

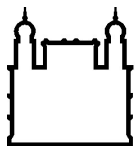
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**SOROPREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA
HEPATITE D (HDV) CIRCULANTE NO BRASIL.**

TAIRINE MONTEIRO DE BARROS

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

TAIRINE MONTEIRO DE BARROS

Soroprevalência e caracterização molecular do vírus da hepatite D (HDV) circulante no Brasil.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador (es): Prof. Dr^a. Livia Melo Villar
Prof. Dr. Francisco Campello do Amaral Mello

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2020

Monteiro de Barros, Tairine.

SOROPREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE D (HDV) CIRCULANTE NO BRASIL. / Tairine Monteiro de Barros.

- Rio de Janeiro, 2020.

85 f.; il.

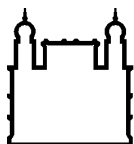
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2020.

Orientadora: Livia Melo Villar.

Co-orientador: Francisco Campello do Amaral Mello.

Bibliografia: f. 63-68

1. Vírus da Hepatite Delta. 2. HDV. 3. Epidemiologia molecular. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: TAIRINE MONTEIRO DE BARROS

**SOROPREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA
HEPATITE D (HDV) CIRCULANTE NO BRASIL.**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr^a. Livia Melo Villar
Prof. Dr. Francisco Campello do Amaral Mello

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Natalia Motta de Araujo - Presidente (IOC-FIOCRUZ-RJ)
Prof. Dr. Monick Lindenmeyer Guimarães (IOC-FIOCRUZ-RJ)
Prof. Dr. Deusilene Souza Vieira Dall'Acqua (FIOCRUZ-RO)
Prof. Dr. Tulio Machado Fumian (IOC-FIOCRUZ-RJ)
Prof. Dr. Gina Peres Lima dos Santos (UFF-RJ)

Rio de Janeiro, 19 de fevereiro de 2020

Aos meus pais, que são meu alicerce;

**Ao meu esposo, que desperta o
melhor de mim.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me mostrar todos os dias que está comigo, guiando meus passos e me levando nos braços para enfrentar todos os obstáculos e dificuldades, por me dar forças e sabedoria para chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, Andréa e Heber, por me apoiarem sempre, por confiarem em mim, por acreditarem na minha capacidade, pelo colo nos momentos mais difíceis. Vocês são os amores da minha vida, minha fortaleza. Agradeço a minha família, que torce e vibra a cada conquista minha.

Agradeço ao meu Esposo, Cristiano, por ter aceitado dividir a vida comigo e ser um companheiro incomparável, por me apoiar e estar ao meu lado a cada passo, por fazer do meu sorriso, o dele.

Agradeço a todos da coordenação e professores da pós-graduação, por toda dedicação a nós como alunos e pelo privilégio de obter o conhecimento de pessoas tão nobres e admiráveis.

Agradeço a minha turma por termos passado por esse período de mãos dadas, apoiando uns aos outros, pelos momentos de risada e de choro também, pela linda amizade que nasceu entre nós durante essa caminhada.

Agradeço imensamente ao meu orientador Chico, pelo incentivo antes mesmo da seleção do mestrado, por ter me honrado com sua orientação, por ter abraçado este projeto, pela paciência de ensinar e pelas broncas necessárias. Me sinto extremamente privilegiada por poder aprender com uma grande pessoa e pesquisador como você, serei eternamente grata por todas as oportunidades e conhecimento adquirido, obrigada por fazer de mim uma pesquisadora melhor a cada etapa.

Agradeço a minha orientadora Lívia, por todo apoio e empenho, por ser uma grande mulher e inspirar outras mulheres como eu, ainda no início da caminhada. Obrigada por todo o conhecimento e pela oportunidade de poder trabalhar e aprender além da ciência com você.

Agradeço a Babi, a mãezona de todos, por ser uma pessoa tão iluminada e cheia de paz, por não medir esforços pra ajudar a todos, pelas palavras de carinho, afago e incentivo. Você é um espelho para nós como mulher e pesquisadora.

Agradeço a Vanessa Duarte, minha irmã científica, por ter estado ao meu lado em todos os momentos, agradeço não só por toda sua ajuda e ensinamento, mas também pela sua amizade, que vai além dos muros da FIOCRUZ.

Agradeço aos meus outros irmãos científicos Vinícius, Giovana e Krishna, por apoiarmos e ajudarmos uns aos outros sempre, por compartilharmos nossas experiências e aprendermos juntos a cada dia. Obrigada por eu poder contar sempre com vocês.

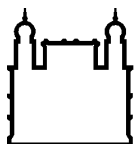
Agradeço a toda equipe LAHEP e AHV por serem mais que um grupo de trabalho. Me sinto imensamente honrada por fazer parte desta família há 6 anos, muito obrigada por tudo que aprendi com vocês e por todos os momentos.

Agradeço a minha revisora, Natalia Araújo, e aos demais membros da banca, Dra Monick, Dr Tulio, Dra Deusilene e Dra Gina, por toda a dedicação, colaboração e enriquecimento deste trabalho.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo auxílio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma, em algum momento, participou desta trajetória, tornando-me a pessoa que sou hoje.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

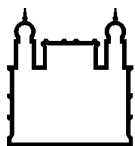
SOROPREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE D (HDV) CIRCULANTE NO BRASIL.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Tairine Monteiro de Barros

O vírus da hepatite D (HDV) acomete entre 48-60 milhões de pessoas no mundo e é um vírus satélite dependente do vírus da hepatite B (HBV) para a sua replicação. O genoma do HDV está classificado em 8 genótipos (GTs) enumerados de 1 a 8 que apresentam uma distribuição geográfica distinta. Entretanto, estudos recentes sugerem uma subdivisão intragenotípica devido a sua alta variabilidade genética. No Brasil predominam o GT3, que está associado a manifestação clínica exacerbada da doença, e o GT1, que é cosmopolita. Além disso, tendo sido relatada a ocorrência dos GTs 5 e 8, que são autóctones da África, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, respectivamente. Esses achados sugerem a importação e a circulação de genótipos de HDV “estrangeiros” no país, destacando a importância da pesquisa de HDV em áreas não endêmicas. Diante deste cenário, este estudo tem como objetivo determinar a soroprevalência da infecção pelo HDV e o perfil epidemiológico molecular dos genótipos do HDV circulantes em áreas endêmicas e não endêmicas do Brasil. Neste estudo transversal do tipo retrospectivo foram selecionadas 1240 amostras de soro provenientes de portadores do HBV de todas as regiões geográficas brasileiras, incluindo 24 dos 26 estados, coletadas entre 2013 a 2015. A presença de infecção pelo HDV foi avaliada por testes imunológicos (pesquisa de anticorpos anti-HDV por ELISA) e moleculares (presença de RNA viral por RT-PCR), bem como a identificação dos genótipos e sua associação à infecção pelo HBV. Das 1240 amostras testadas, 40 foram positivas para anti-HDV, resultando em uma soroprevalência global de 3,2%. Considerando as amostras positivas, 52,5% eram do sexo feminino e tinham idade média de 38,1 anos (mediana: 41,0). Considerando as faixas etárias, o anti-HDV apresentou maior taxa em indivíduos de 12 a 20 anos (média: 17,4 anos; $P < 0,0001$). A região Norte apresentou a maior prevalência de anti-HDV (8,5%; $P < 0,001$). Das 40 amostras positivas para o anti-HDV, 38 (95%) foram submetidas a testes moleculares, das quais 13 (34,2%) foram positivas para o HDV-RNA. Destas, 11 foram genotipadas através do sequenciamento da região que codifica o HDAg (403pb), onde 9 amostras (81,8%) foram caracterizadas como sendo GT3 (8 na região Norte e 1 na Região Centro-Oeste), 1 (9,1%) como GT5 (São Paulo) e 1 (9,1%) como GT8 (São Paulo). As sequências brasileiras de HDV-GT8 apresentaram uma distância genética de 15,5% das GT8 africanas. Com relação à associação entre os genótipos de HDV e HBV, predominou a co-infecção HBV-F2/HDV-GT3 (4/10; 40%). Por outro lado, dentre as amostras que apresentaram anti-HDV+ sem HDV-RNA detectável ($n=19$), o HBV-A (13/19; 68,4%) foi o mais frequente. Além disso, o presente estudo, além de confirmar a presença endêmica do HDV na região Norte, indicou a circulação do HDV em áreas não endêmicas do Brasil, evidenciando a importância de estudos nestas áreas. Ainda, a caracterização molecular identificou em duas amostras a coinfecção por GTs autóctones do continente africano circulando no país, ressaltando a utilidade da vigilância epidemiológica molecular na elucidação de rotas de introdução e dispersão do HDV na população brasileira.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

SEROPREVALENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CIRCULATING HEPATITIS D VIRUS (HDV) IN BRAZIL

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Tairine Monteiro de Barros

Hepatitis D virus (HDV) affects 48-60 million people worldwide and is considered a satellite virus dependent on the hepatitis B virus (HBV) to propagate. The HDV genome is classified into 8 genotypes (GTs) numbered from 1 to 8 that have a distinct geographic distribution, however, recent studies suggest an intragenotypic subdivision due to its high genetic variability. In Brazil there is a predominance of GT3, which is associated with clinical exacerbation of the disease; GT1, which is cosmopolitan, and the occurrence of GTs 5 and 8, in which are African genotypes, in North and Northeast regions, respectively. These findings suggest the importation and circulation of 'foreign' HDV genotypes in Brazil, emphasizing the importance of HDV research in non-endemic areas. In this context, this study aims to determine the seroprevalence of HDV infection and the molecular epidemiological profile of HDV genotypes in the country in endemic and non-endemic areas. In this retrospective cross-sectional study, 1240 serum samples from HBV carriers from all Brazilian geographic regions, including 24 of the 26 states, collected from 2013 to 2015 were selected. The presence of HDV infection was assessed by immunoassays (anti-HDV antibodies by ELISA) and molecular tests (presence of viral RNA by RT-PCR), as well as the identification of genotypes and their association with HBV infection. Of the 1240 samples tested, 40 were anti-HDV positive, resulting in an overall prevalence of 3.2%. Considering the positive samples, 52.5% were female and had a mean age of 38.1 years (median: 41.0). Considering age groups, anti-HDV showed a higher rate in individuals aged 12 to 20 years (mean: 17.4 years; $P < 0.0001$). The northern region had the highest prevalence of anti-HDV (8.5%; $P < 0.001$). Of the 40 anti-HDV positive samples, 38 (95%) were submitted to molecular testing in which 13 (34.2%) were HDV-RNA positive. Of these, 11 were genotyped by sequencing the HDAg coding region (403bp), where 9 samples (81.8%) were characterized as GT3 (8 in the North and 1 in the Midwest), one (9, 1%) as GT5 (São Paulo) and one (9.1%) as GT8 (São Paulo). The Brazilian HDV-8 sequences presented a genetic distance of 15.5% from the African ones. Regarding the association between HBV / HDV GTs ($n = 10$), HBV-F2 / HDV-3 co-infection predominated (4/10; 40%) and, among the samples that presented anti-HDV + without HDV-detectable RNA ($n = 19$), HBV-A (13/19; 68.4%) was the most frequent. The present study, besides confirming the endemic presence of HDV in the northern region, indicated the circulation of HDV in non-endemic areas of Brazil, highlighting the importance of studies in these areas. Moreover, the molecular characterization identified the presence of two imported GTs from the African continent circulating in the country, showing the importance of molecular epidemiological surveillance in elucidating the routes of introduction and dispersion of HDV in the Brazilian population.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	1
1.2. Origem do HDV - Teorias	2
1.3. Características gerais do HDV	5
1.3.1. Classificação	5
1.3.2. Morfologia	5
1.3.3. Genoma viral	6
1.3.4. Antígeno Delta (HDAg)	7
1.4. Ciclo replicativo do HDV	8
1.4.1. O vírion	8
1.4.2. A entrada do vírus no hepatócito	8
1.4.3. A entrada da ribonucleoproteína no núcleo	8
1.4.4. A replicação do genoma no núcleo	8
1.4.5. Formação das proteínas HDAg	9
1.4.6. O papel das proteínas HDAg na replicação viral	9
1.4.7. A exportação do vírus	10
1.5. Variabilidade genética e classificação dos genótipos do HDV	11
1.5.1. Distribuição dos genótipos pelo mundo e no Brasil	11
1.5.2. Reclassificação dos genótipos	13
1.6. Aspectos clínicos da infecção pelo HDV	15
1.7. Diagnóstico	16
1.8. Tratamento	17
1.9. Modos de transmissão	18
1.10. Epidemiologia	18
1.11. O vírus da hepatite B (HBV)	20
1.11.1. Características gerais do HBV	20
1.11.2. Ciclo de replicação do HBV	21
1.11.3. Epidemiologia do HBV	21
1.11.4. Infecção pelo HBV	22
1.11.5. Tratamento do HBV	23

1.11.6. Variabilidade genética do HBV	23
1.12. Interação molecular HBV-HDV	26
1.13. Justificativa.....	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Desenho do estudo	30
3.2. Considerações éticas.....	30
3.3. População do estudo	30
3.4. Estratégia	31
3.5. Detecção do anti-HDV no soro.....	33
3.5.1. Procedimento.....	33
3.6. Extração do material genético viral: DNA do HBV e RNA do HDV.....	34
3.6.1. Procedimento.....	35
3.7. Detecção do RNA do HDV por <i>nested</i> PCR.....	36
3.7.1. Procedimento.....	36
3.8. Detecção do DNA do HBV por <i>semi-nested</i> PCR	38
3.8.1. Procedimento.....	38
3.9. Purificação dos produtos de PCR.....	40
3.9.1. Procedimento.....	40
3.10. Sequenciamento das regiões amplificadas do HDV e HBV	41
3.10.1. Procedimento.....	42
3.11. Análise de sequências e filogenia	42
3.12. Análises estatísticas	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Testes sorológicos.....	44
4.2. Testes moleculares	46
4.2.1. Detecção dos ácidos nucleicos do HBV e HDV	46
4.2.2. Genotipagem do HDV e HBV e variabilidade de sequências.....	47
5. DISCUSSÃO	56
5.1. Soroprevalência.....	56

5.2. Caracterização molecular	58
6. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Imagem por microscopia eletrônica da partícula do HDV	2
Figura 2: Representação das proteínas do envelope do HBV utilizadas pelo HDV.....	6
Figura 3: RNA genômico, antígenômico e RNAm do HDV.....	7
Figura 4: Ciclo de vida do HDV	10
Figura 5: Distribuição global dos genótipos do HDV.....	12
Figura 6: Distribuição global dos genótipos e subgenótipos do HDV	14
Figura 7: Prevalência global da infecção pelo HDV em indivíduos HBsAg+	19
Figura 8: Distribuição geográfica dos genótipos do HBV no mundo.....	24
Figura 9: Distribuição dos genótipos do HBV no Brasil.....	25
Figura 10: Fluxograma da estratégia e metodologia.....	32
Figura 11: Princípio do teste ETI-AB-DELTAK-2.	34
Figura 12: Soroprevalência de amostras anti-HDV positivas entre os portadores de hepatite B crônica de acordo com a localidade.	46
Figura 13: Árvore filogenética para definição dos genótipos de HDV.	48
Figura 14: Árvore filogenética com sequências do HDV-3.....	50
Figura 15: Análise dos resíduos de aminoácidos da região parcial da S-HDAg das sequências do HDV-3.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 16: Árvore filogenética com sequências do HDV-5.....	51
Figura 17: Árvore filogenética com sequências do HDV-8.....	52
Figura 18: Análise dos resíduos de aminoácidos da região parcial da L-HDAg das sequências do HDV-8 brasileiras e africanas.....	53
Figura 19: Árvore filogenética para definição dos genótipos de HBV.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação da quantidade de amostras HBsAg+ por estado e região do Brasil testadas para a presença do anticorpo anti-HDV.....	31
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região que codifica HDAg do HDV por PCR.....	36
Tabela 3: concentrações e volumes do mix do RT-PCR para HDV (região HDAg).	37
Tabela 4: Concentrações e volumes dos reagentes para o mix da <i>nested</i> -PCR do HDV (região HDAg)	37
Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região P e S do HBV.....	38
Tabela 6: concentrações e volumes do mix do primeiro PCR para amplificação das regiões Pol e S do genoma do HBV.....	39
Tabela 7: concentrações e volumes do mix do segundo PCR para amplificação das regiões Pol e S do genoma do HBV.....	39
Tabela 8: Primers internos para sequenciamento do fragmento P e S do HBV.	42
Tabela 9: Características demográficas e virológicas da população estudada monoinfectada pelo HBV ou co-infectadas com HDV e sua distribuição pelas regiões brasileiras.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAR - "Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase"
anti-HBc IgM - anticorpo da classe IgM para o antígeno do "core" do HBV
anti-HDV - Anticorpo referente ao antígeno delta
avHDV - Hepatite delta de aves
CCD - "coiled-coil domain"
CHC - Carcinoma hepatocelular
DNA - Ácido desoxiribonucleico
EASL - Associação Europeia de Estudo do Fígado
ELISA - Ensaio imunoenzimático
HBcAg - Antígeno da região do "core" do HBV
HBeAg - Antígeno da região do envelope do HBV
HBsAg - Antígeno de superfície do HBV
HBV - Vírus da Hepatite B
HCV - Vírus da Hepatite C
HDAg - antígeno delta
HDV - Vírus da Hepatite Delta
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
HSPG - Proteoglicanos de sulfato de heparina
ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IFN - Interferon
L-HBsAg - Antígeno de superfície do HBV "large"
L-HDAg - Antígeno delta "large"
M-HBsAg - Antígeno de superfície do HBV "medium"
NAs - Análogos de nucleotídeos
NLS - Sinal de localização nuclear
NTPC - Polipeptídeo cotransportador de sódio celular
ORF - Fase de leitura aberta
PCDT - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
RBD - Domínio de Ligação de RNA
RNA - Ácido ribonucleico
RNAi - RNA de interferência
RNAm - RNA mensageiro

RNP - Complexo ribonucleoproteico

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

RVS - Resposta virológica sustentada

S-HBsAg - Antígeno de superfície do HBV "small"

S-HDAg - Antígeno delta "small"

sHDAg - Antígeno delta de cobra (snake)

sHDV - Hepatite Delta de cobra (snake)

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

O vírus da hepatite delta ou vírus da hepatite D (HDV) foi descrito pela primeira vez em 1977 por Rizzetto e colaboradores em núcleos de hepatócitos humanos de indivíduos portadores do vírus da hepatite B (HBV). O HDV foi identificado, a princípio, como um antígeno associado ao HBV com seu respectivo anticorpo, denominados antígeno delta (HDAg) e anticorpo delta (anti-HDV), respectivamente, apresentando distinção aos demais antígenos do HBV⁽¹⁾.

Posteriormente, estudos de prevalência evidenciaram a correlação do “agente delta” à presença do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) e pela primeira vez, sugeriram a possível associação deste sistema antígeno-anticorpo à um agente diferente do HBV^(2, 3).

Em 1980, Rizzetto e colaboradores apresentaram um trabalho de infecção experimental no qual inocularam soro com o HBV e o “agente delta” em chimpanzés portadores e suscetíveis ao HBV pela via parenteral, com a finalidade de definir algumas características da transmissibilidade desta infecção⁽⁴⁾. Neste estudo, o grupo concluiu que o HDAg estaria possivelmente associado à um agente defectivo, dependente do HBV. No mesmo ano, outro estudo mais detalhado⁽⁵⁾ realizado pelo mesmo grupo descreveu a presença de um envelope composto pelo HBsAg associado com o HDAg, formando uma partícula de aproximadamente 37 nm, evidenciando novamente o papel auxiliar do HBV na infecção e transmissão deste agente. Neste mesmo estudo, descrevem pela primeira vez um RNA como possível material genético do agente em questão, apontando seu pequeno tamanho comparado a outros RNAs virais e uma alta semelhança com viróides de plantas.

Em 1982, Smedile e colaboradores realizaram um estudo associando o agente delta à gravidade da infecção pelo HBV⁽⁶⁾, evidenciando a exacerbação do quadro clínico na co-infecção bem como sua relação com a hepatite fulminante, sendo o mesmo corroborado por Govindarajan e colaboradores em 1984⁽⁷⁾.

Finalmente, em 1984, Bonino e colaboradores⁽⁸⁾ identificaram o “agente delta” através de microscopia eletrônica (figura 1), denominando-o vírus da hepatite delta,

descrito como uma partícula formada por um envelope composto por HBsAg contendo o HDAg (nucleoproteína) juntamente com o RNA viral⁽⁹⁾.

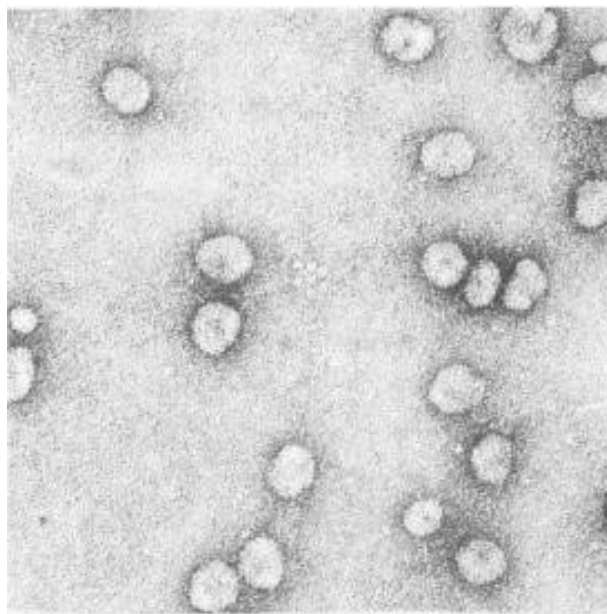


Figura 1: Imagem por microscopia eletrônica da partícula do HDV (adaptado de Bonino *et al.* 1984). Na imagem pode-se observar as partículas esféricas com tamanho aproximado de 36nm.

1.2. Origem do HDV - Teorias

A primeira especulação sobre a origem do HDV foi descrita por Kos e colaboradores em 1986, onde foi analisada a homologia deste vírus com viróides de plantas⁽¹⁰⁾. Elena e colaboradores reforçam esta teoria com um estudo realizado em 1991, no qual é realizada uma análise filogenética mostrando uma origem monofilética entre os viróides, alguns RNAs satélites e parte do genoma do HDV, além de citar outros fatores em comum entre estes patógenos como o genoma de RNA de fita simples, o alto conteúdo de guanina-citosina, a “replicação por círculo rolante” (do inglês *rolling circle replication*) e a capacidade auto-catalítica da molécula de RNA (ribozima)⁽¹¹⁾. Ainda, outro estudo associando estas três classes apontam a ampla distribuição da ribozima em diversos organismos, sugerindo que estes, incluindo o HDV, podem ser os representantes ancestrais dos RNAs⁽¹²⁾.

Ainda com relação à semelhança do HDV com viróides, um estudo experimental conseguiu demonstrar a replicação do genoma do HDV em plantas e a replicação de viróides em células animais, porém, este último ocorreu apenas com a expressão obrigatória do HDAg.⁽¹³⁾ Apesar destes estudos, ainda não está claro se o HDV e viróides apresentam evolução convergente, se possuem um ancestral comum ou, ainda, se estão evolutivamente relacionados.

Outra vertente teórica sobre a origem do HDV o associa a um RNA mensageiro primitivo. Levando em consideração que o HDAg é fundamental para a replicação do HDV, Brazas e Ganem, em 1996, realizaram um estudo objetivando analisar a interação do HDAg com as células do hospedeiro, demonstrando a efetividade da fusão e replicação do HDAg com diversas proteínas celulares⁽¹⁴⁾. A partir disso, propuseram que um RNA auto-replicante de vida livre capturou um RNA mensageiro de uma proteína do hospedeiro que apresentava alta similaridade de aminoácidos com o HDAg.

Com relação à auto clivagem que o genoma do HDV realiza em seu processo replicativo, dois estudos identificaram ribozimas em mamíferos com essa função catalítica, CLEC-2⁽¹⁵⁾ e CPEB3⁽¹⁶⁾, sendo esta última associada bioquimicamente à ribozima do HDV, sugerindo que o HDV possa ter se originado a partir do transcriptoma humano. Uma teoria mais recente sugere que o HDV se originou de um RNA circular distinto presente nos hepatócitos do hospedeiro capaz de utilizar as polimerases celulares para sua replicação e que o HDAg surgiu a partir de um RNA mensageiro do hospedeiro conjugado com sequências transcritas do genoma do HBV que evoluíram por deriva gênica^(13, 17, 18).

Contudo, desde a sua descoberta, estudos consideraram portadores humanos do HBV como únicos hospedeiros do HDV, sendo a presença do HBV premissa para ocorrer a infecção natural pelo vírus delta. Até recentemente, o HDV era o único vírus conhecido com estas características peculiares capaz de infectar animais, mais precisamente humanos.

Entretanto, novos estudos identificaram vírus com características semelhantes ao HDV ocorrendo em outras classes animais e não associados a uma co-infecção com membros da família *Hepadnaviridae*, refutando diversas teorias que têm como base a ocorrência exclusiva do HDV na espécie humana e em portadores do HBV.

Hetzel e colaboradores descobriram, no início de 2018, um agente semelhante ao HDV (*delta-like*) em cobras designado *snake* HDV (sHDV), apresentando um genoma com 1711 nucleotídeos e duas fases de leitura aberta (ORFs) onde uma delas codifica uma proteína semelhante ao HDAg, bem como uma ribozima genômica estruturalmente muito semelhantes às observadas no HDV humano⁽¹⁹⁾. Neste estudo, as cobras estavam co-infectadas com arenavirus e não foi identificado nenhum hepadnavírus co-infectando os animais. O sHDAg foi encontrado em grande quantidade no interior de células neuronais e epiteliais do rim, baço e pulmão, hepatócitos, leucócitos, resultado que demonstrou a replicação ativa do vírus em diversos tecidos.

Neste mesmo ano, Wille e colaboradores identificaram outro vírus *delta-like* em aves, com genoma contendo 1706 nucleotídeos, alto grau de pareamento de bases conferindo o formato característico de haste, um conteúdo de GC de 51% e uma proteína codificada (avHDAg) apresentando uma similaridade de aminoácidos de 32% com o HDAg, além da região de ribozima no genoma e antígenoma⁽²⁰⁾. Vale ressaltar que estas aves estavam co-infectadas com o vírus da *influenza* e não apresentavam nenhuma infecção por hepadnavírus. Este estudo, assim como o anterior, sugeriu a existência de um ancestral comum entre estes vírus, bem como a capacidade dos vírus *delta-like* utilizarem envelopes de outras classes de vírus para a sua replicação.

Chang e colaboradores (2019) também identificaram vírus *delta-like* utilizando uma abordagem meta-transcriptômica em outros táxons de vertebrados (peixes, anfíbios e répteis) e invertebrados (cupins subterrâneos) no qual todos estes apresentavam estruturas genômicas auto-complementares e não ramificadas em formato de haste, como o HDV, e todos codificando proteínas semelhantes ao HDAg⁽²¹⁾. Novamente, nenhum destes agentes foram associados a uma co-infecção com um hepadnavírus e sim com diversos outros vírus como arenavírus, hantavírus, reovírus, astrovírus, influenza, entre outros.

Estes trabalhos, além de desafiar as teorias evolutivas anteriores ao sugerir que o ancestral do HDV estava presente desde o surgimento do Metazoa⁽²¹⁾, evidenciam a ocorrência de vírus semelhantes ao HDV (*delta-like*) em diversas classes animais infectando sem a necessidade de um hepadnavírus como vírus auxiliar, levando a novas perspectivas na tentativa de explicar a origem deste vírus. Neste cenário, Perez-Vargas e colaboradores (2019) desenvolveram um estudo no

qual demonstraram a eficácia da replicação e montagem de partículas infecciosas do HDV utilizando glicoproteínas de envelope de seis gêneros diferentes de vírus *in vitro*, além de co-infecção com o vírus da hepatite C (HCV) *in vivo*⁽²²⁾. Os autores sugerem que o motivo de nunca se ter encontrado esta co-infecção em pacientes de fato possa estar associado a fatores bioquímicos e imunológicos do hospedeiro, impedindo a manutenção desta co-infecção à longo prazo. Todos esses achados recentes trouxeram novos elementos a serem considerados, evidenciando a necessidade de estudos mais abrangentes sobre a evolução do HDV.

1.3. Características gerais do HDV

1.3.1. Classificação

O HDV é o único membro do gênero *Deltavirus*, gênero este que não possui família⁽⁹⁾. É um vírus considerado deficiente devido sua dependência das proteínas do envelope do HBV para sua replicação e infecção em humanos. Seu vírion apresenta uma densidade flutuante em CsCl de cerca de 1,24 g/cm³⁽⁹⁾. Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), nenhum outro vírus foi aprovado como espécie para pertencer a este gênero até o momento, apesar dos recentes trabalhos nos quais foram descritos vírus *delta-like* tendo como hospedeiro diversos outros táxons animais como aves, anfíbios e invertebrados⁽¹⁹⁻²¹⁾.

1.3.2. Morfologia

O HDV apresenta um formato esférico com um diâmetro de aproximadamente 42 nm e não apresenta projeções visíveis em sua superfície. Seu envelope é composto pelas proteínas de superfície do HBV (HBsAg) (figura 2), que abriga uma ribonucleoproteína formada por cerca de 70 cópias das proteínas antigênicas do HDV⁽²³⁾ juntamente ao genoma viral, que consiste em um RNA circular de fita simples com aproximadamente 1690 nucleotídeos e polaridade negativa, apresentando uma dobra em sua estrutura semelhante a uma haste devido ao alto conteúdo de nucleotídeos GC e, conseqüentemente, alto grau de pareamento de bases^{(24),(25)}.

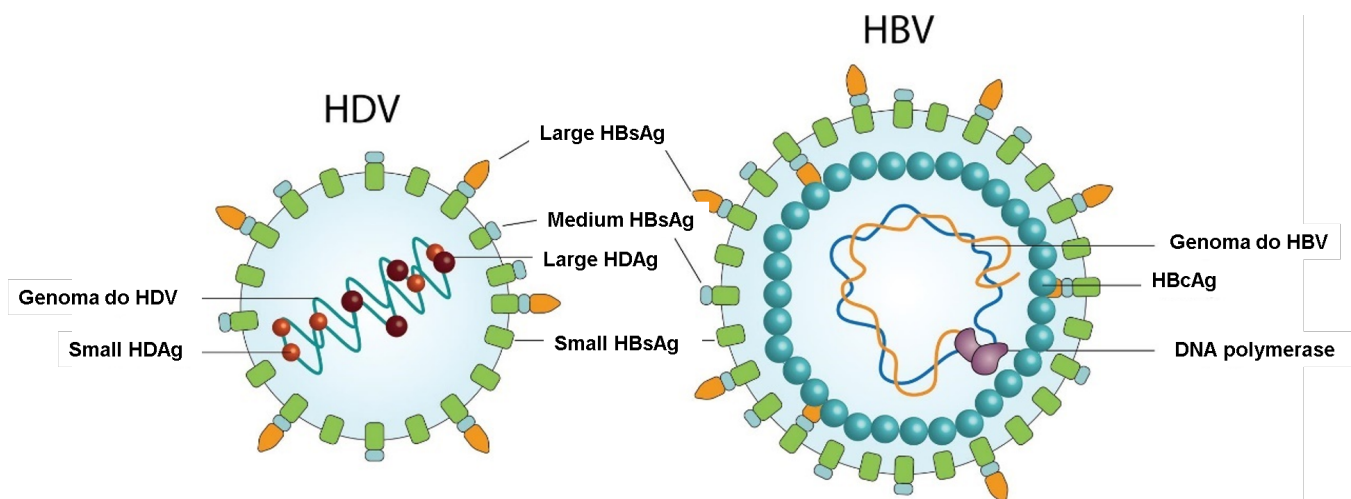


Figura 2: Representação das proteínas do envelope do HBV utilizadas pelo HDV (Adaptado de Giersch e Dandri, 2015).

1.3.3. Genoma viral

Além do genoma contido no vírion, o HDV apresenta dois RNAs adicionais nas células infectadas sendo um deles o seu antigenoma, no qual está a única ORF codificante das proteínas HDAg, e o segundo RNA adicional que atua como RNA mensageiro com cerca de 800 nt com a mesma polaridade do antigenoma (figura 3)⁽²⁶⁾. Seu RNA circular apresenta um potencial de se dobrar em formato de haste devido ao alto grau de pareamento de bases (~74%), ocorrendo no seu genoma e antigenoma⁽¹⁰⁾. Esta região da dobra pode assumir uma conformação específica e atuar como uma ribozima auto-catalítica⁽¹⁸⁾.

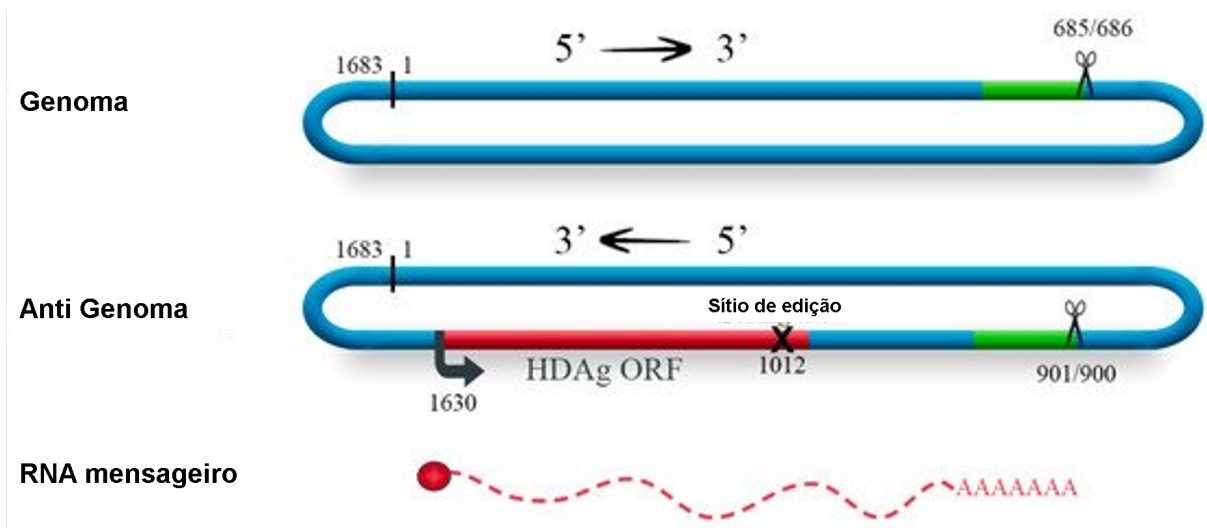


Figura 3: RNA genômico, antígenômico e RNAm do HDV (adaptado por Goodrum e Pelchat, 2019). As ribozimas são representadas pelas partes verdes e a região de clivagem está sendo indicada pela tesoura. A ORF do HDAg está representada em vermelho e a seta na posição 1630 indica o início da transcrição. O “X” na ORF indica a região onde ocorre a edição do codon de parada presente no S-HDAg.

1.3.4. Antígeno Delta (HDAg)

O RNA do HDV codifica duas proteínas antigênicas: uma menor, S-HDAg (do inglês *small hepatitis delta virus antigen*), com 195 aminoácidos, e outra maior, L-HDAg (do inglês *large hepatitis delta virus antigen*), com 214 aminoácidos, que diferem apenas pela presença de 19 resíduos adicionais na porção C-terminal do L-HDAg. Tal diferença ocorre devido a uma modificação pós-transcricional no qual o gene codificante do S-HDAg sofre a alteração de uma adenina por uma citosina pela enzima adenosina deaminase da célula hospedeira e, com isso, o códon de parada (UAG) é substituído pelo códon UGG-triptofano, originando o gene maior que codifica o L-HDAg⁽²⁷⁾. A proteína S-HDAg ativa a replicação do RNA genômico e medeia a transcrição do RNA mensageiro viral, enquanto a L-HDAg é uma proteína tardia que inibe a transcrição e replicação viral, interage com os antígenos de superfície do HBV (com participação da S-HDAg) e acelera a formação de novos vírions⁽²⁸⁾. As duas isoformas do HDAg apresentam diversos domínios em comum, como o de ligação ao RNA (RBD), sinal de localização nuclear (NLS), domínio CCD (*coiled-coil domain*) e uma porção C-terminal da sequência rica em prolina e glicina⁽²⁵⁾.

1.4. Ciclo replicativo

A replicação do HDV ocorre por um processo conhecido como “círculo rolante” (do inglês *rolling circle*) no qual uma fita circular de RNA é utilizada como modelo e transcrita por uma enzima RNA polimerase dependente de RNA do hepatócito do hospedeiro. Durante a formação dos novos filamentos de RNA, estes sofrem clivagem catalizada pelas ribozimas virais e as extremidades resultantes são ligadas pela enzima RNA ligase celular, adquirindo a forma circular (figura 4).^(25, 29)

1.4.1. O vírion

O vírion do HDV é formado a partir da associação do seu genoma a cerca de 70-200 proteínas HDAg, formando um complexo ribonucleoproteico (RNP), envolto por uma bicamada lipídica derivada do retículo endoplasmático contendo as três proteínas do envelope do HBV (S-HBsAg, M- HBsAg e L- HBsAg), o que possibilita a entrada do HDV nos hepatócitos^(29, 30).

1.4.2. A entrada do vírus no hepatócito

Inicialmente ocorre a associação dos proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs, do inglês *heparan sulfate proteoglycan*) da célula com o vírus pelas proteínas do envelope do HBV, levando a uma mudança na conformação do domínio preS1 da L-HBsAg. O HDV então se liga ao polipeptídeo cotransportador de sódio celular (NTPC) (figura 4), entrando na célula de modo ainda não claramente conhecido^(29, 30).

1.4.3. A entrada da ribonucleoproteína no núcleo

O complexo ribonucleoproteico, liberado no citoplasma após a entrada no HDV no hepatócito, é transportado para o núcleo provavelmente mediante a um sinal de localização nuclear do HDAg que permite a sua importação para o núcleo celular, local onde ocorre a replicação do HDV (figura 4)^(29, 30).

1.4.4. A replicação do genoma no núcleo

Para as etapas da replicação do RNA do HDV, faz-se necessário o uso de enzimas da célula hospedeira, uma vez que este vírus não apresenta uma polimerase própria. A polimerase II provavelmente catalisa a replicação e a síntese

do RNAm para a produção das proteínas HDAG, podendo ocorrer também o auxílio da polimerase I^(29, 30).

Inicialmente, ocorre a síntese da fita antígenômica a partir da fita genômica. Em seguida, a replicação viral pelo processo de círculo rolante forma multímeros do RNA viral com ambas as polaridades, que sofrem ação catalítica pelas ribozimas do próprio RNA viral levando a formação de monômeros, que se religam pela ação de ligases celulares para a formação do RNA circular (genômico e antígenômico) do HDV^(29, 30).

1.4.5. Formação das proteínas HDAG

Apenas a fita antígenômica apresenta a sequência codificante das proteínas HDAG e, por estar no núcleo, faz-se necessária a produção de uma fita de RNAm de aproximadamente 800 nucleotídeos com uma Cap 5' e uma calda poliadenilada na porção 3', o que permite a sua saída do núcleo para o citoplasma para a sua tradução^(29, 30).

A proteína L-HDAG difere da S-HDAG apenas pela adição de 19 aminoácidos na porção C-terminal. Ambas são codificadas na mesma sequência do RNA antígenômico. Uma edição no RNA promovida pela enzima ADAR1 provoca uma mutação no codon de parada da S-HDAG, no qual UAG torna-se UGG, permitindo a extensão desta com a adição dos 19 aminoácidos extras, formando a L-HDAG^(29, 30).

1.4.6. O papel das proteínas HDAG na replicação viral

As proteínas virais do HDV apresentam influência em diversas etapas da replicação viral. Ao passo que a síntese do S-HDAG leva a continuidade do processo de replicação, a produção do L-HDAG suprime a replicação viral mediante uma farnesilação na sua porção adicional, dando início as etapas de montagem e secreção viral. Ambas as proteínas apresentam domínios funcionais que promovem a entrada, montagem e saída do vírus no hepatócito. A S-HDAG além de direcionar o complexo ribonucleoproteico para o núcleo, promove também a alteração da especificidade da polimerase permitindo sua atividade no RNA auto-complementar do HDV^(29, 30).

1.4.7. A exportação do vírus

Exceto o RNA antígeno, os produtos da replicação do HDV contidos no núcleo são exportados para o citoplasma para a montagem das ribonucleoproteínas. Apesar das partículas do HDV apresentarem em seu envelope as três proteínas HBsAg (Small, Medium e Large), o HDV necessita apenas da S-HBsAg para sua montagem e secreção. Contudo, um envelope apenas com esta proteína não seria capaz de infectar outros hepatócitos, uma vez que a L-HBsAg faz-se necessária para a entrada do vírion na célula. A via de secreção do HDV ainda permanece incerta⁽²⁸⁻³⁰⁾.

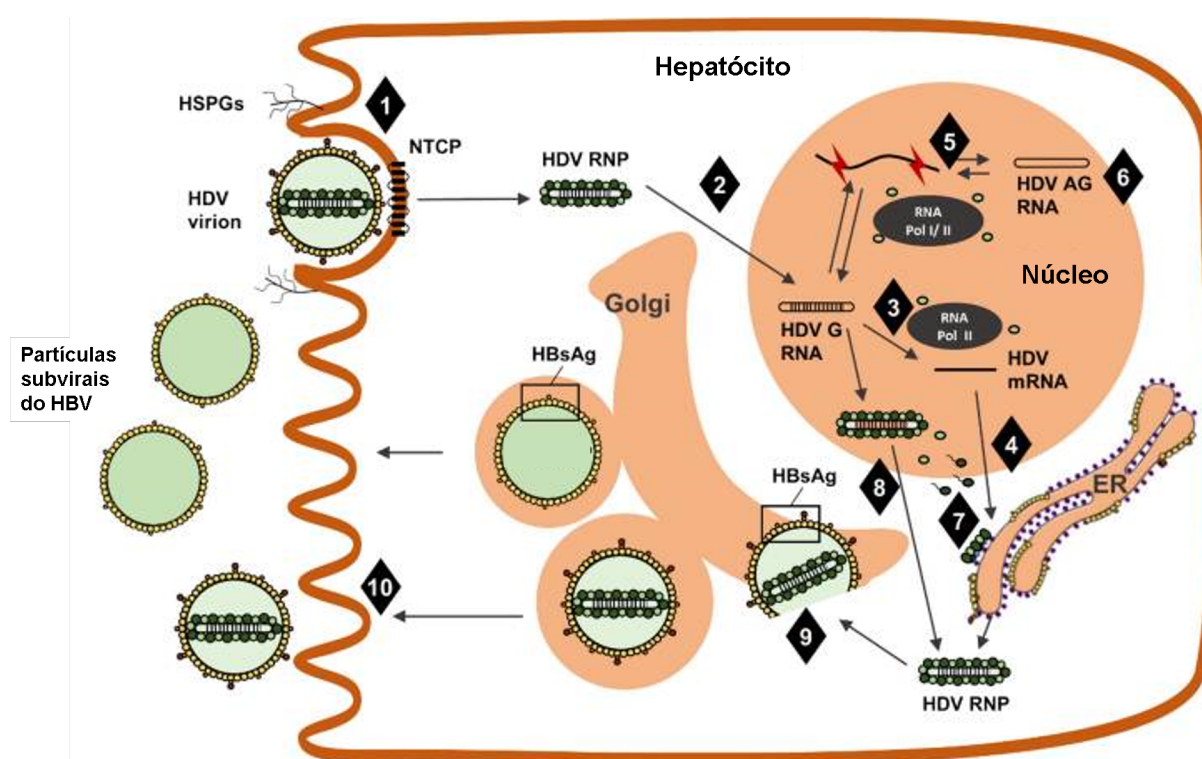


Figura 4: Ciclo de vida do HDV (Adaptado de Mentha *et al.* 2019). 1- Entrada do HDV no hepatócito. 2- Transporte da ribonucleoproteína do HDV (HDV RNP) para o núcleo e liberação do genoma viral (HDV G RNA). 3- Transcrição do genoma viral em RNA mensageiro (HDV mRNA). 4- Tradução do HDAG. Replicação do RNA viral mediada por polimerases da célula pelo mecanismo de *rolling circle*, com formação de intermediários de RNA multiméricos e antígenoicos. 6- Edição do RNA antígeno para formação da Large HDAG. 7- Farnesilação do L-HDAg, que leva a regulação da replicação e montagem viral. 8- Montagem da ribonucleoproteína no núcleo. 9- Montagem do virion (com as proteínas HBsAg por meio da interação destas com a L-HDAg farnesilado) e exportação. 10- Secreção dos virions pelo Complexo de Golgi.

1.5. Variabilidade genética e classificação dos genótipos do HDV

Inicialmente, o HDV foi classificado em 3 grandes clados (I, II e III), porém essa classificação foi sofrendo modificações conforme o surgimento de novos estudos. A classificação atual enumera os genótipos do HDV de 1 a 8. O clado I manteve-se denominado genótipo 1, os clados IIa e IIb tornaram-se os genótipos 2 e 4, respectivamente, e o clado III manteve-se como genótipo 3. Os genótipos 5, 6, 7 e 8 descritos inicialmente no continente africano, foram os genótipos mais recentemente descobertos, sendo o último, genótipo 8, descrito em 2006⁽³¹⁾. Até o momento, a classificação do HDV em genótipos se baseia em uma divergência intragenotípica de até 16% e intergenotípica de até 40%. Esta diversidade está associada à ineficácia da revisão da Pol II no RNA do HDV, bem como, à pressão do sistema imunológico em pacientes crônicos ao longo dos anos, podendo levar a edições nucleotídicas em diferentes locais do genoma⁽³²⁾.

1.5.1. Distribuição dos genótipos pelo mundo e no Brasil

Até o momento, como mencionado anteriormente, 8 genótipos do HDV já foram descritos, enumerados de 1 a 8, com uma distribuição geográfica característica (figura 5). O genótipo 1 apresenta distribuição mundial, sendo predominante na América do Norte, Europa, África, Mongólia, China, Oriente Médio e no Sul da Ásia, ocorrendo, também, com menor frequência, na América do Sul, Rússia, Japão e Taiwan. Já o genótipo 2 é o mais frequente no Japão e Taiwan, ocorrendo menos frequentemente no Sul da Ásia e, recentemente, relatado no Egito e Irã. O genótipo 3 está restrito ao continente americano, ocorrendo de forma predominante na América Central e América do Sul, principalmente na região da Bacia Amazônica. O genótipo 4 é predominante em Taiwan. Os genótipos 5, 6, 7 e 8, até recentemente, eram relatados apenas no continente africano, contudo, nos últimos anos, o genótipo 5 foi relatado no Reino Unido, França, Austrália, Brasil e Suíça. O genótipo 6 foi relatado na França e no Reino Unido, genótipo 7 também na França, e o genótipo 8 no Brasil.^(33, 34)

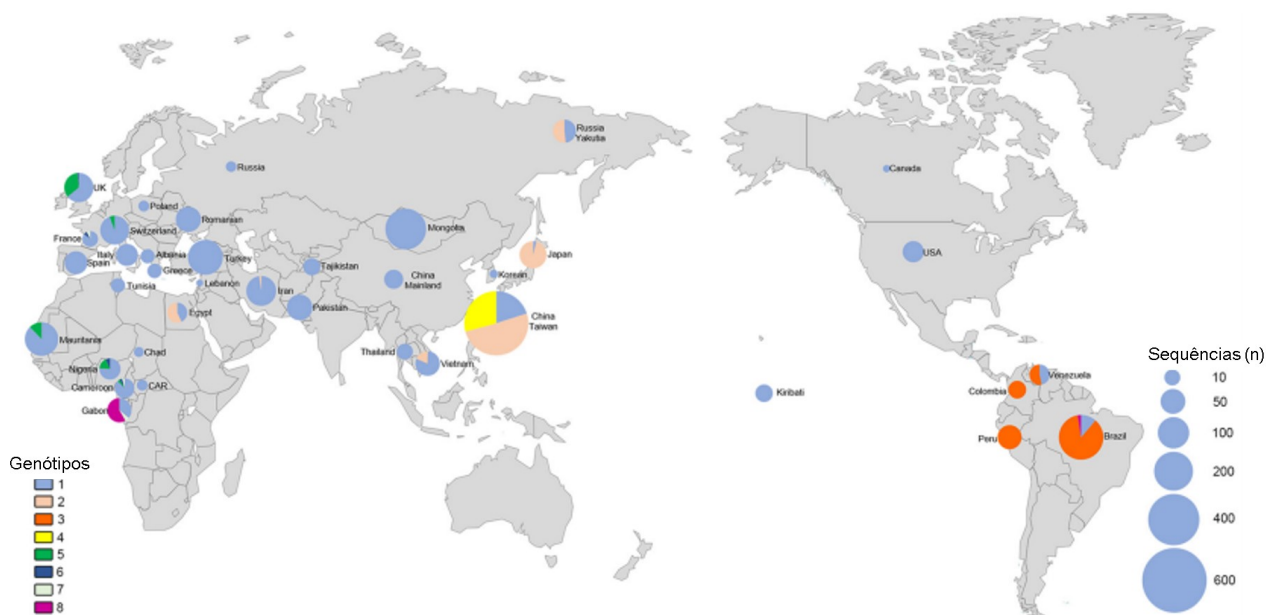


Figura 5: Distribuição global dos genótipos do HDV (Adaptado de Chen *et al.*, 2018). Cada cor representa um genótipo distinto, conforme descrito na legenda na parte inferior esquerda da figura, e o tamanho do círculo varia de acordo com o número de sequências analisadas, conforme descrito na legenda na parte inferior direita da figura.

No Brasil, a porção ocidental da região Norte, na qual encontra-se a Bacia Amazônica, é considerada endêmica para o HDV, sendo o genótipo 3 o mais prevalente⁽³⁵⁻³⁸⁾, seguido do genótipo 1, que ocorre em todos os continentes. Contudo, na última década, dois trabalhos^(39, 40) relataram a circulação do genótipo 8 – até então relatado exclusivamente na África – no Maranhão, região Nordeste do Brasil, área considerada não endêmica para o HDV, fato que foi associado ao tráfico de escravos que ocorreu no Brasil durante o século XIV. Ainda, outro estudo relatou a ocorrência do genótipo 5 no Acre⁽³⁸⁾, área endêmica, genótipo este que até pouco tempo era relatado apenas no continente africano, mas que vem sendo encontrado em diversos outros continentes^(41, 42). Apesar do genótipo 1 não ser o mais prevalente na área endêmica do país, um estudo realizado em Minas Gerais, região Sudeste do Brasil, encontrou uma prevalência de 6,2% de HDV em pacientes HBsAg+ no qual das 26 amostras sequenciadas, todas pertenciam ao genótipo 1⁽⁴³⁾.

1.5.2. Reclassificação dos genótipos

Recentemente, alguns estudos(41, 44-46) vêm sugerindo uma subdivisão dos genótipos do HDV devido à alta divergência intragenotípica. Le Gal e colaboradores (2017)⁽⁴¹⁾ realizaram um estudo com sequências do genoma completo e parciais (HDAg) do HDV, onde a similaridade nucleotídica entre os mesmos genótipos foi definida em >85% na região parcial ou >80% no genoma completo, enquanto que uma similaridade maior que 90% no genoma completo redefiniria o grupo em subgenótipos. O genótipo 1 foi subdividido em 4 subgenótipos (a-d) onde o HDV-1a e o HDV-1b estão restritos à África e Madagascar e HDV-1c às ilhas da Oceania, enquanto o HDV-1d é encontrado no Oriente Médio, leste e oeste da Europa, Ásia e América do Norte. O HDV-2 foi subdividido em HDV-2a e HDV-2b, sendo encontrados, respectivamente, no Japão e Sibéria. O HDV-4a e HDV-4b circulam na porção oriental do continente asiático (figura 6). O HDV-3, HDV-5, HDV-6, HDV-7 e HDV-8 não apresentaram subdivisão neste trabalho.

Já no trabalho publicado por Miao e colaboradores (2019)⁽⁴⁴⁾, os genótipos 3 e 6 foram segregados em três subgenótipos e os genótipos 1, 2, 4, 5, 7 e 8 foram agrupados em apenas dois subgenótipos. Neste trabalho, as análises com sequências do genoma completo do HDV apontaram o genótipo 3 como o mais distinto dentre os genótipos, com uma similaridade nucleotídica de cerca de 62% deste para os outros, ao passo que a similaridade nucleotídica entre os outros genótipos variou de 69% a 79%. Já a similaridade nucleotídica para definir os subgenótipos variou de 81,5% a 91%.

Em outro estudo, entretanto, Delfino e colaboradores (2018)⁽⁴⁵⁾ propõem a redução dos grupos filogenéticos do HDV em três, onde o Grupo 1 e o Grupo 3 correspondem aos genótipos 1 e 3 respectivamente, e o Grupo 2 é composto por todos os outros (2 e 4-8), onde cada um destes grupos formam grupos monofiléticos. Neste trabalho, os resultados das análises realizadas com a sequência parcial (HDAg) ou com o genoma completo do HDV não apresentaram diferenças significativas.

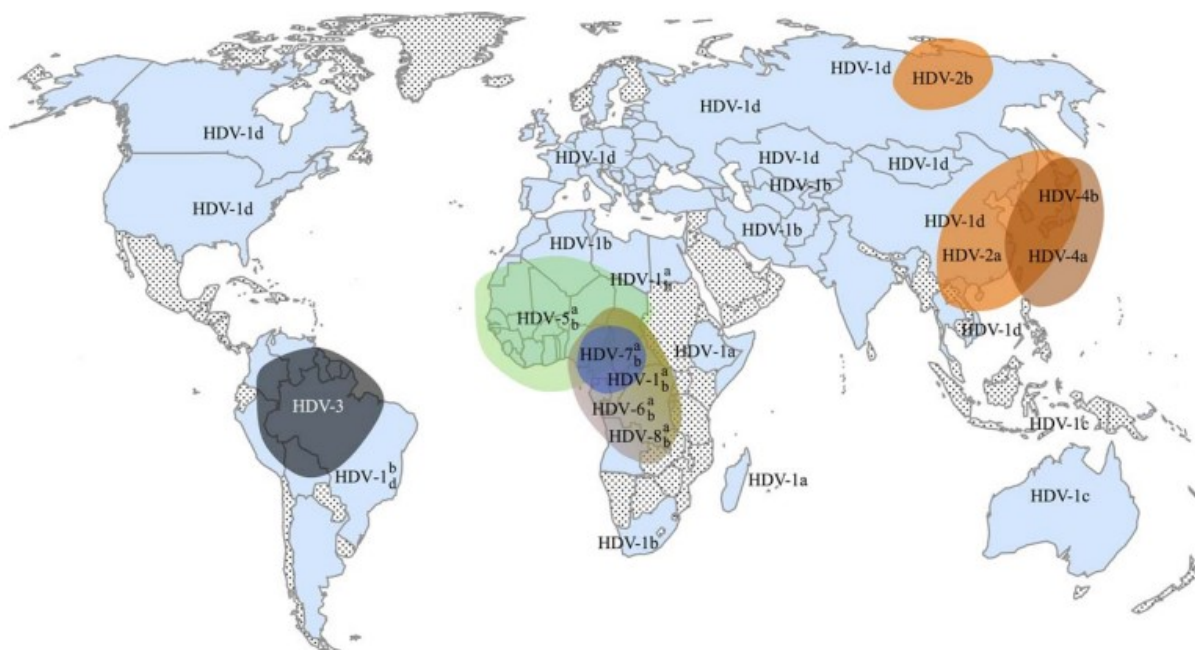


Figura 6: Distribuição global dos genótipos e subgenótipos do HDV (Le Gal *et al.* 2017). Os países onde ocorre o HDV-1 estão em azul claro. O HDV-1a e o HDV-1b estão restritos à África e Madagascar e o HDV-1c às ilhas da Oceania, enquanto que o HDV-1d é encontrado no Oriente Médio, Europa Oriental e Ocidental, Ásia e América do Norte. O HDV - 2a é encontrado em principalmente em Taiwan e Japão e o 2b, na Sibéria. O HDV - 3 (preto) está presente no norte da América do Sul. HDV - 4a e HDV - 4b (marrom claro) circulam no Extremo Oriente. HDV - 5, HDV - 6, HDV - 7 e HDV - 8 (verde, roxo, azul e marrom, respectivamente) estão presentes na África Ocidental, Subsaariana e Central. As áreas pontilhadas indicam regiões onde ainda não há dados disponíveis.

Karimzadeh e colaboradores⁽⁴⁶⁾ (2019) realizaram um estudo detalhado analisando a divergência entre os genótipos, no qual a menor divergência entre genótipos foi encontrada entre o HDV-5 e o HDV-2 ($\geq 10\%$), e a maior divergência foi encontrada no genótipo 3 contrapondo com todos os outros genótipos (28,44%). A análise filogenética revelou a subdivisão do genótipo 1 em cinco subgenótipos, classificados como HDV-1a-e, no qual a identidade média entre as sequências HDV-1 foi de 92,06% e a diferença intersubgenótipo variou de 2,3% (1c e 1e) a 8,7% (1a e 1b). Também apresentaram divisão em subgenótipos os genótipos 2 (2a-2b) e 4 (4a-4b), no qual apresentavam uma distinção em suas sequências nucleotídicas de $7,35 \pm 0,49\%$ e $6,49 \pm 0,81\%$, respectivamente. Vale ressaltar que a análise filogenética neste estudo foi realizada com sequências completas do genoma do HDV e, separadamente, com sequências da região que codifica o L-HDAg, não

havendo discordância entre as duas análises. Com relação à distribuição dos subgenótipos, os cinco subgenótipos do HDV-1 pertenciam a regiões geográficas distintas, onde os subgenótipos 1a e 1b estão presentes na África Subsaariana, o subgenótipo 1c nos países asiáticos como China, Vietnã, Japão e Taiwan, o subgenótipo 1d na Turquia e Irã e, por fim, o subgenótipo 1e ocorrendo nos países europeus. Com relação aos subgenótipos do HDV-2, as sequências do Japão e Taiwan pertenciam ao subgenótipo 2a, enquanto as amostras da Rússia foram classificadas como 2b. Por fim, O subgenótipo 4a foi associado às amostras de Taiwan e o 4b, às do Japão. Concluindo, este trabalho propõe que os clados apresentando uma diferença intergenotípica $\geq 10\%$ sejam classificados como genótipos, enquanto os que apresentam distinção intragenotípica de $\geq 3\%$ a $<10\%$ sejam classificadas como subgenótipos⁽⁴⁶⁾.

Apesar de ainda não existir um consenso entre os pesquisadores para definir a nova classificação dos genótipos do HDV, levando em consideração a alta divergência genética entre os clados observada na atual classificação, a subdivisão dos genótipos do HDV em subgenótipos pode auxiliar na compreensão da história evolutiva e rotas de dispersão deste vírus.

1.6. Aspectos clínicos da infecção pelo HDV

A hepatite D crônica é considerada a forma mais grave dentre as hepatites virais. Os mecanismos que definem o curso da infecção pelo HDV ainda não estão bem definidos⁽³²⁾. Sabe-se que, comparado a monoinfecção pelo HBV, a coinfeção HBV/HDV apresenta um aumento da morbidade em até três vezes e o risco de progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC)⁽⁴⁷⁾.

A hepatite D aguda ocorre a partir da coinfeção simultânea de HBV e HDV em um indivíduo susceptível (anti-HBs negativo), sendo indistinguível clinicamente a infecção pelo HBV isoladamente e a coinfeção. O período de incubação varia de 1 a 2 meses. As manifestações clínicas são similares a monoinfecção pelo HBV tanto na fase pré-clínica como na fase icterica. Já a superinfecção ocorre quando um indivíduo já infectado cronicamente pelo HBV contrai o HDV, causando uma hepatite aguda grave que, em 80% dos casos, progride para a cronicidade⁽⁶⁾. Diferentemente da coinfeção simultânea que geralmente leva a eliminação de ambos os vírus, a maioria dos pacientes com superinfecção progride para infecção crônica, geralmente

piorando o dano hepático preexistente relacionado ao HBV. A hepatite D crônica caracteriza-se por características típicas de todas as hepatites crônicas. Este processo pode levar ao desenvolvimento de cirrose, insuficiência hepática e CHC dentro de poucas décadas⁽⁴⁸⁾.

Em um recente estudo de meta-análise, a taxa de resolução espontânea do HDV na coinfeção é estimada em 81% e a progressão para a infecção crônica ocorre em 10% dos casos, ao passo que na superinfecção os valores mudam para 30% e 77%, respectivamente⁽⁴⁹⁾. Em média, dentre os casos de infecção pelo HDV, a progressão para cirrose ocorre em 5 anos e, para CHC, em 10 anos. Na infecção crônica pelo HDV, cerca de 54% dos casos progridem para cirrose hepática em um período médio de 3 anos. Dentre os casos de hepatite crônica com cirrose, aproximadamente 14% progridem para CHC em 3,7 anos.

Com relação à comparação entre a coinfeção HBV-HDV e a monoinfecção pelo HBV, enquanto 57% dos indivíduos monoinfectados são assintomáticos, o percentual diminui para cerca de 15% entre os indivíduos coinfectados. Ainda, 39% dos coinfectados apresentam quadro cirrótico, ao passo que nos monoinfectados esse valor diminui para 14%. Um indivíduo coinfectado apresenta quase quatro vezes mais chances de ter cirrose, quase duas vezes mais chances de ter CHC e duas vezes mais chances de ir a óbito comparado ao indivíduo monoinfectado⁽⁴⁹⁾.

Dentre os genótipos, o HDV-3 está relacionado às formas mais graves da infecção, sendo ele o responsável por surtos de hepatite grave e fulminante no noroeste da América do Sul⁽²⁵⁾. Casey e colaboradores relataram uma possível associação da forma grave da doença entre o genótipo 3 do HDV e o genótipo F do HBV.⁽⁵⁰⁾ Todavia, outros genótipos do HBV foram associados à forma grave da infecção em estudos posteriores, sugerindo que a infecção grave não está necessariamente relacionada ao genótipo F do HBV^(35, 38).

1.7. Diagnóstico

Segundo a Associação Europeia de Estudo do Fígado (EASL), todo paciente portador do HBV deve realizar testes para o HDV⁽⁵¹⁾. No Brasil, o teste padrão para triagem e diagnóstico inicial do HDV é um teste de ELISA baseado na pesquisa de

anticorpos anti-HDV IgG, sendo recomendada a realização deste teste diagnóstico a cada 12 meses em portadores do HBV residentes em áreas endêmicas ou caso haja suspeita devido alguma descompensação clínica. Ainda, a confirmação do diagnóstico pode ser realizada pela detecção do RNA do HDV ou anti-HDV IgM, realizados apenas para fins de pesquisa clínica⁽⁵²⁾.

Uma vez contraindo a infecção pelo HDV, em todos os casos haverá produção de anticorpos anti-HDV pelo hospedeiro e, por isso, recomenda-se a realização de testes sorológicos para detecção do anti-HDV (total ou IgG) em todos os indivíduos HBsAg positivos. Atualmente, a confirmação de infecção ativa se dá pela detecção dos níveis séricos de RNA do HDV pelo teste de PCR em tempo real ou convencional. Não há relatos de infecção oculta por HDV e, portanto, não é recomendado o exame de carga viral sem a detecção prévia do anticorpo. Os testes de genotipagem são realizados geralmente por grupos de pesquisa, contudo, tem-se mostrado útil no diagnóstico e acompanhamento do indivíduo portador devido a associação dos genótipos com maior risco de doença. Faz-se necessário também investigar a infecção pelo vírus da hepatite C e pelo HIV devido a chance de coinfeção por compartilharem muitas das vias de transmissão⁽³²⁾.

1.8. Tratamento

O tratamento atual utilizado mundialmente para a infecção crônica pelo HDV é o interferon alfa (IFN), que apresenta uma baixa eficácia, com uma taxa de resposta virológica sustentada (RVS) de 25-45%⁽⁵³⁾. Ainda, a recidiva do RNA do HDV após o tratamento pode ocorrer em até 50% dos pacientes tratados com IFN⁽⁵⁴⁾.

No Brasil, segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfeções do Ministério da Saúde (PCDT, 2019), todo paciente portador do HDV é candidato ao tratamento com alfapeguinterferona 2a e/ou tenofovir ou entecavir, sendo o principal objetivo do tratamento o controle do dano hepático, uma vez que a resolução viral sustentada é rara⁽⁵²⁾.

Estudos analisando a eficácia do interferon na inibição da replicação viral do HDV mostraram uma redução nos níveis das transaminases, porém, a negatificação do RNA do HDV foi observada em 0-50% dos pacientes incluídos nos estudos, apresentando maiores taxas de sucesso conforme a dosagem elevada^(55, 56). A

associação do peg-IFN-alfa com a ribavirina ou a ribavirina isolada não apresentou eficácia⁽⁵⁷⁾.

Na busca de uma maior eficácia no tratamento contra o HDV, algumas alternativas de medicamento vem sendo analisadas, como o uso de análogos de nucleotídeos com e sem o IFN, bem como outras estratégias que interrompem etapas do ciclo do HDV como o uso do Myrcludex B que é um peptídeo sintético derivado da pre-S1 do HBV e atua como um inibidor do receptor NTCP, uso do Lorafarbid que inibe a farnesiltransferase, o uso de polímeros de ácido nucleico (NAP) que podem inibir a exportação das partículas viras e outros estudos incluindo moduladores de montagem de capsídeo, estimuladores do sistema imune do hospedeiro e silenciamento do gene por RNAi⁽⁵³⁾.

1.9. Modos de transmissão

As vias de transmissão do HDV são as mesmas do HBV. Eles são encontrados majoritariamente no sangue, sendo encontrado também no sêmen, saliva e outros fluídos corporais em menor concentração⁽⁵⁸⁾. As principais vias de transmissão são a parenteral, sexual e vertical⁽⁵⁹⁾. Por conseguir se manter viável no ambiente por um longo período, instrumentos perfurocortantes utilizados em consultórios dentários, manicures, estúdio de tatuagens, uso de drogas injetáveis, entre outros, tornam-se um fator importante na transmissão desses dois vírus⁽⁶⁰⁾. Por ser dependente da infecção do hospedeiro pelo HBV, a vacina contra a hepatite B protege também contra a hepatite D⁽⁶¹⁾.

1.10. Epidemiologia

Estima-se que cerca de 13% (figura 7) dos indivíduos infectados pelo HBV estejam infectados com o HDV, equivalendo a 48-60 milhões de pessoas⁽⁶²⁾. Todavia, diversos países não realizam testes diagnósticos para HDV nos indivíduos com hepatite B, indicando uma provável subnotificação da doença no cenário epidemiológico mundial⁽⁵⁹⁾. Alguns países apresentam taxas elevadas de indivíduos com HDV, como, por exemplo, a Mongólia, onde até 60% dos portadores de HBV

são infectados pelo HDV⁽⁵⁹⁾. A Ásia e África apresentam uma prevalência de 44,41%-56,55% e 22,30%-38,37%, respectivamente. Outras áreas que apresentam alta prevalência incluem países da África, Ásia, Ilhas do Pacífico, Oriente Médio, Europa Oriental, Groenlândia e América do Sul (Bacia Amazônica)⁽⁵⁹⁾. Apesar da vacinação em larga escala contra a hepatite B, nota-se o aumento da prevalência da hepatite D até mesmo em países desenvolvidos, como nos Estados Unidos, Austrália e países da Europa, no qual a população de imigrantes, principalmente, apresenta um maior risco de infecção⁽⁶³⁾.

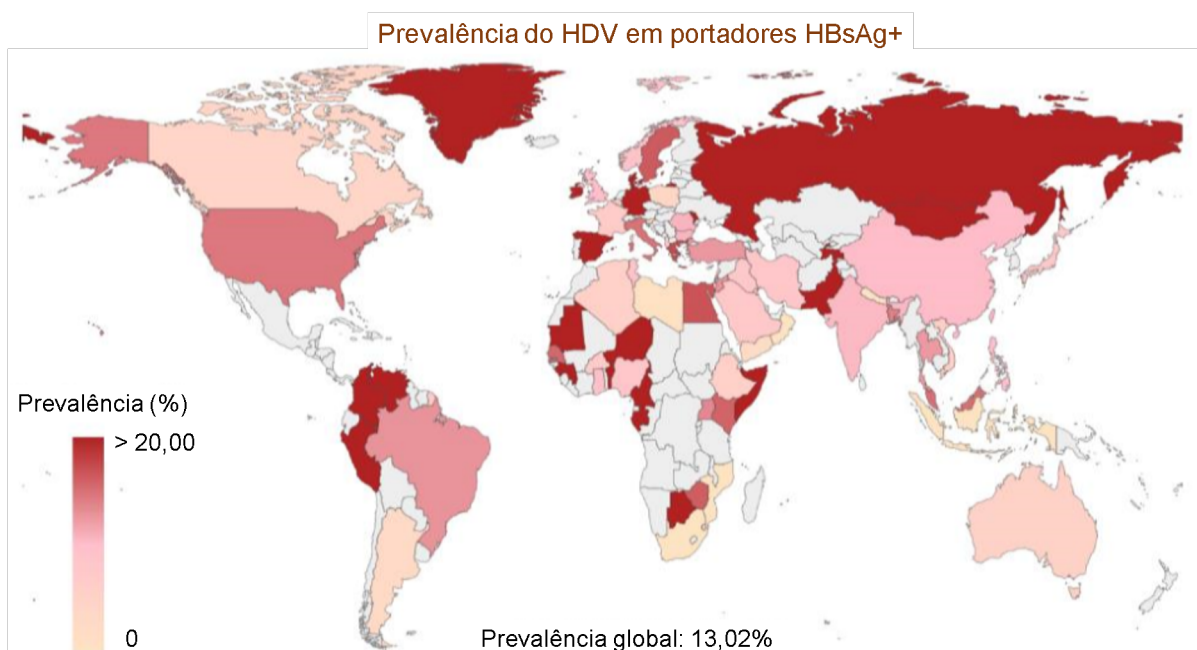


Figura 7: Prevalência global da infecção pelo HDV em indivíduos HBsAg+ (Adaptado de Miao *et al.* 2019).

No Brasil, foram notificados 3.984 casos de hepatite D no período de 1999 a 2018, no qual a maioria dos casos notificados concentrou-se na região Norte (74,9%), seguido das regiões Sudeste, Sul, Nordeste e Centro-Oeste (10,3, 5,9, 5,5 e 3,4%, respectivamente). No ano de 2018 um total de foram notificados 145 casos no país, onde destes, 104 foram notificados na região Norte do país, correspondendo a 71,7%. Na maioria dos casos notificados (57,7%), os indivíduos pertenciam ao sexo masculino. Contudo, a razão entre os sexos vem diminuindo ao

longo do tempo. A maior parte da população infectada possui idade entre 20 e 39 anos (51,2%). Aproximadamente 16,5% dos casos analisados neste período apresentavam idade acima dos 50 anos. A maioria dos casos notificados foi clinicamente classificada como infecção crônica. Aproximadamente 0,5% dos casos foram fulminantes, porém, 5,0% dos casos não tinham informações suficientes ou foram inconclusivos. Foram notificados 781 óbitos associados à hepatite D no período de 2000 a 2018, sendo a maioria destes na região Norte (52,2%)⁽⁶⁴⁾.

1.11. O vírus da hepatite B (HBV)

Descoberto em 1965, o HBV foi o primeiro patógeno viral descrito dentre as outras hepatites virais clássicas^(65, 66). Atualmente encontra-se classificado na família *Hepadnaviridae*, no gênero *orthohepadnavirus*, sendo um vírus com genoma de DNA parcialmente dupla fita com um peculiar mecanismo de replicação no qual um intermediário de RNA é convertido em DNA pela transcriptase reversa do vírus⁽⁹⁾.

Além do HBV que acomete humanos, outros vírus similares, pertencentes ao mesmo gênero, são capazes de infectar diversos outros mamíferos como primatas não humanos, esquilos, morcegos e marmotas, bem como outro gênero similar, *avihepadnavirus*, pertencente à mesma família, capaz de infectar aves⁽⁹⁾.

1.11.1. Características gerais do HBV

O HBV apresenta três partículas virais distintas, porém duas são incompletas e não infecciosas. A partícula esférica infecciosa e completa apresenta aproximadamente 42 nm de diâmetro com glicoproteínas no seu envelope, os antígenos de superfície, denominados Small-HBsAg, Middle-HBsAg e Large-HBsAg (S-HBsAg, M-HBsAg e L-HBsAg, respectivamente), no qual o genoma do HBV encontra-se contido dentro de um nucleocapsídeo formado pelo antígeno do core (HBcAg) juntamente com a polimerase viral⁽⁶⁷⁾. Este vírus apresenta como material genético uma molécula de DNA circular parcialmente dupla fita com aproximadamente 3200 pares de base⁽⁶⁸⁾, apresentando quatro ORFs parcialmente sobrepostas, o que lhe confere um aumento de 50% na quantidade de proteínas codificadas. O genoma do HBV apresenta quatro regiões promotoras que regulam a síntese dos RNAs virais: pré-S1, pré-S2, pré-C/C e X⁽⁶⁹⁾.

A ORF pré-s/s é composta pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S, sendo responsável pela síntese das três proteínas do HBsAg, que são formadas a partir de diferentes códons de iniciação desta ORF⁽⁷⁰⁾. Já a ORF Pré-C/C é a responsável pela síntese das proteínas HBcAg, que é um antígeno estrutural integrante do nucleocapsídeo, e HBeAg, um importante marcador de replicação viral ativa⁽⁷¹⁾. A ORF P está associada à síntese da polimerase viral e, por fim, a ORF X é a responsável por codificar a proteína HBx, que apresenta uma alta homologia com as demais espécies do gênero *orthohepadnavirus*, porém ausente nas linhagens que têm as aves como hospedeiro, sugerindo que esta ORF não esteja diretamente relacionada a replicação e, sim, segundo outros estudos, pode atuar como um regulador viral⁽⁷²⁾, além de outras associações como o desencadeamento do processo inflamatório e hepatocarcinogênese⁽⁷³⁾.

1.11.2. Ciclo de replicação do HBV

Após a adsorção do vírus pelo hepatócito, este perde o seu envelope e o nucleocapsídeo é transportado para o núcleo, onde será liberado o genoma do HBV. No núcleo, a fita de DNA positiva incompleta é finalizada pela DNA polimerase celular e as estruturas terminais removidas, formando uma estrutura circular, covalentemente fechada (cccDNA) que será transcrita em filamentos de RNA genômicos e subgenômicos pela RNA polimerase II celular⁽⁶⁷⁾. Enquanto os RNAs subgenômicos são traduzidos para a síntese das proteínas do envelope e HBx, os genômicos atuam na formação do RNA pré-genômico (pgRNA) e para a tradução e síntese das proteínas HBcAg, HBsAg e polimerase viral⁽⁶⁸⁾. O pgRNA é então encapsidado com o auxílio da enzima viral e envolvido pelas proteínas do core, formando o nucleocapsídeo. Internamente, inicia-se a transcrição reversa da fita positiva de RNA em uma fita negativa de DNA, sendo esta, posteriormente, utilizada como molde para a fita de DNA positiva, que não é sintetizada por completo. Este nucleocapsídeo é enviado ao retículo endoplasmático e ao complexo de Golgi, onde as proteínas do envelope são incorporadas formando o vírion que será secretado ou retornará ao núcleo celular para um novo ciclo de replicação^(74, 75).

1.11.3. Epidemiologia do HBV

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a prevalência mundial do HBV é de 3,5% da população geral, apresentando taxas mais elevadas no continente africano e na região ocidental do pacífico (6,1% e 6,2%, respectivamente). Com isto,

estima-se que 257 milhões de pessoas vivem com a infecção pelo HBV no mundo. Ainda, 65 milhões de mulheres na idade reprodutiva apresentam potencial risco de transmitir o HBV para os seus bebês. Segundo a OMS, apenas no ano de 2015, 1,34 milhões de pessoas foram a óbito devido infecções por hepatites virais e, destas, 66% estavam associadas ao HBV, podendo esta elevada taxa relacionada com a superinfecção com o HDV⁽⁵⁹⁾.

No Brasil, dentre os casos notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) entre 1999 a 2018, a maioria foi referente aos casos de hepatite B (36,8%), totalizando 233.027 casos, predominando na região Sudeste do Brasil. Nestes casos acumulados, a maioria dos indivíduos apresentava idade entre 25 e 39 anos (38,2% dos casos), porém, em 2018, o maior percentual de casos ocorreu entre pessoas de 30 a 49 anos (47,6%), dado que corrobora com a queda na taxa de detecção em indivíduos de até 39 anos nos últimos 10 anos, evidenciando uma mudança no cenário epidemiológico da hepatite B no país. Com relação à provável fonte de infecção, dentre as notificações com esta informação, a maioria foi associada à via sexual⁽⁶⁴⁾.

1.11.4. Infecção pelo HBV

Sabe-se que, na população geral, cerca de 90% dos adultos infectados pelo HBV progridem para resolução espontânea ao passo que 10% passam a ser portadores crônicos, valores estes opostos quando se trata de crianças, ou seja, 90% destas se tornarão portadoras crônicas⁽⁶⁰⁾. No curso de uma infecção pelo HBV seguido de cura espontânea, os primeiros marcadores detectados no indivíduo com hepatite B aguda são o anti-HBc IgM, o HBsAg e o HBeAg, juntamente com o DNA do HBV. Ao longo do curso da infecção, o anti-HBc IgM começa a diminuir enquanto o IgG aumenta, permanecendo detectável por toda a vida na maioria dos indivíduos, evidenciando o contato com o HBV. Os antígenos HBs e HBe também tendem a desaparecer concomitantemente com o surgimento dos seus respectivos anticorpos. O anti-HBs é um importante indicativo de imunidade e cura espontânea, sendo este também o anticorpo detectável em indivíduos imunizados por vacinação. No caso dos indivíduos que progridem para a infecção crônica, definida pela presença do HBsAg no soro do indivíduo infectado por mais de 6 meses, observa-se a persistência do DNA do HBV, podendo manter também os marcadores de replicação viral, bem como a ausência de soroconversão para o anti-HBs. A infecção crônica

acarreta na destruição progressiva do tecido hepático podendo levar à cirrose e hepatocarcinoma com o passar das décadas. A resposta do sistema imune do hospedeiro frente à infecção é o principal responsável por esse dano hepático, uma vez que o HBV não é diretamente citopático⁽⁷⁶⁾.

1.11.5. Tratamento do HBV

Um resultado ideal do tratamento para o HBV seria a perda sustentada do HBsAg, porém, raramente ocorre. Por isso, o tratamento atua, na maioria dos casos, reduzindo os níveis da replicação viral e do dano hepático, evitando complicações mais graves⁽⁵²⁾. Segundo a EASL, os tratamentos indicados para portadores crônicos do HBV são o INF-alfa ou os análogos de nucleos(t)ídeos (NAs) como a Lamivudina, Adefovir, Entecavir, Telbivudina e Tenofovir⁽⁵¹⁾. No Brasil, segundo o PCDT, é indicado para o tratamento da hepatite B crônica o entecavir ou tenofovir, caso haja contraindicação ao primeiro.⁽⁵²⁾

1.11.6. Variabilidade genética do HBV

O HBV apresenta uma taxa de evolução estimada em suas sequências de 10^{-5} a 10^{-4} substituições/sítios/ano⁽⁷⁷⁾, uma taxa considerada elevada quando comparada a taxa de outros vírus de DNA, devido, principalmente, à ausência de atividade de revisão da sua polimerase durante a transcrição reversa do pgRNA. Como consequência, o HBV apresenta alta variabilidade genética, sendo classificado em 10 genótipos distintos, designados de A a J, com mais de 8% de divergência intergenotípica. Ainda, os genótipos A, B, C, D, F e I são divididos em subgenótipos que apresentam divergência em sua sequência nucleotídica de 4-8%. Os genótipos do HBV apresentam uma distribuição geográfica bem característica (figura 8). O genótipo A ocorre em todo o globo, e os genótipos B e C são predominantes na Ásia. O genótipo D apresenta distribuição generalizada, com maior prevalência no Oriente Médio, região mediterrânea e Europa central, enquanto o genótipo E está restrito ao continente africano. O genótipo F está restrito a América do Sul, principalmente na Bacia Amazônica, enquanto o genótipo G, apesar de ter uma prevalência mundial baixa, também circula em todo o globo, como os genótipos A e D. O genótipo H é comumente encontrado na América Central. O genótipo I foi relatado no Vietnã e Laos e o genótipo J foi identificado em uma ilha do Japão^(78, 79).

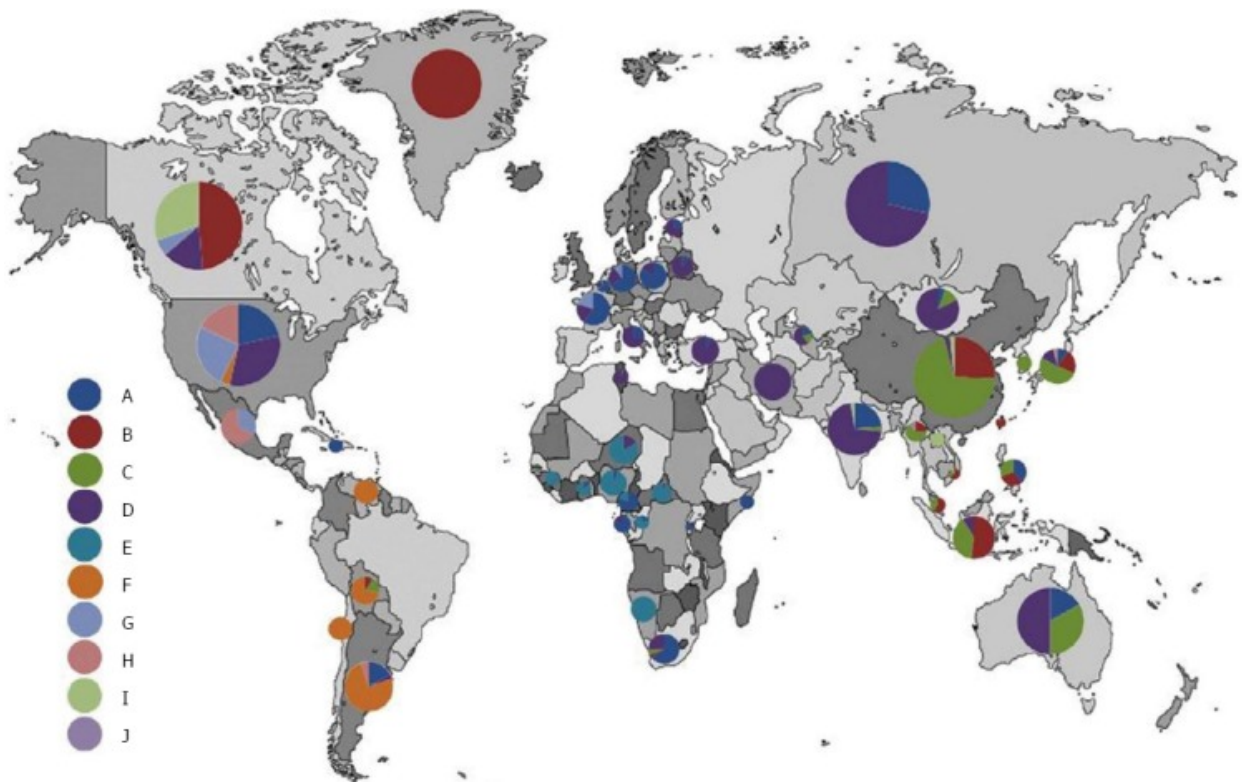


Figura 8: Distribuição geográfica dos genótipos do HBV no mundo (adaptado de Shi *et al.* 2014). Cada cor representa um genótipo.

No Brasil, o genótipo A apresenta maior prevalência, seguidos do genótipo D e F, contudo, esta proporção varia de acordo com a região geográfica brasileira. Enquanto o genótipo A é majoritário nas regiões Norte e Nordeste, o genótipo D é o mais prevalente na região Sul. O genótipo F é o segundo genótipo mais frequente na região Norte, apresentando uma frequência baixa nas outras regiões. Além deste, outros genótipos são encontrados em menor proporção os genótipos E, G, C e B, sendo estes, com exceção do G, geralmente associados à imigrantes⁽⁸⁰⁾.

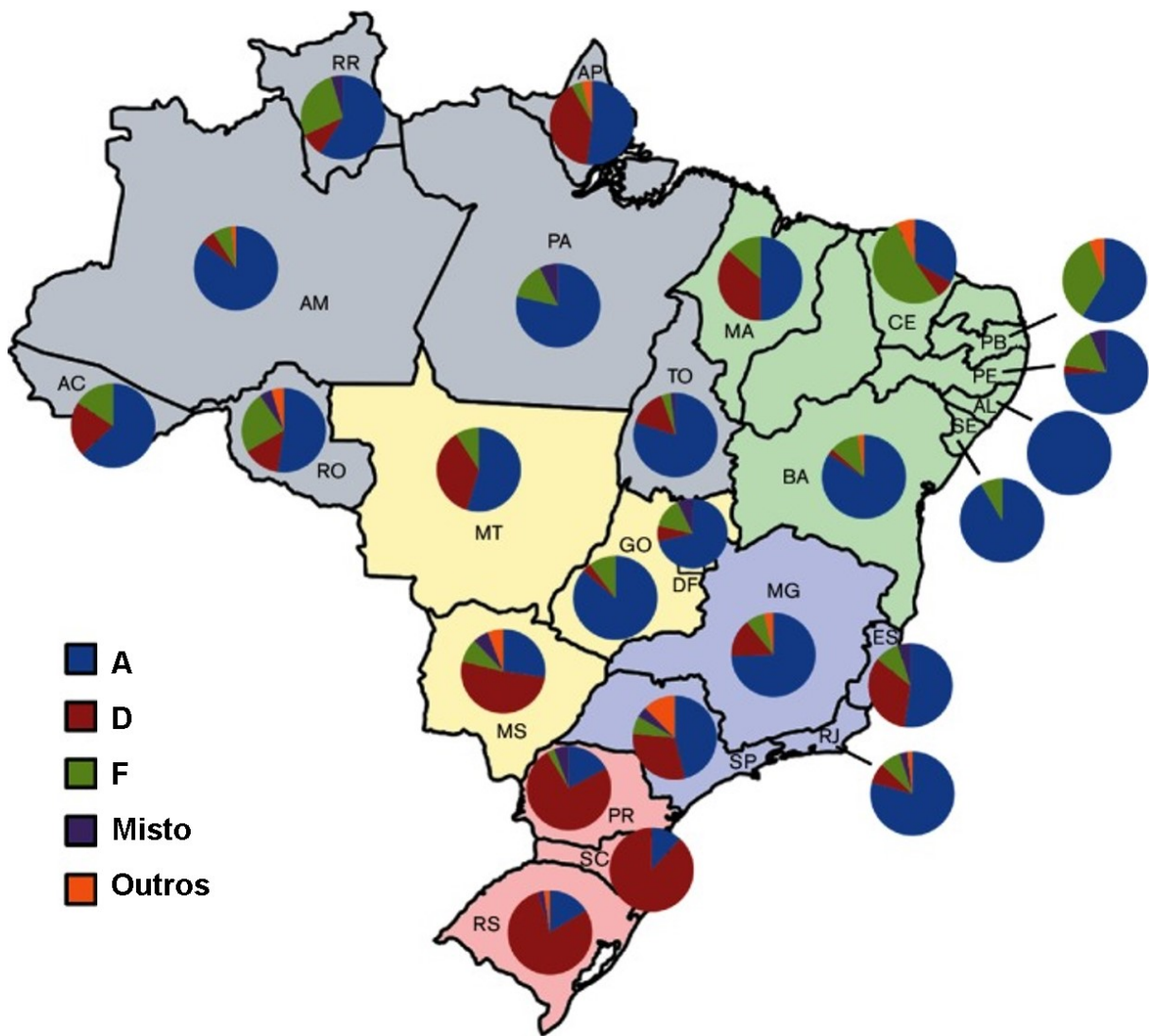


Figura 9: Distribuição dos genótipos do HBV no Brasil (Adaptado de Lampe *et al.*, 2017).

Com relação à patogenicidade, alguns genótipos têm sido associados a diferentes desfechos da infecção. Os genótipos C e D apresentam uma maior prevalência de hepatocarcinoma quando comparado a outros genótipos, enquanto que o genótipo H apresenta-se com um desfecho mais brando e uma baixa replicação viral⁽⁷⁸⁾.

1.12. Interação molecular HBV-HDV

Devido à dependência de proteínas do HBV para o ciclo replicativo e infeccioso do HDV, estudos que analisam a interação entre estes vírus são importantes para o entendimento da dinâmica de co-infecção. Com relação às interações moleculares entre o HBV e o HDV, estudos *in vivo* demonstraram que as três proteínas do HBsAg (Small, Middle e Large HBs) estavam presentes na partícula do HDV. As proteínas HDAg podem interagir com o domínio S do envelope do HBV e pré-S1 do HBsAg, sendo esta a mesma região em que as proteínas do núcleo do HBV interagem com a superfície⁽⁸¹⁾. Shih e colaboradores associaram o desempenho da montagem e secreção do HDV (genótipos 1, 2 e 4) de acordo com os níveis de HBsAg do HBV (genótipos B e C) e com isso puderam observar que o HDV secretado é mais dependente da quantidade de HBsAg do que do genótipo do HBV, além de mostrar que mudanças que ocorrem naturalmente na sequência de aminoácidos do HBsAg afetam a montagem de alguns genótipos do HDV⁽⁸²⁾.

Ainda não está claro o papel de cada um dos vírus na evolução clínica agravada da doença. Alguns autores sugerem que a causa é a ação concomitante de ambos nos hepatócitos, enquanto outros indicam que o HDV é mais patogênico e suprime o HBV. Schaper e colaboradores (2010) realizaram um estudo de corte onde observaram que o HDV foi dominante em 60% dos indivíduos co-infectados, porém, a predominância do HBV foi observada em alguns casos ou ainda uma flutuação de ambos os vírus em diferentes etapas do curso da infecção⁽⁸³⁾, porém, pode ser que a predominância do HDV na co-infecção com o HBV não possa ser associada apenas a um fator, pois diversos fatores virológicos, ambientais e do hospedeiro devem ser levados em consideração⁽⁸⁴⁾. Mecanismos moleculares são necessários para que o HDV possa garantir uma grande quantidade de HBsAg para a montagem dos seus vírions ao mesmo tempo suprimindo a replicação do seu vírus auxiliar. Autores sugeriram uma regulação epigenética da atividade transcricional do cccDNA pelo HDAg ou que as isoformas do HDAg seriam capazes de inibir o HBV ou interagir com o seu RNA mensageiro, desestabilizando-o⁽⁸⁵⁾. Do ponto de vista molecular, é provável que os dois vírus modulem o nível de replicação um do outro⁽²⁸⁾.

1.13. Justificativa

A hepatite D é um grave problema de saúde pública e acomete milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, a maioria das informações obtidas sobre a prevalência/incidência do HDV é obtida pelas notificações do SINAN, já que a doença é um agravo de notificação compulsória. Contudo, além das dificuldades para se concluir um diagnóstico, nota-se falhas no preenchimento dos dados das notificações, uma vez que os casos em branco/ignorados e inconclusivos representaram 4,6% dos casos notificados no período de 1999 a 2016⁽⁶⁴⁾, fatos estes que sugerem uma subnotificação. Por isso, pesquisas sobre o HDV são fundamentais para colaborar no fornecimento de dados clínicos, históricos e epidemiológicos da doença, auxiliando desta forma nas medidas preventivas e de controle.

Dados do SINAN apresentam uma incidência constante dos casos confirmados de hepatite D ao longo dos anos (1997-2018), com 74,9% dos casos concentrados na região Norte. Todavia, temos 25,1% dos casos ocorrendo fora da região endêmica, fato que reforça a necessidade de estudos sobre o HDV nestas áreas. A região Sudeste apresenta o segundo maior número de casos (10,3%), porém, pouco se é relatado na literatura sobre a ocorrência do HDV nesta região. O menor número de casos notificados no período em questão ocorreu no Centro-Oeste, região onde seu maior Estado (Mato Grosso) possui extensa área de divisa com Estados hiperendêmicos da região Norte, sugerindo possíveis falhas no sistema de notificação nacional a respeito deste agravo.

A obtenção de dados que nos permitam traçar um perfil sócio-demográfico da infecção pelo HDV em portadores crônicos de hepatite B, especialmente nas regiões endêmicas, pode auxiliar a implementação de ações preventivas como campanhas de vacinação direcionadas a indivíduos mais expostos à infecção pelo HDV.

Estudos sobre o HDV em áreas fora da região amazônica no Brasil são escassos. Em 2011, Barros e colaboradores descreveram a ocorrência do genótipo 8 do HDV no Maranhão, região Nordeste do Brasil, genótipo esse até então restrito ao continente africano⁽³⁹⁾. Anos mais tarde, Santos e colaboradores também relataram a ocorrência do HDV-8 na mesma região⁽⁴⁰⁾. Esses dados indicam a importância de estudos epidemiológicos sobre o HDV nas regiões não endêmicas do Brasil. Ainda, a identificação de genótipos do HDV geralmente restritos a outras

regiões geográficas sendo introduzidas no país e a avaliação da interação de tais genótipos com as estirpes de HBV circulantes no Brasil é importante para o monitoramento e controle da disseminação do HDV entre a população brasileira.

O presente projeto pretende contribuir com a caracterização molecular de estirpes de HDV circulantes no Brasil, dados ainda escassos nos bancos genéticos. O conhecimento da variabilidade viral auxiliará estudos futuros de epidemiologia molecular que permitam elucidar as rotas de introdução e dispersão do HDV na população brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a soroprevalência e o perfil epidemiológico molecular dos genótipos do HDV em áreas endêmicas e não endêmicas no Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar a presença de anticorpos contra o vírus da hepatite D (anti-HDV) em amostras de soro de pacientes com hepatite B recrutados nas cinco regiões geográficas brasileiras;
- Investigar a presença de RNA do vírus da hepatite D em amostras anti-HDV reagentes;
- Identificar os genótipos do HDV e avaliar a variabilidade genética do gene HDAg do HDV nas amostras brasileiras;
- Determinar os genótipos do HBV co-infectante nas amostras positivas para o RNA do HDV buscando uma associação entre os genótipos de HDV e HBV.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

O presente estudo foi do tipo transversal retrospectivo, onde nos propusemos a avaliar a prevalência e epidemiologia molecular do HDV em portadores crônicos do HBV nas diferentes regiões brasileiras, contemplando locais endêmicos e não endêmicos, entre os anos de 2013 e 2015.

3.2. Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) sob o número 2.364.950, estando em conformidade com as diretrizes éticas da Declaração de Helsinque de 1975.

3.3. População do estudo

Neste estudo foram utilizadas 1240 amostras de soro de pacientes positivos para o antígeno de envelope do HBV (HBsAg) de todas as regiões geográficas brasileiras, incluindo 24 dos 26 estados e o Distrito Federal, coletadas no período de 2013 a 2015, contidas no biorrepositório do Laboratório de Referência Nacional em Hepatites Virais da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. As amostras foram coletadas por nove laboratórios públicos das cinco regiões do país que compuseram uma rede nacional de genotipagem do vírus da hepatite B durante o período citado (tabela 1).

Tabela 1: Relação da quantidade de amostras HBsAg+ por estado e região do Brasil testadas para a presença do anticorpo anti-HDV.

Região	Estado	nº de amostras
Norte	Acre	37
	Amapá	31
	Amazonas	116
	Pará	10
	Rondônia	28
	Roraima	23
	Tocantins	85
Nordeste	Alagoas	26
	Bahia	125
	Ceará	89
	Maranhão	35
	Paraíba	20
	Pernambuco	47
	Sergipe	14
	Centro-Oeste	Goiás
Mato Grosso		13
Mato Grosso do Sul		34
Distrito Federal		28
Sudeste	Espírito Santo	12
	Minas Gerais	51
	São Paulo	109
	Rio de Janeiro	177
Sul	Paraná	22
	Rio Grande do Sul	45
	Santa Catarina	16
Total		1240

3.4. Estratégia

Todas as amostras oriundas de pacientes sabidamente portadores do HBV (HBsAg+) foram submetidas inicialmente a pesquisa de anticorpos anti-HDV pelo kit “ETI-AB-DELTAK-2 (DiaSorin). As amostras que apresentaram resultado positivo ou indeterminado foram repetidas pelo mesmo protocolo. As amostras reagentes para o anti-HDV foram submetidas a testes moleculares, onde foi realizada inicialmente a extração dos ácidos nucleicos (RNA e DNA) pelo kit comercial “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche Life Science, Mannheim, Alemanha) para a realização do PCR qualitativo tanto para a região do genoma do HDV que codifica o HDAg quanto para as regiões Pol e S do HBV, com o propósito de definir as amostras positivas para o RNA do HDV e DNA do HBV, bem como caracterizar seus respectivos

genótipos. O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose à 1,5% juntamente com um padrão de peso molecular “100 pb DNA Ladder” (Thermo Fisher Scientific) para certificação do correto tamanho dos fragmentos e as amostras consideradas positivas foram submetidas a purificação pelo kit comercial “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche Life Science). Os produtos purificados foram, então, submetidos à reação de sequenciamento usando o kit “Big Dye Terminator Cycle Sequencing 3.1” (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e utilizando o equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Por fim, foi realizada a análise das seqüências e filogenia. O processo metodológico está resumido na figura 10.

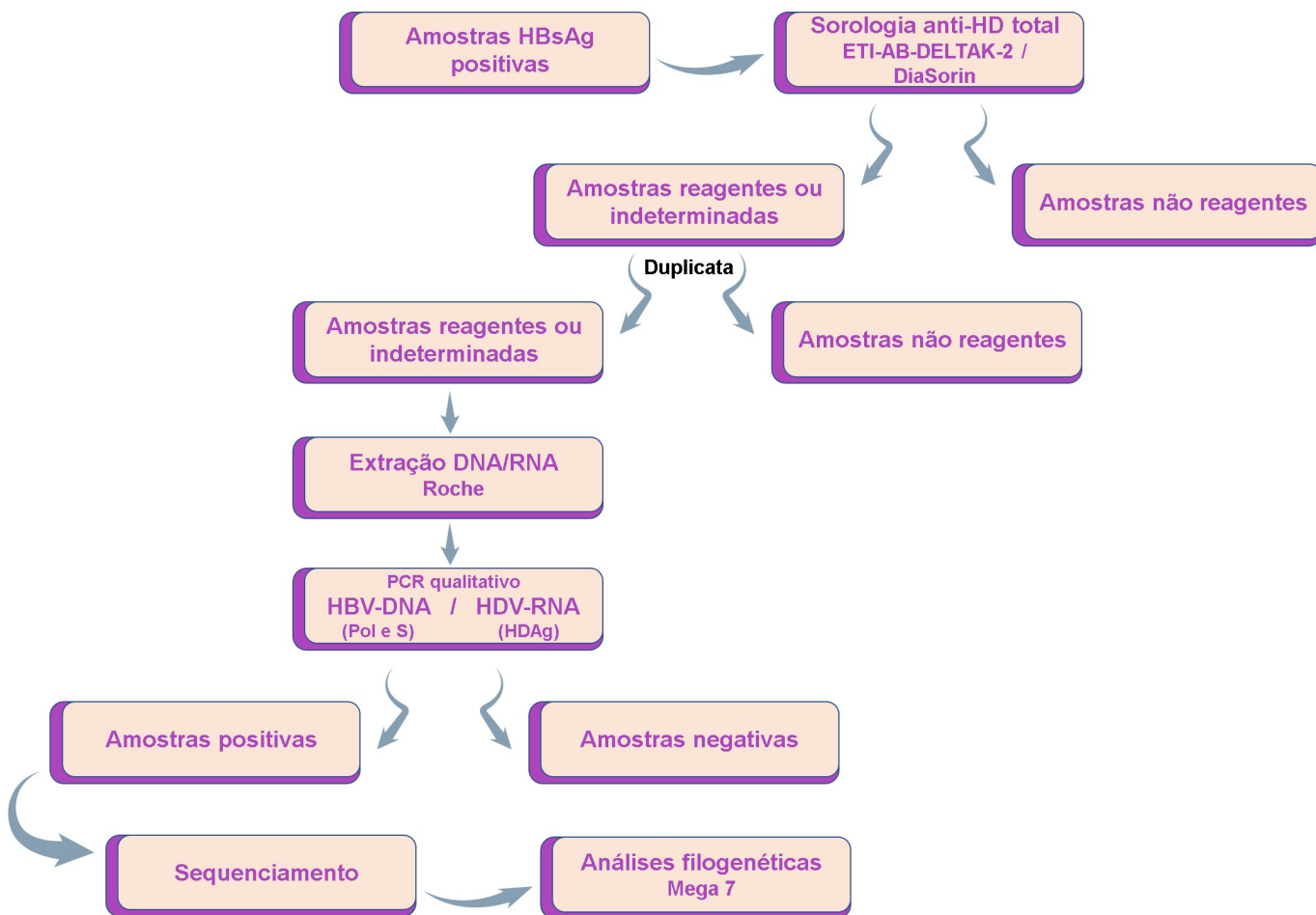


Figura 10: Fluxograma da estratégia e metodologia.

3.5. Detecção do anti-HDV no soro

A pesquisa de anticorpos totais anti-HDV foi realizada utilizando um ensaio imunoenzimático (ELISA) do kit comercial "ETI-AB-DELTA-2 (anti-HDV)" (DiaSorin, Turim, Itália), seguindo as instruções do fabricante. O princípio desta metodologia consiste na determinação qualitativa dos anticorpos anti-HDV IgM ou IgG através de um ensaio de competição simultânea. A especificidade de diagnóstico do ensaio é de 98,99% (intervalo de confiança de 95%: 97,81-99,63%) e a sensibilidade de diagnóstico de 99,42% (intervalo de confiança de 95%: 96,81-99,99%). As amostras reagentes ou indeterminadas foram retestadas no mesmo ensaio para confirmação dos resultados. O princípio do teste consiste em uma competição simultânea entre os anticorpos anti-HDV presentes na amostra (caso positiva) e os anticorpos anti-HDV conjugados com peroxidase de rábano do kit por uma quantidade limitada de HDAg presente no substrato da placa de ELISA, de modo que o conjugado se liga em quantidade inversamente proporcional à das amostras e controles. A reação do conjugado ligado ao substrato com cromógeno produz uma coloração que será medida posteriormente por um espectrofotômetro. A partir dos valores desta medição, é realizado um cálculo para definição do valor de corte (*cut-off*) que irá distinguir as amostras reagentes das não reagentes.

3.5.1. Procedimento

Aplica-se 50uL dos controles e das amostras nos respectivos poços da placa de ELISA, de acordo com um espelho previamente organizado, deixando um poço vazio(branco) para o cálculo final do *cut-off*. Em seguida, aplica-se 100uL do conjugado enzimático previamente diluído com o diluente do conjugado do kit na proporção 1:50, em todos os poços exceto o branco. Feito isto, a placa deve ser vedada com o adesivo autocolante a fim de evitar a evaporação da solução e incubada por três horas (+-15 minutos) a 37°C (+-1°C). Durante este período, deve-se preparar a mistura do cromógeno/substrato com a solução H₂O₂ na proporção 1:1. Finalizado o tempo de incubação, descartar o adesivo e lavar os poços em uma lavadora automática ou semiautomática, com cerca de 0,30mL do tampão de lavagem por poço e tempo de imersão de 30 segundos. Após a lavagem deve-se inverter a placa sobre um papel absorvente para remover por completo os resíduos de líquido dos poços. Com a placa já seca, deve-se distribuir 100uL de cromógeno/substrato em todos os poços e incubar por 30 minutos (+- 2 minutos) a

temperatura ambiente e protegido de luz intensa. Por fim, distribuir 100uL da solução de parada em todos os poços na mesma ordem de aplicação do cromógeno/substrato, a fim de todos os poços apresentarem o mesmo intervalo de tempo. A absorbância deve ser medida em cada poço a 450/630nm em até uma hora após a adição da solução de parada. O valor do cut-off é determinado pela soma da absorbância média do controle negativo (CN X) multiplicado por 0,5 mais a absorbância média do controle positivo multiplicada por 0,5. (0,5 CN + 0,5.CP) (Figura 11).

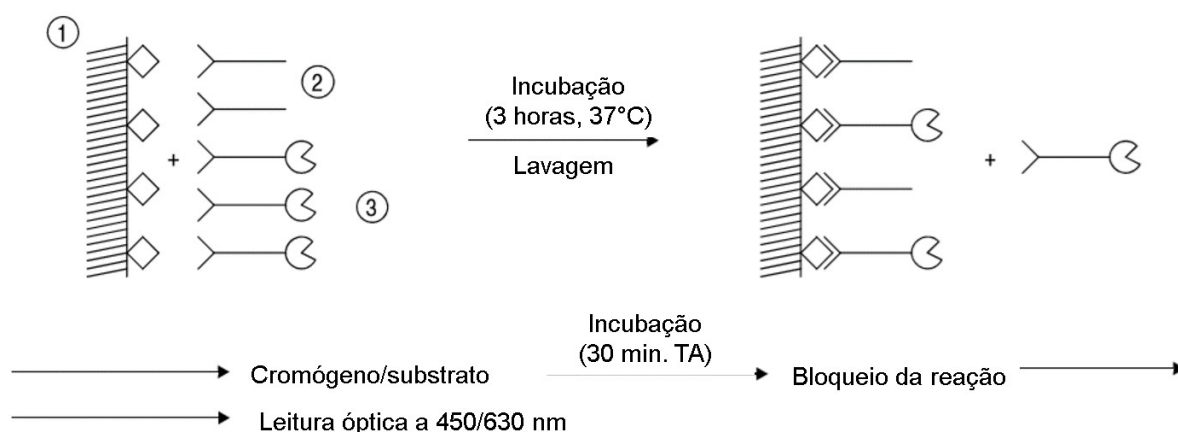


Figura 11: Princípio do teste ETI-AB-DELTA-2 (adaptado de DiaSorin). 1- poço revestido com HDAg recombinante. 2- Anticorpo anti-HDV da amostra ou controle. 3- Anti-HDV humano conjugado com peroxidase.

3.6. Extração do material genético viral: DNA do HBV e RNA do HDV

As amostras de soro nas quais o anticorpo anti-HDV foi detectado no ensaio imunoenzimático foram submetidas à extração de ácidos nucleicos virais (RNA e DNA) utilizando o kit comercial “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche Life Science, Mannheim, Alemanha), por um processo de adsorção em sílica e posterior eluição do material, procedendo de acordo com as indicações do fabricante. O princípio do teste consiste na incubação do soro com um tampão de lise com um sal caotrópico e proteinase K a fim de lisar as partículas virais, expondo o material genético, além da poli-A, que aumenta a afinidade dos ácidos nucleicos com a sílica.

Posteriormente, um tampão é adicionado à amostra e esta solução é aplicada em um microtubo contendo um filtro de sílica no qual é adsorvido apenas o material genético por afinidade de cargas. Ocorrem então etapas de lavagem e centrifugação para a eliminação das substâncias contaminantes (sais, proteínas e contaminantes celulares) e, por fim, o material genético purificado é eluído com um tampão de baixa salinidade.

3.6.1. Procedimento

Inicialmente, em um microtubo, mistura-se 200uL da amostra mais 200uL da solução de trabalho (Tampão "*Binding Buffer*" mais RNA carreador "Poly A") mais 50uL da proteinase K. Após homogeneizado, deve-se incubar imediatamente a 72°C por 10 minutos. Passado este tempo, deve-se centrifugar brevemente os tubos com as soluções para remover os resíduos da tampa e em seguida adicionar 100uL do tampão "*Binding Buffer*" e homogeneizar novamente. Posteriormente as soluções devem ser transferidas completamente para suas respectivas colunas com sílica acopladas em tubos coletores devidamente identificadas e submetidas a centrifugação por 1 minuto a 8000xg de velocidade. Após a centrifugação os tubos coletores devem ser descartados e substituídos. Em seguida, adiciona-se 500uL do tampão de remoção de inibidores (*Inhibitor Removal Buffer*) em cada coluna, seguida de centrifugação por 1 minuto a 8000xg. Após a centrifugação, novamente os tubos coletores devem ser descartados e substituídos e, em seguida, adiciona-se 450uL do tampão de lavagem (*Wash Buffer*), sendo submetido novamente a centrifugação por 1 minuto a 8000xg, processo este que ocorre duas vezes. Após as duas etapas com o tampão de lavagem, o tubo coletor deve ser descartado e substituído por um microtubo estéril de 1,5mL. Por fim, adiciona-se 50uL do tampão de eluição (*Elution buffer*) e novamente os tubos devem ser centrifugados a 8000xg por 1 minuto, resultando nos ácidos nucleicos extraídos, que devem ser armazenados a -70°C até o momento da utilização. Todos os ensaios foram realizados juntamente com controles negativos (H₂O) para indicação e rastreamento de possíveis contaminações durante o procedimento.

3.7. Detecção do HDV-RNA por *nested* PCR

Para definir as amostras positivas para o RNA do HDV, foi realizada a amplificação parcial da região genômica que codifica o HDAg (403 pb) a partir do material genético extraído. O conjunto de reagentes “Superscript™ III One Step RT-PCR system” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) foi utilizado para a transcrição reversa em cDNA e subsequente amplificação por PCR (RT-PCR) do RNA viral extraído de amostras de soro. Em seguida, um segundo ciclo de PCR foi realizado utilizando iniciadores internos (*nested* PCR), visando uma melhor amplificação do material, seguindo o protocolo descrito por Gomes-Gouvêa e colaboradores (2008)⁽³⁵⁾. Os oligonucleotídeos utilizados nesta etapa estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região que codifica HDAg do HDV por PCR.

Oligonucleotídeo	Polaridade	Posição	Sequências (5' – 3')
853IU	Senso	855-873	CGG ATG CCC AGG TCG GAC C
1302OD	Anti-senso	1324-1307	GGA TTC ACC GAC AAG GAG AG
HDV-A	Anti-senso	1290-1267	GAA GGA AGG CCC TCG AGA ACA AGA
HDV-E	Senso	885-908	GAG ATG CCA TGC CGA CCC GAA GAG

3.7.1. Procedimento

A mistura de reagentes para o PCR (mix) deve ser preparada em uma estação asséptica e o manuseio dos reagentes deve ocorrer sempre em contato com o gelo. Todos os ensaios foram realizados juntamente com controles negativos tanto do procedimento de extração do material genético descrito anteriormente quanto da etapa de preparação do mix (H₂O). A preparação do mix da primeira reação (RT-PCR) para cada uma amostra, deve ser realizada conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3: concentrações e volumes do mix do RT-PCR para HDV (região HDAg).

Componentes (Concentração de Estoque)	Concentração final (reação)	Volume de reação
Água destilada “DNase RNase free”	--	4,5 µL
2X Reaction Mix	2X	12,5 µL
1302 OD 25 pmol	0,5 µM	0,5 µL
853 IU 25 pmol	0,5 µM	0,5 µL
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	40U/uL	1,0 µL
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	--	1,0 µL

O volume de cada componente deve ser multiplicado pelo número de reações que se pretende realizar, sendo todos eles misturados em um microtubo de 1,5 mL. O volume final do mix é de 20µl por tubo, que devem estar devidamente identificados. Em cada tubo com mix, deve-se adicionar 5µL do material extraído. A próxima etapa é o ciclo de amplificação que ocorre em um termociclador da seguinte maneira: um ciclo de 50 °C por 30 minutos; um ciclo de 94°C por 2 minutos; cinco ciclos de 94 °C por 30 segundos mais 58 °C por 30 segundos mais 68 °C por 1 minuto; 35 ciclos de 94°C por 30 minutos mais 56°C por 30 minutos (com queda até 52°C) mais 68°C por 1 minuto; 1 ciclo de 68 °C por 5 min e encerramento à 4°C.

A preparação do mix para a *nested*-PCR ocorre nas mesmas condições ambientais descritas anteriormente para a preparação do mix do RT-PCR, utilizando os reagentes descritos na tabela 4.

Tabela 4: Concentrações e volumes dos reagentes para o mix da *nested*-PCR do HDV (região HDAg)

Componentes (Concentração de Estoque)	Concentração final (reação)	Volume de reação
Água destilada DNase RNase free	--	34,8 µL
dNTPs 10 Mm	0,2 mM	1,0 µL
10X PCR Buffer, – Mg	1X	5,0 µL
50 mM MgCl ₂	2,0 mM	2,0 µL
HDV-A 25 pmol	0,5 µM	1,0 µL
HDV-E 25 pmol	0,5 µM	1,0 µL
Platinum™ Taq DNA Polymerase	2U/reação	0,2 µL

O volume de cada componente deve ser multiplicado pelo número de reações que se pretende realizar, sendo todos eles misturados em um microtubo de 1,5 mL.

O volume final do mix é de 45µl por tubo, que devem estar devidamente identificados. Em cada tubo com mix, deve-se adicionar 5µL do produto do primeiro PCR. A próxima etapa é o segundo ciclo de amplificação que ocorre em um termociclador da seguinte maneira: um ciclo de 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos mais 55 °C por 30 segundos mais 72 °C por 1 minuto; um ciclo de 72 °C por 5 minutos e o encerramento a 4°C.

Os produtos amplificados foram visualizados através de uma corrida eletroforética em gel de agarose à 1,5% juntamente com um padrão de peso molecular “100 pb DNA Ladder” (Thermo Fisher Scientific) para certificação do correto tamanho dos fragmentos.

3.8. Detecção do DNA do HBV por semi-nested PCR

O DNA do HBV extraído das amostras anti-HDV positivas foi submetido à amplificação por PCR e sequenciamento de nucleotídeos de uma região genômica contendo porções de ambas as ORFs P e S de acordo com o descrito por Mallory e colaboradores (2011)⁽⁸⁹⁾. Os oligonucleotídeos utilizados nesta etapa estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região P e S do HBV.

Oligonucleotídeo	Polaridade	Sequências (5' – 3')
S1	Senso	CTTCTCGAGGACTGGGGACC
4R	Anti-senso	GAAAGGCCTTGTAAGTTGGCG
1F	Senso	TAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGG

3.8.1. Procedimento

As condições ambientais para o preparo do mix devem ser as mesmas descritas no item acima. Todos os ensaios foram realizados juntamente com controles negativos tanto do procedimento de extração do material genético descrito anteriormente quanto da etapa de preparação do mix (H₂O). Os reagentes com seus

respectivos volumes e concentrações para o mix do primeiro PCR estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: concentrações e volumes do mix do primeiro PCR para amplificação das regiões Pol e S do genoma do HBV.

Componentes (Concentração de Estoque)	Concentração final (reação)	Volume de reação
Água destilada DNase RNase free	--	14,9 µL
dNTPs 10 mM	0,2 mM	0,5 µL
10X PCR Buffer, – Mg	1X	2,5 µL
50 mM MgCl ₂	2,0 mM	1,0 µL
Primer S1 10 pmol	0,5 µM	0,5 µL
Primer 4R 10 pmol	0,5 µM	0,5 µL
Platinum™ Taq DNA Polymerase	2U/reação	0,1 µL

O volume de cada componente deve ser multiplicado pelo número de reações que se pretende realizar, sendo todos eles misturados em um microtubo de 1,5 mL. O volume final do mix é de 20µl por tubo, que devem estar devidamente identificados. Em cada tubo com mix, deve-se adicionar 5µL do material extraído. A próxima etapa é o ciclo de amplificação que ocorre em um termociclador da seguinte maneira: um ciclo de 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 15 segundos mais 56 °C por 30 segundos mais 72 °C por 1 minuto e 15 segundos; 1 ciclo de 72 °C por 10 minutos e encerramento à 4°C.

A preparação do mix para a semi-*nested*-PCR ocorre nas mesmas condições ambientais descritas anteriormente, utilizando os reagentes descritos na tabela 7.

Tabela 7: concentrações e volumes do mix do segundo PCR para amplificação das regiões Pol e S do genoma do HBV.

Componentes (Concentração de Estoque)	Concentração final (reação)	Volume de reação
Água destilada DNase RNase free	--	36,8 µL
dNTPs 10 Mm	0,2 mM	1,0 µL
10X PCR Buffer, – Mg	1X	5,0 µL
50 mM MgCl ₂	2,0 mM	2,0 µL
Primer 1F 10 pmol	0,5 µM	1,0 µL
Primer 4R 10 pmol	0,5 µM	1,0 µL
Platinum™ Taq DNA Polymerase	2U/reação	0,2 µL

O volume de cada componente deve ser multiplicado pelo número de reações que se pretende realizar, sendo todos eles misturados em um microtubo de 1,5 mL. O volume final do mix é de 45µl por tubo, que devem estar devidamente identificados. Em cada tubo com mix, deve-se adicionar 5µL do produto do primeiro PCR. A próxima etapa é o segundo ciclo de amplificação que ocorre em um termociclador da seguinte maneira: um ciclo de 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos mais 55 °C por 30 segundos mais 72 °C por 1 minuto; um ciclo de 72 °C por 5 minutos e o encerramento a 4°C.

Os produtos amplificados foram visualizados através de uma corrida eletroforética em gel de agarose à 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e recoberto com tampão TBE 1X. Cada produto amplificado (5µL), bem como o padrão de peso molecular “100 pb DNA Ladder” (Thermo Fisher Scientific) para certificação do correto tamanho dos fragmentos, foi homogeneizado com 1µL de corante 1x Blue Juice Gel Loading Buffer (Invitrogen, Califórnia, EUA) e aplicado no seu respectivo poço no gel. Posteriormente o gel foi submetido à corrida eletroforética em voltagem constante de 100V durante aproximadamente uma hora. Por fim, o gel foi examinado sob transiluminação ultravioleta para realização da leitura do fragmento de aproximadamente 403 pb correspondente a região que codifica HDAg e do fragmento de ~900 pb correspondente as regiões pol e S do genoma do HBV.

3.9. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos da PCR foram aplicados no gel de agarose *low melting* (Sigma, Missouri, EUA) a 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e recoberto com tampão TBE 1X. Posteriormente foram submetidos à corrida eletroforética para separação e corte das bandas específicas, transferindo-as para microtubos de 1,5 mL devidamente identificados. A purificação do DNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do conjunto de reagentes “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche).

3.9.1. Procedimento

A cada 100mg de gel, adiciona-se 300µL da solução “Binding Buffer” no tubo. Posteriormente, os tubos devem ficar no banho-maria à 56°C por 10 minutos,

homogeneizando-os a cada 3 minutos, até que o gel se dilua por completo. Após isto, deve-se aplicar 100µL de isopropanol à 100% em cada tubo e, após, a solução toda deve ser transferida para o tubo coletor contendo o tubo filtro, centrifugando por um minuto à 13.000g em temperatura ambiente. Nesta etapa, o produto amplificado fica retido no filtro. Após a centrifugação, deve-se descartar o fluído do tubo coletor e reconectar o tubo filtro, aplicando em seguida 500µL da solução “Wash Buffer” (previamente diluída de acordo com as instruções do fabricante) em cada tubo, centrifugando novamente por um minuto à 13.000g em temperatura ambiente, seguida do descarte do fluído e reconecção do tubo filtro. A etapa de lavagem deve ser repetida com 200µL da solução “Wash Buffer”. Por fim, o tubo filtro deve ser conectado em um outro tubo com tampa, devidamente identificado, aplicado 50µL a solução “Elution” e centrifugado novamente por um minuto à 13.000g em temperatura ambiente. Nesta etapa, o produto purificado encontra-se eluído no tubo final.

A quantificação do produto purificado foi realizada a partir da visualização da banda em gel de agarose, comparando-as com o padrão molecular comercial “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen).

3.10. Sequenciamento das regiões amplificadas do HDV e HBV

Após purificação e quantificação do DNA, o volume adequado da amostra foi submetido à reação de sequenciamento usando o kit “Big Dye Terminator Cycle Sequencing 3.1” (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) com os mesmos oligonucleotídeos senso e antisenso utilizados para a realização da segunda reação de PCR no caso do HDV, e, para o HBV, foram utilizados dois oligonucleotídeos internos (tabela 8) e externos (segunda reação do PCR). A sequência de nucleotídeos foi determinada utilizando o equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tabela 8: Primers internos para sequenciamento do fragmento P e S do HBV.

Primer	Polaridade	Sequências (5' – 3')
2F	Senso	CATCCTGCTGCTATGCCTCATC
3R	Anti-senso	GATGGGATGGGAATACAGGTGC

3.10.1. Procedimento

Para a preparação do mix do sequenciamento, cada poço da placa deve conter 1µL do primer à 3,2 pmol, 1µL do Big Dye, 1,5µL do buffer 5x, com um volume total de 3,5uL por poço. Feito isto deve-se aplicar o volume de produto purificado de acordo com a concentração de material genético no eluido quantificado anteriormente, variando entre 2µL e 6,5µL de produto, complementando com H₂O quando necessário para a obtenção de um volume final de 10µL por poço. A placa é então levada ao termociclador para uma reação de PCR.

Finalizada a reação no termociclador, adiciona-se 80 µl de isopropanol a 75% em cada poço. Em seguida, a placa deve ser incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e, após, deve-se centrifugar à temperatura ambiente por 45 minutos à 4000xg (xg=RCF), com velocidade de 1 de início e de parada. Após a centrifugação a placa deve ser virada em papel absorvente para retirar o sobrenadante e centrifugada invertida por 1 minuto a 900xg, para eliminar qualquer resíduo. Posteriormente a placa deve ser seca por 5 minutos no termociclador a 70°C com a tampa aberta. Depois de seca, deve-se aplicar 10 µl de formamida HiDi em temperatura ambiente e colocar a placa no termociclador por 3 minutos a 95°C com a tampa para placa do sequenciador, seguido de um choque térmico no gelo por 2 minutos, pressionando a placa para baixo. Por fim, a placa está pronta para ser colocada no sequenciador já previamente preparado e checado.

3.11. Análise de sequências e filogenia

Para a realização da genotipagem, as sequências nucleotídicas obtidas (senso e reverso complementar) de cada amostra foram editadas e montadas no programa MEGA v.7.0⁽⁹⁰⁾ para a obtenção do consenso. Um alinhamento múltiplo

contendo sequências representativas de cada genótipo de HDV e HBV obtidas do GenBank foi criado para a realização da análise de sequências e análise filogenética. Os cálculos de distância genética e a dedução dos resíduos de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas foram realizados no programa MEGA v.7.0, assim como a filogenia foi realizada através do método baseado em caracteres por máxima verossimilhança empregado no mesmo programa, com a aferição de confiabilidade da análise realizada através de um *bootstrap* com 1000 replicatas.

Ainda, para a filogenia individual de cada genótipo e análise de resíduos de aminoácidos, as nossas sequências foram submetidas ao programa BLAST para obtenção das sequências do GenBank com maior similaridade nucleotídica.

3.12. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos como frequências, médias e desvio padrão ou mediana com intervalo de acordo com o tipo de distribuição. Análises bivariadas foram realizadas para comparar proporções por meio do teste qui-quadrado (χ^2) com correção de continuidade de Yates ou teste exato de Fisher, quando apropriado. O teste não-paramétrico Mann-Whitney U foi aplicado para analisar variáveis quantitativas com distribuição normal e o teste paramétrico Kruskal-Wallis foi empregado para análises variáveis quantitativas com distribuição não normal. As variáveis analisadas foram consideradas estatisticamente significativas na análise bivariada quando o valor de $p < 0,05$. Em seguida foi realizada regressão logística binária para avaliar a co-dependência entre as diferentes variáveis significativas na análise bivariada. Todos os cálculos foram realizados usando o programa IBM SPSS Statistics para Windows, versão 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY).

4. RESULTADOS

4.1. Testes sorológicos

As primeiras análises realizadas neste projeto incluíram a realização de teste ELISA para detecção de anticorpos anti-HDV em 1240 amostras de soro de indivíduos sabidamente HBsAg+ residentes em 24 dos 26 estados do Brasil mais Distrito Federal. Das 1172 amostras com informações disponíveis, 55,4% correspondiam a indivíduos do sexo masculino. A idade média foi de $43,1 \pm 13,4$ anos (mediana = 42,0). A carga viral média do HBV foi de $3,16 + E07$ UI/mL (mediana = $3,73 + E03$ UI/mL). Estes dados estão representados na tabela 9.

Com relação aos resultados obtidos pelo ensaio de ELISA, das 1240 amostras testadas, 40 foram reagentes para anti-HDV, caracterizando uma prevalência geral do anti-HDV no Brasil de 3,2%. Destes, 52,5% pertenciam ao sexo feminino e apresentavam idade média de 38,1 anos (mediana: 41,0). Mesmo ocorrendo em todas as faixas etárias, o anti-HDV apresentou maior taxa de soroprevalência em indivíduos com idade entre 12 e 20 anos (média: 17,4 anos; $P < 0,0001$) (tabela 9).

A prevalência do anti-HDV foi maior na região Norte com 8,5% (28/330), seguida pelo Centro-Oeste (3/122; 2,5%), Sudeste (6/349; 1,7%) e Nordeste (3/356; 0,8%). A região Sul não apresentou nenhum caso reagente neste estudo.

Tabela 9: Características demográficas e virológicas da população estudada mono infectada pelo HBV ou co-infectadas com HDV e sua distribuição pelas regiões brasileiras.

	Co-infecção HBV/HDV n=40 (%)	Monoinfecção HBV n=1200 (%)	Valor de p
Gênero*			
Masculino	19 (47,5%)	591 (49,25%)	p=0.303
Feminino	21 (52,5%)	501 (41,75%)	
N.I.	0	108 (9,0%)	
Idade*			
0-20	6 (15%)	18 (1,5%)	p<0.0001
21-40	11 (27,5%)	339 (28,25%)	
41-60	17 (42,5%)	349 (29,1%)	
>61	1 (2,5%)	95 (7,9%)	
N.I.	5 (14,28%)	399 (33,25%)	
Carga viral do HBV (UI/mL)*			
Mediana	2.5+E03	3.7+E03	p=0.431
Min	3.7+E02	9.9	
Max	3.2+E07	1.0+E09	
Regiões brasileiras			
Norte	28 (70%)	302 (25,16%)	p<0.001
Nordeste	3 (7,5%)	353 (29,41%)	
Centro-Oeste	3 (7,5%)	119 (9,9%)	
Sudeste	6 (15%)	343 (28,58%)	
Sul	0	83 (6,9%)	

*Informações disponíveis nos registros.

N.I.= não informado.

A figura 12 representa a soroprevalência do HDV em cada estado estudado. Dos 12 estados brasileiros onde o anti-HDV foi encontrado, oito são considerados áreas não endêmicas. O estado com maior prevalência de anticorpos anti-HDV foi o Acre (24,3%), seguido do Amazonas (13,8%), locais considerados de alta endemicidade para o HDV. Não foram encontrados casos positivos na porção oriental da região Norte. Dentre as áreas não endêmicas, o estado de São Paulo apresentou 4 amostras anti-HDV reagentes dentre as 40 positivas encontradas no Brasil (10%) e uma prevalência total de 3,6%. Além deste, Minas Gerais e Rio de Janeiro também apresentaram resultados positivos (1/51; 1,9% e 1/177; 0,6%, respectivamente). Na região Centro-Oeste, todos os estados tiveram uma amostra positiva, mesmo diante de um tamanho amostral relativamente baixo, visto que é uma região considerada não endêmica. Os estados do Ceará e Pernambuco também tiveram amostras positivas, com prevalências de 2,2% e 2,1% respectivamente.

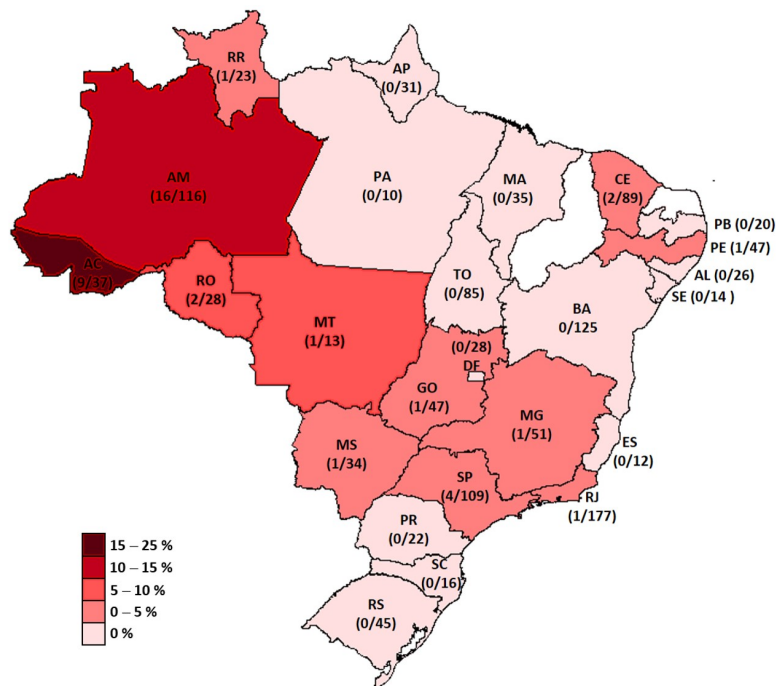


Figura 12: Soroprevalência de amostras anti-HDV positivas entre os portadores de hepatite B crônica de acordo com a localidade. O número de amostras positivas e a quantidade total de amostras testadas em cada estado estão indicados entre parênteses (Lago et.al, 2018).

4.2. Testes moleculares

4.2.1. Detecção dos ácidos nucleicos do HBV e HDV

Das 40 amostras positivas para o anti-HDV, 38 foram submetidas à extração de ácidos nucleicos seguida de amplificação parcial da região genômica que codifica o HDAg (403 pb). Duas amostras apresentavam quantidade insuficiente para a realização dos testes. Treze amostras (13/38; 34,2%) foram positivas para o RNA do HDV.

Com relação aos dados moleculares sobre o HBV, cinco amostras já tinham resultado da genotipagem realizados em estudo prévio(80). As 33 amostras restantes foram submetidas à extração de ácidos nucleicos com posterior amplificação por PCR de uma região genômica contendo porções de ambas as ORFs P e S. Destas, 24 (72,7%) foram positivas para o DNA do HBV, totalizando 29 amostras com DNA detectável.

4.2.2. Genotipagem do HDV e HBV e variabilidade de sequências

Das 13 amostras positivas para o RNA do HDV, 11 foram sequenciadas com sucesso, possibilitando a realização de genotipagem através de análise filogenética. A figura 13 apresenta a árvore filogenética por máxima verossimilhança onde as sequências determinadas neste estudo foram comparadas às sequências internacionais disponíveis no GenBank representando todos os genótipos do HDV conhecidos, segundo a classificação proposta por Miao e colaboradores (2019)(44).

Como observado na árvore filogenética (figura 13), 9 amostras foram classificadas como sendo do genótipo 3 (81,8%) no qual 8 são oriundas da região Norte e uma da região Centro-Oeste (estado de Mato Grosso do Sul), 1 como genótipo 5 (9,1%) oriunda do estado de São Paulo e 1 como genótipo 8 (9,1%), também do estado de São Paulo.

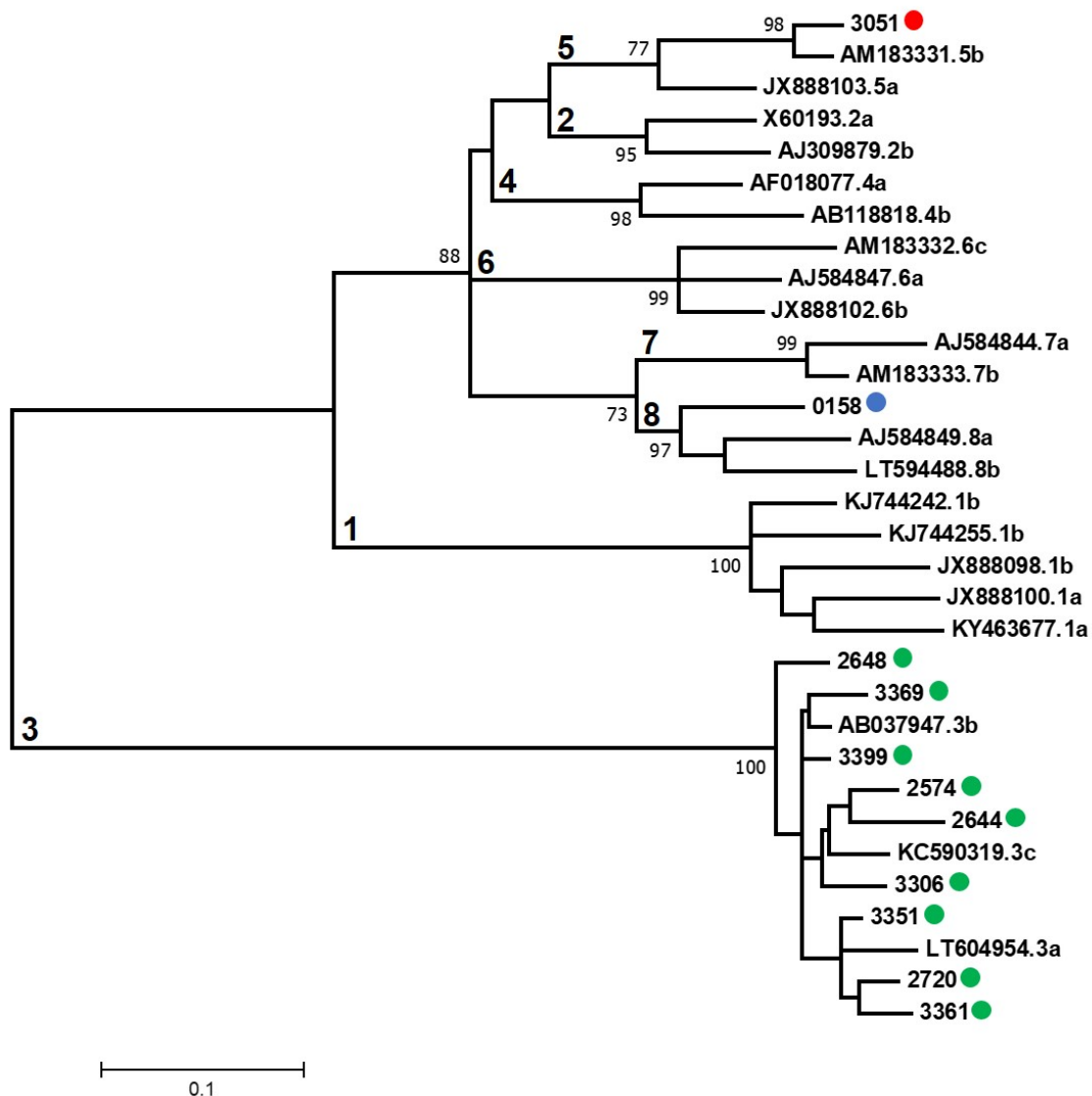


Figura 13: Árvore filogenética gerada pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo HKY+G+I para definição dos genótipos de HDV. As numerações no início dos ramos indicam os clados representando os diferentes genótipos do HDV. As amostras determinadas no presente estudo caracterizadas como genótipo 3 estão representadas por círculos verdes, a amostra do genótipo 5 por um círculo vermelho e a amostra do genótipo 8 por um círculo azul. As sequências referência estão apresentadas pelo seu número de acesso no GenBank seguido pela classificação de genótipo segundo proposta de Miao *et al.* (2019). Os valores de *bootstrap* maiores que 70% para as 1000 replicatas estão representados nos nós da árvore.

Com a finalidade de estabelecer a variabilidade intragenotípica das sequências brasileiras do HDV determinadas neste estudo, as sequências de cada genótipo (HDV-3, HDV-5 e HDV-8) foram analisadas filogeneticamente junto à sequências com alta similaridade recuperadas pela ferramenta online BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”).

A análise filogenética das sequências do HDV-3 (figura 14) mostrou uma impossibilidade de definir o genótipo 3 em subgenótipos, como proposto por Miao e

colaboradores (2019)⁽⁴⁴⁾. As sequências determinadas em nosso estudo coletadas nos estados considerados endêmicos (Acre, Amazonas e Rondônia) apresentaram similaridade com as sequências referência da região Norte. Já a sequência isolada de amostra coletada em Mato Grosso do Sul (2720) apresentou alta similaridade com as sequências do Amazonas, sugerindo a dispersão do vírus da região Norte para o Centro-Oeste.

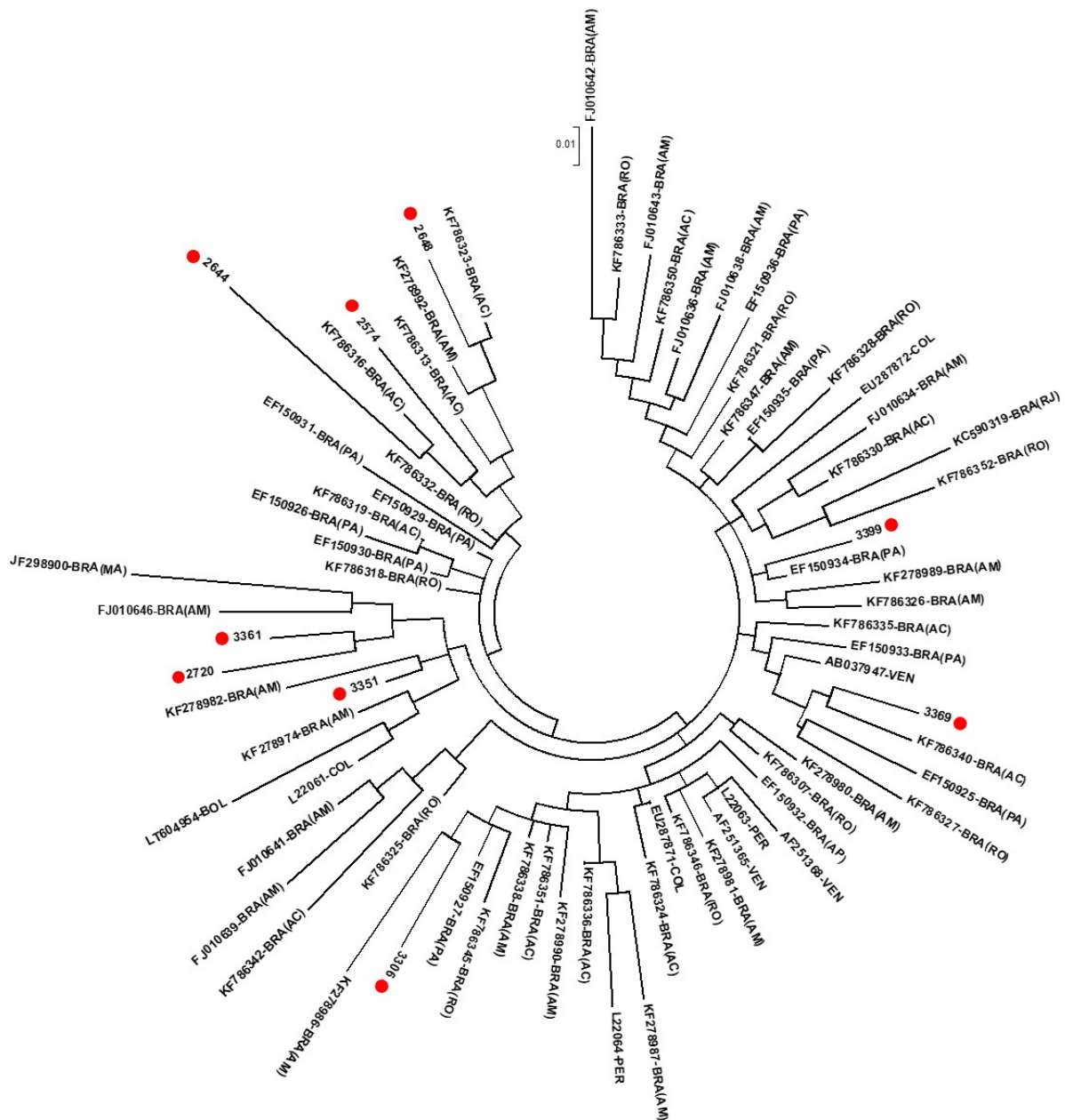


Figura 14: Árvore filogenética por máxima verossimilhança com sequências do HDV-3. As amostras determinadas no presente estudo estão representadas com um círculo vermelho. As sequências referência estão apresentadas pelo seu número de acesso no GenBank seguido pela sigla do país de origem (BOL: Bolívia, VEN: Venezuela, PER: Peru, COL: Colômbia, BRA: Brasil). As sequências referência brasileiras apresentam também o estado de coleta entre parênteses (AM: Amazonas, AC: Acre, RO: Rondônia, PA: Pará, AP: Amapá, MA: Maranhão, RJ: Rio de Janeiro).

Em relação às relações intragenotípicas do HDV-5, conforme observado na figura 15, a amostra 3051, coletada no estado de São Paulo, classificada como genótipo 5 do HDV, agrupou-se com as amostras do subgenótipo 5b de acordo com

a classificação de Miao e colaboradores (2019)⁽⁴⁴⁾. Todas as sequências internacionais contempladas foram coletadas em países localizados no noroeste da África sendo que o isolado obtido da amostra 3051 apresentou uma maior similaridade com uma sequência de Guiné-Bissau.

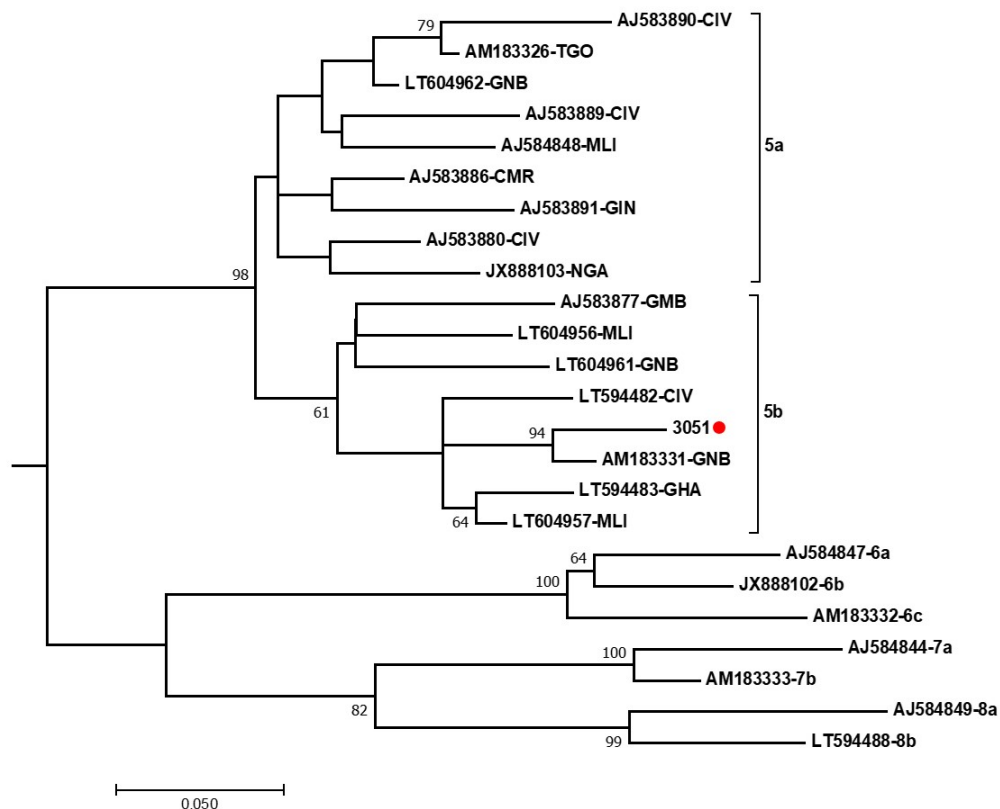


Figura 15: Árvore filogenética por máxima verossimilhança com sequências do HDV-5. A amostra determinada no presente estudo está representada com um círculo vermelho. As sequências referência estão apresentadas pelo seu número de acesso no GenBank seguido pela sigla do país de origem (CIV: Costa do Marfim, TGO: Togo, GNB: Guiné-Bissau, MLI: Mali, CMR: Camarões, GIN: Guiné, GMB: Gâmbia, GHA: Gana). Os valores de *bootstrap* maiores que 60% para as 1000 replicatas estão representados nos nós da árvore.

Na avaliação da relação intragenotípica do HDV-8, a análise filogenética da sequência 0158, também coletada no estado de São Paulo e definida como genótipo 8, foi realizada juntamente com sequências brasileiras previamente reportadas e africanas do mesmo genótipo (figura 16). Na árvore, pode-se observar a formação de um grupo monofilético a parte dos subgenótipos 8a e 8b propostos por Miao e colaboradores (2019) contemplando todas as sequências brasileiras incluindo a

deste estudo. O cálculo de distância genética entre o clado brasileiro e os clados formados pelas sequências 8a e 8b indicou uma alta variação de 15,5% enquanto a distância calculada entre o clado 8a e 8b foi de apenas 8,7%.

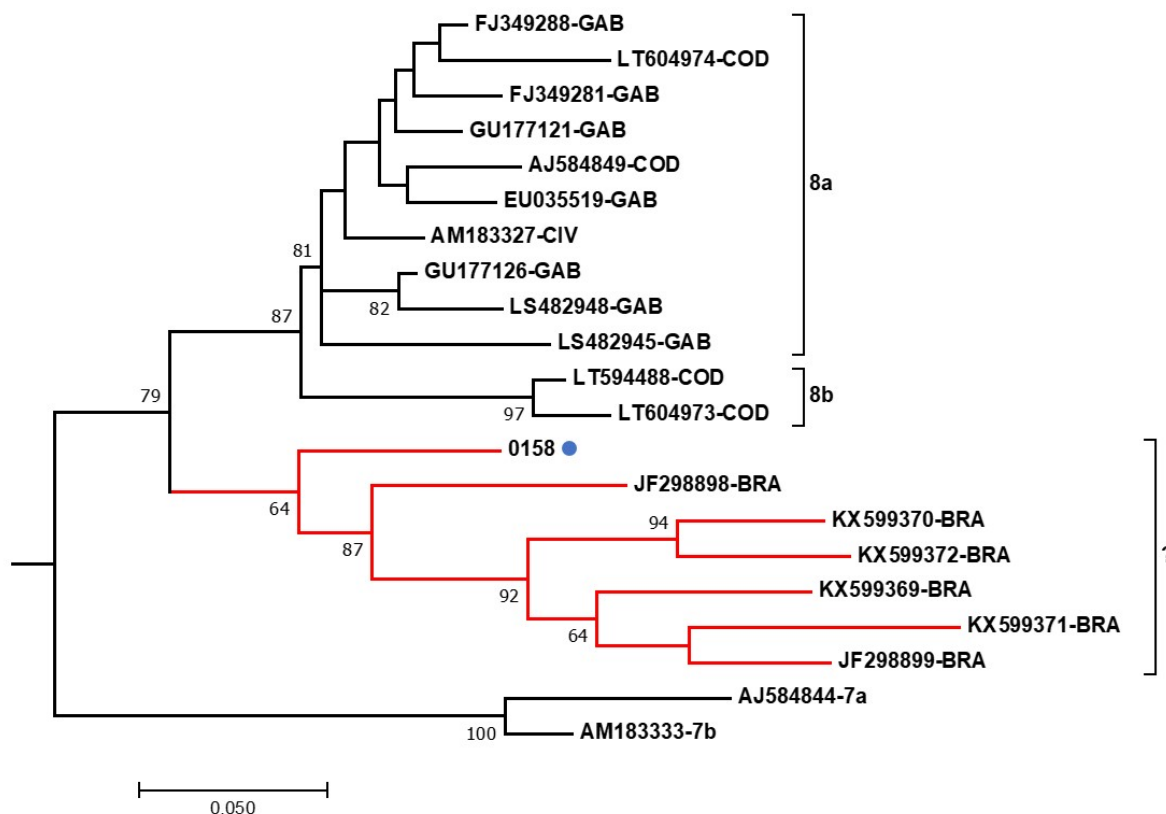


Figura 16: Árvore filogenética por máxima verossimilhança com sequências do HDV-8. A amostra determinada no presente estudo está representada com um círculo azul. O ramo apresentado em vermelho mostra um terceiro clado distinto dos subgenótipos 8a e 8b. As sequências referência estão apresentadas pelo seu número de acesso no GenBank seguido pela sigla do país de origem (CIV: Costa do Marfim, COD: República Democrática do Congo, GAB: Gabão, BRA: Brasil). Os valores de *bootstrap* maiores que 60% para as 1000 replicatas estão representados nos nós da árvore.

Ainda, em uma análise dos aminoácidos da região parcial do L-HDAg (figura 17), pode-se observar substituições de aminoácidos exclusivas das amostras brasileiras na posições 127, apresentando a substituição de um aspartato (D), comum às sequências africanas, para prolina (P), serina (S) ou isoleucina (I). No resíduo 177, foi observada a substituição de uma glutamina (Q) por aspartato (D) ou glutamato (E). No resíduo 184, ocorreu a substituição de uma arginina (R) pela

glicina (G), fenilalanina (F) ou leucina (L), e, por fim, na posição 189, ocorreu a substituição do glutamato (E) pela glicina (G).

	101		127						177	184	189
GU177126-GAB	SKEEEEELRR	LTEEDEKRER	RSAGPQ	DGGV	NPPGGSPRGA	PGGGFVPRML	GVPESPFTRH	GDGLDIRGDQ	QFPWGO	QPPP	PERLPLIE
EU035519-GABV.R.	.V.E.F.
LT604973-CODK.D.R.	.I.	.D.Q.T.N.Y.	.S.
LT604974-CODK.D.	.V.R.I.	.T.R.	.P.
AM183327-CIVK.	.R.	.A.R.
LS482948-GABK.G.T.N.N.
FJ349288-GABK.	.R.	.V.R.
LS482945-GABE.	.AK.R.G	.I.S.R.S.N.
FJ349281-GABGK.	.R.	.V.R.HN.
GU177121-GABK.	.R.	.A.S.
LT594488-CODK.	.R.	.I.Q.T.R.Y.W.
0158K.	.I.	.V.	.RP.D.	.V.E.A.R.	.T.
KX599372-BRA	-----R.	.I.	.RP.D.D.S.Q.V.S.Y.
KX599370-BRAR.	.I.	.RS.D.D.T.Q.	.I.
KX599369-BRAA.R.	.T.	.RP.D.S.S.Q.	.TR.H.
KX599371-BRAK.R.	.T.	.RP.D.	.I.L.E.D.T.Q.L.
JF298899-BRAG.	.K.	.I.K.	.I.	.RP.D.	.L.E.S.T.L.
JF298898-BRAG.	.KD.E.K.	.A.	.RI.	.D.	.S.E.	.T.

Figura 17: Análise dos resíduos de aminoácidos da região parcial da L-HDAg das seqüências do HDV-8 brasileiras e africanas. As posições destacadas em vermelho (resíduos de aminoácidos 127, 177, 184 e 189) apresentam substituições de aminoácidos encontradas exclusivamente em seqüências brasileiras.

Em relação à genotipagem do HBV, dentre as 29 amostras com DNA do HBV detectável, 15 foram classificadas como genótipo A, onde 9 (60%) são da região Norte, 3 (20%) da região Sudeste, 2 (13,3%) da região Nordeste e 1 (6,6%) da região Centro-Oeste. O segundo genótipo mais frequente foi o D (n= 7), com 6 (85,7%) amostras na região Norte e 1 (14,3%) na região Nordeste. Cinco amostras foram identificadas como sendo genótipo F, no qual 4 (80%) são oriundas da região Norte e 1 (20%) da Região Centro-Oeste. Por fim, 2 amostras foram caracterizadas como sendo genótipo E, ambas provenientes da região Sudeste, do estado de São Paulo. A árvore filogenética gerada pelo método de máxima verossimilhança está representada na figura 18.

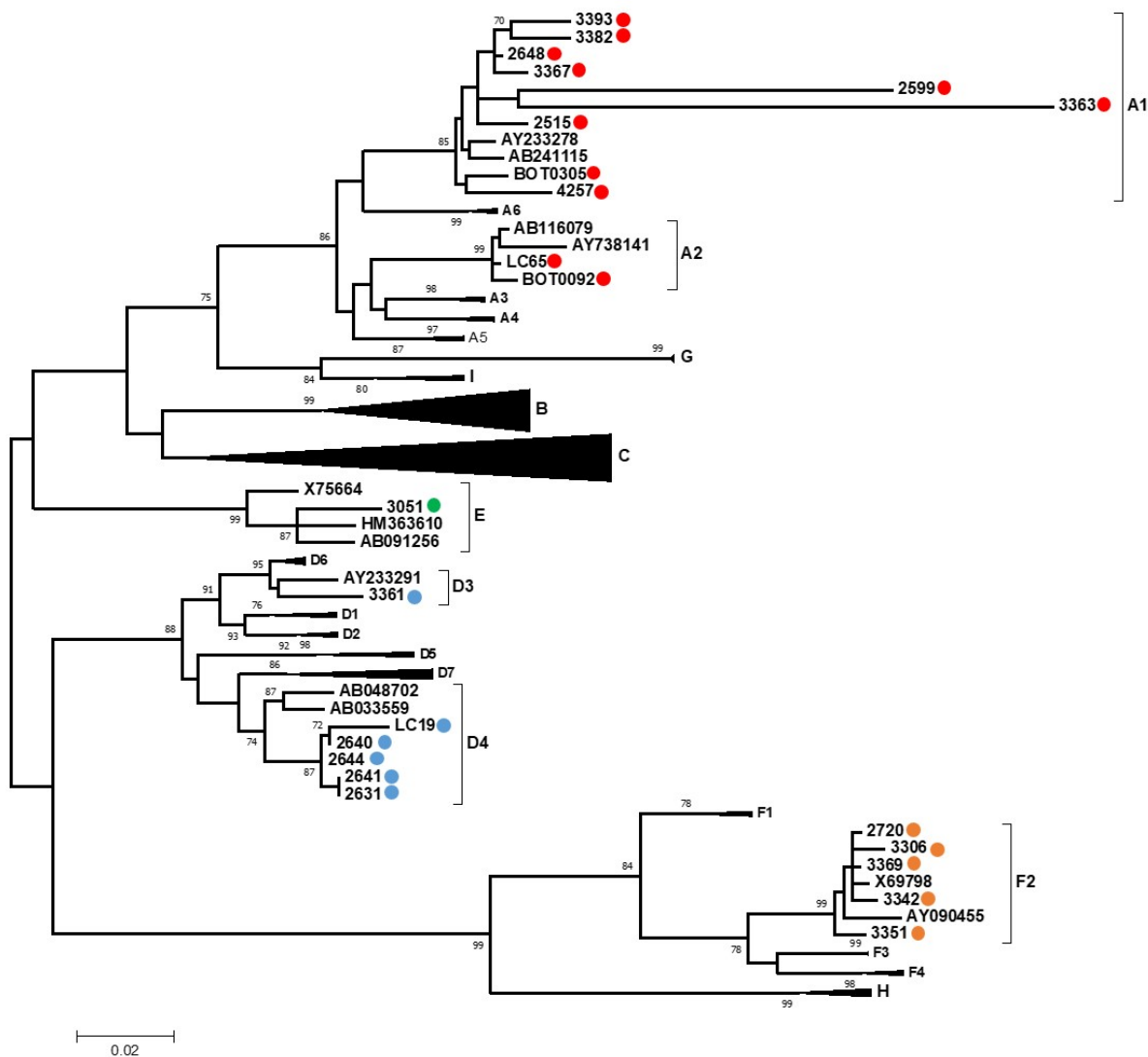


Figura 18: Árvore filogenética gerada pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo HKY+G+I para definição dos genótipos de HBV. Os diferentes genótipos e subgenótipos do HBV estão apresentados ao lado dos táxons colapsados ou dos colchetes. As amostras determinadas no presente estudo caracterizadas como genótipo A estão representadas por círculos vermelhos, as amostras do genótipo D por círculos azuis, as amostras do genótipo F por círculos laranjas e a amostra do genótipo E por um círculo verde. As sequências referência estão apresentadas pelo seu número de acesso no GenBank. Os valores de bootstrap maiores que 70% para as 1000 replicatas estão representados nos nós da árvore.

Com relação à associação entre os genótipos do HBV e do HDV, 10/38 (26,3%) amostras tiveram ambos os vírus genotipados, no qual a maioria apresentou a associação HBV-F2/HDV-3 (4/10; 40%) oriundos da região Norte (três casos) e Centro-Oeste (um caso), 40% (4/10) foram HBV-nãoF/HDV-3, incluindo as associações HBV-A1 / HDV-3 (n=2; 20%) na região Norte, HBV-D1 / HDV-3 (n=1; 10%) na região Norte e HBV-D4 / HDV-3 (n=1; 10%) também na região Norte,

seguido das associações HBV-E / HDV-5 (n=1; 10%) e HBV-E / HDV-8 (n=1; 10%), sendo os dois últimos provenientes do estado de São Paulo.

Dentre as amostras com DNA do HBV detectável e anti-HD+ sem RNA do HDV detectável (19/38; 50%), 68,4% apresentaram o genótipo A do HBV, ocorrendo nas quatro regiões geográficas estudadas (Norte=7, Sudeste=3, Nordeste=2, Centro-Oeste=1), seguidos dos genótipos D (n=5; 26,3%) com 4 amostras na região Norte e uma no Nordeste, e F (n=1; 5,3%) na região Norte. Uma amostra caracterizada como HDV-3 não obteve resultado para o genótipo do HBV e em 8 amostras (8/38; 21%) não foi possível obter nenhum dos genótipos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Soroprevalência

Este estudo estimou a soroprevalência do anti-HDV em 24 dos 26 estados brasileiros, sendo a primeira vez nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Roraima, Santa Catarina, Sergipe, Tocantins e o Distrito Federal, oferecendo, deste modo, um panorama mais fidedigno do cenário epidemiológico do HDV no Brasil.

A maioria dos trabalhos sobre o HDV no Brasil até o momento foi realizada na região endêmica da Bacia Amazônica^(35-37, 87, 88, 91, 92) e, visto que o fluxo humano pode alterar a distribuição do HDV no espaço ao longo do tempo, faz-se importante a pesquisa deste agente nas demais regiões do país. Dados científicos são fatores fundamentais nas estratégias de controle da infecção podendo auxiliar diretamente na eficácia da vigilância epidemiológica em áreas endêmicas e não endêmicas, direcionando o acesso à vacinação contra o HBV em áreas mais remotas.

A prevalência geral do anti-HDV no Brasil neste estudo foi de 3,2%. Um estudo de meta-análise⁽³⁴⁾ estimou uma prevalência do HDV em indivíduos HBsAg+ de 21,7% com base em 6 artigos publicados no Brasil até 2016, onde a maioria destes estudos foi realizada na Bacia Amazônica (área endêmica), o que levou a uma estimativa exacerbada da prevalência no Brasil. Estudos realizados em áreas não endêmicas brasileiras apresentam uma prevalência menor^(39, 40, 93-95), variando de 1,2% a 8,7%, ratificando a prevalência encontrada em nosso estudo, uma vez que incluímos as 5 regiões geográficas brasileiras. Dentre os estudos realizados em áreas não endêmicas, dois foram realizados no Maranhão pelo mesmo grupo de pesquisa em anos distintos, onde a prevalência aumentou de 3,7% em 2011 para 8,7% em 2016, levando em consideração que, neste último, o estudo incluiu populações de 5 cidades fora da capital^(39, 40). Estes achados reforçam mais uma vez a importância de realizar estudos nas áreas não endêmicas, incluindo municípios no interior dos estados.

O anti-HDV foi observado em todas as faixas etárias, sendo observada uma maior taxa em indivíduos entre 12 e 20 anos (média: 17,4 anos; $P < 0,0001$). Apesar deste grupo etário ser exclusivamente da região Norte, uma análise estatística considerando apenas as amostras desta região também apresentou

significativamente uma maior soroprevalência neste grupo etário, além de estudos anteriores também encontrarem taxas elevadas de infecção por HDV em adultos jovens^(92, 96), sugerindo que a transmissão sexual pode ter uma importante via de transmissão.

Apesar da queda na prevalência da infecção pelo HBV observada nos últimos anos em todas as regiões brasileiras^(97, 98), a alta taxa na prevalência do HDV em adultos jovens reforça a importância do monitoramento da eficácia e adesão da estratégia de vacinação contra o HBV, uma vez que este grupo etário em questão já estava incluso no esquema vacinal em recém-nascidos implementado desde 1998.

Como esperado, a região Norte apresentou a maior prevalência para o anti-HDV comparado as outras regiões. Estudos apontam uma maior prevalência na porção ocidental desta região^(36, 37, 88, 91, 92) corroborando com o observado em nosso estudo.

Apesar do estado do Pará e do Tocantins pertencerem a região Norte, a baixa prevalência do HDV na porção oriental da Bacia Amazônica já foi descrita em outros estudos^(95, 99, 100). Recentemente, um estudo realizado nesta região, mais precisamente no estado do Tocantins, com populações urbanas e ameríndias, encontrou uma soroprevalência do HDV de 0% e 3,4% respectivamente⁽¹⁰¹⁾, ratificando a baixa frequência observada em nosso estudo.

A região Centro-Oeste apresentou a segunda maior soroprevalência neste estudo (2,5%), o que diverge dos dados encontrados no SINAN, uma vez que este classifica a região Centro-Oeste com a menor prevalência dentre as regiões geográficas brasileiras⁽⁶⁴⁾. A extensa área de fronteira do Mato Grosso com áreas de alta endemicidade pode favorecer a circulação do HDV. Visto isso, estudos adicionais com um tamanho de amostra expressivo são fundamentais para elucidar melhor o perfil do HDV nesse estado.

Na região Sudeste, o estado de São Paulo apresentou a maioria dos casos positivos (4/109; 3,7%). Há poucos estudos sobre a prevalência do HDV na região Sudeste e a infecção é raramente relatada⁽²⁵⁾. Um estudo recente realizado no estado de Minas Gerais estimou uma prevalência de 6,22% do HDV em indivíduos HBsAg+, valor acima do encontrado em nosso estudo (0,6%), o que pode estar associado à população estudada, uma vez que o nosso estudo concentrou amostras da capital (Belo Horizonte) e o outro obteve amostras de todo o estado de Minas Gerais. Os resultados obtidos acerca do estado de São Paulo podem estar associados ao alto fluxo populacional de turistas e imigrantes nesta região.

Neste estudo, não foram encontrados casos positivos para o HDV na região Sul. Apesar da notificação do Ministério da Saúde de uma média de 15 casos por ano nos últimos 18 anos⁽⁶⁴⁾, até onde se sabe, não há relatos na literatura sobre a circulação do HDV no Sul do Brasil. A ausência de casos confirmados de HDV neste estudo está de acordo também com a baixa prevalência do HBV na região em questão⁽¹⁰²⁾.

5.2. Caracterização molecular

No presente estudo, três genótipos distintos do HDV foram descritos no Brasil, em áreas endêmicas e não endêmicas. Além do genótipo 3, já esperado, os genótipos 5 e 8, autóctones do continente africano porém já relatados em estudos anteriores na região amazônica⁽³⁸⁾ e no Nordeste^(40, 103), respectivamente, foram encontrados ambos no estado de São Paulo, região Sudeste do Brasil. Um estudo realizado em São Paulo⁽⁹³⁾ com uma população de co-infectados HBV/HIV encontrou uma amostra positiva para HDV-RNA (1/86; 1,2%), sendo esta caracterizada como genótipo 1, que é o mais difundido no mundo, porém, apresentando maior similaridade com sequências provenientes da Europa comparadas as da América do Sul. Novamente, o alto fluxo de imigrantes e turistas no estado de São Paulo pode ser um fator determinante para a entrada de estirpes estrangeiras nesta região.

Neste estudo, o genótipo 1 não foi encontrado entre as amostras positivas. Estudos realizados na região endêmica relatam a ocorrência do genótipo 1 porém com uma prevalência menor comparada ao genótipo 3^(38, 87), atingindo até 7,6%. A baixa prevalência do genótipo 1 no Brasil pode ter contribuído com a ausência do mesmo no nosso estudo.

O genótipo 3 é o mais prevalente no Brasil e na América do Sul. No presente estudo, 9/11 (81,8%) amostras foram caracterizadas como sendo genótipo 3, sendo 8 na região endêmica e uma no Centro-Oeste, no Mato Grosso do Sul. Não há relatos na literatura sobre caracterização molecular do HDV nos estados do Centro-Oeste. Este achado sugere uma possível migração do vírus da região endêmica para o Centro-Oeste, uma vez que seu maior estado faz divisa com diversos estados da região Norte, como citado anteriormente. Nosso estudo confirma o relatado em pesquisas anteriores sobre a alta prevalência do genótipo 3 do HDV na porção ocidental da região Norte^(36-38, 88).

Apesar do HDV-3 ser o mais distinto dentre os genótipos, ele apresentou uma variação intragenotípica de apenas 2,0% na região genômica analisada no nosso estudo, diferentemente dos genótipos 5 e 8, que apresentaram uma variação intragenotípica de 6,1% e 6,8%, respectivamente. Devido à baixa variabilidade dentro do grupo de sequências HDV-3 não foi possível classificar as amostras HDV-3 nos três subgenótipos (3a, 3b e 3c) propostos por Miao e colaboradores (2019). A análise filogenética apenas com sequências HDV-3 mostrou a similaridade das sequências das nossas amostras provenientes da região Norte com as sequências referência da mesma região, bem como a similaridade do isolado da amostra do Mato Grosso do Sul (2720) com as sequências do Amazonas, sugerindo a dispersão do vírus da região Norte para a Centro-Oeste.

O genótipo 5 foi encontrado em uma amostra proveniente do estado de São Paulo no presente estudo. Este genótipo é autóctone no continente africano, mais precisamente com relatos em Camarões, Mauritânia e Nigéria⁽³⁴⁾. Na última década, entretanto, foi relatado em alguns trabalhos a circulação deste genótipo na Europa⁽³⁴⁾ (Suíça e Reino Unido). Recentemente, um estudo realizado na Austrália⁽⁴²⁾ também identificou a circulação do genótipo 5, ocorrendo em 16% (27/181) dos casos estudados. No Brasil, um trabalho publicado em 2019 por Melo da Silva e colaboradores⁽³⁸⁾ identificou pela primeira vez no Brasil o genótipo 5 em amostras provenientes do estado do Acre. Contudo, a ausência de informação impediu a definição se estas amostras são provenientes de brasileiros ou de estrangeiros.

Ainda, a análise filogenética das sequências do HDV-5 evidenciou a divisão de dois clados bem definidos com os subgenótipos 5a e 5b. Os países de origem das sequências estão situados no noroeste da África, região onde prevalece o genótipo E do HBV. A amostra 3051 foi caracterizada como pertencendo ao subgenótipo 5b, com alta similaridade genética com uma sequência de Guiné-Bissau. Este indivíduo apresentou coinfeção com o genótipo E do HBV, sugerindo uma infecção no continente africano com a dispersão para o Brasil.

Com relação ao genótipo 8, encontrado em uma amostra de São Paulo no nosso estudo, também é um genótipo autóctone do continente africano, tendo sido descrito no Gabão⁽³⁴⁾. Na última década, dois trabalhos realizados no Maranhão identificaram o genótipo 8 em amostras brasileiras^(39, 40), associando o evento ao tráfico de escravos que ocorreu no Brasil do século XVI até meados do século XIX.

Além da divisão bem definida dos dois clados 8a e 8b, um terceiro clado, com considerável suporte estatístico (valor de *bootstrap* = 79), foi formado pela sequência determinada no presente estudo e sequências autóctones brasileiras descritas por Barros e colaboradores (2011) e Santos e colaboradores (2016) no Maranhão(39). No primeiro estudo, os autores relatam uma similaridade nucleotídica média de 83% com a sequência africana e, ainda, que a região do L-HDAg contemplando os 19 aminoácidos terminais apresentavam aminoácidos exclusivos das sequências brasileiras. Em nosso estudo, a amostra 0158 apresentou coinfeção com o HBV do genótipo E. Novamente, por se tratar de dois genótipos característicos e relativamente restritos ao noroeste africano, o achado sugere uma infecção alóctone com posterior entrada no Brasil. Entretanto, a alta similaridade com as sequências isoladas no Maranhão sugere fortemente a ocorrência de um evento de transmissão autóctone, o que ressalta a importância de estudos de epidemiologia molecular para contribuir com a vigilância de disseminação viral no país. Ainda, nossa análise mostrou que as sequências de HDV-8 isoladas no Brasil formaram um clado isolado, um agrupamento monofilético frente aos subgenótipos descritos 8a e 8b. A distância genética entre os grupos formados pelas sequências brasileiras, sequências 8a e sequências 8b, revelou uma distância de 15,5%. Levando em consideração o proposto por Miao e colaboradores e Karimzadeh e colaboradores, tal distância genética seria suficiente para a caracterização de um novo subgenótipo ou, até, de um novo genótipo do HDV^(44, 46). Para tanto, precisaríamos definir se essa distância genética, observada em um fragmento parcial do gene HDAg, se confirma com a análise do genoma completo da amostra 0158.

Na análise dos resíduos de aminoácidos da região parcial adicional do L-HDAg das amostras do genótipo 8, foram observadas substituições de aminoácidos exclusivas das amostras brasileiras em 4 posições, podendo justificar a alta divergência destas com as sequências africanas.

Neste estudo, além da definição dos genótipos do HDV, definimos também os genótipos do HBV. Em um estudo recente, Lampe e colaboradores (2017)⁽⁸⁰⁾ realizaram um estudo multicêntrico e definiram a prevalência dos genótipos do HBV circulantes no Brasil, no qual foram predominantes os genótipos A, D e F e, com exceção da região Sul, o genótipo A foi o mais encontrado nas outras regiões geográficas brasileiras. Nossos resultados confirmaram a predominância da circulação do genótipo A no Brasil, tendo sido observado em 51,7% do total de amostras de HBV genotipadas.

No nosso estudo, dentre as amostras com ambos os genótipos de HBV e HDV definidos, 40% apresentaram a co-infecção HBV-F/HDV-3. Alguns estudos relatam esta associação como a mais frequente e associada a um desfecho clínico mais grave ^(36, 37, 50). Tal associação, entretanto, não foi confirmada por outros estudos ^(38, 88). Kay e colaboradores (2014)⁽³⁷⁾ descrevem em seu estudo a prevalência dos genótipos da coinfeção HDV-HBV na região Norte do Brasil, no qual a coinfeção HBV-F2/HDV-3 é a mais prevalente (50%), seguida do HBV-A1/HDV-3 (14%), corroborando com a prevalência encontrada no nosso estudo de 40% HBV-F2/HDV-3 e 20% HBV-A1 / HDV-3. Aqui, a ausência de dados clínicos das amostras analisadas nos impediu de avaliar o desfecho clínico em relação aos genótipos virais co-infectantes.

A maioria das amostras com RNA do HDV indetectável apresentou o genótipo A do HBV. Um estudo realizado para avaliar a influência dos genótipos do HBV na eficácia da infecção da célula usando o HDV como vetor⁽¹⁰⁴⁾ sugeriu que o genótipo A do HBV apresentava a menor taxa de infectividade comparado aos outros genótipos, o que poderia explicar uma possível resolução do HDV nestes pacientes. Contudo, mais estudos devem ser realizados para avaliar a relação das associações destes genótipos com o HDV.

Os achados neste estudo demonstram a importância da vigilância epidemiológica contínua para mapear vias de disseminação viral em áreas endêmicas e não endêmicas, bem como a necessidade de mais estudos sobre a variabilidade genética do vírus e a associação entre os genótipos co-infectantes, visando elucidar as características da infecção para auxiliar no seu diagnóstico, tratamento e controle.

6. CONCLUSÕES

- A prevalência de anticorpos anti-HDV foi avaliada pela primeira vez em 14 estados brasileiros e a soroprevalência geral encontrada neste estudo foi de 3,2%, tendo sido encontradas amostras reagentes em todas as regiões geográficas exceto o Sul;
- O RNA do HDV foi encontrado em 34,2% das amostras anti-HDV reagentes;
- O genótipo 3 do HDV, endêmico na região Norte, foi encontrado em 81,8% das amostras, incluindo uma amostra oriunda do Mato Grosso do Sul, além de duas amostras do estado de São Paulo classificadas como genótipos 5 e 8, endêmicos do continente africano.
- A amostra classificada como genótipo 5 do HDV apresentou maior similaridade nucleotídica com uma sequência oriunda de Guiné-Bissau juntamente com outras sequências do genótipo 5b;
- A amostra classificada como genótipo 8 do HDV formou um grupo monofilético com as sequências brasileiras do Maranhão, diferindo em 15,5% das amostras africanas classificadas como 8a e 8b, o que nos leva a sugerir a formação de um terceiro subgenótipo 8c;
- As sequências brasileiras da região que codifica a S-HDAg no genótipo 3 do HDV apresentam aminoácidos exclusivos em relação as outras sequências dos países da América do Sul.
- A co-infecção HBV-F2/HDV-3 apresentou maior prevalência (40%) em relação às outras associações encontradas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*. 1977;18(12):997-1003.
2. Rizzetto M, Shih JW, Gerin JL. The hepatitis B virus-associated delta antigen: isolation from liver, development of solid-phase radioimmunoassays for delta antigen and anti-delta and partial characterization of delta antigen. *J Immunol*. 1980;125(1):318-24.
3. Rizzetto M, Shih JW, Gocke DJ, Purcell RH, Verme G, Gerin JL. Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection. *Lancet*. 1979;2(8150):986-90.
4. Rizzetto M, Canese MG, Gerin JL, London WT, Sly DL, Purcell RH. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis*. 1980;141(5):590-602.
5. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(10):6124-8.
6. Smedile A, Farci P, Verme G, Caredda F, Cargnel A, Caporaso N, et al. Influence of delta infection on severity of hepatitis B. *Lancet*. 1982;2(8305):945-7.
7. Govindarajan S, Chin KP, Redeker AG, Peters RL. Fulminant B viral hepatitis: role of delta agent. *Gastroenterology*. 1984;86(6):1417-20.
8. Bonino F, Hoyer B, Shih JW, Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL. Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta-associated particle. *Infect Immun*. 1984;43(3):1000-5.
9. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2018.
10. Kos A, Dijkema R, Arnberg AC, van der Meide PH, Schellekens H. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature*. 1986;323(6088):558-60.
11. Elena SF, Dopazo J, Flores R, Diener TO, Moya A. Phylogeny of viroids, viroidlike satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis delta virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(13):5631-4.
12. Flores R, Grubb D, Elleuch A, Nohales M, Delgado S, Gago S. Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: variations on a theme. *RNA Biol*. 2011;8(2):200-6.
13. Taylor J, Pelchat M. Origin of hepatitis delta virus. *Future Microbiol*. 2010;5(3):393-402.
14. Brazas R, Ganem D. A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science*. 1996;274(5284):90-4.
15. Martick M, Horan LH, Noller HF, Scott WG. A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature*. 2008;454(7206):899-902.
16. Salehi-Ashtiani K, Lupták A, Litovchick A, Szostak JW. A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science*. 2006;313(5794):1788-92.
17. Littlejohn M, Locarnini S, Yuen L. Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(1):a021360.

18. Taylor JM. Host RNA circles and the origin of hepatitis delta virus. *World J Gastroenterol.* 2014;20(11):2971-8.
19. Hetzel U, Szirovicza L, Smura T, Prähauser B, Vapalahti O, Kipar A, et al. Identification of a Novel Deltavirus in Boa Constrictors. *MBio.* 2019;10(2).
20. Wille M, Netter HJ, Littlejohn M, Yuen L, Shi M, Eden JS, et al. A Divergent Hepatitis D-Like Agent in Birds. *Viruses.* 2018;10(12).
21. Chang WS, Pettersson JH, Le Lay C, Shi M, Lo N, Wille M, et al. Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates. *Virus Evol.* 2019;5(2):vez021.
22. Perez-Vargas J, Amirache F, Boson B, Mialon C, Freitas N, Sureau C, et al. Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nat Commun.* 2019;10(1):2098.
23. Gudima S, He Y, Meier A, Chang J, Chen R, Jarnik M, et al. Assembly of hepatitis delta virus: particle characterization, including the ability to infect primary human hepatocytes. *J Virol.* 2007;81(7):3608-17.
24. Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M, Gerlich WH. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol.* 1986;58(3):945-50.
25. Botelho-Souza LF, Vasconcelos MPA, Dos Santos AO, Salcedo JMV, Vieira DS. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virol J.* 2017;14(1):177.
26. Chen PJ, Kalpana G, Goldberg J, Mason W, Werner B, Gerin J, et al. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(22):8774-8.
27. Casey JL. Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;353:123-43.
28. Dastgerdi ES, Herbers U, Tacke F. Molecular and clinical aspects of hepatitis D virus infections. *World J Virol.* 2012;1(3):71-8.
29. Taylor JM. Hepatitis D Virus Replication. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(11).
30. Lempp FA, Ni Y, Urban S. Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(10):580-9.
31. Le Gal F, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E, et al. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(9):1447-50.
32. Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. *Lancet.* 2011;378(9785):73-85.
33. Rizzetto M. Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(7):a021576.
34. Chen HY, Shen DT, Ji DZ, Han PC, Zhang WM, Ma JF, et al. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2018.
35. Gomes-Gouvêa MS, Pereira Soares MoC, Guedes de Carvalho Mello IM, Brito EM, Pereira Moia LeJ, Bensabath G, et al. Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin. *Acta Trop.* 2008;106(3):149-55.
36. Gomes-Gouvêa MS, Soares MC, Bensabath G, de Carvalho-Mello IM, Brito EM, Souza OS, et al. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 11):2638-43.
37. Kay A, Melo da Silva E, Pedreira H, Negreiros S, Lobato C, Braga W, et al. HBV/HDV co-infection in the Western Brazilian Amazonia: an intriguing mutation among HDV genotype 3 carriers. *J Viral Hepat.* 2014;21(12):921-4.

38. Melo Da Silva E, Kay A, Lobato C, Muwonge R, Zoulim F, Brites C, et al. Non-F HBV/HDV-3 coinfection is associated with severe liver disease in Western Brazilian Amazon. *J Med Virol.* 2019;91(6):1081-6.
39. Barros LM, Gomes-Gouvêa MS, Pinho JR, Alvarado-Mora MV, Dos Santos A, Mendes-Corrêa MC, et al. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? *Virus Res.* 2011;160(1-2):333-9.
40. Santos MD, Gomes-Gouvêa MS, Nunes JD, Barros LM, Carrilho FJ, Ferreira AeS, et al. The hepatitis delta genotype 8 in Northeast Brazil: The North Atlantic slave trade as the potential route for infection. *Virus Res.* 2016;224:6-11.
41. Le Gal F, Brichtler S, Drugan T, Alloui C, Roulot D, Pawlotsky JM, et al. Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains. *Hepatology.* 2017;66(6):1826-41.
42. Jackson K, MacLachlan J, Cowie B, Locarnini S, Bowden S, Higgins N, et al. Epidemiology and phylogenetic analysis of hepatitis D virus infection in Australia. *Intern Med J.* 2018;48(11):1308-17.
43. Scarponi CF, Kroon EG, Vieira DS, Fernandes AP, Gomes KB, Mota BE. Molecular epidemiology of Hepatitis delta virus infection in Minas Gerais state from Brazil, an area outside the hyperendemic region of the Amazon Basin. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114:e190074.
44. Miao Z, Zhang S, Ma Z, Hakim MS, Wang W, Peppelenbosch MP, et al. Recombinant identification, molecular classification and proposed reference genomes for hepatitis delta virus. *J Viral Hepat.* 2019;26(1):183-90.
45. Delfino CM, Cerrudo CS, Biglione M, Oubiña JR, Ghiringhelli PD, Mathet VL. A comprehensive bioinformatic analysis of hepatitis D virus full-length genomes. *J Viral Hepat.* 2018;25(7):860-9.
46. Karimzadeh H, Usman Z, Frishman D, Roggendorf M. Genetic diversity of hepatitis D virus genotype-1 in Europe allows classification into subtypes. *J Viral Hepat.* 2019;26(7):900-10.
47. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut.* 2000;46(3):420-6.
48. Negro F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(11):a021550.
49. Miao Z, Zhang S, Ou X, Li S, Ma Z, Wang W, et al. Estimating the global prevalence, disease progression and clinical outcome of hepatitis delta virus infection. *J Infect Dis.* 2019.
50. Casey JL, Niro GA, Engle RE, Vega A, Gomez H, McCarthy M, et al. Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis.* 1996;174(5):920-6.
51. easloffice@easloffice.eu EAftSotLEa, Liver EAftSot. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;67(2):370-98.
52. Saúde Md. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções 2019 [
53. Gilman C, Heller T, Koh C. Chronic hepatitis delta: A state-of-the-art review and new therapies. *World J Gastroenterol.* 2019;25(32):4580-97.
54. Keskin O, Wedemeyer H, Tüzün A, Zachou K, Deda X, Dalekos GN, et al. Association Between Level of Hepatitis D Virus RNA at Week 24 of Pegylated Interferon Therapy and Outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(13):2342-49.e1-2.

55. Rosina F, Pintus C, Meschievitz C, Rizzetto M. A randomized controlled trial of a 12-month course of recombinant human interferon-alpha in chronic delta (type D) hepatitis: a multicenter Italian study. *Hepatology*. 1991;13(6):1052-6.
56. Farci P, Mandas A, Coiana A, Lai ME, Desmet V, Van Eyken P, et al. Treatment of chronic hepatitis D with interferon alfa-2a. *N Engl J Med*. 1994;330(2):88-94.
57. Garripoli A, Di Marco V, Cozzolongo R, Costa C, Smedile A, Fabiano A, et al. Ribavirin treatment for chronic hepatitis D: a pilot study. *Liver*. 1994;14(3):154-7.
58. Davison F, Alexander GJ, Trowbridge R, Fagan EA, Williams R. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication. *J Hepatol*. 1987;4(1):37-44.
59. Organization WH. Global Hepatitis Report 2017 [Available from: <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>].
60. Indolfi G, Easterbrook P, Dusheiko G, Siberry G, Chang MH, Thorne C, et al. Hepatitis B virus infection in children and adolescents. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019;4(6):466-76.
61. Masood U, John S. Hepatitis D. 2017.
62. Organization WH. Hepatitis D 2018 [Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d>].
63. Nouredin M, Gish R. Hepatitis delta: epidemiology, diagnosis and management 36 years after discovery. *Curr Gastroenterol Rep*. 2014;16(1):365.
64. Departamento de Vigilância PeCdl, do HIV/Aids e das Hepatites Virais - Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais 2018 [Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018>].
65. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*. 1967;66(5):924-31.
66. Bayer ME, Blumberg BS, Werner B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature*. 1968;218(5146):1057-9.
67. Karayiannis P. Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatology*. 2017;11(6):500-8.
68. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. 2004;350(11):1118-29.
69. Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:651-93.
70. Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*. 1986;232(4749):477-84.
71. Nassal M, Rieger A. An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys61 determines the structure of the secretory core gene product (e antigen) of hepatitis B virus. *J Virol*. 1993;67(7):4307-15.
72. Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol*. 2001;36(10):651-60.
73. Xu C, Zhou W, Wang Y, Qiao L. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2014;345(2):216-22.
74. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*. 1986;47(3):451-60.
75. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res*. 2004;106(2):199-209.

76. Lin CL, Kao JH. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017;31(3):249-55.
77. Lin YY, Liu C, Chien WH, Wu LL, Tao Y, Wu D, et al. New insights into the evolutionary rate of hepatitis B virus at different biological scales. *J Virol.* 2015;89(7):3512-22.
78. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol.* 2014;20(18):5427-34.
79. Velkov S, Ott JJ, Protzer U, Michler T. The Global Hepatitis B Virus Genotype Distribution Approximated from Available Genotyping Data. *Genes (Basel).* 92018.
80. Lampe E, Mello FCA, do Espírito-Santo MP, Oliveira CMC, Bertolini DA, Gonçalves NSL, et al. Nationwide overview of the distribution of hepatitis B virus genotypes in Brazil: a 1000-sample multicentre study. *J Gen Virol.* 2017;98(6):1389-98.
81. Hourieux C, Sureau C, Poisson F, Brand D, Goudeau A, Roingard P. Interaction between hepatitis delta virus-encoded proteins and hepatitis B virus envelope protein domains. *J Gen Virol.* 1998;79 (Pt 5):1115-9.
82. Shih HH, Jeng KS, Syu WJ, Huang YH, Su CW, Peng WL, et al. Hepatitis B Surface Antigen Levels and Sequences of Natural Hepatitis B Virus Variants Influence the Assembly and Secretion of Hepatitis D Virus ν . *J Virol.* 822008. p. 2250-64.
83. Schaper M, Rodriguez-Frias F, Jardi R, Taberero D, Homs M, Ruiz G, et al. Quantitative longitudinal evaluations of hepatitis delta virus RNA and hepatitis B virus DNA shows a dynamic, complex replicative profile in chronic hepatitis B and D. *J Hepatol.* 2010;52(5):658-64.
84. Giersch K, Dandri M. Hepatitis B and Delta Virus: Advances on Studies about Interactions between the Two Viruses and the Infected Hepatocyte. *J Clin Transl Hepatol.* 32015. p. 220-9.
85. Mentha N, Clément S, Negro F, Alfaiate D. A review on hepatitis D: From virology to new therapies. *J Adv Res.* 2019;17:3-15.
86. Wranke A, Pinheiro Borzacov LM, Parana R, Lobato C, Hamid S, Ceausu E, et al. Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions worldwide: The Hepatitis Delta International Network (HDIN). *Liver Int.* 2018;38(5):842-50.
87. Botelho-Souza LF, Souza Vieira D, de Oliveira Dos Santos A, Cunha Pereira AV, Villalobos-Salcedo JM. Characterization of the Genotypic Profile of Hepatitis Delta Virus: Isolation of HDV Genotype-1 in the Western Amazon Region of Brazil. *Intervirology.* 2015;58(3):166-71.
88. Crispim MA, Fraiji NA, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MM, Kiesslich D. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infect Dis.* 2014;14:94.
89. Mallory MA, Page SR, Hillyard DR. Development and validation of a hepatitis B virus DNA sequencing assay for assessment of antiviral resistance, viral genotype and surface antigen mutation status. *J Virol Methods.* 2011;177(1):31-7.
90. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-4.
91. Braga WS, Brasil LM, de Souza RA, Castilho Mda C, da Fonseca JC. [The occurrence of hepatitis B and delta virus infection within seven Amerindian ethnic groups in the Brazilian western Amazon]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34(4):349-55.
92. Braga WS, Castilho Mda C, Borges FG, Leao JR, Martinho AC, Rodrigues IS, et al. Hepatitis D virus infection in the Western Brazilian Amazon - far from a vanishing disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(6):691-5.

93. Mendes-Correa MC, Gomes-Gouvea MS, Alvarado-Mora MV, Da Silva MH, Lazari C, Cavalcanti NC, et al. Hepatitis delta in HIV/HBV co-infected patients in Brazil: is it important? *Int J Infect Dis.* 2011;15(12):e828-32.
94. Pierre A, Feldner A, Carvalho Filho RJ, Lopes EPA, Gouvea MSG, Pinho JRR, et al. Prevalence of hepatitis delta virus among hemodialysis and renal transplant patients. *Int J Artif Organs.* 2018;41(3):171-4.
95. Strauss E, Gayotto LC, da Silva LC, Alves VA, Carrilho F, Chamone DA, et al. Unexpected low prevalence of delta antibodies in the east Amazon region and Sao Paulo: evidence for regional differences in the epidemiology of delta hepatitis virus within Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(1):73-4.
96. Ribeiro LC, Souto FJ. [Hepatitis Delta in the State of Mato Grosso, Brazil: report of 5 cases]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33(6):599-602.
97. Pereira LM, Martelli CM, Merchan-Hamann E, Montarroyos UR, Braga MC, de Lima ML, et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(2):240-7.
98. Souto FJ. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(1):11-23.
99. Nunes HM, Monteiro MR, Soares Mdo C. [Prevalence of hepatitis B and D serological markers in the Parakana, Apyterewa Indian Reservation, Para State, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2007;23(11):2756-66.
100. Soares MC, Menezes RC, Martins SJ, Bensabath G. [Epidemiology of hepatitis B, C and D viruses among indigenous Parakana tribe in the Eastern Brazilian Amazon Region]. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1994;117(2):124-35.
101. Villar LM, Milagres FAP, Lampe E, Cruz HM, Scalioni Lde P, Magalhães Mde AFM, et al. Determination of hepatitis B, C and D prevalence among urban and Amerindian populations from the Eastern Brazilian Amazon: a cross sectional study. *BMC Infect Dis.* 182018.
102. Bertolini DA, Gomes-Gouvea MS, Guedes de Carvalho-Mello IM, Saraceni CP, Sitnik R, Grazziotin FG, et al. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1295-304.
103. Barros LM, Gomes-Gouvea MS, Pinho JR, Alvarado-Mora MV, Dos Santos A, Mendes-Correa MC, et al. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? *Virus Res.* 2011;160(1-2):333-9.
104. Freitas N, Abe K, Cunha C, Menne S, Gudima SO. Support of the Infectivity of Hepatitis Delta Virus Particles by the Envelope Proteins of Different Genotypes of Hepatitis B Virus. *J Virol.* 882014. p. 6255-67.