinar <b>(0,1,2,3)</b>	0/03	0/04	0/03	0/04	0/03	0/03	01/03 <b>(0-1)</b>
Hepatite de interface	0/03	0/04	0/03	0/04	0/03	0/03	01/03 <b>(0-1)</b>
Apoptose <b>(0,1,2)</b>	0/03	0/04	01/03 <b>(0-1)</b>	01/04 <b>(0-2)</b>	02/03 <b>(0-1)</b>	01/03 <b>(0-1)</b>	0/03
Necrose lítica	0/03	01/04 <b>(1)</b>	01/03 <b>(1)</b>	0/04	0/03	01/03 <b>(1)</b>	0/03
Necrose focal	0/02	0/04	0/03	01/03 <b>(0-2)</b>	0/03	0/03	0/03
Corpúsculo de Mallory	0/02	01/04	0/03	0/3	0/03	0/03	0/03

**Tabela 9.4 Análise tempo-dependente da evolução das alterações histopatológicas dos fragmentos hepáticos realizadas nos macacos imunossuprimidos infectados com HEV (G2).**

Achados histopatológicos	17/06/2014	16/09/2014	14/10/2014	10/11/2014	10/12/2014	21/01/2015	10/02/2015
<b>Grupo 2</b>	<b>0 dpi</b>	<b>14 dpi</b>	<b>42 dpi</b>	<b>69 dpi</b>	<b>99 dpi</b>	<b>141dpi</b>	<b>160 dpi</b>
Esteatose (0,1,2,3)	04/04 (0)	02/03 (0-1)	01/02 (0-1)	04/04 (1-3)	04/04 (1-3)	04/04 (2-3)	04/04 (1-3)
Balonização (0,1,2)	01/04 (0-1)	02/03 (0-1)	01/02 (0-1)	03/04 (0-2)	04/04 (1-2)	04/04 (1-2)	04/04 (1-2)
Fibrose (0,1,2,3,4)	0/04	0/03	0/02	0/04	0/04	0/04	0/04
Infl. Lobular (0,1,2,3)	0/04	0/03	0/02	01/04	0/04	0/04	01/04 (0-1)
Infl. Portal/Intra-acinar (0,1,2,3)	0/04	0/03	0/02	0/04	01/04 (2)	0/04	01/04 (0-2)
Hepatite de interface	0/04	0/03	0/02	0/04	0/04	0/04	03/04 (0-1)
Apoptose (0,1,2)	0/04	0/03	01/02 (0-1)	01/04 (0-2)	01/04 (0-1)	01/04 (0-2)	0/04
Necrose lítica	0/04	0/03	0/02	0/04	01/04 (1)	01/04 (1)	02/04 (1)
Necrose focal	0/04	0/03	01/02 (1)	01/04 (1)	01/04 (1)	0/04	02/04 (1)
Corpúsculo de Mallory	0/04	0/03	0/03	0/04	0/04	0/04	0/04

**Tabela 9.5 Análise tempo-dependente da evolução das alterações histopatológicas dos fragmentos hepáticos realizadas nos macacos imunossuprimidos com tacrolimo (G3).**

Achados histopatológicos	17/06/2014	16/09/2014	14/10/2014	10/11/2014	10/12/2014	21/01/2015	10/02/2015
<b>Grupo 3</b>	<b>0 dpi</b>	<b>14 dpi</b>	<b>42 dpi</b>	<b>69 dpi</b>	<b>99 dpi</b>	<b>141dpi</b>	<b>160 dpi</b>
Esteatose (0,1,2,3)	2/04 (0-1)	01/04 (0-2)	02/04 (0-2)	02/03 (0-2)	01/02 (0-2)	02/02 (2-3)	02/02 (1-3)
Balonização (0,1,2)	0/04	02/04 (0-2)	01/04 (0-1)	03/03 (1-3)	01/02 (0-1)	01/02 (0-1)	0/02
Fibrose (0,1,2,3,4)	0/04	0/04	0/04	0/03	0/02	0/02	0/02
Infl. Lobular (0,1,2,3)	0/04	0/04	0/04	0/03	0/02	0/02	0/02
Infl. Portal/Intra-acinar (0,1,2,3)	0/04	0/04	0/04	01/03 (0-1)	0/02	01/02 (0-1)	0/02
Hepatite de interface	0/04	0/04	0/04	0/03	0/02	0/02	0/02
Apoptose (0,1,2)	0/04	01/04 (0-1)	0/04	0/03	0/02	0/02	0/02
Necrose lítica	0/04	02/04 (2)	0/04	02/03 (1 e 2)	01/02	0/02	0/02
Necrose focal	0/04	0/04	0/04	0/03	0/02	0/02	0/02
Corpúsculo de Mallory	0/04	04/04	0/04	0/03	0/02	0/02	0/02

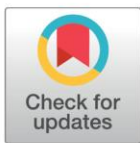
## 9.5 Anexo 5

Artigo aceito para publicação pela revista PlosOne: PONE-D-16-46847R1. DOI: 10.1371/journal.pone.0174070: “Cynomolgus monkeys are successfully and persistently infected with hepatitis E virus genotype 3 (HEV-3) after long-term immunosuppressive therapy.”

RESEARCH ARTICLE

# Cynomolgus monkeys are successfully and persistently infected with hepatitis E virus genotype 3 (HEV-3) after long-term immunosuppressive therapy

Noemi Rovaris Gardinali<sup>1\*</sup>, Juliana Rodrigues Guimarães<sup>1</sup>, Juliana Gil Melgaço<sup>1</sup>, Yohan Britto Kevorkian<sup>1</sup>, Fernanda de Oliveira Bottino<sup>1</sup>, Yasmine Rangel Vieira<sup>1</sup>, Aline Campos de Azevedo da Silva<sup>2</sup>, Douglas Pereira Pinto<sup>2</sup>, Laís Bastos da Fonseca<sup>2</sup>, Leandro Schiavo Vilhena<sup>2</sup>, Edilson Uiechi<sup>3</sup>, Maria Cristina Carlan da Silva<sup>4</sup>, Julio Moran<sup>5</sup>, Renato Sérgio Marchevsky<sup>6</sup>, Oswaldo Gonçalves Cruz<sup>7</sup>, Rodrigo Alejandro Arellano Otonel<sup>8</sup>, Amauri Alcindo Alfieri<sup>8</sup>, Jaqueline Mendes de Oliveira<sup>1</sup>, Ana Maria Coimbra Gaspar<sup>1</sup>, Marcelo Alves Pinto<sup>1</sup>



**1** Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Serviço de Equivalência e Farmacocinética –SEFAR, Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde–VPPI, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Libbs Indústria Farmacêutica, Embu, São Paulo, Brazil, **4** Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos (Virologia Molecular), Centro de Ciências Naturais e Humanas-CCNH, Universidade Federal do ABC-UFABC, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil, **5** Dr. Julio Moran Laboratories, Ebmatingen, Zurich, Switzerland, **6** Laboratório de Neurovirulência, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **7** Programa de Computação Científica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **8** Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil

\* [no\\_rovaris@yahoo.com.br](mailto:no_rovaris@yahoo.com.br)

**OPEN ACCESS**

**Citation:** Gardinali NR, Guimarães JR, Melgaço JG, Kevorkian YB, Bottino FdO, Vieira YR, et al. (2017) Cynomolgus monkeys are successfully and persistently infected with hepatitis E virus genotype 3 (HEV-3) after long-term immunosuppressive therapy. PLoS ONE 12(3): e0174070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070>

**Editor:** Pierre Roques, CEA, FRANCE

**Received:** December 5, 2016

**Accepted:** March 2, 2017

**Published:** March 22, 2017

**Copyright:** © 2017 Gardinali et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All genomic sequences files are available from the GeneBank database (accession number(s): KX578263/KX578267, KX578264/KX578268, KX578265/KX578269, KX578266/KX578270).

**Funding:** Support was provided by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), grants awarded to AMCG (E-26/110.848/2013); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grants awarded to MAP;

## Abstract

Epidemiological studies found that hepatitis E virus genotype 3 (HEV-3) infection was associated with chronic hepatitis and cirrhosis in immunocompromised patients. Our study aimed to investigate the relationship between the host immunosuppressive status and the occurrence of HEV-related chronic hepatitis. Here we describe a successful experimental study, using cynomolgus monkeys previously treated with tacrolimus, a potent calcineurin inhibitor immunosuppressant, and infected with a Brazilian HEV-3 strain isolated from naturally infected pigs. HEV infected monkeys were followed up during 160 days post infection (dpi) by clinical signs; virological, biochemical and haematological parameters; and liver histopathology. The tacrolimus blood levels were monitored throughout the experiment. Immunosuppression was confirmed by clinical and laboratorial findings, such as: moderate weight loss, alopecia, and herpes virus opportunistic infection. In this study, chronic HEV infection was characterized by the mild increase of liver enzymes serum levels; persistent RNA viremia and viral faecal shedding; and liver histopathology. Three out of four immunosuppressed monkeys showed recurrent HEV RNA detection in liver samples, evident hepatocellular ballooning degeneration, mild to severe macro and microvesicular steatosis (zone 1), scattered hepatocellular apoptosis, and lobular focal inflammation. At 69 dpi, liver biopsies of all infected monkeys revealed evident ballooning degeneration (zone 3), discrete



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), fellowship awarded to NRG; and FIOCRUZ –PASTEUR Program, budget awarded to MAP within the framework of the call 2013/2015. Libbs Indústria Farmacêutica provided, as a donation, the tacrolimus medicine, the immunosuppressive used in the present study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Libbs Indústria Farmacêutica provided support in the form of salaries for author EU, and Dr. Julio Moran Laboratories for author JM but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** Edilson Uiechi is a full-time employee of Libbs Indústria Farmacêutica, which manufactures and markets the tacrolimus medicine Tarfic (1 mg/kg and 5 mg/kg formulations). Libbs Indústria Farmacêutica provided, as a donation, the tacrolimus medicine, the immunosuppressive used in the present study. Julio Moran is employed by Julio Moran Laboratories. There are no further patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter our adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

hepatocellular apoptosis, and at most mild portal and intra-acinar focal inflammation. At 160 dpi, the three chronically HEV infected monkeys showed microscopic features (piecemeal necrosis) corresponding to chronic hepatitis in absence of fibrosis and cirrhosis in liver parenchyma. Within 4-months follow up, the tacrolimus-immunosuppressed cynomolgus monkeys infected with a Brazilian swine HEV-3 strain exhibited more severe hepatic lesions progressing to chronic hepatitis without liver fibrosis, similarly as shown in tacrolimus-immunosuppressed solid organ transplant (SOT) recipients. The cause-effect relationship between HEV infection and tacrolimus treatment was confirmed in this experiment.

## Introduction

Hepatitis E virus (HEV) infection is the major aetiology of acute viral hepatitis worldwide (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>). According to the current taxonomic classification, HEV is classified into the *Hepeviridae* Family, which is divided in two genera: *Orthohepevirus* with four species (A-D) that infect mammals and birds; and *Piscihepevirus* with a single species (A) identified in trouts (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). The *Orthohepevirus A* species includes the four major mammalian genotypes of human interest: genotypes 1 and 2 (HEV-1 and HEV-2) that infect only humans, and cause large water-borne epidemics in hyperendemic areas; and genotypes 3 and 4 (HEV-3 and HEV-4) that cause autochthonous infections in developing and developed countries and can infect not only humans but also a variety of animal species, such as pigs and other domestic and wild animals [1]. Pigs represent the major reservoir for HEV-3 and HEV-4, which are transmitted by the consumption of raw or uncooked pig meat [2].

Intriguingly, the epidemiologic scenario of hepatitis E in Brazil seems to be closer to that observed in developed countries, where few human cases have been reported. Moreover, in the best of our knowledge HEV-3 is the single genotype circulating in Brazil. [3–5]. HEV-3 is widely disseminated among Brazilian pig herds, and has been detected in pig faeces and effluent of slaughterhouses, as well as in swine livestock products [6–8]. Although HEV infection is largely disseminated among pig herds from different regions, the source of HEV exposure in Brazil remains unclear. It is possible that consumption of raw or undercooked contaminated meat/sausage and exposure to animal hosts may be sources of infection [9]. Other foods like shellfish, vegetables and fruits can be contaminated with HEV and are possible sources of foodborne HEV transmission [10–12].

Both, HEV-3 (more frequently) and HEV-4 infection can persist and become chronic in immunosuppressed patients, mainly in solid organ transplant (SOT) receptors [13–15]. Likewise, patients with haematological disease or coinfecting with human immunodeficiency virus (HIV) and low TCD4+ count (<200/mm<sup>3</sup>) can become persistently infected by HEV [16, 17]. Chronic HEV infection is defined by persistent HEV replication for more than three months [18], that can evolve to chronic hepatitis and fibrosis progression quite rapid, within the first two years of infection [18, 19]. Approximately 60% of HEV infected SOT receptors may become chronically infected [19, 20].

Different types of immunosuppressants can modulate viral infection by inhibiting host immunity and/or directly affecting the virus life cycle. Tacrolimus is a potent macrolide immunosuppressant derived from *Streptomyces tsukubaensis* (calcineurin pathway inhibitor) and the most common medication employed to reduce the rate of rejection, especially in parenchymal organ transplantation [21]. The use of tacrolimus is the most important risk factor associated

with chronic hepatitis in SOT recipients infected with HEV-3 [19]. High doses of tacrolimus showed to promote infection of liver cells with HEV in cell culture models [22].

Non-human primates (NHP), including *Macaca fascicularis* (cynomolgus monkeys) and *Macaca mulatta* (rhesus monkeys), are primary models for studying the clinical course of HEV infection. NHP are often the most appropriate model to evaluate the zoonotic potential of HEV. Rhesus monkeys are able to mimic a chronic infection by HEV-4 [23], and cynomolgus monkeys are used as animal model for studying pathogenesis of acute HEV infection, which is characterized by liver enzyme elevation, viremia, and seroconversion [24–26]. Besides, cynomolgus monkeys are considered the ideal model for human organ transplantation [27, 28], and have been used for the preclinical development of a broad variety of immunosuppressive agents, including tacrolimus [28, 29]. The present study aimed to investigate the relationship between the host immunosuppressive status of cynomolgus tacrolimus-immunosuppressed and the occurrence of HEV-related chronic hepatitis.

## Methods

### Animals and ethics statement

Twelve clinically healthy cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), six males and six females, aged between 1–8 years old, weight from 1.3 to 3.6 kg (Table 1), were used in this study. Animals were obtained from a breeding colony from the Institute of Science and Technology in Biomodels (ICTB), of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil at Animal Biohazard Level 2 facilities during quarantine and throughout the whole experiment. Animals were singly housed in stainless steel squeeze-back cages (0.77 m height x 0.60 m width x 0.68 m depth) in a climate-controlled room (temperature of 22 ± 1 °C and humidity 55 ± 5%) with a 12h light/dark cycle and fed daily with a commercial primate diet supplemented with fresh fruits and vegetables. Water was provided *ad libitum*. The study protocol was approved (LW-17/13) by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA-Fiocruz), and conducted in strict accordance with the recommendations from the Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL) and the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil). The single housing cynomolgus monkey approach was adopted in our study in order to prevent cross contamination, since HEV is transmitted via the fecal-oral route. The housing standard

**Table 1. Gender, age, sex, and body weight of the cynomolgus monkeys used in this study.**

Monkey ID	Gender*	Age (yr)	Weight (kg)
AB17	M	4,8	3,66
AD7	M	2,4	2,24
Z2	F	6,8	2,75
AE2	F	1,11	1,62
AD4	F	2,4	1,85
AE3	M	1,5	1,55
V12	F	8,4	3,1
AC11	M	3,4	3,07
AE6	F	1,2	1,3
AB19	M	4,11	3,5
AD8	F	2,3	1,83
AC7	M	3,6	2,94

\* M = male; F = female.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070.t001>

adopted in our study attended to the space recommendations for individually non-human primates with a maximum weight of 7 kg, in accordance with the Brazilian Normative Resolution CONCEA n.28, of November 13, 2015 ([http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0240/240230.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0240/240230.pdf)). Environmental enrichment programs were offered throughout the study in the form of alimentary (popcorn and nuts), audio-visual (movies and audios with forest themes) and tactile enrichment (toys such as hanging balls). Clinical procedures were performed under anaesthesia, and all efforts were made to minimize painful procedures.

## Study design

Monkeys were divided into three groups of four animals, matched by age, weight, and gender. Group 1 (G1) consisted of immunocompetent monkeys (AD4, AE3, V12 and AC11) that were intravenously inoculated with HEV-3. The Group 2 (G2) monkeys (AE6, AB19, AD8 and AC7) were treated with the immunosuppressive tacrolimus and then intravenously inoculated. The Group 3 (G3) animals (AB17, AD7, Z2 and AE2) were immunosuppressed but did not receive the inoculum (negative control). G2 and G3 monkeys started receiving tacrolimus treatment 42 days prior to inoculation. Aiming to evaluate the possibility of HEV infection reactivation, monkeys from G1 (not treated prior to inoculation) started receiving the immunosuppressive treatment from day 91 to 149 post-inoculation. All animals, which were from colony free of simian immunodeficiency virus (SIV) and simian type D retrovirus (SRV/D), tested also negative for anti-HEV IgG and IgM and HEV RNA (in sera, faeces, and liver biopsies). Cage side observation of unanesthetized monkeys for signs of illness was performed daily during quarantine and throughout 160 days post infection (dpi). Physical examinations (weight, rectal temperature and body inspection) were performed on all blood collection days under anaesthesia, since the animals were not trained for such procedures. Haematological, biochemical, and serological basal parameters were established for each animal by using three serially obtained individual pre-inoculation samples. Whole blood and faecal samples were collected at 0, 7, 14, 28, 42, 57, 69, 99, 141 and 160 dpi for virological, serological, biochemical and haematological determinations, and for tacrolimus plasmatic concentration. Liver biopsies for virological and histopathological analyses were obtained at 0, 14, 42, 69, 99, 141 and 160 dpi and collected by ultrasound-guided biopsy in monkeys under surgical anaesthesia. For local analgesia, 0.1–0.2 ml of 2% lidocaine was subcutaneously injected at the biopsy site in order to reduce the post-operative pain at the recovery phase of general anaesthesia. In dorsal decubitus position, the hair trichotomy was performed from the right cranial abdomen and skin disinfection was conducted. A transabdominal ultrasound was conducted to identify an appropriate liver biopsy site free of great vessels, gallbladder, and adjacent organs. Samples were taken from the right medial or right lateral lobe. A sterile Menghine needle (n.16) was slowly advanced under the skin until it was visualized at the appropriate biopsy site and then the spring-loaded biopsy apparatus was discharged to obtain a core of the liver tissue (~4–8 mg). At the end of the procedure, ultrasound visualization of the biopsy site was maintained to check for signs of haemorrhaging. In addition, bile, liquor and different types of tissues including gallbladder, duodenum, jejunum, ileum, colon, spleen, mesenteric lymph nodes, pancreas and brain were collected from all animals at necropsy. The anaesthetic protocol used in all collection dates was performed with ketamine hydrochloride at 20 mg/kg (Vetanarcol, König, Argentina) and xylazine hydrochloride at 0.1 mg/kg (Syntec Brazil, São Paulo, Brazil). At 160 dpi, animals were euthanized under deep barbiturate anaesthesia with sodium thiopental 2.5% at 25 mg/kg (Thiopentax, Cristalia, São Paulo, Brazil), which was delivered intravenously. Subsequently, animals were submitted to cardiac punctures and then euthanized by exsanguination.

## Tacrolimus treatment

Tacrolimus treatment was based on the therapeutic dose used in cynomolgus monkeys models for human organ transplantation [28]. Forty-two days prior to inoculation, G2 and G3 monkeys were treated orally with 3.5 mg/kg/day of tacrolimus until day 71 pi, and with 2.0 mg/kg/day up to 149 dpi. The immunocompetent HEV infected G1 monkeys started receiving tacrolimus treatment (PO. 2.0 mg/kg/day) from 91 to 149 dpi. The tacrolimus medicine used in this study was kindly donated by Libbs Farmacêutica Ltda/Farmanguinhos/Fiocruz.

## Inoculum

The HEV strain used for inoculation was recovered from faeces of a commercial farmed pig located in Paraná state, Brazil and characterized as genotype 3 (GenBank accession numbers: ORF1 KX578263, ORF2 KX578267). The faecal sample was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) to make a 10% water/volume (wt/vol) suspension. Subsequently, the clarified suspension was filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  and 0.22  $\mu\text{m}$  filters. The inoculum contained a load of 6.4  $\log_{10}$  copies per millilitre (ml), as determined by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) [30].

## Serological assays

Pre and post-inoculation sera samples (obtained at 0, 14, 28, 56, 99, 141 and 160 dpi) were tested for detection of macaque anti-HEV IgG, IgM and IgA by using the commercially available DiaCheck anti-human HEV antibody assay supplemented with a goat anti-macaque immunoglobulin conjugate (Fitzgerald Industries International, Inc., Massachusetts, USA), according to a modified protocol (Dr. Julio Moran Laboratories, Zurich, Switzerland). The cut off was calculated for each animal as the mean of absorbances of negative samples plus three times the standard deviation of negative samples.

## qRT-PCR

Total RNA from 200 microliter ( $\mu\text{l}$ ) of serum/liquor and 10% faecal/bile suspensions was purified with the High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), and from 30 mg of liver and other tissue samples with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Five  $\mu\text{l}$  of RNA were reverse-transcribed and amplified by using the "AgPath-ID one-step RT-PCR kit" (Applied Biosystems, USA) and was carried out with previously described primers and probe [30]. Assays were run in duplicate and used a calibrated standard curve generated with serial dilutions (ranging from  $10^1$  to  $10^7$ ) of a plasmid clone previously characterized as genotype 3 [6]. Target copy numbers were calculated based on Ct values in reference to the standard curve. Lastly, the number of copies per millilitre was determined by adjusting the values according to the volumes that were used for each step of the procedure (i.e., extraction, and the qRT-PCR reaction).

## Detection of positive and negative strand RNA by nested RT-PCR

Serum, faecal and tissue samples collected at inoculum and at necropsy were tested by RT-PCR. In order to detect and characterize the HEV RNA positive-strand, two nested RT-PCR assays were carried out for amplification of partial fragments of 287 base pairs (bp) (ORF1) and 342 bp (ORF2), corresponding to methyltransferase and capsid genes of HEV, respectively. Complementary DNA (cDNA) synthesis and PCR amplifications were done in a single-tube using the SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA

Polymerase (Invitrogen Life Technology, CA, USA), in the presence of the specific external ORF1 and ORF2 primers, and carried out as previously described [31, 32]. Then, two sets of specific internal primer pairs were used in the nested step.

To further identify HEV replication sites, tissue samples that had detectable positive-strand HEV RNA were also tested for detection of negative-sense HEV RNA by both, ORF1 and ORF2 nested RT-PCR assays. The extracted RNA was reverse transcribed at 42°C for 60 min with the SuperScript III reverse transcription (Invitrogen Life Technology, CA, USA), in the presence of the external forward primer of both genome regions. Then, PCR and nested PCR were carried out to amplify the partial fragments of ORF1 and ORF2 as described above.

### Sequencing reactions and phylogenetic analyses

ORF1 and ORF2 products (amplified from the inoculum and liver samples of monkeys AE6, AB19 and AC7 obtained at necropsy) were purified using reagents and protocols of the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) and sequenced using reagents and protocols of the Big Dye Terminator 3.1 kit. A Bayesian phylogenetic tree was constructed by using concatenated partial nucleotide sequence of ORF1 and ORF2 (546 bp) of HEV. Multiple nucleotide sequence alignment was analysed by using the Markov Chain Monte Carlo method implemented in the program MrBayes version 3.1.2 under GTR+G+I nucleotide substitution model, selected using the jModeltest program. The partial genomic sequences reported in this study have been deposited in the GenBank under accession numbers: inoculum ORF1/ORF2-KX578263/KX578267; liver AE6 ORF1/ORF2-KX578264/ KX578268; liver AB19 ORF1/ORF2-KX578265/ KX578269; and liver AC7 ORF1/ORF2-KX578266/KX578270.

### Biochemical and haematological analyses

Haematological analyses were carried out in the Sysmex XT-2000iv automated haematology analyzer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Biochemical analyses were performed using a Vitros DT60 II chemistry system (Johnson & Johnson's, Minnesota, USA). The following parameters were evaluated: red and white blood cell counts (RBC and WBC), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), creatinine (CREA), blood urea nitrogen (BUN), glucose (GLU), albumin (ALB), and cholesterol (CHOL). Serum levels of glycated haemoglobin were determined by using the Dimension RxL Max integrated chemistry system (Siemens Healthineers, Muenchen Germany). Baseline levels were determined from blood samples of the pre-inoculation period for each animal. Biochemical evidence of hepatitis was considered when the post-inoculation serum levels of ALT exceed by > 2-fold the pre-inoculation baseline levels.

### Histopathological analyses

Liver tissues were obtained by ultrasound-guided biopsy, as described above, and at necropsy. A portion of each obtained sample was stored in 10% buffered formalin (pH 7.0). Paraffin sections from liver tissues were sectioned at 4 micrometre ( $\mu\text{m}$ ) and stained with haematoxylin-eosin (Sigma-Aldrich, USA). Light photomicrographs were made in a DMRXA (Leica®) microscope mounted with a DFC300FX camera using Leica® and a Qwin Standard software. Liver sections were blindly examined and lesions were scored according to a previously classification for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by the non-alcoholic steatohepatitis Clinical Research Network (NASH CRN) [33].

## HEV antigen detection

Frozen liver sections (4  $\mu\text{m}$ ) obtained at 160 dpi were examined by indirect immunofluorescence using the Mouse Monoclonal (IgG1, 1 mg/mL) [clone 4B2] (LifeSpan BioSciences, Inc) that recognizes HEV ORF2 at a 1:150 dilution as the primary antibody. The Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488; 2 mg/mL) (Abcam plc, Cambridge, UK) was used as the secondary antibody at a 1:1,500 dilution. The slides were mounted with SlowFade Gold Antifade Reagent with DAPI (Life Technologies Corporation, USA), and covered with a coverslip. Images of the positive fields were obtained by immunofluorescence microscope (Zeiss Axio Observer Z1, Göttingen, Germany).

## Bioequivalence of tacrolimus

The blood levels of tacrolimus in the cynomolgus monkeys were analysed by liquid chromatography (LC)—mass spectrometry system (LC-MS/MS). The method was validated according to the criteria of RDC27, 17/05/2012—Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). The tacrolimus reference standard was provided by United States Pharmacopeia (Rockville, MD, USA) and, diazepam used as the internal standard solution, was provided by National Institute for Quality Control in Health (INCQS/BRASIL). The LC-MS/MS was composed of liquid chromatography Prominence LC-20AB (Shimadzu, Kyoto, JP) and tandem mass spectrometry API 4000 (ABSCIEX, Foster City, CA, USA). The data were processed with the Analyst® software (version 1.6.2). The mass spectrometry was operated with electrospray ionization in the positive mode, and transitions at  $m/z$  822.69 > 769.59 and  $m/z$  284.99 > 192.77 were monitored for tacrolimus and internal standard, respectively. Nitrogen was used as the nebulizer and auxiliary gas.

## Statistical analyses

Two logistical models were applied based on HEV RNA detection on faeces (model 1) and sera (model 2). For each model, a previous univariate logistic regression was performed in order to select the variables for the multivariate model. The following variables were included: liver enzyme levels (AST, ALT, and TBIL), CREA, BUN, GLU, ALB, and CHOL levels, haematological parameters, immunosuppressive regimen (dose and bloody concentration), age, sex, body weight and temperature, and antibodies levels (IgM, IgG and IgA). Only the variables with significance of  $P < 0.40$  were considered for the final logistic multivariate analysis and calculated the odds ratio for the final variables. All analysis were performed using the R Project for Statistical Computing (<http://www.r-project.org/>), and the software GraphPad Prism 5 for windows, version 5.01 (San Diego, CA, United States). For these models, we drop the control group (G3), since it was not exposed to HEV.

## Results

Both, G1 and G2 monkeys inoculated with swine HEV became infected. HEV infection was evidenced and monitored by HEV RNA in sera, faeces, and liver samples; anti-HEV antibodies; ALT and AST (Table 2); and histopathological features (S1 Table) throughout the experiment. The tacrolimus blood levels were monitored throughout the experiment (Fig 1).

### Immunocompetent monkeys infected with HEV-3 (Group 1)

HEV viremia (Table 2) was detected from 7–14 to 21–28 dpi excepting AC11, which exhibited an intermittent pattern of viremia at 56 dpi. Similar findings were noticed for viral faecal shedding excepting AE3, which remained excreting virus in faeces until 42 dpi. As expected, HEV

**Table 2. Summary of post infection detection of HEV RNA, seroconversion and aminotransferases peaks in G1, G2, and G3 cynomolgus monkeys.**

Monkey ID	Group	HEV RNA detection dpi*			Anti-HEV seroconversion dpi*			Aminotransferases peaks** dpi* (corresponding values in IU/L)	
		Serum	Faeces	Liver	IgA	IgM	IgG	ALT	AST
AD4	1	7–28	7–28	14–69	28	28	28	21, 28 (125, 173)	21 (127)
AE3		7–21	7–42	14	57	28	28	-	-
V12		14–21	7–28	14	57	28	28	21 (67)	21; 99 (97; 96)
AC11		14–21; 56	7–21	14	28	28	28	-	-
AE6	2	7–160	7–160	14–160	141	99	57	42; 56; 160 (82; 89; 84)	21 (93)
AB19		14–160	7–160	14–160	57	14	57	141; 160 (76; 120)	7; 14; 21; 42; 99 (106; 76; 84; 88; 95)
AD8		14–42	7–42	14–42	57	28	28	-	-
AC7		14–160	7–160	14–160	99	14	57	28; 42; 56; 99; 141; 160 (69; 122; 145; 71; 149; 90)	21; 42; 56; 69 (107; 74; 125; 80)
AB17	3	—	—	—	—	—	—	—	—
AD7		—	—	—	—	—	—	—	—
Z2		—	—	—	—	—	—	—	—
AE2		—	—	—	—	—	—	—	—

\* dpi: days post inoculation

\*\* Aminotransferases peaks: ALT/AST serum levels exceeding at least twice the individual baseline levels.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070.t002>

RNA was detected in the liver for all monkeys at the first biopsy pi and remained detectable for at least 69 dpi in one of them (AD4). AD4 monkey was euthanized from an unrelated cause before the end of the study (71 dpi). The remaining monkeys from this group, AE3, V12 and AC11, showed viral clearance within 69 days or less (Fig 2A–2C). All monkeys seroconverted to anti-HEV IgM and IgG at 28 dpi and to anti-HEV IgA between 28–57 dpi. In two monkeys (AD4 and V12), a transient but significant elevation of ALT/AST levels was noticed at 21 dpi. The average number of platelets, RBC and WBC, and biochemical parameters did not change over the course of study.

The main liver histopathological findings at the acute phase of infection (at 14, 42 and 69 dpi) revealed mild to moderated macro and microvesicular steatosis (more evident in zone 1), hepatocellular ballooning degeneration (zone 3), intra-acinar inflammation, and mild intensity of hepatocellular apoptosis (Fig 3G1A and Fig 3G1B). Ballooning degeneration, mild to severe steatosis, apoptosis, and some inflammatory infiltrates were continuously diagnosed until 160 dpi (Fig 3G1C and Fig 3G1D). At the end of study, G1 animals neither showed evidence of chronic hepatitis, nor detectable HEV Ag (Fig 4A), or HEV RNA in liver sections. HEV infection in this group did not result in overt clinical signs.

In order to evaluate the possibility of reactivation of HEV infection, tacrolimus was administered (PO. 2.0 mg/kg/day) from 91 to 149 dpi to all animals of G1. G1 animals achieved a lower tacrolimus blood concentration, in comparison with G2 and G3 (Fig 1). Despite of small focus of acute inflammation detected in liver parenchyma at 160 dpi (Fig 3G1D), liver enzymes were not elevated. Neither HEV RNA nor HEV Ag were detected, even after tacrolimus challenge.

### Immunosuppressed monkeys infected with HEV-3 (G2)

In this group, the blood tacrolimus concentrations ranged from 4.78 ng/ml to 18.83 ng/ml (Fig 1). In respect of viral load in blood, liver, and faecal samples at the acute stage of infection, G2

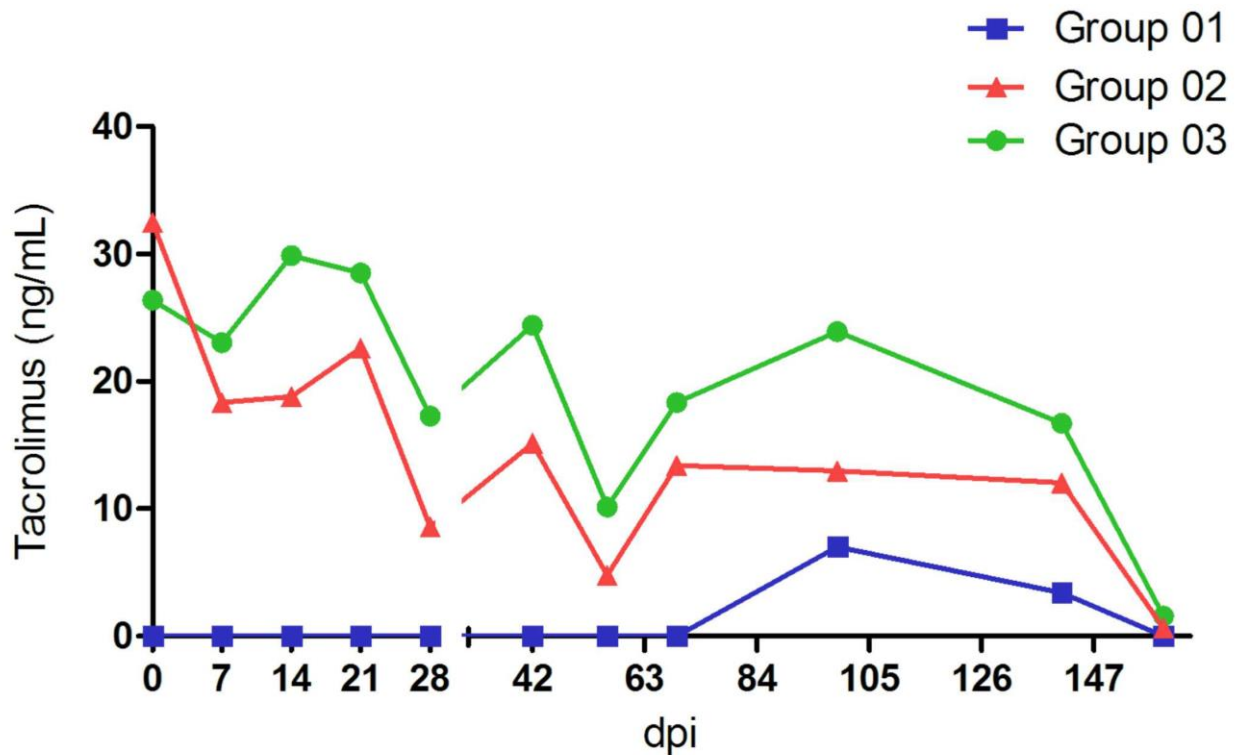


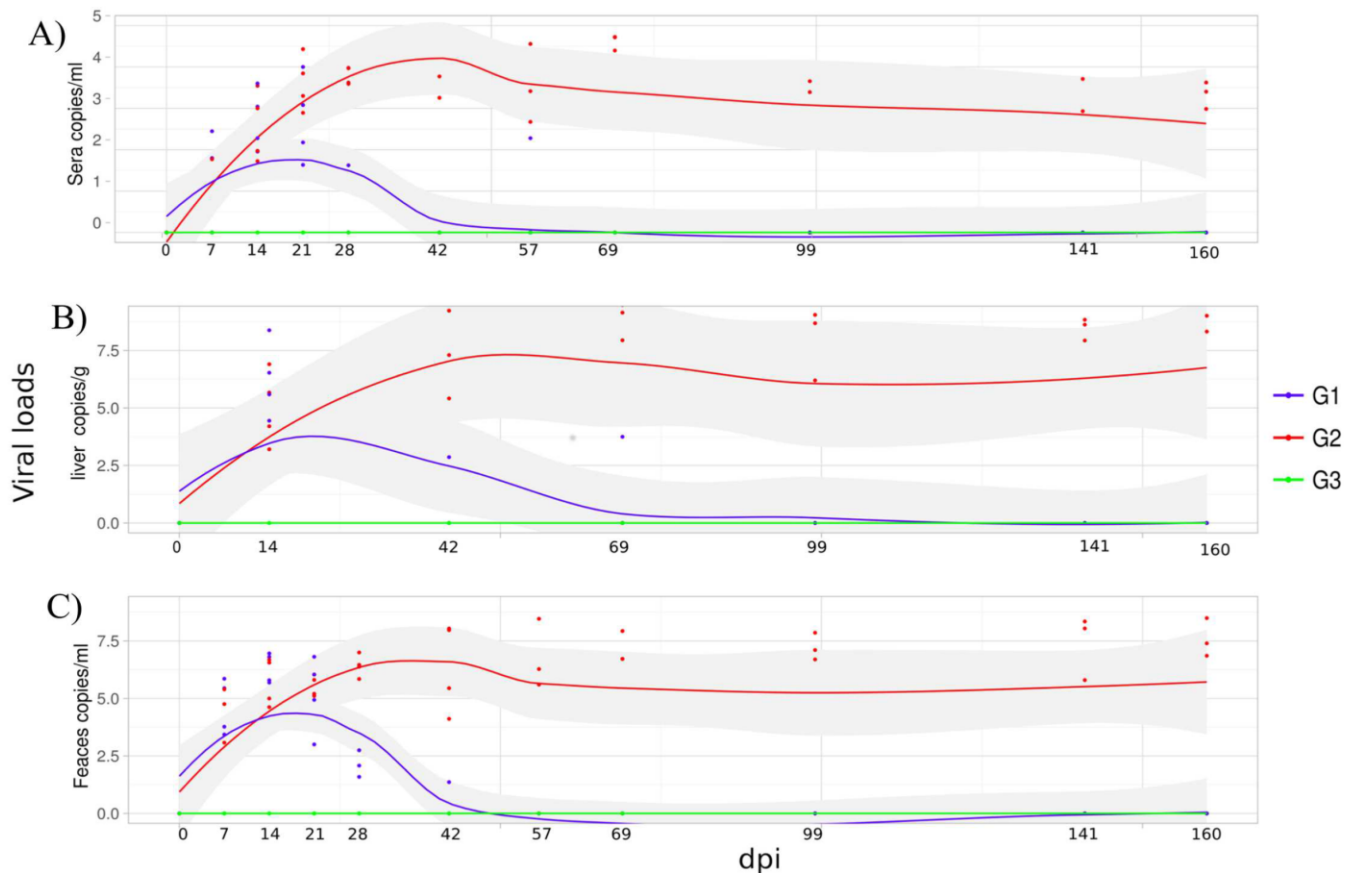
Fig 1. Liquid chromatography-mass spectrometry measurement of tacrolimus in blood samples from cynomolgus monkeys.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070.g001>

and G1 monkeys showed similar patterns. After three months of infection, three out of four HEV inoculated monkeys (AE6, AB19, and AC7) revealed a persistent pattern of viremia, faecal shedding and presence of HEV RNA in all liver biopsies compatible with a chronic HEV infection (Fig 2A–2C). The exception AD8, exhibited viral clearance within 69 dpi, similar to that observed in G1 (Table 2). Monkeys from G2 showed lower IgM titres in comparison with immunocompetent animals, even though no significant difference was reported at multivariate analysis (Fig 5A). The appearance of anti-HEV-IgG antibodies was a little later, as well as its peak (Fig 5B). Moreover, the three chronically HEV infected monkeys exhibited an intermittent pattern of ALT and AST elevated levels (Fig 5D and Fig 5E, Table 2). Again, monkey AD8 did not show changes in liver enzymes levels. As observed in G1, during the experiment, no variation of the average number of platelets, RBC, WBC, and other biochemical parameters was noticed. However, the counting of platelets numbers in G2 was slightly lower to the observed in G1 in the first 60 dpi, but no significant statistical difference was noted (Fig 5F). A significant lower level of CHOL was noted in G2 comparing to G1 as we can observe in Fig 5G.

At 14 and 42 dpi, challenged monkeys exhibited few ballooning degeneration, mild steatosis (Fig 3G2A), scattered hepatocellular apoptosis, and lobular inflammation. At 69 dpi, all monkeys revealed mild to severe macro and microsteatosis (zone 1), marked ballooning degeneration (zone 3), few hepatocellular apoptosis, and at most mild portal and lobular inflammations (Fig 3G2B). At the chronic stage (160 dpi), a limited area of interface hepatitis (piecemeal necrosis) (Fig 3G2D) was observed in the tacrolimus treated animals, with the exception of the AD8 monkey, that presented a self-limited acute hepatitis characterized by absence of





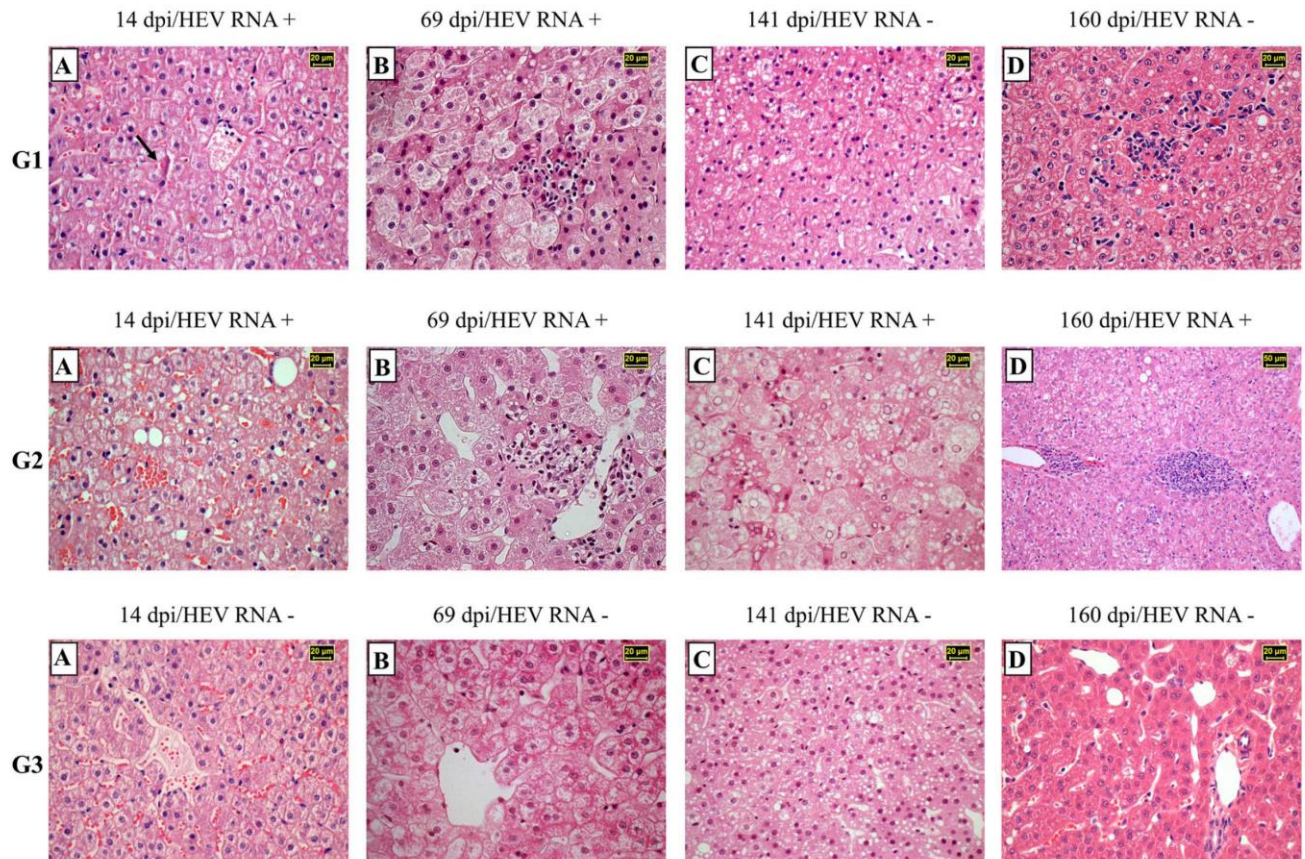
**Fig 2. Dynamic of HEV RNA measured by quantitative reverse transcription PCR qRT-PCR.** Immunocompetent monkeys (G1) were inoculated with HEV-3; tacrolimus-treated monkeys inoculated with HEV-3 (G2) and tacrolimus-treated monkeys (G3). qRT-PCR assay were performed on RNA extracted from sera, liver biopsies and faeces samples. The viral load results are show in: (A) sera, (B) liver biopsies, and (C) faeces.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070.g002>

inflammatory cell infiltrate in the liver parenchyma. In addition, HEV antigens were observed in the liver sections of all monkeys (Fig 4B), with exception of AD8.

All animals from this group presented alopecia in dorsal left and right forelimbs and hind limbs (S1 Fig), and moderate weight loss throughout the experiment. AC7 and AB19 showed herpetic lesions (S2 Fig) confirmed by PCR on oral mucosal and lips. Moreover, AC7, who presented dermatitis, polyuria and polydipsia, developed diabetes mellitus with a markedly elevated level of blood glucose, ranging from 181 to 327 mg/dl through the experiment and glycosylated haemoglobin (8.8% at 78 dpi). Hyperglycaemia was first reported 49 days after the beginning of the tacrolimus treatment (at 7 dpi) (Fig 6). At the end of the experiment, glycaemic levels start declining to normal levels. Fig 3G2C shows a massive presence of glycogen accumulation in the nuclei of hepatocytes, an indicative of diabetes mellitus.

Both positive- and negative-strand HEV RNA, were detected in hepatic (liver and gallbladder) and extrahepatic tissues (spleen, duodenum, colon, lymph node and pancreas) taken from the persistently infected monkeys AE6, AB19 and AC7. Bile, jejunum and ileum also presented the positive but not the negative-strand RNA, whereas, liquor, thymus and brain were negative for viral detection. No viral RNA was detected in tissue samples from AD8. As determined by direct sequencing, sequences found in liver samples from the three chronic infected



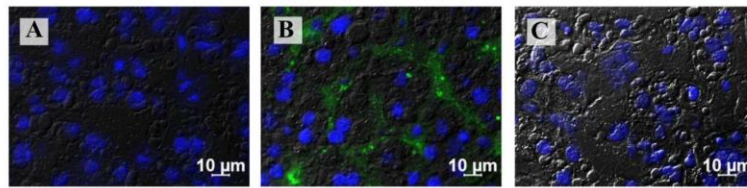
**Fig 3. Chronological analysis of histopathological features of liver biopsies from immunocompetent cynomolgus monkeys infected with HEV (G1), monkeys previously treated with tacrolimus and infected with HEV (G2) and monkeys only treated with tacrolimus (G3). Hematoxylin-eosin (H&E)-stained paraffin section. (G1A)** Lobular architecture disorganization, ballooning degeneration of the hepatocytes with lytic necrosis. Acidophilic clumps (arrow) are located in a perinuclear position (Mallory bodies). **(G1B)** The liver cytoarchitecture was modified by ballooning and lytic necrosis of hepatocytes. Lipid droplets and inflammatory cell infiltration were observed. **(G1C)** Hepatic parenchyma shows significantly fat droplets deposition, mixture of macrosteatosis and microsteatosis. **(G1D)** Focal collection of lymphocytes and macrophages localized in the pericentral area. Ballooned hepatocytes and lytic necrosis were noted. **(G2A)** Irregular distribution pattern of hepatocytes, ballooning and cytolytic necrosis associated with fatty changes. **(G2B)** Normal liver architecture. Lymphohistiocytic infiltration of portal liver tract. Microvesicular steatosis is also present. **(G2C)** Disarray of the cytoarchitecture of the parenchyma. Hepatocytes exhibiting ballooning, lytic necrosis and steatosis. Note glycogen accumulation in hepatocyte nuclei. **(G2D)** Interface hepatitis surrounded by micro and macrosteatosis. **(G3A)** Normal hepatic venule. Hepatocytes plates shows regular distribution. **(G3B)** Lobular disarray and hepatocellular ballooning predominantly distributed in zone 3. **(G3C)** Significant and strong diffusely distributed mixture of hepatocellular macrosteatosis and microsteatosis in all zones from zone 1 to 3. **(G3D)** Hepatocytes cords converging towards portal tract. Minimal fat droplets deposition in the hepatocyte cytoplasm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070.g003>

animals matched with the original inoculum. Phylogenetic reconstruction using concatenated partial nucleotide sequences of ORF1 and ORF2 (546 nt) clustered all the samples within genotype 3, clade abchij, subclade chi (Fig 7).

### Comparison between immunocompetent (G1) and immunosuppressed (G2) HEV infected groups

Univariate and multivariate analysis models were performed to identify variables associated with chronic HEV infection. In model 1, univariate analysis pointed the following variables: age, sex, weight, IgM, IgG, IgA, tacrolimus dose, ALT, AST, TBIL, GLU, CREA, CHOL, BUN. After adjustments for model 1, the multivariate analysis revealed the following independent



**Fig 4. Immunofluorescence staining using monoclonal antibody to detect HEV antigen in the liver from cynomolgus monkeys obtained at the end of the experiment.** (A) Negative immunofluorescence of monkey from G1 after viral clearance. (B) Detection of HEV antigen (labelled in green) in sinusoidal lining cells of chronically infected monkey from G2. (C) Negative results in control monkey from G3. Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070.g004>

predictive factors associated with chronic HEV infection in G2: ALT (odds ratio = 1.0432; 95% confidence interval, 1.00392–1.0840;  $P = 0.030781$ ), and AST (odds ratio = 1.0457; 95% confidence interval, 1.01120–1.0815;  $P = 0.009062$ ) as risk factors; and CHOL appears as protection factor (odds ratio = 0.9752; 95% confidence interval, 0.95612–0.9947;  $P = 0.012968$ ) (Fig 8A). In model 2, univariate analysis pointed the following variables: age, weight, IgM, IgA, tacrolimus dose, ALT, AST, TBIL, GLU, CREA, and CHOL. After adjustments for model 2, variables IgM, ALT, AST, and weight remain in the final model, but only ALT was considered a risk factor for chronic HEV infection (odds ratio = 1.05453; 95% confidence interval, 1.007643–1.1036;  $P = 0.02213$ ) whereas IgM (odds ratio = 0.99983; 95% confidence interval, 1.0001–0.999567;  $P = 0.999567$ ), AST (odds ratio = 1.03456; 95% confidence interval, 1.0747–0.995963;  $P = 0.07987$ ), and weight (odds ratio = 0.99959; 95% confidence interval, 1.0002–0.998998;  $P = 0.16941$ ) were not (Fig 8B).

### Immunosuppressed monkeys not infected (G3)

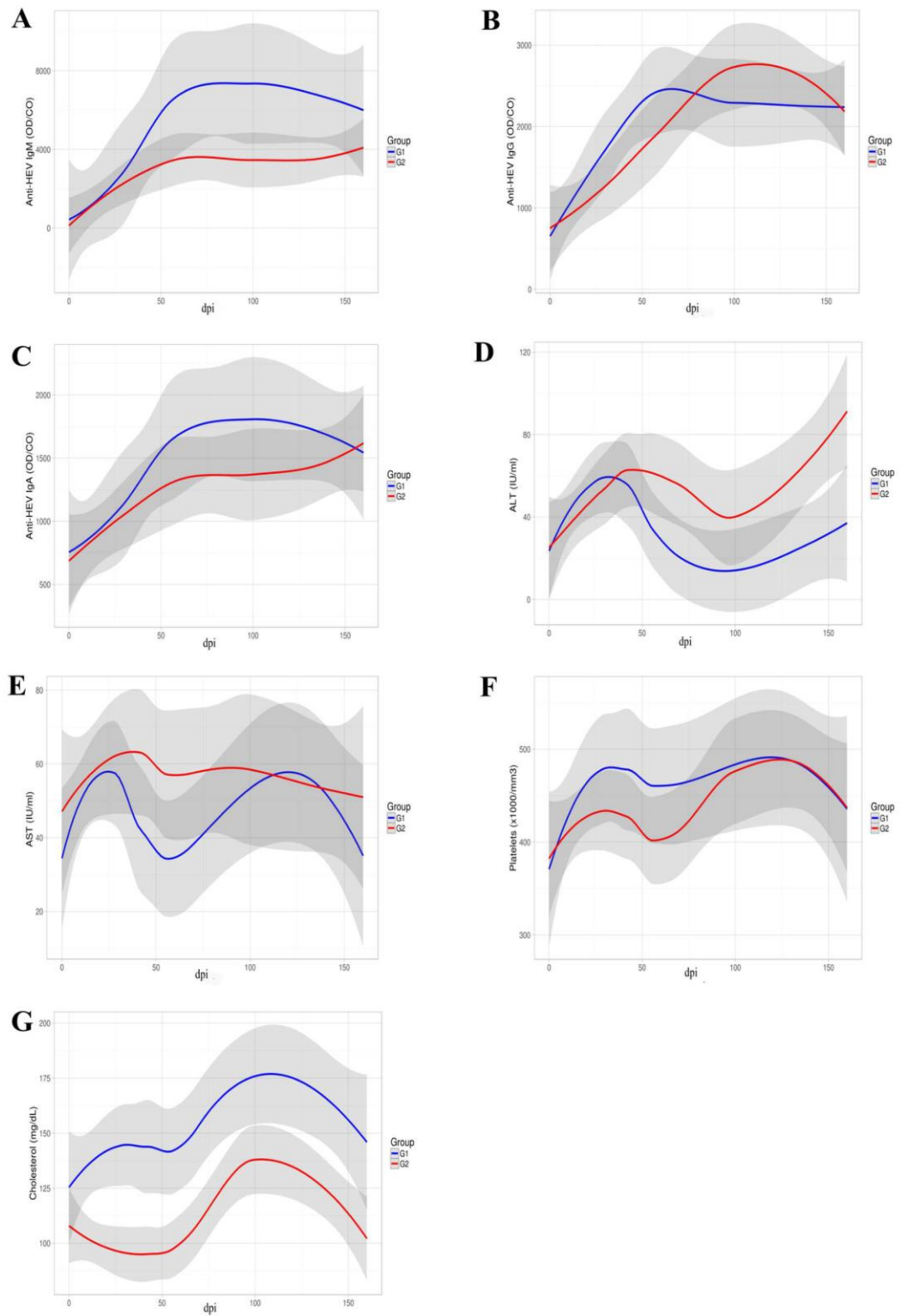
In the control group, the blood tacrolimus concentrations ranged from 10.13 ng/ml to 29.89 ng/ml (Fig 1). All animals presented normal ALT/AST levels, and were negative for anti-HEV antibodies, HEV RNA (faeces, sera, and liver biopsies) throughout the experiment and at necropsy. No haematological and biochemical variation was observed in this group.

Histologic features revealed hepatocellular ballooning degeneration, hepatocytes binucleation and cytolytic necrosis (Fig 3G3A–3G3D). HEV antigen was not detected in liver samples from any monkey (Fig 4C).

Similarly to G2, all animals presented moderate loss weight and bilateral alopecia in the same body regions. Monkeys AD7 and Z2 got severely ill by opportunistic herpes virus infection, and they were euthanized at 45 and 71 dpi, respectively.

### Discussion

Recently, autochthonous HEV infection has emerged as an important cause of morbidity among immunocompromised patients, since it can progress to chronic hepatitis in approximately 60% of transplant recipients who are exposed to HEV [19, 20]. The risk is increased in patients receiving tacrolimus therapy at the time of hepatitis E diagnosis [19]. Both, the risk of reactivation and the incidence of a de novo HEV infection after solid organ transplantation have been reported, in Germany, the Netherlands and France [19, 34, 35]. So far, HEV infection in Brazil is similar to that observed in developed countries, with HEV-3 being detected in humans and pigs [3, 6, 36]. Indeed, few indigenous cases of human hepatitis E have been described in Brazil, mostly in SOT immunosuppressed patients, all classified within genotype 3 [4, 5, 36]. The present study describes a successful experimental chronic infection of



**Fig 5. Distributions of anti-HEV antibodies, ALT, AST, platelets and CHOL observed in inoculated groups (G1 and G2).** Anti-HEV IgM, IgG and IgA are shown in A, B, and C, respectively. Samples with OD/cutoff ratios above 1.0

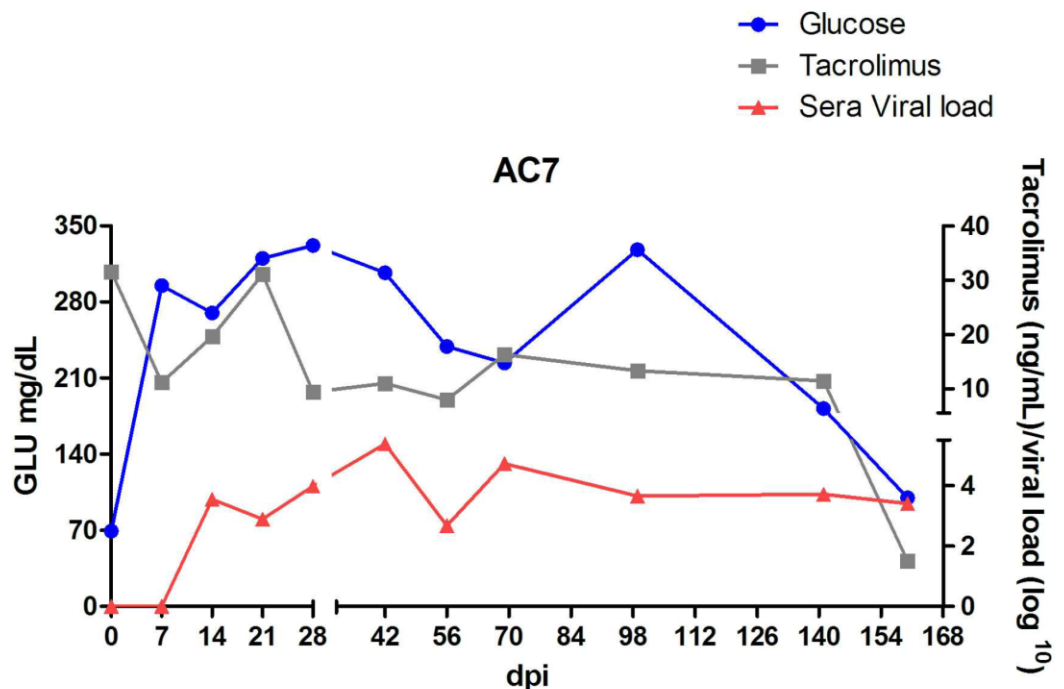
are considered positive for anti-HEV. ALT and AST levels are show in **D** and **E**, and platelets and cholesterol levels in **F** and **G**.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070.g005>

immunosuppressed cynomolgus monkeys with a Brazilian swine HEV-3 isolated from a naturally infected pig.

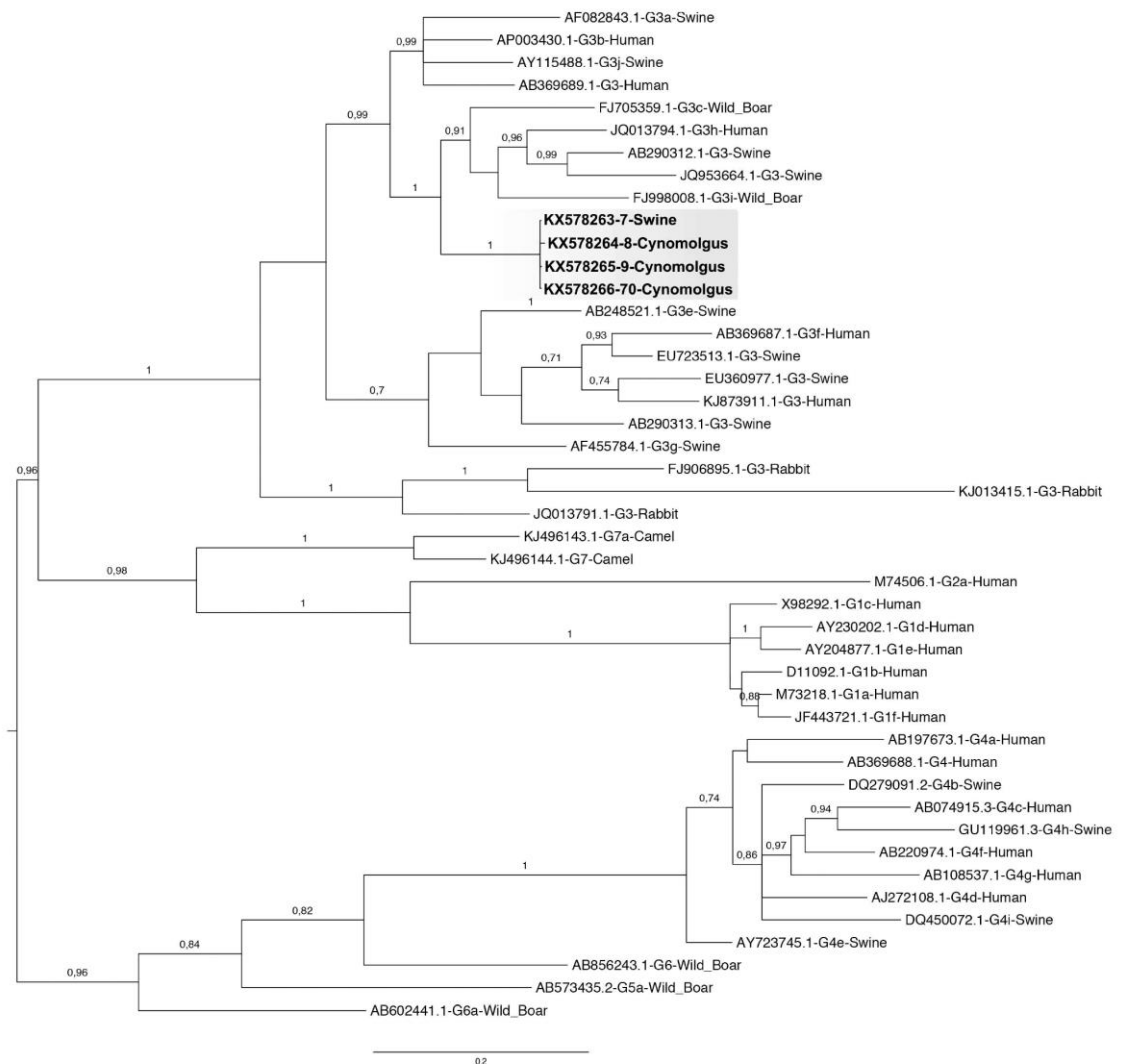
In our study both, tacrolimus-treated and -untreated NHP groups inoculated with the Brazilian swine HEV-3 developed subclinical hepatitis. However, the pattern of infection in the untreated group (G1) varied somewhat, as previously reported, in experimental studies using immunocompetent NHP [25, 37]. The first sign of HEV infection was the viral shedding in faeces within 7 dpi, followed by seroconversion to anti-HEV IgM and IgG within 28 dpi, discrete liver enzymes elevation within 21–28 dpi, associated with a mild liver inflammation. Lastly, viral clearance was achieved spontaneously in this group within 69 dpi or earlier. In immunocompetent patients infected with HEV-3, clinical symptoms occur in only 2–5% [38]. Here, the subclinical hepatitis noted in our untreated NHP reflects a similar scenario

Chronic human HEV infection is defined as persistently HEV replication longer than three months, with mild elevation of liver enzymes, and infrequent association with clinical signs [18]. In our study, the immunosuppressed NHP AE6, AB19 and AC7 became chronically infected, as hypothesized. As observed in SOT receptors [20], the present study showed that HEV viral loads (in sera, faeces or liver) and anti-HEV IgM/IgG levels obtained during acute infection phase were not able to predict the progression to chronic hepatitis E. Previous studies reported that serological tests may give false negative results in SOT patients, so that HEV antibodies are infrequently detected at the acute phase [20, 34, 39]. Besides, the detection of IgG and IgM anti-HEV may be delayed in patients treated with immunosuppressants including



**Fig 6. Tacrolimus concentrations measured by LC-MS/MS in whole blood, HEV viral load and blood glucose level in AC7 monkey previously treated with tacrolimus and infected with HEV.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070.g006>

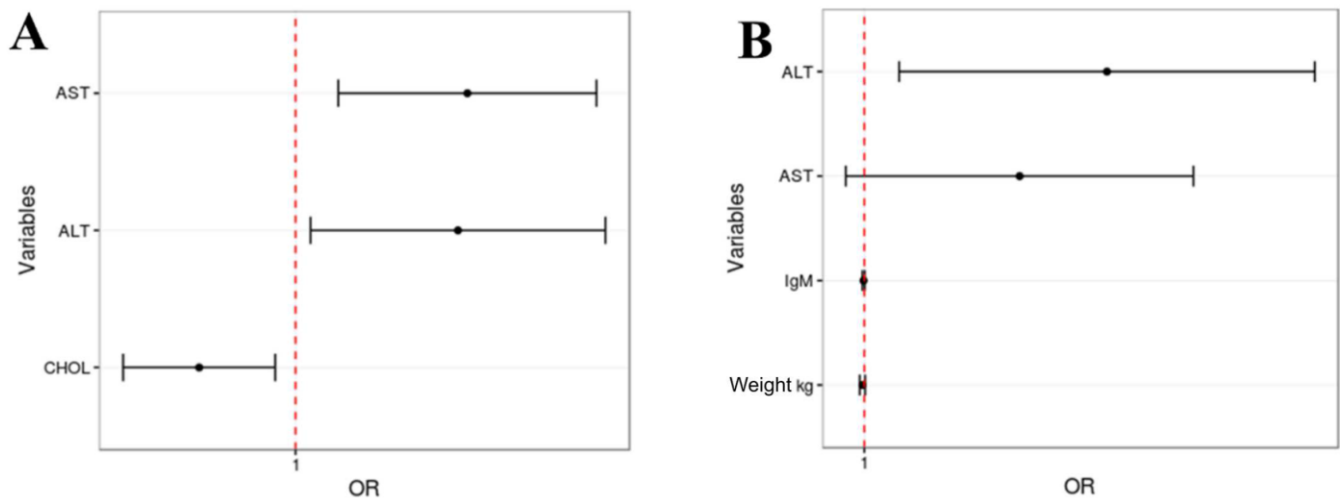


**Fig 7. Phylogenetic analysis of Hepatitis E virus strains from human and animal samples.** The Bayesian phylogenetic tree was constructed by using concatenated partial nucleotide sequence of ORF1 and ORF2 (546 nt) of HEV. For each sequence used, the GenBank accession number, animal species from which it was isolated and the corresponding genotype are shown. The tree was rooted at midpoint. Posterior probabilities (pp) are shown at the branch label. Numerical value  $\geq 0.7$  indicates the pp replicates that supported the interior branch. Newly described HEV sequences in this study are indicated. Scale bar indicates evolutionary distance of 0.2 substitutions per position in the sequence.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070.g007>

calcineurin inhibitors [39]. In our experiment, all chronically infected monkeys seroconverted to anti-HEV antibodies, however, those that developed chronic infection showed a delayed seroconversion. In addition, tacrolimus-treated NHP showed lower IgM and IgA titres throughout the experiment when compared with untreated NHP, even though no significant difference was observed.

Intriguingly, notwithstanding tacrolimus treatment, one out of four of the immunosuppressed NHP (AD8) developed a self-limited acute hepatitis—characterized by absence of inflammatory cell infiltrates in liver parenchyma, poor liver enzymes elevation, spontaneous viral clearance, and HEV-specific seroconversion. Similarly, 40% of the HEV infected immunosuppressed SOT patients are able to clear the virus [19]. The activation of the innate



**Fig 8. Predictive factors associated with chronic HEV infection. (A)** Predictive factors obtained based on faeces viral load. **(B)** Predictive factors obtained based on sera viral load.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174070.g008>

immune response and the development of a multispecific CD4 + and CD8 + T-cell response to ORF2 seem to be critical for the clearance of the virus in patients with hepatitis E [40]. Besides, a weak inflammatory response, and high serum concentrations of chemokines in the acute phase of hepatitis E have been associated with the persistence of HEV infection [41]. Therefore, self-limited acute outcome of HEV infection has been associated with a potent and multi-specific T-cell response.

In our study, the animals that developed chronic HEV infection had low peak transaminases levels (ALT and AST); the same has been observed in SOT patients who evolved to chronic infection [19]. As previously demonstrated, at acute phase, liver enzymes levels are higher in self-limited HEV infections [20]. Nevertheless, the tacrolimus-treated monkey who spontaneously resolved infection did not show liver enzymes changes. In the present study, persistently increased ALT and AST levels were predictors of progression to chronic HEV infection, as observed in HBV chronically infected patients [42].

Cyclosporine, which is also a calcineurin inhibitor, has been frequently associated with hyperlipidemia in SOT recipients [43]. In contrast, in our study reduced plasma levels of cholesterol were significantly associated with chronic HEV infection in the tacrolimus-treated group. It can be explained by the evident abnormal fatty deposit (macro and micro steatosis) in liver parenchyma [44], as observed in our study (G2 animals). Regarding haematological features, the WBC count was not reduced by tacrolimus treatment, as expected [45] and platelets count could not be associated with HEV chronicity, as previously reported in SOT patients infected with HEV [19]. Mild to moderate thrombocytopenia after transplantation can be observed due to many factors, such as reduced hepatic thrombopoietin production, allograft sequestration, hypersplenism, haemorrhage, heparin-induced thrombocytopenia, immunologic reactions, hemolysis, drugs, infections, and sepsis [46, 47]. However, in the present study, the animal model was not submitted to the surgical procedures that could result in mild to moderate thrombocytopenia in SOT patients. Both, drug-induced and immune-mediated (severe) thrombocytopenia has been associated with the use of tacrolimus [48] and due to HEV infection, respectively [49, 50]. In our study, all the infected animals showed platelet counts within the normal range at the time of infection and throughout the experiment. Still and all, three out four tacrolimus-treated monkeys became persistently infected by HEV-3.

Tacrolimus blood levels above 10 ng/ml have been used successfully to prevent renal allograft rejection in cynomolgus monkeys [27, 28]. The rate of absorption and the bioavailability of tacrolimus after oral administration (which was the chosen administration via, in our study) appear to be variable in all the patient populations studied [51]. It was extremely difficult to control the blood concentrations of oral tacrolimus in our cynomolgus monkeys, as also reported by other authors [52], therefore the dose had to be adjusted throughout the experiment. At 149 dpi, tacrolimus dose was reduced from 3.5 mg/kg/day to 2.0 mg/kg/day, since some animals exhibited herpetic lesions assumed as opportunistic infection. Besides that, G1 animals achieved a lower tacrolimus blood concentration, in comparison with G2 and G3. This fact may have interfered with our hypothesis of HEV reactivation.

Chronic HEV infection rapidly progress to fibrosis in 60% of SOT patients, and within 2 or 3 years 10% of these can become cirrhotic [18, 19, 53]. Therefore, chronic hepatitis E is typically more aggressive than chronic hepatitis B or hepatitis C [54]. In our study, chronic hepatitis was diagnosed according to typical histological features, such as interface hepatitis, at 160 dpi, in chronically infected monkeys. Liver fibrosis was not observed, probably due to the limited period of the study. Similar results—lymphocytic portal infiltrates with piecemeal necrosis (interface hepatitis)—were observed in heart and liver-transplanted recipients showing strong interface activity [13, 34, 39].

Previous studies have shown that HEV can replicate in organs and tissues other than the liver [55, 56]. Acute or chronic HEV infection may also cause extrahepatic manifestations that includes neurological disorders, kidney injury, acute pancreatitis and haematological abnormalities [57]. HEV RNA negative strand, which is indicative of replication, was detected in the liver, gallbladder, spleen, duodenum, colon, lymph node and pancreas from the three chronic infected monkeys. Recently, different HEV *quasispecies* were identified from serum and liquor from the same patient with chronic HEV, suggesting that chronic infection might promote the emergence of neurotropic variants of HEV [58]. In the short time of this study, it was not possible to detect HEV RNA in central nervous system (CNS), in contrast to that described in chronically infected rabbits [59]. Since histopathological changes were not observed in kidney tissues (data not shown), and no renal function changes were noticed, HEV RNA was not tested.

Common side effects of tacrolimus medication include nephrotoxicity, neurotoxicity, hepatotoxicity, and new-onset diabetes mellitus after transplantation (NOADT) [21, 60]. In order to assess the possible toxic effects of tacrolimus, we opted to include a control group (G3) of tacrolimus-treated-not-infected monkeys. Nevertheless, none animal from this group showed signs of neurotoxicity, nephrotoxicity or NOADT. The former is a clinical condition commonly observed in humans, and recently, was reported in an experimental study using tacrolimus-treated cynomolgus [27]. In our study one chronically HEV infected monkey, AC7, developed diabetes mellitus type 2 under immunosuppressive therapy, when daily blood levels of tacrolimus ranged 6.5–30 ng/ml and after HEV inoculation. Hyperglycaemia was first noticed (294 mg/dl) at 49 days of the immunosuppressive treatment, one week pi and reached elevated levels (327 mg/dl) associated to increased levels of glycated haemoglobin (8.8%) throughout the experiment. Glycaemia turned into the normal level (99 mg/dl) as soon as tacrolimus treatment was discontinued, even when HEV infection was still active. These findings were similar to those described in heart-and-thymus-transplanted cynomolgus, submitted to a daily intramuscular immunosuppressive therapy including tacrolimus at blood concentrations of 20–30 ng/ml [27].

The relationship between calcineurin inhibitors, such as tacrolimus and cyclosporin, and the development of NOADT is widely recognized in human medicine. Patients on cyclosporine treatment has been shown lower risk of developing NOADT than those using tacrolimus



[61]. The mechanism of NOADT is multifactorial with high incidence in the first year after transplantation and immunosuppressive treatment. Besides exposure to pharmacologic agents, other events like hepatitis C infection in SOT recipients also confer an increased risk of NOADT development [61, 62]. However, no association between chronic HEV infection in immunosuppressed patients and NOADT development was reported until now.

In conclusion, this study has provided the evidence that immunosuppressed cynomolgus monkeys treated with tacrolimus and infected with swine HEV-3 can develop chronic HEV infection. HEV infection was associated with interface hepatitis, characterizing the beginning of a chronic hepatitis. Furthermore, the cross-species transmission reported here reinforces the zoonotic role of swine HEV-3 strains in epidemiology of HEV infection in Brazil.

## Supporting information

**S1 Fig. Clinical appearance of alopecia in fore limbs and hind limbs, with well-circumscribed areas of hair loss without underlying skin inflammation.**

(TIF)

**S2 Fig. Lesion caused by herpetic reactivation.**

(TIF)

**S1 Table. Time course analysis of histopathological changes of liver biopsies. (A)** analysis from immunocompetent monkeys infected with HEV (G1); **(B)** analysis from monkeys previously treated with tacrolimus and infected with HEV (G2); and **(C)** analysis from monkeys only treated with tacrolimus (G3).

(DOCX)

## Acknowledgments

We are thankful to Hayne Felipe da Silva, director of Farmanguinhos/Fiocruz, for his kind and expert technical assistance.

## Author Contributions

**Conceptualization:** NRG MAP.

**Data curation:** NRG YRV JM.

**Formal analysis:** OGC.

**Funding acquisition:** MAP.

**Investigation:** NRG JRG JGM YBK FOB DPP LSV JM RSM RAAO JMO MAP.

**Methodology:** JRG JGM LBF MCCS EU JM AAA ACAS AMCG MAP.

**Project administration:** NRG MAP.

**Resources:** EU AAA JM.

**Validation:** JM DPP LSV LBF ACAS.

**Visualization:** NRG JMO MAP.

**Writing – original draft:** NRG MAP.

**Writing – review & editing:** RSM JMO.

## References

- Smith DB, Simmonds P, International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study G, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol*. 2014; 95(Pt 10):2223–32. PubMed Central PMCID: PMC4165930. <https://doi.org/10.1099/vir.0.068429-0> PMID: 24989172
- Khuroo MS, Khuroo NS. Transmission of Hepatitis E Virus in Developing Countries. *Viruses*. 2016; 8(9). Epub 2016/09/23. PubMed Central PMCID: PMC45035967.
- Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MF, de Sousa PS, Gaspar AM, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol*. 2010; 47(3):276–9. Epub 2010/02/02. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.12.021> PMID: 20116328
- Hering T, Passos AM, Perez RM, Bilar J, Fragano D, Granato C, et al. Past and current hepatitis E virus infection in renal transplant patients. *J Med Virol*. 2014; 86(6):948–53. Epub 2014/03/13. <https://doi.org/10.1002/jmv.23915> PMID: 24619955
- Passos-Castilho AM, Porta G, Miura IK, Pugliese RP, Danesi VL, Porta A, et al. Chronic hepatitis E virus infection in a pediatric female liver transplant recipient. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(12):4425–7. PubMed Central PMCID: PMC4313334. <https://doi.org/10.1128/JCM.02286-14> PMID: 25275004
- dos Santos DR, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol*. 2011; 149(1–2):236–41. Epub 2010/12/07. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.024> PMID: 21129863
- Gardinali NR, Barry AF, da Silva PF, de Souza C, Alfieri AF, Alfieri AA. Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds. *Res Vet Sci*. 2012; 93(3):1515–9. Epub 2012/07/10. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.06.003> PMID: 22769738
- Heldt FH, Staggmeier R, Gularte JS, Demoliner M, Henzel A, Spilki FR. Hepatitis E Virus in Surface Water, Sediments, and Pork Products Marketed in Southern Brazil. *Food Environ Virol*. 2016. Epub 2016/05/14.
- Yugo DM, Meng XJ. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10(10):4507–33. Epub 2013/09/28. PubMed Central PMCID: PMC3823334. <https://doi.org/10.3390/ijerph10104507> PMID: 24071919
- Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A, et al. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(11):1738–44. Epub 2009/11/07. PubMed Central PMCID: PMC2857258. <https://doi.org/10.3201/eid1511.091094> PMID: 19891860
- Kokkinos P, Kozyra I, Lazic S, Bouwknegt M, Rutjes S, Willems K, et al. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food Environ Virol*. 2012; 4(4):179–91. Epub 2013/02/16. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9087-8> PMID: 23412890
- Maunula L, Kaupke A, Vasickova P, Soderberg K, Kozyra I, Lazic S, et al. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int J Food Microbiol*. 2013; 167(2):177–85. Epub 2013/10/19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.003> PMID: 24135674
- Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Peron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2008; 358(8):811–7. Epub 2008/02/22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706992> PMID: 18287603
- Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, Benne CA, Vennema H, Reimerink JH, et al. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2008; 14(4):547–53. Epub 2008/04/03. <https://doi.org/10.1002/lt.21480> PMID: 18383084
- Geng Y, Zhao C, Huang W, Harrison TJ, Zhang H, Geng K, et al. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *J Hepatol*. 2016; 64(1):37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.08.034> PMID: 26362822
- Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, et al. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res*. 2007; 37(2):113–20. Epub 2007/02/16. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00024.x> PMID: 17300706
- Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med*. 361. United States 2009. p. 1025–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0903778> PMID: 19726781
- Kamar N, Rostaing L, Legrand-Abravanel F, Izopet J. How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? *Am J Transplant*. 2013; 13(7):1935–6. Epub 2013/05/11. <https://doi.org/10.1111/ajt.12253> PMID: 23659713
- Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, et al. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants.

- Gastroenterology. 2011; 140(5):1481–9. Epub 2011/03/01. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.050> PMID: 21354150
20. Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Garrouste C, Dubois M, Mansuy JM, et al. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis.* 2010; 202(6):835–44. Epub 2010/08/11. <https://doi.org/10.1086/655899> PMID: 20695798
  21. Griffin SP, Nelson JE. Impact of a Clinical Solid Organ Transplant Pharmacist on Tacrolimus Nephrotoxicity, Therapeutic Drug Monitoring, and Institutional Revenue Generation in Adult Kidney Transplant Recipients. *Prog Transplant.* 2016. Epub 2016/09/16.
  22. Wang Y, Zhou X, Debing Y, Chen K, Van Der Laan LJ, Neyts J, et al. Calcineurin inhibitors stimulate and mycophenolic acid inhibits replication of hepatitis E virus. *Gastroenterology.* 2014; 146(7):1775–83. Epub 2014/03/04. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.036> PMID: 24582714
  23. Huang F, Yang C, Zhou X, Yu W, Pan Q. Rhesus macaques persistently infected with hepatitis E shed virus into urine. *J Hepatol.* 2016.
  24. Longer CF, Denny SL, Caudill JD, Miele TA, Asher LV, Myint KS, et al. Experimental hepatitis E: pathogenesis in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J Infect Dis.* 1993; 168(3):602–9. Epub 1993/09/01. PMID: 8354901
  25. Tsarev SA, Emerson SU, Tsareva TS, Yarbough PO, Lewis M, Govindarajan S, et al. Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *J Infect Dis.* 1993; 167(6):1302–6. Epub 1993/06/01. PMID: 8501318
  26. de Carvalho LG, Marchevsky RS, dos Santos DR, de Oliveira JM, de Paula VS, Lopes LM, et al. Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:495. Epub 2013/10/24. PubMed Central PMCID: PMC3870956. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-495> PMID: 24148233
  27. Matthews KA, Tonsho M, Madsen JC. New-Onset Diabetes Mellitus After Transplantation in a Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*). *Comp Med.* 2015; 65(4):352–6. Epub 2015/08/28. PubMed Central PMCID: PMC4549682. PMID: 26310466
  28. Kinugasa F, Nagatomi I, Ishikawa H, Nakanishi T, Maeda M, Hirose J, et al. Efficacy of oral treatment with tacrolimus in the renal transplant model in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Sci.* 2008; 108(4):529–34. Epub 2008/12/23. PMID: 19098392
  29. Haustein SV, Kolterman AJ, Sundblad JJ, Fechner JH, Knechtle SJ. Nonhuman primate infections after organ transplantation. *Ilar j.* 2008; 49(2):209–19. Epub 2008/03/08. PubMed Central PMCID: PMC4876599. PMID: 18323582
  30. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods.* 2006; 131(1):65–71. Epub 2005/08/30. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004> PMID: 16125257
  31. Wang Y, Ling R, Erker JC, Zhang H, Li H, Desai S, et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol.* 1999; 80 Pt 1):169–77. Epub 1999/02/06.
  32. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, et al. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(4):1326–32. Epub 2002/03/30. PubMed Central PMCID: PMC4140370. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1326-1332.2002> PMID: 11923352
  33. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005; 41(6):1313–21. Epub 2005/05/26. <https://doi.org/10.1002/hep.20701> PMID: 15915461
  34. Pischke S, Stiefel P, Franz B, Bremer B, Suneetha PV, Heim A, et al. Chronic hepatitis e in heart transplant recipients. *Am J Transplant.* 2012; 12(11):3128–33. Epub 2012/07/25. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04200.x> PMID: 22823202
  35. Haagsma EB, Niesters HG, van den Berg AP, Riezebos-Brilman A, Porte RJ, Vennema H, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2009; 15(10):1225–8. Epub 2009/10/01. <https://doi.org/10.1002/lt.21819> PMID: 19790147
  36. Passos AM, Heringer TP, Medina-Pestana JO, Ferraz ML, Granato CF. First report and molecular characterization of hepatitis E virus infection in renal transplant recipients in Brazil. *J Med Virol.* 2013; 85(4):615–9. Epub 2013/02/06. <https://doi.org/10.1002/jmv.23494> PMID: 23382036
  37. Aggarwal R, Kamili S, Spelbring J, Krawczynski K. Experimental studies on subclinical hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques. *J Infect Dis.* 2001; 184(11):1380–5. Epub 2001/12/26. <https://doi.org/10.1086/324376> PMID: 11709779
  38. Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase

- 3 trial. *Lancet*. 2010; 376(9744):895–902. Epub 2010/08/24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61030-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61030-6) PMID: 20728932
39. Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C, Barg-Hock H, Heim A, Kamar N, et al. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2010; 16(1):74–82. Epub 2009/10/30. <https://doi.org/10.1002/lt.21958> PMID: 19866448
  40. Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, Grabowski J, Fytilli P, Gronert A, et al. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology*. 2012; 55(3):695–708. Epub 2011/10/19. <https://doi.org/10.1002/hep.24738> PMID: 22006345
  41. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Sandres-Saune K, Rostaing L, Kamar N, et al. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J Virol*. 2012; 86(18):10006–14. Epub 2012/07/05. PubMed Central PMCID: PMC3446597. <https://doi.org/10.1128/JVI.01003-12> PMID: 22761386
  42. Krogsgaard K, Wantzin P, Mathiesen L, Ring-Larsen H. Chronic evolution of acute hepatitis B: the significance of simultaneous infections with hepatitis C and D. Copenhagen Hepatitis Acuta Programme. *Scand J Gastroenterol*. 1991; 26(3):275–80. Epub 1991/03/01. PMID: 1906632
  43. Ciftci HS, Ayna TK, Caliskan YK, Turkmen A, Gurtekin M. Lipid parameters, doses and blood levels of calcineurin inhibitors in renal transplant patients. *Indian J Clin Biochem*. 2013; 28(2):164–8. Epub 2014/01/16. PubMed Central PMCID: PMC3613508. <https://doi.org/10.1007/s12291-012-0251-6> PMID: 24426203
  44. Du L, Tang H. An insight into the molecular characteristics of hepatitis C virus for clinicians. *Saudi Med J*. 2016; 37(5):483–91. <https://doi.org/10.15537/smj.2016.5.14178> PMID: 27146609
  45. Mahalingam R, Traina-Dorge V, Wellish M, Deharo E, Singletary ML, Ribka EP, et al. Latent simian varicella virus reactivates in monkeys treated with tacrolimus with or without exposure to irradiation. *J Neurovirol*. 2010; 16(5):342–54. Epub 2010/09/09. PubMed Central PMCID: PMC3076590. <https://doi.org/10.3109/13550284.2010.513031> PMID: 20822371
  46. Chin JL, Hisamuddin SH, O'Sullivan A, Chan G, McCormick PA. Thrombocytopenia, Platelet Transfusion, and Outcome Following Liver Transplantation. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2016; 22(4):351–60. Epub 2014/11/29. <https://doi.org/10.1177/1076029614559771> PMID: 25430936
  47. Diaz GC, Prowda J, Lo JJ, Arepally GM, Evans N, Wheelless Y, et al. Transplantation-mediated alloimmune thrombocytopenia: Guidelines for utilization of thrombocytopenic donors. *Liver Transpl*. 2008; 14(12):1803–9. Epub 2008/11/26. <https://doi.org/10.1002/lt.21539> PMID: 19025920
  48. Arai K, Kuramitsu K, Fukumoto T, Kido M, Takebe A, Tanaka M, et al. A Case Report of Drug-Induced Thrombocytopenia after Living Donor Liver Transplantation. *Kobe J Med Sci*. 2016; 62(1):E9–e12. Epub 2016/08/06. PMID: 27492209
  49. Colson P, Payraudeau E, Leonnet C, De Montigny S, Villeneuve L, Motte A, et al. Severe thrombocytopenia associated with acute hepatitis E virus infection. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(7):2450–2. Epub 2008/05/16. PubMed Central PMCID: PMC2446901. <https://doi.org/10.1128/JCM.02295-07> PMID: 18480231
  50. Fourquet E, Mansuy JM, Bureau C, Recher C, Vinel JP, Izopet J, et al. Severe thrombocytopenia associated with acute autochthonous hepatitis E. *J Clin Virol*. 48. Netherlands2010. p. 73–4. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.02.016> PMID: 20308017
  51. Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, McMaster P, Wong SH, Zylber-Katz E, et al. Consensus document: therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506). *Ther Drug Monit*. 1995; 17(6):606–14. Epub 1995/12/01. PMID: 8588229
  52. Kisu I, Mihara M, Banno K, Hara H, Masugi Y, Araki J, et al. Uterus allotransplantation in cynomolgus macaque: a preliminary experience with non-human primate models. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014; 40(4):907–18. Epub 2014/03/13. <https://doi.org/10.1111/jog.12302> PMID: 24612366
  53. Kamar N, Abravanel F, Selves J, Garrouste C, Esposito L, Lavayssiere L, et al. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation*. 2010; 89(3):353–60. Epub 2010/02/11. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181c4096c> PMID: 20145528
  54. Dalton HR, Webb GW, Norton BC, Woolson KL. Hepatitis E Virus: Time to Change the Textbooks. *Dig Dis*. 2016; 34(4):308–16. Epub 2016/05/14. <https://doi.org/10.1159/000444468> PMID: 27170383
  55. Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(9):3040–6. Epub 2001/08/30. PubMed Central PMCID: PMC388293. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3040-3046.2001> PMID: 11526125
  56. Liu P, Bu QN, Wang L, Han J, Du RJ, Lei YX, et al. Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(4):559–65. Epub 2013/05/01. PubMed Central PMCID: PMC3647409. <https://doi.org/10.3201/eid1904.120827> PMID: 23628346

57. Kamar N, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Dalton HR. Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus. *Liver Int.* 2016; 36(4):467–72. <https://doi.org/10.1111/liv.13037> PMID: [27005692](#)
58. Kamar N, Izopet J, Cintas P, Garrouste C, Uro-Coste E, Cointault O, et al. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am J Transplant.* 2010; 10(5):1321–4. Epub 2010/03/30. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03068.x> PMID: [20346067](#)
59. Han J, Lei Y, Liu L, Liu P, Xia J, Zhang Y, et al. SPF rabbits infected with rabbit hepatitis E virus isolate experimentally showing the chronicity of hepatitis. *PLoS One.* 2014; 9(6):e99861. Epub 2014/06/18. PubMed Central PMCID: PMC4061063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099861> PMID: [24937350](#)
60. Marchetti P, Navalesi R. The metabolic effects of cyclosporin and tacrolimus. *J Endocrinol Invest.* 2000; 23(7):482–90. Epub 2000/09/27. <https://doi.org/10.1007/BF03343761> PMID: [11005276](#)
61. Muduma G, Saunders R, Odeyemi I, Pollock RF. Systematic Review and Meta-Analysis of Tacrolimus versus Cyclosporin as Primary Immunosuppression After Liver Transplant. *PLOS ONE.* 2016; 11(11):e0160421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160421> PMID: [27812112](#)
62. Bloom RD, Rao V, Weng F, Grossman RA, Cohen D, Mange KC. Association of hepatitis C with post-transplant diabetes in renal transplant patients on tacrolimus. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(5):1374–80. Epub 2002/04/19. PMID: [11961026](#)