

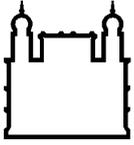
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária
Mestrado

**FILOGEOGRAFIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA HEPATITE B DE
GENÓTIPO D NAS AMÉRICAS.**

NATÁLIA SPITZ TOLEDO DIAS

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Natália Spitz Toledo Dias

FILOGEOGRAFIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA HEPATITE B DE
GENÓTIPO D NAS AMÉRICAS.

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Natalia Motta de Araujo

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

D541 Dias, Natália Spitz Toledo

Filogeografia e variabilidade genética do vírus da Hepatite B de genótipo D nas Américas / Natália Spitz Toledo Dias. – Rio de Janeiro, 2016.

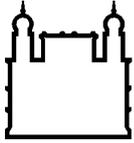
xvi, 112 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 81-107

1. HBV. 2. Genótipo D. 3. Genoma completo. 4. Variabilidade. 5. Filogeografia. I. Título.

CDD 616.3623



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: NATÁLIA SPITZ TOLEDO DIAS

**FILOGEOGRAFIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA HEPATITE B DE
GENÓTIPO D NAS AMÉRICAS.**

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Natalia Motta de Araujo

Aprovada em: 23/02/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Gonzalo José Bello Bentancor – IOC/FIOCRUZ - Presidente

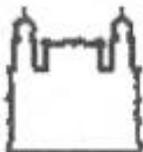
Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula – IOC/FIOCRUZ

Prof. Dra. Regina Maria Bringel Martins – UFG

Prof. Dra. Débora Regina Lopes dos Santos – UFRRJ

Prof. Dra. Caroline Cordeiro Soares – IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 23 de Fevereiro de 2016



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Natália Spitz Toledo Dias**, sob orientação da Dr^a. Natália Motta de Araújo. Ao vigésimo terceiro dia do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, realizou-se às dez horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Filogeografia e variabilidade genética do vírus da Hepatite B de Genótipo D nas Américas**" no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Estudos Bioquímicos e Moleculares de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Gonzalo Jose Bello Bentancor - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Vanessa Salete de Paula - IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Regina Maria Bringel Martins - UFG/GO e como suplentes: Dr^a. Debora Regina Lopes dos Santos - UFRRJ/RJ e Dr^a. Caroline Cordeiro Soares -IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestra em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 23 de fevereiro de 2016.

Dr. Gonzalo Jose Bello Bentancor (Presidente da Banca):

Dr^a. Vanessa Salete de Paula (Membro da Banca):

Dr^a. Regina Maria Bringel Martins (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Aos meus amados pais, Ana Paula e Edson, por todo o investimento, apoio incondicional e amor que sempre me deram. À minhas irmãs Aline e Leticia, por todo companherismo e cumplicidade. À meu grande amigo e amor Bruno, por sempre me incentivar e acreditar na minha capacidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por todo amor e ensinamentos dados ao longo da vida, pela confiança e por sempre acreditarem em mim.

À minha irmãs amadas, por todos os momentos compartilhados, de alegria e de aflições, por serem minhas melhores confidentes.

Ao meu querido Bruno, por partilhar meus medos e me acalmar nos momentos de ansiedade. Por sempre me incentivar a ser melhor e por todo o carinho e paciência.

Ao meu amigo Mazzine por todo companherismo, pelas dúvidas tiradas, por ser um ótimo amigo sempre disposto a ajudar.

À minha orientadora Dra. Natalia por me dar a oportunidade de realizar este trabalho que me permitiu aprender muitas coisas novas e conhecer pessoas incríveis que têm muito a ensinar. Pela paciência em me orientar durante todo o projeto, principalmente na fase final da escrita da dissertação.

Ao Dr. Gonzalo por me ensinar grande parte da metodologia de bioinformática utilizada neste trabalho, por toda atenção dada a mim durante esse processo de aprendizado, por ter aceitado participar da banca examinadora da minha dissertação e por realizar a revisão desta dissertação.

À todos os membros da banca examinadora por terem aceitado com muito prezo avaliar essa dissertação de mestrado.

Ao Dr. Christian Maurice Niel e á Dra. Selma de Andrade Gomes, pelo constante suporte em todas as questões relacionadas ao Laboratório de Virologia Molecular. Obrigado por todo conhecimento compartilhado e apoio para participação em eventos científicos.

À coordenação da Pós Graduação em Biologia Parasitária, pela excelente equipe docente e contribuição para minha formação acadêmica, além do apoio financeiro para participação em eventos científicos.

À FIOCRUZ e a CAPES, pela infraestrutura e auxílio financeiro por meio da bolsa de mestrado.

À FAPERJ, pela concessão da Bolsa Nota 10.

À Aline dos Santos Moreira, pela colaboração e realização das reações de sequenciamento das amostras analisadas neste trabalho na Plataforma de Sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ.

À todos os queridos amigos do Laboratório de Virologia Molecular: Agatha, Juliana, Lívia, Júnior, Carol, Naty, Oscar, Babi, Maryrose e Waldir. Por todas as conversas, risadas, momentos e ensinamentos compartilhados.

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) representa um grave problema de saúde pública mundial. Dez genótipos (A a J) foram identificados e alguns deles foram ainda classificados em subgenótipos. O genótipo D (HBV/D) tem uma distribuição mundial e possui nove subgenótipos (D1 a D9) descritos. A história evolutiva do HBV/D nas Américas não é bem compreendida e poucas sequências de genoma completo HBV/D estão disponíveis. O objetivo deste estudo é analisar a proporção e a distribuição geográfica dos subgenótipos de D nas Américas, determinar as sequências genômicas completas do HBV/D isolados de diferentes regiões geográficas do Brasil e investigar a origem e a propagação dos subgenótipos de D nas Américas. Para identificar os subgenótipos circulantes nas Américas, foram obtidos do GenBank genomas completos e sequências dos genes pré-S/S e S (n = 609). Foram detectados no continente os subgenótipos HBV/D1-D4 e HBV/D7. O HBV/D1 foi encontrado na Argentina (83%), Brasil (2%), Cuba (3%) e no Canadá (18%), enquanto que HBV/D2 foi detectado na Argentina (4%), Brasil (17%), Canadá (18%), Chile (75%), Cuba (5%) e EUA (90%). O subgenótipo HBV/D3 foi o mais frequente no Brasil (56%) e foi encontrado em todos os países americanos, exceto na Venezuela e Groelândia. O HBV/D4 foi o subgenótipo mais frequente no Canadá (35%), Cuba (76%), Haiti (84%), Martinica (80%) e Venezuela (100%). O subgenótipo HBV/D7 foi observado apenas em Cuba (8%). Ademais, amostras de soro HBsAg positivas, coletadas de todas as cinco regiões geográficas brasileiras e caracterizadas como HBV/D foram selecionadas para o sequenciamento do genoma completo. Quarenta e cinco sequências de genoma completo foram determinadas (D1, n = 1; D2, n = 11; D3, n = 32; D4, n = 1). Para investigar a origem e a propagação do HBV/D nas Américas, foram criados diferentes arquivos contendo genomas completos dos subgenótipos D1 a D4, incluindo as sequências brasileiras sequenciadas neste trabalho, bem como sequências do GenBank de diferentes origens geográficas e data de coleta conhecida. As análises foram realizadas usando o pacote BEAST v.1.8.2. A análise filogeográfica sugeriu que o HBV/D1 foi introduzido no Brasil por isolados da Síria e, na Argentina por isolados da Turquia. As sequências HBV/D2 brasileiras e argentinas ficaram relacionadas a sequências da Europa Oriental e Rússia, de onde parece ter se originado os isolados circulantes nestes países. O HBV/D2 dos EUA parece ter se originado da Índia. Já o HBV/D3 não apresentou uma origem clara nas Américas, mas provavelmente foi introduzido pelos europeus. A análise do HBV/D4 sugeriu que este subgenótipo foi provavelmente introduzido pelos escravos africanos trazidos para trabalhar nas Américas. Nossos resultados sugerem que os subgenótipos de D tiveram diferentes introduções no

continente americano e demonstram a utilidade de ferramentas computacionais desenvolvidas recentemente para investigar a história evolutiva do HBV.

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major global health problem. Ten genotypes (A to J) have been identified and some of them have been further divided into subgenotypes. Genotype D (HBV/D) has a worldwide distribution and nine subgenotypes (D1 to D9) have so far been described. The evolutionary history of HBV/D in the Americas is not well understood and few HBV/D complete genome sequences are available. The aim of this study is to examine the proportion and geographical distribution of D subgenotypes in the Americas, determine the full-length genomic sequences of HBV/D isolates from different Brazilian regions and investigate the origin and spread of D subgenotypes in the Americas. To identify the circulating subgenotypes, we downloaded American HBV/D complete and partial (pré-S/S or S gene) available in GenBank (n=609). It was detected in the Americas the subgenotypes HBV/D1-D4 and HBV/D7. HBV/D1 was found in Argentina (83%), Brazil (2%), Cuba (3%) and Canada (18%), while HBV/D2 was detected in Argentina (4%), Brazil (17%), Canada (18%), Chile (75%), Cuba (5%) and USA (90%). The subgenotype HBV/D3 was the most prevalent subgenotype in Brazil (56%) and was found in all American countries except Venezuela and Greenland. HBV/D4 was the most prevalent subgenotype in Canada (35%), Cuba (76%), Haiti (84%), Martinique (80%) and Venezuela (100%). HBV/D7 was observed only in Cuba (8%). In addition, HBsAg positive serum samples, collected from all five regions of Brazil and characterized as having HBV/D strains were selected for full genome sequencing. 45 full-length sequences were determined (D1, n=1; D2, n=11; D3, n=32; D4, n=1). To investigate the origin and spread of HBV/D in the Americas, we compiled different data sets of complete genomes for subgenotypes D1 to D4, using the Brazilian sequences as well as GenBank sequences from different geographic origins and known collection date. The analyses were carried out by using BEAST v.1.8.2 software package. The phylogeographic analysis suggested that HBV/D1 was introduced in Brazil by Syrian strains and in Argentina by Turkish strains. The Brazilian and Argentinian D2 sequences were closely related to Eastern Europe and Russian isolates, where are the most probable locations to be the source of this subgenotype in these countries. The HBV/D2 from USA seems to have originated from India. HBV/D3 had no clear introduction in the Americas, but probably was brought by the Europeans. The analysis of HBV/D4 suggested that this subgenotype was probable introduced by African slaves brought to work in the Americas. Our results suggest that D subgenotypes had different introductions in the American continent and demonstrate the usefulness of recently developed computational tools for investigating the evolutionary history of HBV.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	01
I.1 - Histórico	01
I.2 - Classificação e Morfologia do Vírus da Hepatite B	02
I.3 - Organização Genômica do HBV	04
I.3.1 - ORF pré-S/S	05
I.3.2 - ORF pré-C/C	06
I.3.3 - ORF P	07
I.3.4 - ORF X	07
I.4 - Replicação do HBV	08
I.5 - Transmissão do HBV	10
I.6 - Patogenia da infecção pelo HBV	11
I.7 - Aspectos Clínicos e Marcadores Sorológicos da Hepatite B	12
I.8 - Relação do Hepatocarcinoma com o HBV	16
I.9 - Variabilidade do HBV	17
I.10 - Genótipo D do HBV	23
I.11 - Origem e Evolução do HBV	26
I.12 - Filogeografia	31
II - JUSTIFICATIVA	36
III - OBJETIVOS	37
III.1 - Objetivo Geral	37
III.2 - Objetivos específicos	37
IV - MATERIAL E MÉTODOS	38
IV.1 - Levantamento dos subgenótipos de D circulantes no continente Americano	38
IV.2 - Amostragem	38
IV.3 - Extração do DNA viral	39
IV.4 - Amplificação do genoma completo	39
IV.5 - Eletroforese	39
IV.6 - Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento	40
IV.7 - Sequenciamento e análise do genoma completo do HBV/D	40
IV.8 - Análise e edição das sequências obtidas	41
IV.9 - Distância genética e análise filogenética dos genomas completos brasileiros	41

IV.10 - Inferência Bayesiana de eventos migratórios	42
V - RESULTADOS	46
V.1 - Subgenótipos de D circulantes no continente americano	46
V.2 - Sequenciamento de genomas completos brasileiros e filogenia	50
V.3 - Mutações relacionadas ao desenvolvimento do hepatocarcinoma	53
V.4 - Subtipos do HBV do genótipo D circulante nas Américas e detecção do primeiro isolado de D do subtipo adr _q + no mundo	54
V.5 - Análise Filogeográfica do genótipo D nas Américas	57
V.5.1 - Subgenótipo D1	57
V.5.2 - Subgenótipo D2	60
V.5.3 - Subgenótipo D3	64
V.5.4 - Subgenótipo D4	68
VI - DISCUSSÃO	72
VII - CONCLUSÕES	80
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
IX - ANEXO	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura do HBV	03
Figura 1.2. Partículas infecciosas e não infecciosas do HBV	04
Figura 1.3. Modelo esquemático do genoma do HBV	08
Figura 1.4. Modelo esquemático do ciclo replicativo do HBV	10
Figura 1.5. Curvas sorológicas nas infecções aguda e crônica	14
Figura 1.6. Fluxograma da infecção pelo HBV	15
Figura 1.7. Algoritmo para determinação do subtipo do HBV a partir da estrutura primária do gene S	18
Figura 1.8. Distribuição dos genótipos do HBV na América Latina	22
Figura 1.9. Distribuição dos genótipos do HBV em diferentes regiões do Brasil	23
Figura 1.10. Distribuição global dos subgenótipos de D	26
Figura 1.11. Estimativa bayesiana da história do tamanho da população do HBV	27
Figura 1.12. Padrão de dispersão da expansão geográfica do HBV	28
Figura 1.13. Prováveis locais de origem e rotas de migração do HBV/A1	32
Figura 1.14. Dispersão filogeográfica do HBV/E	33
Figura 1.15. Prováveis rotas de dispersão do HBV/D suportadas por um Fator de Bayes ≥ 6	35
Figura 1.16. Rotas epidemiológicas do HBV/D1 com Fator de Bayes > 3	35
Figura 5.1. Distribuição dos subgenótipos de D nas Américas	48
Figura 5.2. Distribuição dos subgenótipos de D nas diferentes regiões geográficas do Brasil	49

Figura 5.3. Análise filogenética baseada em sequências do genoma completo do HBV	51
Figura 5.4. Gráfico de distribuição das mutações associadas ao desenvolvimento do hepatocarcinoma nas regiões do promotor basal do <i>core</i> e do pré- <i>core</i> nos genomas completos dos subgenótipo D1-D4 do continente americano	54
Figura 5.5. Árvore bayesiana de máxima credibilidade com genomas completos de HBV/D1	58
Figura 5.6. Rotas significativas da dispersão do HBV/D1.	60
Figura 5.7. Árvore bayesiana de máxima credibilidade com genomas completos de HBV/D2	62
Figura 5.8. Rotas significativas da dispersão do HBV/D2	64
Figura 5.9. Árvore bayesiana de máxima credibilidade com genomas completos de HBV/D3	66
Figura 5.10. Rotas significativas da dispersão do HBV/D3	68
Figura 5.11. Árvore bayesiana de máxima credibilidade com genomas completos de HBV/D4	70
Figura 5.12. Rotas significativas da dispersão do HBV/D4	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Subgenótipos, subtipos e distribuição geográfica do HBV	21
Tabela 1.2: Principais taxas evolutivas do HBV encontradas na literatura	30
Tabela 4.1. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do genoma completo do HBV/D	39
Tabela 4.2. Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento do genoma completo do HBV/D	41
Tabela 4.3. Localidades super-representadas antes e depois do CD-HIT	44
Tabela 4.4. Quantidade de sequências por localidade para cada subgenótipo de D	45
Tabela 5.1. Países e quantidade de sequências do GenBank adicionadas ao banco de dados	46
Tabela 5.2. Distância genética intersubgenotípica entre os genomas completos HBV/D Brasileiros e outros países	52
Tabela 5.3. Subtipos encontrados nos subgenótipos de D circulantes no Brasil	55
Tabela 5.4. Subtipos encontrados nos subgenótipos de D circulantes nos países americanos (sem Brasil)	56
Tabela 5.5. tMRCAs dos principais clados americanos do subgenótipo D1	57
Tabela 5.6. Fator de Bayes das rotas de migração do HBV/D1	59
Tabela 5.7. tMRCAs dos principais clados americanos do subgenótipo D2	61
Tabela 5.8. BF das rotas de migração do HBV/D2	63
Tabela 5.9. tMRCAs dos principais clados americanos do subgenótipo D3	65
Tabela 5.10. BF das rotas de migração do HBV/D3	67
Tabela 5.11. tMRCAs dos principais clados americanos do subgenótipo D4	69
Tabela 5.12. BF das rotas de migração do HBV/D4	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Anti-HBc - Anticorpo contra a proteína do *core* viral

Anti-HBe - Anticorpo contra a proteína solúvel e

Anti-HBs - Anticorpo contra o antígeno de superfície viral

Anti-HBx - Anticorpo contra a proteína multifuncional X

BF - Fator de Bayes

BSP - *Bayesian Skyline Plot*

BSSVS - Bayesian Stochastic Search Variable Selection

cccDNA - DNA circular covalentemente ligado

CHC - Hepatocarcinoma

ESS - *Effective Sample Size*

HAV - Vírus da hepatite A

HBcAg - Proteína do *core* viral

HBeAg - Proteína solúvel e

HBsAg - Antígeno de superfície viral

HBV - Vírus da hepatite B

HBV/A1 - subgenótipo A1 do vírus da hepatite B

HBV/D - genótipo D do vírus da hepatite B

HBV/D1 - subgenótipo D1 do vírus da hepatite B

HBV/D2 - subgenótipo D2 do vírus da hepatite B

HBV/D3 - subgenótipo D3 do vírus da hepatite B

HBV/D4 - subgenótipo D4 do vírus da hepatite B

HBV/D7 - subgenótipo D7 do vírus da hepatite B

HBV/E - genótipo E do vírus de hepatite B

HBV/F - genótipo F do vírus da hepatite B

HBxAg - Proteína multifuncional X

HCV - Vírus da hepatite C
HDV - Vírus da hepatite Delta
HEV - Vírus da hepatite E
HGV - Vírus da hepatite G
HPD - *highest posterior density*
MCC - *Maximum Clade Credibility*
MCMC - *Markov Chain Monte Carlo*
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK - Célula natural killer
ORFs - *Open Reading Frames*
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PEG - Polietilenoglicol
Pol - Polimerase viral
tMRCA - Tempo do ancestral comum mais recente
TTMDV - Torque Teno Midi vírus
TTMV - Torque Teno Mini virus
TTV - Torque Teno vírus
WMHBV - *Woolly Monkey Hepatitis B Virus*

I-INTRODUÇÃO

I.1 – Histórico

A história das hepatites virais remonta a milhares de anos. A mais antiga descrição de "hepatite epidêmica", que pode ou não ter sido causada devido ao vírus da hepatite B (HBV), é creditada a Hipócrates (cerca de 450 aC), quase 2500 anos atrás. Relatos de icterícia, como doença epidêmica também podem ser encontrados no Tamulde da Babilônia (Sherlock, 1987).

O primeiro caso documentado de hepatite sérica aconteceu na Alemanha, em 1883, quando 191 trabalhadores de um estaleiro em Bremen desenvolveram icterícia acompanhada por sintomas semelhantes aos da hepatite após serem vacinados com um mesmo lote de vacina contra a varíola estabilizada com linfa humana, num período variável de dois a oito meses após a vacinação (Gardner, 1950). Em 1940, a transmissão parenteral foi confirmada quando militares americanos apresentaram icterícia após receberem uma vacina contra febre amarela que havia sido preparada com soro humano. Nesse período, também se observou que surtos de hepatite associados à utilização de seringas e agulhas não esterilizadas possuíam um período de incubação mais longo (mais de 100 dias) (Krugman, 1989).

Em meados da década de 1940, pode-se identificar com clareza a existência de distintos agentes virais para as epidemias de icterícia que ocorreram durante a II Guerra. Em 1947, MacCallum designou os termos "vírus da hepatite A" (HAV) e "vírus da hepatite B" (HBV), referindo-se, respectivamente, aos supostos agentes etiológicos das hepatites de período de incubação curto ou infecciosa (18 a 37 dias) e de período de incubação longo de transmissão parenteral (50 a 180 dias) (Hollinger, 1996).

Após esse evento de 1947, a Organização Mundial da Saúde (OMS) adotou a denominação de hepatites A e B, em substituição, respectivamente, aos termos hepatite infecciosa e hepatite sérica. Mais tarde, verificou-se, entretanto, a existência de um segundo tipo de hepatite sérica. Inicialmente denominada hepatite não A – não B, a hepatite C foi reconhecida no final da década de 1980 (Revisto por Hollinger, 1996).

Em 1965, Blumberg e colaboradores publicaram o primeiro trabalho que buscava caracterizar traços polimórficos hereditários em amostras de soro de diversas regiões geográficas do mundo. Nesse estudo, foi identificado um antígeno em uma amostra de soro de um aborígene australiano que reagia especificamente com um anticorpo presente no soro

de um paciente hemofílico americano. Denominou-se, então, esse antígeno de Austrália (Au), o qual era relativamente raro na América do Norte e Europa ocidental e prevalente em populações africanas e asiáticas e entre pacientes com leucemia, síndrome de Down e hepatite aguda (Blumberg *et al.*, 1967; Bayer *et al.*, 1968). Estudos posteriores (Okochi e Murakami, 1968; Prince, 1968) mostraram que esse antígeno era exclusivamente encontrado no soro de indivíduos infectados pelo HBV. Posteriormente, a purificação do HBV foi realizada a partir do soro de portadores do antígeno Au e a partícula completa do vírus foi detectada por microscopia eletrônica (Dane *et al.*, 1970).

Atualmente, diversos vírus hepatotrópicos humanos já foram identificados e associados à doença icterícia. A partir da descrição do HBV em 1970, foram caracterizados os vírus da hepatite A (HAV) (Feinstone *et al.*, 1973), vírus da hepatite D (HDV) (Rizzetto *et al.*, 1977), vírus da hepatite E (HEV) (Balayan *et al.*, 1983) e vírus da hepatite C (HCV) (Choo *et al.*, 1989). Outros vírus foram identificados em pacientes com hepatopatias pós-transfusional não A-E, porém, uma associação direta entre as hepatopatias e as infecções causadas por esses vírus ainda não pôde ser confirmada. Dentre esses, destacam-se o vírus da hepatite G (HGV) (Simons *et al.*, 1995), TorqueTeno vírus (TTV) (Nishizawa *et al.*, 1997), Torque Teno Mini virus (TTMV) (Takahashi *et al.*, 2000) e Torque Teno Midi vírus (TTMDV) (Ninomiya *et al.*, 2007).

I.2 – Classificação e Morfologia do Vírus da Hepatite B

O HBV é o membro protótipo da família *Hepadnaviridae*, que engloba um pequeno número de vírus de DNA com tropismo por células hepáticas. Essa família é dividida em dois gêneros: *Orthohepadnavirus*, composto por vírus que infectam mamíferos, incluindo o HBV, e *Avihepadnavirus*, que compreende os vírus que infectam aves (Fauquet *et al.*, 2005; ICTV, 2014). As principais características da família *Hepadnaviridae* são hepatotropismo, relativa especificidade de espécie e capacidade de causar infecções agudas e persistentes com viremia e antigenemia (Glebe e Bremer, 2013). Além do HBV, os *Orthohepadnavirus* compreendem espécies virais que são capazes de infectar roedores de pequeno ou médio porte. O HBV infecta humanos e primatas não humanos (gorila, chimpanzé, orangotango e gibão) (Vaudin *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 2000; Robertson e Margolis, 2001). Além disso, uma espécie de hepadnavirus de primatas foi isolada a partir do macaco lanoso do Novo Mundo (WMHBV - *woolly monkey hepatitis B virus*) (Lanford *et al.*, 1998).

As partículas infecciosas do HBV (vírions), também chamadas partículas de

Dane, são esféricas, com envelope duplo e cerca de 42-47 nm de diâmetro (Dane *et al.*, 1970). Os vírions são formados por um envelope externo de glicoproteínas que constitui o antígeno de superfície do vírus (HBsAg) (Dane *et al.*, 1970; Almeida *et al.*, 1971; Robinson e Lutwick, 1976). O HBsAg é composto por três proteínas: L (*large*), M (*middle*) e S (*small*) distribuídas em quantidades distintas pelo envelope (Tiollais *et al.*, 1985). O nucleocapsídeo possui simetria icosaédrica, sendo formado pela proteína do core (HBcAg) (Almeida *et al.*, 1971) e pelo genoma viral (Robinson *et al.*, 1974) (Figura 1.1). Estima-se que o soro de indivíduos infectados pelo HBV possa apresentar concentrações superiores a 10^9 partículas virais por mL (Ganem, 1996).

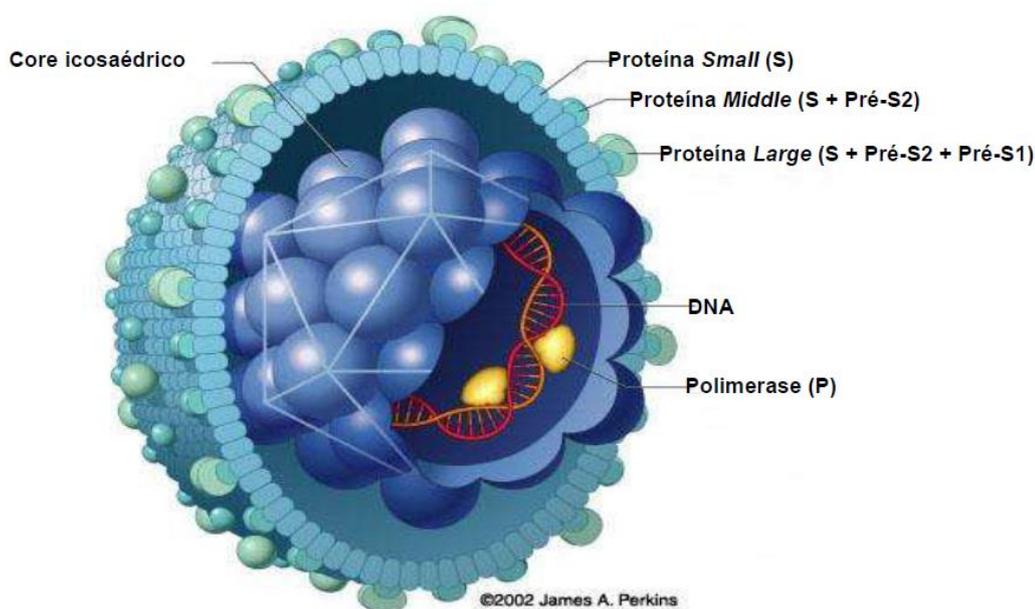


Figura 1.1: Estrutura do HBV. Modelo esquemático de partícula de Dane. Disponível em: <<http://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>> [Acesso em 15 nov. 2015] (Figura adaptada para o português).

Além das partículas completas infecciosas, no soro de pacientes infectados podem ser encontrados outros dois tipos de partículas não infecciosas, as esféricas e filamentosas, que são constituídas apenas pelo HBsAg e por alguns lipídeos oriundos da célula hospedeira (Figura 1.2). As partículas esféricas possuem cerca de 20 nm de diâmetro, e as filamentosas apresentam, aproximadamente, 22 nm de largura e comprimento variável (Robinson *et al.*, 1976; Laub *et al.*, 1983). Elevados níveis dessas partículas não infecciosas podem ser encontrados nas fases aguda e crônica da infecção. Presentes em concentrações superiores a 10^{13} partículas por mL de soro, essas partículas não promovem infecção, pois não

possuem o genoma do vírus (Rizzetto, 1998). Apesar disso, as partículas subvirais são altamente imunogênicas e eficientes em induzir a resposta neutralizante de anticorpos anti-HBs (Ganem, 1996).

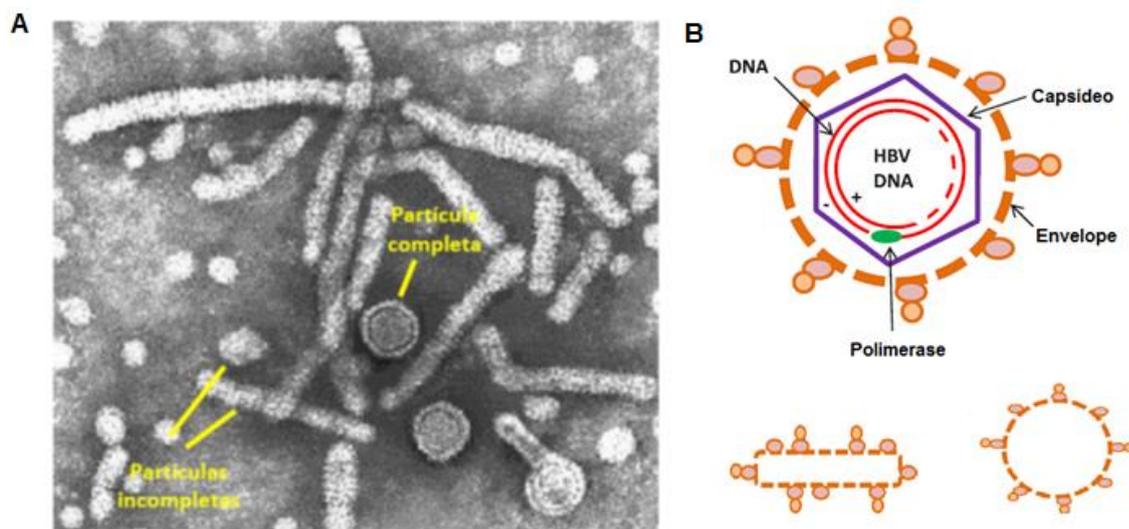


Figura 1.2: Partículas infecciosas e não infecciosas do HBV. A- Microscopia eletrônica. B- Representação esquemática.

A- Disponível em: <<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html>>. [Acesso em 22 agos. 2014] (Figura adaptada).

B- Fonte: Datta *et al.*, 2012. (Figura adaptada).

I.3 – Organização Genômica do HBV

O genoma do HBV, um dos menores dentre os vírus que infectam o homem, é constituído por uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla (ambas as fitas não se encontram covalentemente fechadas), com aproximadamente 3.200 pares de base (pb) de tamanho. A fita mais longa é complementar ao RNA pré-genômico e, por convenção, possui polaridade negativa (Gerlish e Robinson, 1980). Na fita de polaridade positiva, a posição da extremidade 5' terminal é fixa, enquanto a posição da extremidade 3' terminal é variável. Desta forma, o comprimento da fita positiva varia de 50% a 90% do comprimento da fita complementar (Ganem, 1996). Próxima às extremidades 5' de ambas as fitas, há duas pequenas sequências diretamente repetidas, de aproximadamente 11 nucleotídeos (nt) cada, "direct repeats" (DR1 e DR2). Essas sequências são importantes para a inicialização da replicação do HBV (Seeger *et al.*, 1986; Lien *et al.*, 1987; Will *et al.*, 1987). A extremidade 5' da cadeia negativa do DNA codifica a primeira DR, denominada 'DR1', enquanto a fita

positiva começa com outra repetição direta a 'DR2'. A cadeia negativa também tem uma proteína terminal, que é uma parte da polimerase viral, covalentemente ligada à sua extremidade 5'. A fita positiva contém um pequeno oligômero de RNA derivado da extremidade 5' do RNA pré-genômico, que funciona como iniciador da síntese da fita negativa do DNA (Seeger *et al.*, 1986; Lien *et al.*, 1987).

A numeração mais comumente utilizada em relação aos pares de bases do genoma do HBV se inicia a partir de um sítio único de restrição para a enzima *EcoRI*, localizado no início da região pré-S2 ou em sítios homólogos, caso o mesmo esteja ausente. Entretanto, outros métodos de numeração, a partir do primeiro nucleotídeo de cada gene são utilizados para análise de cada uma das regiões individualmente (Stuyver *et al.*, 2000).

O genoma do HBV possui quatro fases de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORFs) designadas de pré-S/S, pré-C/C, P e X (Shafritz e Lieberman, 1984). As ORFs são totalmente codificantes e estão parcialmente sobrepostas, permitindo que o HBV codifique 50% mais proteínas do que seria esperado devido ao reduzido tamanho do seu genoma (Heermann *et al.*, 1984; Ganem e Varmus, 1987) (Figura 1.3). A síntese de quatro RNAs virais é regulada por quatro promotores, pré-S1, pré-S2, pré-C/C e X presentes nas ORFs e dois elementos potencializadores (*enhancers*) (EnhI e EnhII) (Ganem e Varmus, 1987).

I.3.1 – ORF pré-S/S

O gene pré-S/S inclui as regiões pré-S1, pré-S2 e S, com três códons de iniciação na mesma fase de leitura. Esse gene codifica as proteínas que compõe o HBsAg, a proteína estrutural que forma o envelope viral. A transcrição é regulada por regiões promotoras especializadas separadas, permitindo regulação variável da expressão proteica. A proteína L ou *large*, a de maior tamanho (cerca de 400 aminoácidos), é codificada a partir do códon de iniciação localizado no começo da região pré-S1 e sua síntese se estende pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S. A proteína M ou *middle*, que é constituída por 281 aminoácidos, é codificada pelas regiões pré-S2 e S, a partir do segundo códon de iniciação localizado no início da pré-S2. A proteína S ou *small*, a menor das proteínas (226 aminoácidos), é codificada a partir do terceiro códon de iniciação localizado no início da região S. Todas as proteínas têm sua síntese interrompida no mesmo códon de parada, localizado no final da região S (Seeger e Mason, 2000).

Essas proteínas não são encontradas de maneira uniforme entre os diferentes tipos de partículas virais (Heermann *et al.*, 1984). As partículas subvirais, não infecciosas,

são compostas predominantemente pela proteína S, apresentando quantidade variável de proteína M e pouca de L. Entretanto, as partículas virais infecciosas são enriquecidas de proteína L. Como essa proteína é a que possui os sítios de ligação do HBV aos receptores dos hepatócitos (Neurath *et al.*, 1986; Klingmuller e Schaller, 1993), é coerente que a partícula infecciosa possua um número consideravelmente maior de proteína L quando comparada às partículas não infecciosas, as quais sendo mais numerosas poderiam competir com os vírions pelos receptores dos hepatócitos (Ganem *et al.*, 1996).

I.3.2 – ORF pré-C/C

O gene pré-C/C apresenta-se como a região mais conservada do genoma viral, é responsável pela síntese das proteínas HBcAg, constituinte do *core* viral, e HBeAg, que funciona como um importante marcador sorológico de replicação viral. Os códons de iniciação localizam-se na mesma fase de leitura aberta (Nassal e Rieger, 1993; Nassal e Schaller, 1996).

O HBeAg é uma proteína não estrutural, sintetizada a partir do primeiro códon de iniciação localizado na região pré-C, e sua síntese se estende por toda a região C. O primeiro peptídeo precursor produzido é composto de 214 aminoácidos, contendo os 29 aminoácidos da região pré-C e o restante constituinte do gene *core*. Essa sequência da região pré-*core* é responsável pela translocação do HBeAg para o retículo endoplasmático, onde o mesmo será processado pela clivagem nas duas extremidades, resultando em uma proteína final com 159 aminoácidos. Essa proteína é secretada nos estágios iniciais da infecção aguda e nas fases replicativas da infecção crônica (Nassal e Rieger, 1993). O HBeAg é um importante marcador sorológico de replicação viral ativa (Garcia *et al.*, 1988; Nassal e Rieger, 1993); no entanto, ainda não se sabe ao certo seu papel na biossíntese viral.

Já o HBcAg é uma proteína estrutural composta de 185 aminoácidos que compõe o nucleocapsídeo viral, sendo codificada a partir do segundo códon de iniciação localizado no início da região C. O nucleocapsídeo da partícula viral é composto por 180 monômeros do HBcAg, que espontaneamente se aglutinam formando uma estrutura icosaédrica denominada *core* ou cerne viral (Nassal e Schaller, 1996). Essa proteína é capaz de induzir a produção de anticorpos (anti-HBc) pelo hospedeiro, sendo importante, assim como o HBsAg, no diagnóstico sorológico da infecção (Milich e McLachlam, 1986).

I.3.3 – ORF P

O gene P, o maior dos genes do HBV, cobre aproximadamente $\frac{3}{4}$ do genoma viral e codifica a polimerase viral (Pol), uma enzima multifuncional com 832 aminoácidos. Essa proteína é funcionalmente dividida em quatro domínios: o domínio aminoterminal, com atividade de DNA primase, necessário para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa; uma região espaçadora, sem função ainda definida; o domínio da transcriptase reversa, fundamental para a síntese do DNA a partir do RNA pré-genômico; e o domínio carboxiterminal que possui atividade de RNase H. No gene da polimerase, está presente o motivo Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD), essencial para a atividade de transcrição reversa (Toh *et al.*, 1983), o qual é bem conservado em todas as transcriptases reversas virais, constituindo o sítio mais comum de aparecimento de mutações de resistência a fármacos (François *et al.*, 2001; Gaillard *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2012).

I.3.4 – ORF X

A ORF X codifica a proteína viral HBx, um polipeptídeo composto por 154 aminoácidos que pode ser detectado em hepatócitos infectados pelo HBV (Seeger e Mason, 2000).

O gene X apresenta elevada similaridade dentre os *orthohepadnavirus*, mas está ausente nas linhagens que causam infecção em aves, o que sugere que a ORF X não desempenhe um papel crucial nos eventos de replicação. Entretanto, já foi verificado o papel dessa proteína como um regulador viral multifuncional que modula o processo de transcrição, participa de diversas vias de sinalização, degradação de proteínas e resposta celular a estresses; atribuições que afetam a replicação e a proliferação viral direta ou indiretamente (Murakami, 2001).

A proteína X é um regulador viral multifuncional que modula a replicação do HBV, a transcrição celular, o sinal de transdução, a atividade do proteossoma e progressão do ciclo celular (Kim *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2010), e pode induzir a apoptose diretamente ou sensibilizar hepatócitos a uma variedade de estímulos apoptóticos (Kim *et al.*, 2005). HBx também tem sido relacionado a inflamação e imunomodulação. Em linhagens celulares de hepatoma humano, HBx induz a transcrição de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IFN-c e IL-6 (Lara-Pezzi *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2010; Xiang *et al.*, 2011). HBx também aumenta a expressão de moléculas que são importantes na resposta imune, como o

complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Zhou *et al.*, 1990).

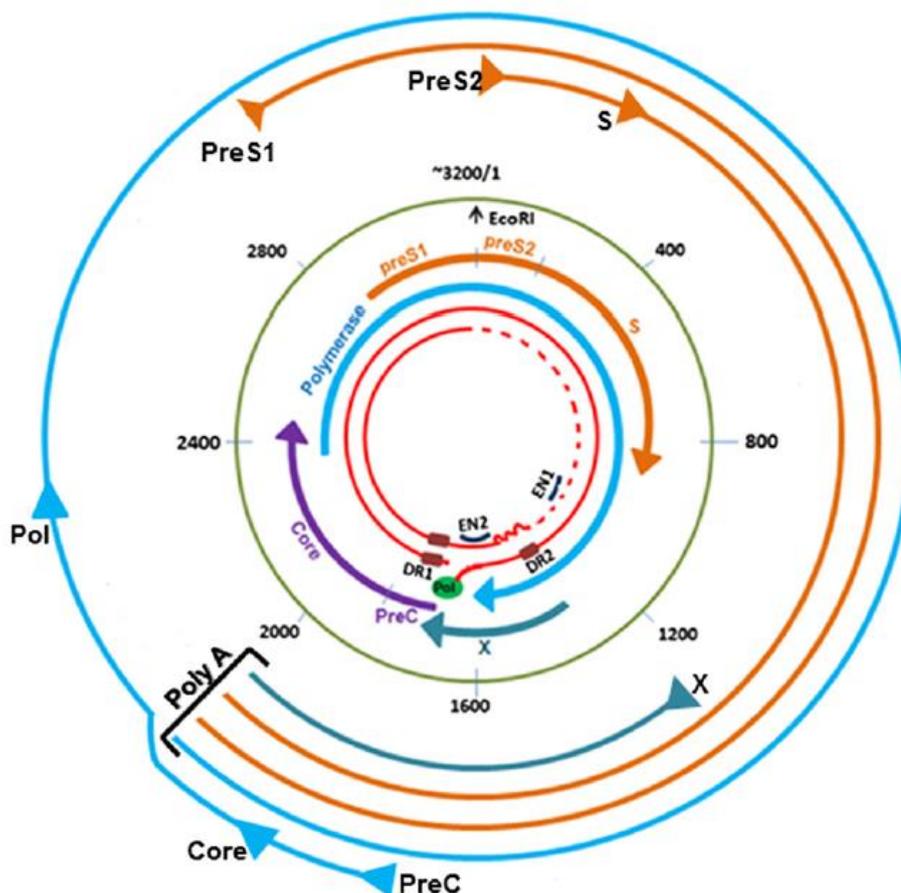


Figura 1.3: Modelo esquemático do genoma do HBV (Fonte: Datta *et al.*, 2012). Os círculos vermelhos representam as fitas de polaridades negativa e positiva do DNA viral. A linha verde indica as posições em nucleotídeos do genoma viral. As setas coloridas representam as ORFs do genoma do HBV. As linhas mais externas semicirculares com setas representam os quatro RNAs (genômicos e subgenômicos) correspondentes às ORFs. As setas indicam as posições dos códons de iniciação diferentes dentro de cada ORF.

I.4 – Replicação do HBV

A replicação do HBV realiza-se por um mecanismo único dentre os vírus de DNA animais, uma vez que apresenta uma etapa envolvendo a produção de um intermediário de RNA e a sua conversão em DNA pela ação da transcriptase reversa viral (Ganem, 1996; Nassal e Schaller, 1996).

A infecção pelo HBV tem início a partir da adsorção viral aos receptores nos

hepatócitos e penetração do vírion na célula. Uma vez no citoplasma do hepatócito, o vírus perde seu nucleocapsídeo, sendo transportado até o núcleo celular, onde libera o seu genoma (Ganem *et al.*, 1996).

Inicialmente, o DNA viral é convertido em uma forma de dupla fita circular covalentemente ligada (cccDNA). Para tanto, a fita positiva é complementada pela DNA polimerase celular. O cccDNA é transcrito em RNAs genômicos e subgenômicos pela RNA polimerase II celular. Os RNAs subgenômicos atuam exclusivamente como RNAs mensageiros para a tradução das proteínas do envelope e da proteína X. Já os RNAs genômicos servem tanto de molde para a síntese de DNA viral (sendo chamado, neste caso, de RNA pré-genômico) como de RNAs mensageiros para a tradução da proteína do *core*, da polimerase viral e do HBeAg. Os transcritos de RNA são, então, transportados para o citoplasma celular onde serão traduzidos em suas respectivas proteínas. Um sinal de encapsidação (ϵ), localizado na extremidade 5' do RNA pré-genômico é responsável pelo empacotamento, no citoplasma, desse RNA nos capsídeos imaturos durante a replicação (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002). A transcrição reversa é iniciada no interior do capsídeo, onde a fita negativa é sintetizada a partir do molde de RNA viral, o qual é concomitantemente degradado pela atividade de RNase H da polimerase. A fita de polaridade positiva é sintetizada a partir da fita negativa. Durante esse processo, o genoma do HBV é circularizado com a peculiaridade da fita positiva não ser completamente sintetizada, resultando em um genoma de fita parcialmente dupla. O nucleocapsídeo pode, então, retornar ao núcleo, liberar o DNA viral (que pode ser convertido novamente em cccDNA) para a amplificação de novos genomas (Tuttleman *et al.*, 1986), ou seguir para membranas intracelulares do retículo endoplasmático ou do complexo de Golgi contendo as glicoproteínas do envelope do vírus para ser envelopado, e posteriormente, secretado através da via de secreção constitutiva (Figura 1.4) (Pollack e Ganem, 1993; Papatheodoridis *et al.*, 2002; Ganem e Prince, 2004).

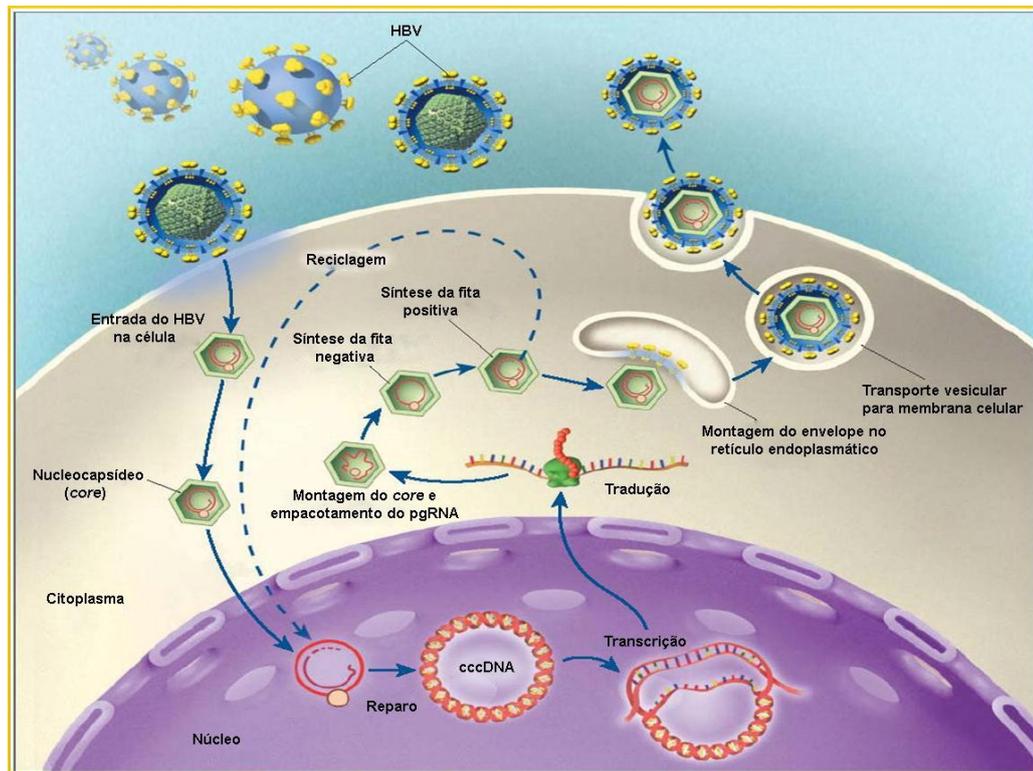


Figura 1.4: Modelo esquemático do ciclo replicativo do HBV (Fonte: Ganem e Prince, 2004 – Figura adaptada para o português).

I.5 – Transmissão do HBV

O HBV pode se manter infeccioso fora do seu hospedeiro durante pelo menos sete dias. O período de incubação do HBV é de em média 75 dias, mas pode variar de 30 a 180 dias. O vírus pode ser detectado dentro de 30 a 60 dias após a infecção e pode persistir e desenvolver para uma hepatite crônica (WHO, 2015).

A transmissão do HBV ocorre, principalmente, por meio da exposição percutânea ou da mucosa a fluidos corporais infectados, incluindo saliva, fluidos menstrual, seminal e vaginal, que têm sido implicados como veículos de transmissão humana (Mast *et al.*, 1999).

A transmissão sexual do vírus da hepatite B pode ocorrer quando há relação sexual sem uso do preservativo. A transmissão do HBV também pode ocorrer por inoculação acidental de pequenas quantidades de sangue ou fluido durante procedimentos médicos, cirúrgico e dental, ou por meio de lâminas de barbear ou objetos similares contaminados com sangue infectado; uso de seringas e agulhas esterilizadas inadequadamente; uso de drogas injetáveis; tatuagem; *piercing* corporal; e acupuntura (WHO, 2015).

A transmissão perinatal é a principal via de transmissão do HBV em muitas partes do mundo e um fator importante para manter o reservatório da infecção em algumas regiões, particularmente na China e Sudeste Asiático. Na ausência de profilaxia, uma grande proporção de mães virêmicas, especialmente as HBeAg positivas, transmite a infecção para seus filhos no momento ou em um curto período após o nascimento (Beasley *et al.*, 1983). O risco de infecção perinatal também é maior se a mãe tem hepatite B aguda no segundo ou terceiro trimestre de gravidez, ou no prazo de dois meses após o parto. Apesar do HBV poder infectar o feto no útero, isso é incomum e parece estar geralmente associado a hemorragia pré-parto e descolamento de placenta. O risco de desenvolvimento da doença crônica durante a infecção perinatal é de 90% (até os seis meses de idade), mas essa porcentagem cai para 20-60% nas idades de 6 meses a 5 anos (Beasley *et al.*, 1983; McMahon *et al.*, 1985).

Também importante é a transmissão horizontal, especialmente em países em desenvolvimento, por contato íntimo não sexual ou por formas pouco conhecidas. Especula-se que tais mecanismos envolvam infecção percutânea por meio da saliva, traços de sangue, compartilhamento de objetos, escarificação, rituais, instrumentos não esterilizados, dentre outros (Kiire, 1996).

I.6 – Patogenia da infecção pelo HBV

O principal alvo do HBV é o hepatócito, uma célula parenquimatosa do fígado. Quando o HBV entra no hepatócito via interação com receptores celulares, o nucleocapsídeo transporta o DNA genômico do HBV para dentro do núcleo, onde o DNA circular é convertido em DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) como molde para os RNAs virais (Rehermann e Nascimbeni, 2005). Muitas evidências suportam que o HBV não é diretamente citotóxico para as células infectadas. Primeiro, o HBV replica persistentemente em linhagens celulares de hepatoma transfectadas (Sells *et al.*, 1987; Quasdorff *et al.*, 2008) ou em hepatócitos humanos primários infectados sem danos ou morte celular (Schulze-Bergkamen *et al.*, 2003). Segundo, ratos transgênicos com HBV ativo (replicação viral) não mostram evidência de inflamação no fígado. Entretanto, a transferência de células T citotóxicas para o rato transgênico provoca inflamação intra-hepática (Guidotti *et al.*, 1995), o que sugere que a inflamação hepática ocorre devido a indução da resposta imune adaptativa pela infecção do HBV e não diretamente pelo vírus. Por último, durante a fase inicial da infecção aguda, antes do recrutamento das células T para o fígado, não há evidência

histológica ou bioquímica de dano hepático em chimpanzés infectados com HBV (Guidotti *et al.*, 1999; Thimme *et al.*, 2003). Em pacientes e modelos animais imunocomprometidos a replicação viral ocorre em níveis altos no fígado sem causar danos, reforçando que o HBV replica não citopaticamente no fígado e que a lesão hepática seria causada pela resposta imune induzida pelo HBV (Chisari e Ferrari, 1995; Ferrari *et al.*, 2003; Ganem e Prince, 2004).

A célula *natural killer* (NK), uma célula inflamatória não específica para um antígeno, é conhecida por participar no processo inflamatório antes do recrutamento das células T citotóxicas para o fígado. Posteriormente, células T citotóxicas específicas para o HBV são responsáveis por significativa citotoxicidade e têm um papel central (direta e indiretamente) na patogênese viral. Além disso, as células T auxiliares, células B e células apresentadoras de antígeno também estão associadas com a patogênese da infecção pelo HBV. Estudos sugeriram ainda que as células inflamatórias não específicas para o HBV exacerbam a imunopatologia induzida por células T citotóxicas e que plaquetas aumentam o acúmulo de células T citotóxicas no fígado (Iannacone *et al.*, 2005; Sitia *et al.*, 2012).

A apoptose de células infectadas contribui para a defesa antiviral, limitando a propagação inicial do vírus. No entanto, a apoptose pode também ajudar na propagação viral (Servet-Delprat *et al.*, 2000). O HBV não precisa destruir a célula para que haja a liberação de progênie infecciosa. Desse modo, permanece controverso se o HBV sensibiliza os hepatócitos à apoptose para a propagação viral no fígado (Terradillos *et al.*, 1998; Su *et al.*, 2001). Resultados de vários estudos sugerem que proteínas do HBV são capazes de induzir respostas anti ou pró-apoptóticas em diversas condições ambientais dependendo do diferente contexto celular, sugerindo que a habilidade do HBV de induzir ou suprimir a apoptose pode ser contraditória durante o curso da infecção pelo HBV (Oh e Park, 2015).

I.7 – Aspectos Clínicos e Marcadores Sorológicos da Hepatite B

O HBV pode causar hepatite aguda, fulminante e crônica, podendo, nesse caso, haver evolução para um quadro de cirrose hepática e/ou carcinoma hepatocelular (Gonçalves, 1997).

A hepatite B aguda caracteriza-se pela presença do antígeno HBs no soro do indivíduo infectado, dos anticorpos anti-HBc da classe IgM, e do antígeno HBe (marcador de replicação viral ativa), além da detecção do DNA do HBV (Sjogren, 1994). A maioria dos adultos com infecção aguda pelo HBV desenvolve doença autolimitada com resolução do

quadro em até seis meses. No entanto, uma minoria (1%) evolui para hepatite fulminante em decorrência da lise maciça, imunomediada, dos hepatócitos infectados. Hepatite fulminante é definida como desenvolvimento de encefalopatia e coagulopatia até oito semanas após o início dos sintomas e apresenta altas taxas de letalidade. A probabilidade de um indivíduo com infecção aguda tornar-se cronicamente infectado depende da idade na qual o indivíduo adquire a infecção (Mendonça *et al.*, 2006).

Durante a fase de convalescença, os títulos de anti-HBc IgM decaem, ao passo que os títulos de anti-HBc IgG aumentam, normalmente permanecendo detectáveis por toda a vida. Nessa fase, o HBsAg e o HBeAg tendem a desaparecer, e surgem os anticorpos anti-HBe e anti-HBs. Esse último, um anticorpo protetor que neutraliza o vírus após infecção aguda (Figura 1.5). Em indivíduos vacinados contra o HBV, o anti-HBs aparece como marcador isolado, indicador de imunidade protetora (Sjogren *et al.*, 1994).

A hepatite B crônica é definida pela persistência do HBsAg no soro por mais de 6 meses após a infecção (Figura 1.5). Os marcadores de replicação viral e as manifestações clínicas evoluem de forma dependente da interação vírus-hospedeiro (Sjogren, 1994). Dentre os indivíduos com infecção crônica, aproximadamente 70% evoluem para estabilização da infecção, 30% apresentam progressão da doença com evolução para cirrose e destes, 1/4 desenvolve descompensação hepática em cinco anos e de 5-10% desenvolvem CHC (Mendonça *et al.*, 2006).

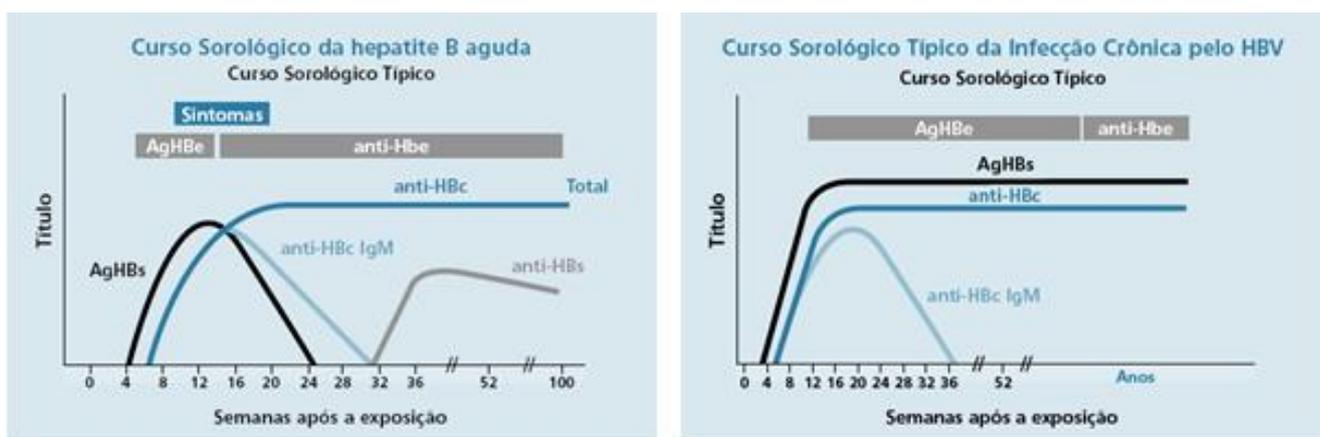


Figura 1.5: Curvas sorológicas nas infecções aguda e crônica.

Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide_3.htm> e <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide_4.htm> [acesso em 16 Jan. 2008] (figuras adaptadas para o português).

Os portadores crônicos constituem o principal reservatório do HBV, devido à persistência viral no organismo. Em função disso, pacientes com a infecção crônica representam um sério risco de transmissão da doença (Coursaget *et al.*, 1991; Elghouzzi *et al.*, 1995; Flichman *et al.*, 2014; Moresco *et al.*, 2014).

Os principais fatores associados à progressão da hepatite crônica incluem a idade na qual o indivíduo foi infectado, que é inversamente proporcional ao risco de cronicidade (Figura 1.6), e o *status* imune, destacando-se a imunossupressão, como a que ocorre em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes renais crônicos que fazem hemodiálise ou pós-transplante e leucêmicos. A infecção dos recém-nascidos, apesar de geralmente assintomática, representa um risco de cerca de 90% de evolução para a forma crônica da doença. Acredita-se que o estado de imaturidade do sistema imune nos muitos jovens seja importante no desenvolvimento desse tipo de infecção (Strauss *et al.*, 2003).

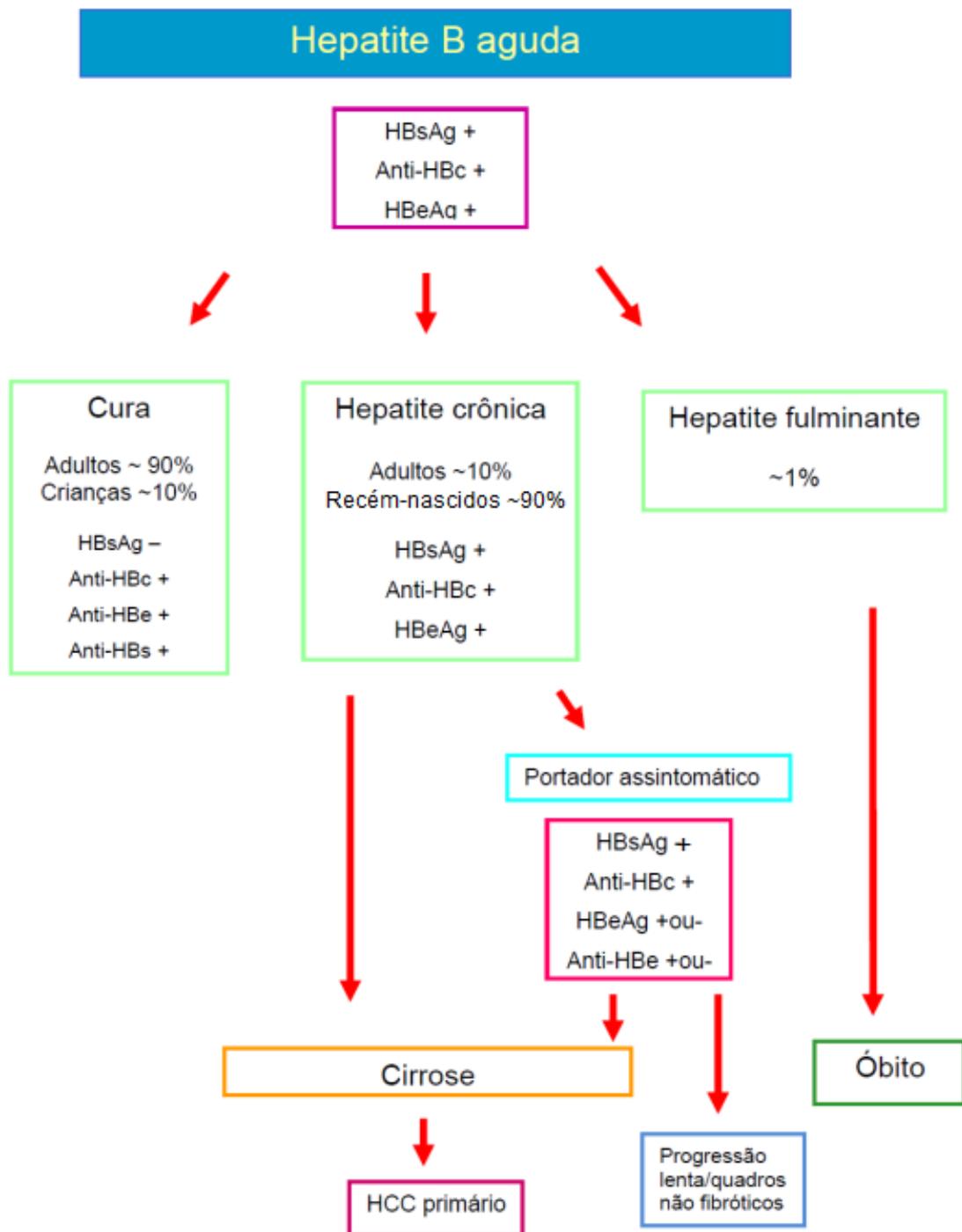


Figura 1.6: Fluxograma da infecção pelo HBV (Fonte: Farrel, 1998). Adaptado.

I.8 - Relação do Hepatocarcinoma com o HBV

A associação entre a infecção crônica pelo HBV e o desenvolvimento de CHC foi primeiramente reportada em 1975 (Blumberg *et al.*, 1975) e a hepatite B tem sido reconhecida como a principal causa desse tipo de tumor (Kew, 2010). No mundo, 55% dos casos de CHC é causado pela infecção pelo HBV (Ferlay *et al.*, 2001; Bosh *et al.*, 2004). Estima-se que dos 360 milhões de portadores crônicos para o HBV, 25% deles desenvolverão CHC (Beasley e Hwang, 1984; IARC, 1994). A infecção pelo HBV aumenta o risco da hepatocarcinogênese em 100 vezes, quando comparada a indivíduos não infectados (But *et al.*, 2008), enquanto a infecção pelo HCV aumenta o risco em 20 vezes (Sun *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2008). Em pacientes com cirrose com etiologia por infecção pelo HBV, o risco aumenta 1.000 vezes (Gomaa *et al.*, 2008).

A hepatocarcinogênese envolve múltiplos mecanismos que afetam os hepatócitos. Os dois processos principais que afetam as células do fígado são alterações genéticas e lesões crônicas dos hepatócitos (Coleman, 2003). Na maioria dos casos, a cirrose é a etapa intermediária para o desenvolvimento de CHC, porém não é fundamental para que isso ocorra (But *et al.*, 2008). A hepatite crônica e outras causas de danos no fígado estão associadas ao processo recorrente de lesão seguido de regeneração que origina a cirrose. Esse processo aumenta o risco do surgimento de anomalias genéticas que podem resultar na ativação de genes relacionados à oncogênese e na inativação de genes supressores de tumor (Coleman, 2003). O HBV, diferente do HCV, é capaz de integrar seu genoma nas células hospedeiras e induzir mudanças que podem promover a carcinogênese (Feitelson *et al.*, 2002; Anzola, 2004).

Estudos recentes indicam que alguns fatores podem ser associados ao desenvolvimento do CHC como a carga viral do HBV, o genótipo do isolado infectante e a presença de determinadas mutações em regiões específicas do genoma do HBV (Kao *et al.*, 2003; Miyakawa e Mizokami, 2003; Asim *et al.*, 2010; Zhang e Cao, 2011). A supressão da replicação do HBV e eventual perda do marcador HBsAg no soro dos pacientes resultam em um menor risco de desenvolvimento de CHC (Fattovich *et al.*, 1997). A replicação viral, representada pela presença do marcador HBeAg no soro do paciente, está associada ao aumento do risco do desenvolvimento de CHC (Yang *et al.*, 2002). A carga viral do HBV DNA maior que 10^4 cópias/mL é um importante preditor da hepatocarcinogênese em pacientes assintomáticos, independente da presença do marcador HBeAg, do nível das transaminases e da presença de cirrose (Chen *et al.*, 2006).

Muitos estudos indicam que a infecção pelo genótipo C do HBV em comparação com o genótipo B, aumenta o risco de hepatocarcinogênese (Kao, 2003; Chan *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Em alguns destes estudos o genótipo C está associado a cargas virais altas, porém outro trabalho demonstrou que o genótipo C e alelos específicos da região do promotor basal do *core* (BCP) estão associados ao desenvolvimento de CHC, independente da carga viral (Yang *et al.*, 2008). Ao comparar a infecção pelo genótipo A com a infecção pelo genótipo D, estudos demonstram que a infecção pelo genótipo D está mais associada a uma lesão mais grave no fígado e uma maior incidência de CHC (Kao, 2002; Gomaa *et al.*, 2008).

Vários isolados mutantes do HBV, principalmente os que apresentam mutações no BCP, no pré-*core* e deleções na região pré-S foram associados a uma maior patogenicidade, aumentando a probabilidade de progressão para cirrose e CHC (Hunt *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2011). As principais mutações são: A1762T e G1764A no BCP, o que promove uma diminuição da produção do antígeno HBeAg (Guo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011), G1896A no pré-*core*, que gera um códon de parada da tradução, impedindo a produção de HBeAg (Zhang *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2011) e deleções encontradas na região genômica pré-S (Sugauchi *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010), que apresenta vários epítomos para as células B e T do sistema imune (Kay e Zoulim, 2007). Nenhum estudo sobre mutações do HBV relacionadas ao CHC foi ainda realizado no Brasil, para confirmar se estas mutações estariam também associadas ao desenvolvimento do CHC em pacientes brasileiros.

I.9 – Variabilidade do HBV

Diferente de outros vírus de DNA, o HBV precisa de uma transcriptase reversa para sua replicação. Pelo fato da transcriptase reversa não possuir capacidade de revisão de incorporação de nucleotídeos (*proofreading*), mutações no DNA ocorrem frequentemente durante a replicação. Se por um lado, o uso de uma enzima transcriptase reversa na replicação, com ausência de atividade de *proofreading*, tende a manter níveis elevados de mutação no DNA viral; por outro, o fato de possuir um genoma totalmente codificante, contendo quatro fases de leitura parcialmente sobrepostas, reduz relativamente a ocorrência de mutações, uma vez que uma substituição, mesmo que silenciosa em uma fase de leitura poderia alterar o funcionamento da fase de leitura a ela sobreposta, inviabilizando a partícula

viral (Chen e Oon, 1999; Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

Os primeiros relatos de variabilidade no HBV foram descritos em 1971 por Le Bouvier (Le Bouvier, 1971), que identificou dois determinantes antigênicos, d e y, localizados no antígeno de superfície do HBV, compartilhando um epítipo conformacional comum, o determinante “a”, (Levene e Blumberg, 1969). Dois determinantes adicionais, w e r, foram subsequentemente enunciados, em 1972, por Bancroft e colaboradores (Bancroft, *et al.*, 1972). Os determinantes antigênicos mutuamente exclusivos, d ou y e w ou r, estão associados a variações de aminoácidos nas posições 122 e 160, respectivamente. Diferenças no epítipo resultam em quatro subtipos principais (adr, adw, ayr and ayw) e dez subtipos (Figura 1.7) (Couroucé-Pauty *et al.*, 1983). Os subtipos mostram diferentes distribuições geográficas e afetam as características antigênicas do HBV (Le Bouvier *et al.*, 1972; Norder *et al.*, 1992). Anticorpos contra o determinante “a” conferem imunidade a todos os subtipos do HBV. A subtipagem de amostras do HBV pode ser utilizada em estudos epidemiológicos e, em alguns casos, para verificar a possibilidade de infecção nosocomial (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

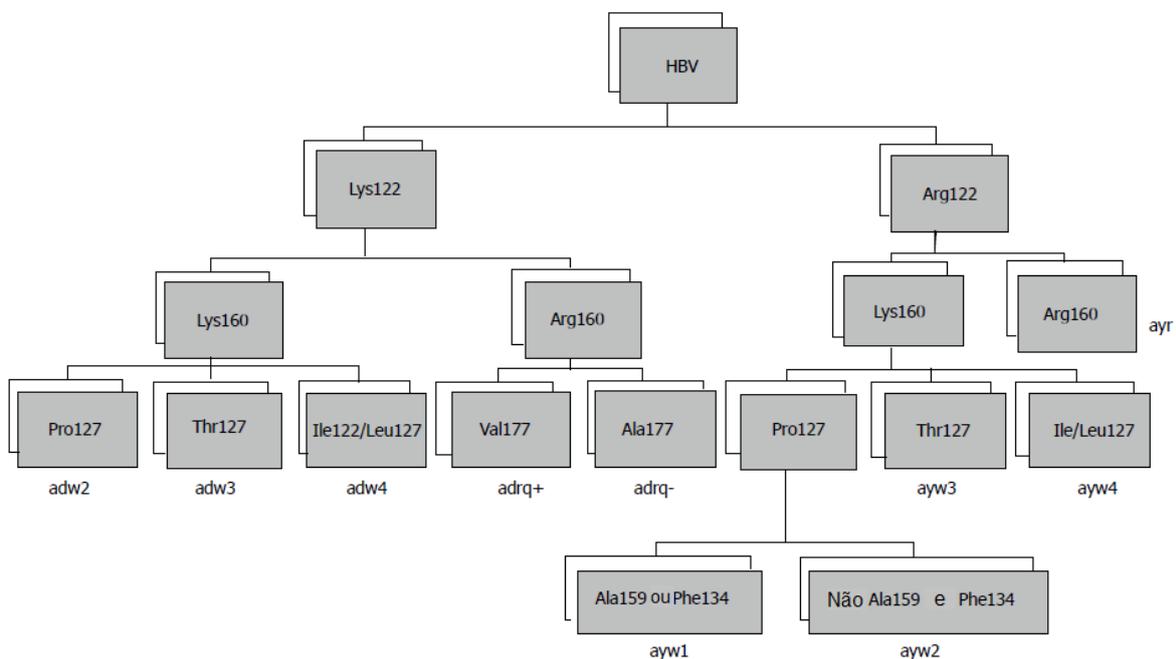


Figura 1.7: Algoritmo para determinação do subtipo do HBV a partir da estrutura primária do gene S. (Fonte: Yano *et al.*, 2015).

O HBV é classificado em pelo menos 10 genótipos (A - J) que são distintos entre si pela estrutura e tamanho do genoma, com no mínimo 8% de divergência no genoma completo entre eles (Norder *et al.*, 1994; Arauz-Ruiz *et al.*, 2002; Tatematsu *et al.*, 2009). Os genótipos A-D e F são também divididos em subgenótipos, baseados numa divergência de 4 a 8% do genoma completo (Magnius e Norder, 1995; Arauz-Ruiz *et al.*, 2002; Norder *et al.*, 2004). Alguns estudos têm demonstrado que os genótipos e subgenótipos apresentam distribuições geográficas distintas (Tabela 1.1), e divergem quanto a progressão e prognóstico da doença e a resposta ao tratamento antiviral (Kao *et al.*, 2000; Kramvis *et al.*, 2005).

Os genótipos do HBV possuem distribuição étnica-geográfica característica. Alguns são amplamente distribuídos pelo mundo, como os genótipos A e D. O primeiro é muito difundido na África Subsaariana e ocidental e Norte da Europa (Liu e Kao, 2013), já o segundo é dominante na África, na Europa, nos países do mediterrâneo e na Índia (Liu e Kao, 2013; Sakamoto *et al.*, 2013). Os genótipos B e C são comuns na Ásia, sendo o C encontrado principalmente no sudeste asiático (Ghosh *et al.*, 2013). O genótipo E circula na África subsaariana. O genótipo G tem sido reportado na França, Alemanha e nos Estados Unidos (Prasetyo *et al.*, 2013); e os genótipos H e F são prevalentes na América Central e do Sul (Schaefer, 2007; Liu e Kao, 2013). O genótipo I foi proposto após ser observado no Vietnã (Tran *et al.*, 2008). Posteriormente o genótipo J, foi isolado de um paciente Japonês (Tatematsu *et al.*, 2009).

No continente americano, Canadá e Estados Unidos apresentam maior prevalência dos genótipos A e D; no entanto, no Canadá, também já foram encontrados os genótipos B, C, E, F, G, H e I (Iqbal *et al.*, 2015; Osiowy *et al.*, 2015; Schwarz *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos, além dos genótipos A e D também já foram detectados B, C, E, F, G e H (Ramachandran *et al.*, 2014; Iqbal *et al.*, 2015; Schwarz *et al.*, 2015). O México apresenta maior predominância do genótipo H, seguido de A, D e G (Sánchez *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2007; Roman *et al.*, 2010; Panduro *et al.*, 2013; Roman e Panduro, 2013). Na América Central, o genótipo mais frequente é o F (Arauz-Ruiz *et al.*, 1997; Panduro *et al.*, 2013). Na região do Caribe, o genótipo mais prevalente no Haiti é o A, mas também são observados os genótipos D e E (Andernach *et al.*, 2009); na Martinica, assim como no Haiti, o genótipo mais comum é o A, seguido do D e F (Brichler *et al.*, 2013). Em Cuba, o genótipo predominante é o A, seguido do D. Os genótipos E e H também já foram detectados (Loureiro *et al.*, 2015). Estudos têm demonstrado que, na Colômbia, Bolívia, Venezuela, Peru e Chile, encontra-se com maior frequência o genótipo F (Casey *et al.*, 1996; Palumbo *et al.*, 2007; Devesa *et al.*,

2008; Khan *et al.*, 2008; Di Lello *et al.*, 2009; Alvarado-Mora *et al.*, 2011). Na Argentina, os genótipos mais encontrados são A, D e F; no entanto, já foram descritos casos de infecção pelo HBV de genótipos B e C (Piñeiro Y Leone *et al.*, 2008; Pezzano *et al.*, 2011). A distribuição dos genótipos do HBV na América Latina está representada na Figura 1.8.

No Brasil, os genótipos prevalentes são o A, D e F, com suas frequências variando nas diferentes regiões geográficas (Moraes *et al.*, 1999; Mello *et al.*, 2007). Nas comunidades indígenas, o genótipo mais comum é o F (Castilho *et al.*, 2012). Os genótipos B e C já foram descritos no Brasil, mas geralmente estão relacionados com descendentes de asiáticos (Sitnik *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2010). A distribuição dos principais genótipos circulantes no Brasil pode ser observada na Figura 1.9.

Tabela 1.1: Subgenótipos, subtipos e distribuição geográfica do HBV. (Fonte: Zehender *et al.*, 2014. Adaptado.)

	Subgenótipo	Subtipo	Origem geográfica	Genoma (pb)
A	A1 (Aa, A')	adw2, ayw1	África, Ásia, América do Sul	3221
	A2 (Ae, A-A')	adw2, ayw1	Norte da Europa, América do Norte, África do Sul	
	A3 (Ac)		Camarões, Gabão, Ruanda	
	A4		Mali, Gâmbia	
	A5		Nigéria, Ruanda, Camarões, Haiti (população Africana)	
	A6		Congo, Ruanda	
	A7	ayw1, adw2, ay	Camarões, Ruanda	
B	B1 (Bj)	adw2	Japão	3215
	B2 (Ba)	adw2, adw3	Ásia excluindo Japão	
	B3	adw2, ayw1	Indonésia, Filipinas	
	B4	ayw1, adw2	Vietnã, Camboja	
	B5		Filipinas	
	B6		Alaska, Norte do Canadá, Groelândia	
	B7-B9		Indonésia	
C	C1 (Cs)	adrq+, ayr, adw2, ayw1	Sudeste Asiático (Vietnã, Miamar, Tailândia, Sul da China)	3215
	C2 (Ce)	adrq+, ayr	Extremo Oriente (Coréia do Sul, Japão, Norte da China)	
	C3	adrq-, adrq+	Ilhas do pacífico (Micronésia, Melanésia, Polinésia)	
	C4		Austrália	
	C5		Filipinas, Vietnã	
	C6		Indonésia, Filipinas	
	C7		Filipinas	
	C8-C16		Indonésia	
D	D1	ayw2, adw1, ayw1	Europa, Oriente Médio, Ásia, Tunísia, Egito, Brasil, Argentina, Nova Zelândia	3182
	D2	ayw3, ayw1	Argentina, Brasil, Estados Unidos, Europa, Indonésia, Marrocos, Índia	
	D3/6	ayw3, ayw2, ayw4	África do Sul, Ásia, Europa, Estados Unidos, Canadá, Brasil	
	D4	ayw2, ayw3	Austrália, Japão, Papua Nova Guiné, Oceania	
	D5		Leste da Índia, Japão	
	D7		Tunísia, Marrocos, Madagascar	
	D8		Nigéria	
	D9		Leste da Índia	

Subgenótipo	Subtipo	Origem geográfica	Genoma (pb)
E	ayw4, ayw2	África subsaariana, Reino Unido, França, Arábia Saudita	3212
F1a	adw4, ayw4	América Central e do Sul	
F1b	adw4	Argentina, Japão, Venezuela, Estado Unidos	
F2	adw4	América do Sul (Brasil, Venezuela, Nicarágua)	3215
F3	adw4	Venezuela, Panamá, Colômbia, Bolívia	
F4	adw4	Bolívia, França, Argentina	
G	adw2	Estados Unidos, Alemanha, Japão, França, México	3248
H	adw4	Estados Unidos, Japão, Nicarágua	3215
I1	adw2	Laos, Vietnã, Noroeste da China	3215
I2	ayw2	Laos, Vietnã	3215
J	ayw	Japão	3182



Figura 1.8: Distribuição dos genótipos do HBV na América Latina. (Fonte: Alvarado-Mora e Pinho, 2013)

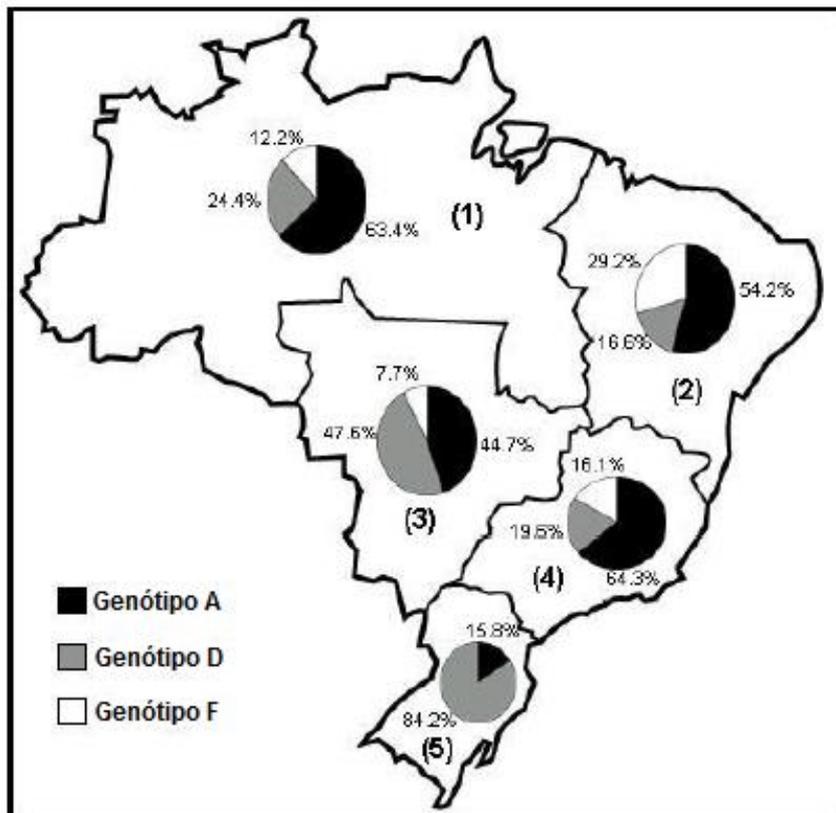


Figura 1.9: Distribuição dos genótipos do HBV em diferentes regiões do Brasil. Mapa representando a distribuição dos genótipos do HBV em todas as cinco regiões geográficas brasileiras (1 – Norte; 2 – Nordeste; 3 – Centro-Oeste; 4 – Sudeste; 5 – Sul). (Fonte: Mello *et al.*, 2007 – Figura adaptada para o português).

I.10 – Genótipo D do HBV

Comparado aos outros genótipos, o HBV/D possui o menor genoma, com 3182 nucleotídeos, sendo caracterizado por uma deleção de 33 nucleotídeos no início da região pré-S1 (Kramvis *et al.*, 2005).

O genótipo D é o mais prevalente no nordeste Europeu, no Mediterrâneo Oriental e Central, Norte da África, e no Oriente Médio. Além disso é muito frequente no subcontinente Indiano e em um grupo de ilhas do Oceano Índico com alta endemicidade para o HBV (Andamão e Nicomar) (Murhekar *et al.*, 2008), e também tem sido identificado na Oceania (Norder *et al.*, 2004).

O HBV/D apresenta algumas características clínicas específicas. Alguns estudos demonstraram que pacientes com hepatite B aguda infectados com esse genótipo possuíam uma taxa de cronicidade maior do que aqueles portadores dos genótipos B e C (Kobayashi

et al., 2004; Wai *et al.*, 2005). Ele também é caracterizado pela conversão do HBeAg para anti-HBe na adolescência ou no início da idade adulta. Tal soroconversão geralmente está associada a mutações na região pré-*core*. Esse período pode resultar em uma fase de portador inativo ou em hepatite B crônica HBeAg-negativa/anti-HBe positiva, que mais tarde pode levar à cirrose e hepatocarcinoma (Grandjacques *et al.*, 2000; Hadziyannis e Vassilopoulos, 2001; McMahon, 2009). Além disso, tem sido descrita uma maior associação do genótipo D com doença hepática mais grave e hepatocarcinoma quando comparado com o genótipo A (Thukar *et al.*, 2002). Outro estudo realizado no Alasca sugeriu que o genótipo D estaria significativamente associado à vasculite relacionada ao HBV (poliartrite nodosa) quando comparado aos genótipos A2, B6, C2 e F1 (Hurlburt *et al.*, 2007). O genótipo D também está associado a uma menor resposta ao tratamento com interferon. Diversos estudos demonstraram que o tratamento com interferon foi mais efetivo para os portadores do genótipo A ou B do que para os genótipos C e D (Tanwar e Dusheiko, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Até o momento, foram descritos nove subgenótipos do genótipo D, nomeados de D1 a D9. O subgenótipo D1 é o mais prevalente na Grécia, Turquia e norte da África (Bozdayi *et al.*, 2005; Garmiri *et al.*, 2011). Um estudo realizado na Turquia mostrou que mutações específicas no promotor basal do *core* estão associadas com doença hepática crônica no subgenótipo D1 do vírus da hepatite B. Foi demonstrado que esse subgenótipo é caracterizado por uma soroconversão precoce do HBeAg e carga viral baixa (Sunbul *et al.*, 2013). Um trabalho de Yousif e Kramvis de 2013 também revelou uma maior frequência da mutação G1896A do pré-*core*, relacionada com a abolição da tradução do HBeAg, no genótipo D1. O D2 é o mais frequente no nordeste Europeu (Rússia, Belarus, Estônia) e Albânia (Tallo *et al.*, 2008; Zehender *et al.*, 2011). O subgenótipo D3 é predominante na Itália e na Sérvia (De Maddalena *et al.*, 2007; Lazarevic *et al.*, 2007). Em um surto de hepatite B aguda na Dinamarca e na Inglaterra, o D3 foi reportado como o subgenótipo predominante em infecções agudas pelo HBV relacionadas com o uso de drogas injetáveis (Christensen *et al.*, 2001; Fisker *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2012). O D3 também foi responsável pela maioria das infecções pelo HBV entre os usuários de drogas no Canadá (Panessa *et al.*, 2009) e na Itália (De Maddalena *et al.*, 2007). Esses estudos sugerem que a transmissão do referido subgenótipo esteja relacionada ao uso de drogas injetáveis (Alestig *et al.*, 2013). O D4 é um subgenótipo relativamente raro, mas dominante na Oceania (Norder *et al.*, 2004) e um dos mais comuns em Cuba (Loureiro *et al.*, 2015), e também já foi descrito no Haiti (Andernach *et al.*, 2009), no Brasil (Santos *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Barros *et al.*,

2014), Marrocos (Baha *et al.*, 2012), em Ruanda (Hübschen *et al.*, 2009), Somália (Norder *et al.*, 2004), Quênia (Kwange *et al.*, 2013) e Gana (Candotti *et al.*, 2006). O D5 é o subgenótipo prevalente em tribos primitivas na Índia onde outros subgenótipos também são verificados (Banerjee *et al.*, 2006); o D6 na Papua e Indonésia, e o D7 na Tunísia e no Marrocos (Meldal *et al.*, 2009; Kitab *et al.*, 2011). Foram, ainda, descritos o D8 e o D9. O subgenótipo D8 foi encontrado na Nigéria, sendo reconhecido como um recombinante D com E (Abdou *et al.*, 2010), e o D9 foi observado na Índia e reconhecido como recombinante D com C (Ghosh *et al.*, 2013). A Figura 1.10 mostra a distribuição global dos subgenótipos de D.

Um trabalho realizado por Yousif e Kramvis, em 2013, demonstrou falta de suporte estatístico para que os subgenótipos D3 e D6 fossem classificados como subgenótipos diferentes. As sequências do subgenótipo D6 ficaram agrupadas com as do D3 com um alto suporte (*bootstrap* = 99%), além de apresentarem uma divergência intergenotípica no genoma completo menor do que 4% (Yousif e Kramvis, 2013), necessária para a classificação do HBV em diferentes subgenótipos (Magnius e Norder, 1995; Arauz-Ruiz *et al.*, 2002; Norder *et al.*, 2004).

Na América Latina, o genótipo D é encontrado na América Central, Argentina, no Chile e no Brasil (revisado por Alvarado-Mora e Pinho, 2013). No Brasil, o HBV/D é observado em todas as regiões geográficas (Mello *et al.*, 2007), sendo o genótipo mais prevalente na Região Sul do País, onde já foi verificado a circulação dos subgenótipos D1, D2 e D3, com uma maior frequência do HBV/D3 (Bertolini *et al.*, 2012; Mello *et al.*, 2014; Gusatti *et al.*, 2015). Um trabalho realizado em Rondônia, Região Norte do País, identificou o genótipo D como mais prevalente, sendo encontrado os subgenótipos D2, D3 e D4, com maior frequência do HBV/D3 (Santos *et al.*, 2010). O estudo de Barros e colaboradores (2014), realizado no Maranhão, observou maior frequência do HBV/D4, mas também verificou a presença dos subgenótipos D2 e D3.

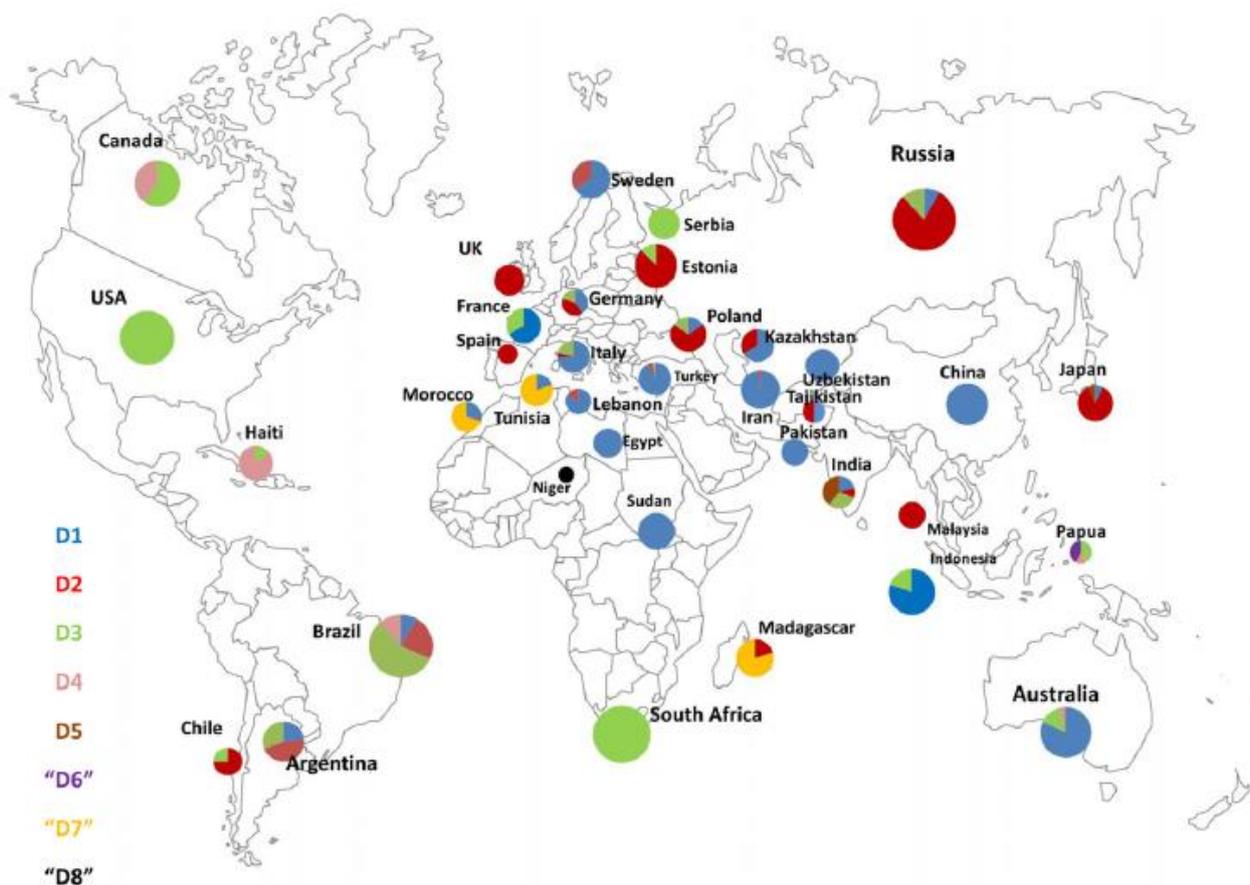


Figura 1.10: Distribuição global dos subgenótipos de D. (Fonte: Yousif e Kramvis, 2013)

I.11 – Origem e Evolução do HBV

Até o momento não existe um consenso sobre a origem do HBV, mas três principais hipóteses têm sido propostas para explicar a origem desse vírus em seres humanos e outros primatas. Uma das hipóteses é que a sua origem teria ocorrido no Novo Mundo e teria se espalhado globalmente devido a colonização europeia nos últimos 400 anos (Bollyky *et al.*, 1998). No entanto, essa hipótese conflitua com a observação de uma grande dispersão do HBV em macacos selvagens do velho mundo (chipanzés, orangotangos e gibões), e com o achado do HBV em uma múmia coreana datada do século XVI (Kahila Bar-Gal *et al.*, 2012). Uma segunda hipótese propõe que o HBV teria co-divergido com seus hospedeiros primatas num período de 10-35 milhões de anos atrás, mas a referida hipótese implicaria numa taxa evolutiva muito lenta (MacDonald *et al.*, 2000), incompatível com estimativas de relógio molecular indicando taxas evolutivas mais rápidas (Orito *et al.*, 1989; Hannoun *et al.*, 2000; Fares *et al.*, 2002; Zehender *et al.*, 2008), além disso seria esperado

uma maior diversidade entra as linhagens do HBV humanas e não humanas, o que não é observado (Locarnini *et al.*, 2013; Paraskevis *et al.*, 2015). Uma terceira hipótese sugere que o HBV estaria presente nos humanos anatomicamente modernos e teria se espalhado como resultado das migrações nos últimos 100.000 anos (Norder *et al.*, 1994; Magnius e Norder, 1995, Soares *et al.*, 2012). Suporte para essa terceira hipótese foi encontrado no recente trabalho de Paraskevis e colaboradores (Paraskevis *et al.*, 2015), onde compararam a história demográfica do HBV e dos humanos. Eles observaram que as mudanças no tamanho populacional do HBV e dos humanos coincidem, sugerindo que o aumento do número de infecções pelo HBV seguiu as mudanças populacionais dos humanos no período Neolítico (Figura 1.11).

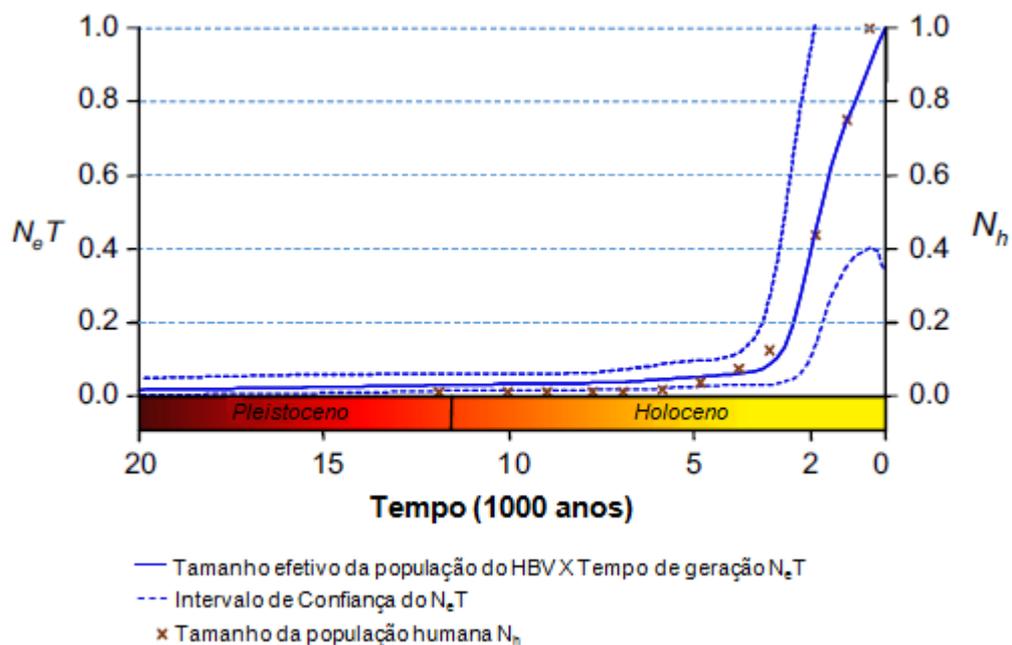


Figura 1.11: Estimativa bayesiana da história do tamanho da população do HBV. (Fonte: Paraskevis *et al.*, 2015 – Figura adaptada para o português).

Baseando-se na teoria de que o HBV estaria presente nos humanos anatomicamente modernos e utilizando o genoma completo do HBV, Paraskevis e colaboradores (Paraskevis *et al.*, 2015) estimaram a taxa evolutiva desse vírus utilizando uma calibração externa baseada nos movimentos migratórios humanos. Propondo que as linhagens do HBV de humanos modernos, assim como as linhagens de outros primatas, se originaram de uma fonte comum há aproximadamente 35 mil anos atrás. Os genótipos do HBV teriam divergido e surgido no Neolítico como resultado da dispersão regional (efeito fundador) de linhagens ancestrais que já haviam seguido as rotas das grandes migrações humanas. Especificamente, essas linhagens dos genótipos, depois de dispersarem para fora

da África, seguiram de três grandes eixos de expansão, provavelmente a partir da Ásia Central: para o sul da Europa e norte da África; para o leste e sudeste asiático e daí para as Américas; e de volta para a África (Figura 1.12). Neste mesmo estudo, estimaram uma taxa evolutiva de $3,7 \times 10^{-6}$, uma das taxas mais lentas já propostas para o HBV.

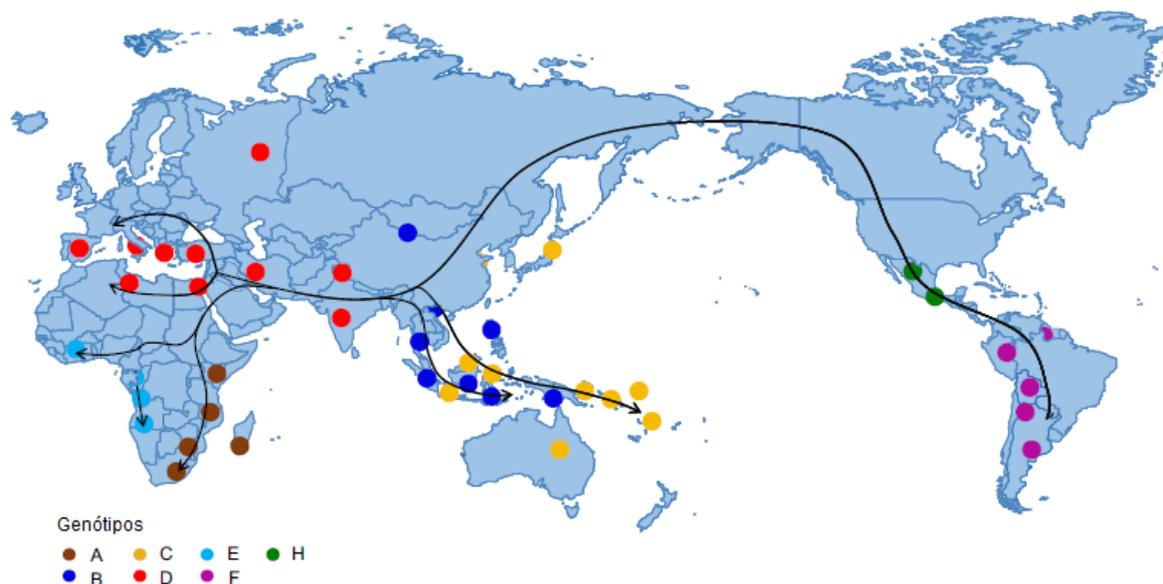


Figura 1.12: Padrão de dispersão da expansão geográfica do HBV (proposto por Paraskevis e colaboradores), dando origem à atual distribuição geográfica dos genótipos do HBV, excluindo os padrões gerados como um resultado das recentes migrações humanas (por exemplo, a presença dos genótipos A e D na América). (Fonte: Paraskevis *et al.*, 2015 – Figura adaptada para o português).

Na investigação de Zhou e Holmes (Zhou e Holmes, 2007), utilizando sequências de genoma completo, a taxa evolutiva do HBV foi estimada aplicando uma calibração interna (baseada na data de coleta das sequências), encontrando a taxa de $7,7 \times 10^{-4}$ (95% HPD $8,4 \times 10^{-5} - 8,61 \times 10^{-4}$). Nessa investigação, eles também calcularam a taxa de evolução das regiões do genoma com e sem sobreposição separadamente, observando que as regiões sem sobreposição evoluem mais rapidamente do que as com sobreposição. Esse resultado também foi verificado no trabalho de Paraskevis (Paraskevis *et al.*, 2015), onde observaram uma taxa de evolução da região do genoma do HBV com sobreposição 40% mais lenta do que a sem sobreposição.

A taxa evolutiva do HBV/D já foi calculada em diversos trabalhos utilizando abordagens distintas, variando de $1,21 \times 10^{-4}$ a $5,4 \times 10^{-5}$ (Michitaka *et al.*, 2006; Zhou e

Holmes, 2007; Zehender *et al.*, 2008; Harrison *et al.*, 2011; Zehender *et al.*, 2012a; Ciccozzi *et al.*, 2013). Em 2006, Michitaka e colaboradores estimaram a taxa evolutiva do HBV/D usando sequências concatenadas de regiões do genoma do HBV sem sobreposição e uma calibração baseada na data de coleta das sequências, encontrando a taxa de $5,4 \times 10^{-5}$ (95% HPD $4,0 \times 10^{-5} - 7,21 \times 10^{-5}$). No estudo de Zhou e Holmes (2007), a taxa de evolução do HBV/D foi estimada em $4,30 \times 10^{-4}$ (95%HPD $1,16 \times 10^{-4} - 7,26 \times 10^{-4}$) ao utilizar sequências de genoma completo com datas de coleta informadas. Zehender e colaboradores (Zehender *et al.*, 2012a) encontraram uma taxa próxima á observada por Zhou e Holmes ($4,4 \times 10^{-4}$; 95% HPD $2,6 \times 10^{-4} - 6,2 \times 10^{-4}$) utilizando sequências do gene da polimerase com datas de coleta informadas. Dois estudos realizados em locais diferentes (Itália e Japão) propuseram uma origem relativamente recente para o genótipo D do HBV, que teria se originado no início do século XX e que um crescimento exponencial de sua epidemia teria ocorrido nos anos 1940 e 1950 (Michitaka *et al.*, 2006; Zehender *et al.*, 2008).

Estudos baseados em métodos de calibração externa (baseados em eventos remotos) sugerem que o HBV seria um vírus de evolução lenta, enquanto os baseados numa calibração interna (amostras heterocrônicas) indicam uma variabilidade alta do vírus com taxa evolutiva comparável à dos retrovírus (Simmonds e Midgley, 2005; Paraskevis *et al.*, 2013; Paraskevis *et al.*, 2015). Essa incerteza em determinar a taxa evolutiva do HBV causa grande variação nas taxas calculadas, fazendo com que as estimativas variem entre 10^{-4} e 10^{-6} (Zhou e Holmes, 2007; Holmes, 2008; Paraskevis *et al.*, 2013). A Tabela 1.2 mostra as principais taxas de substituição obtidas por diferentes autores utilizando diferentes abordagens.

Tabela 1.2: Principais taxas evolutivas do HBV encontradas na literatura. (Fonte: Zehender *et al.*, 2014. Adaptado).

Genótipo	Taxa evolutiva	95% HPD	Referência
A	$9,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5} - 1,7 \times 10^{-4}$	Zehender <i>et al.</i> , 2008
	$8,6 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^{-4} - 14,3 \times 10^{-4}$	Harrison <i>et al.</i> , 2011
A2	$9,1 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5} - 1,7 \times 10^{-4}$	Zehender <i>et al.</i> , 2008
	$3,23 \times 10^{-5}$	$5,6 \times 10^{-8} - 9,0 \times 10^{-5}$	Fujisaki <i>et al.</i> , 2011
	$2,72 \times 10^{-4}$	$1,73 \times 10^{-4} - 5,8 \times 10^{-4}$	Ciccozzi <i>et al.</i> , 2013
C	$2,0 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-4} - 3,61 \times 10^{-4}$	Harrison <i>et al.</i> , 2011
	$3,73 \times 10^{-4}$	$4,7 \times 10^{-5} - 7,15 \times 10^{-4}$	Zhou e Holmes, 2007
D	$6,3 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4} - 7,8 \times 10^{-4}$	Zehender <i>et al.</i> , 2012a
	$4,4 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-4} - 6,2 \times 10^{-4}$	Zehender <i>et al.</i> , 2012a
	$1,21 \times 10^{-4}$	$1,83 \times 10^{-4} - 2,27 \times 10^{-4}$	Harrison <i>et al.</i> , 2011
	$4,30 \times 10^{-4}$	$1,16 \times 10^{-4} - 7,26 \times 10^{-4}$	Zhou e Holmes, 2007
	$3,67 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-4} - 4,5 \times 10^{-4}$	Zehender <i>et al.</i> , 2008
	$5,4 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5} - 7,21 \times 10^{-5}$	Michitaka <i>et al.</i> , 2006
D3	$3,29 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-4} - 3,7 \times 10^{-4}$	Zehender <i>et al.</i> , 2008
D1	$4,2 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-4} - 6,6 \times 10^{-4}$	Ciccozzi <i>et al.</i> , 2013
E	$9,29 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3}$	Harrison <i>et al.</i> , 2011
	$2,4 \times 10^{-4}$	$5,5 \times 10^{-5} - 5,54 \times 10^{-4}$	Forbi <i>et al.</i> , 2010
	$3,2 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-4} - 4,5 \times 10^{-4}$	Alvarado-Mora <i>et al.</i> , 2010
	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-5} - 3,8 \times 10^{-4}$	Andernach <i>et al.</i> , 2013
F	$1,67 \times 10^{-4}$	$9,4 \times 10^{-5} - 2,37 \times 10^{-4}$	Torres <i>et al.</i> 2011
	$1,0 \times 10^{-5}$	$0,6 \times 10^{-5} - 6,1 \times 10^{-5}$	Torres <i>et al.</i> 2011
Raiz	$7,7 \times 10^{-4}$	$8,4 \times 10^{-5} - 8,61 \times 10^{-4}$	Zhou e Holmes, 2007
	$2,2 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-6}$	Paraskevis <i>et al.</i> , 2013
	$3,7 \times 10^{-6}$		Paraskevis <i>et al.</i> , 2015

I.12 – Filogeografia

O estudo da origem, emergência e dispersão de infecções virais em populações humanas é uma das áreas de pesquisa em biologia evolutiva moderna mais ativas e produtiva (Sharp, 2002). Tal sucesso se dá em grande parte devido a rápida taxa a que muitos vírus evoluem. A filogeografia é o estudo da relação entre as populações e sua localização na Terra. Esses estudos auxiliam as investigações de eventos históricos e geográficos e seus efeitos na distribuição de genes e microorganismos, descrevendo sinais genéticos geograficamente estruturados dentro e entre espécies (Avice, 2000). Por meio dessa análise, é possível associar os processos históricos e geográficos com migrações, guerras, e catástrofes, entendendo melhor a migração do vírus entre populações e prever possíveis rotas de vírus, contribuindo assim para a prevenção e controle de doenças virais. Entretanto, ao analisar a filogeografia deve-se tomar cuidado ao interpretar as árvores e as rotas migratórias propostas, uma vez que a análise fica limitada aos dados disponíveis, podendo sugerir às vezes rotas incompatíveis com os dados epidemiológicos e históricos.

Em 2013, Kramvis e Paraskevis publicaram um estudo onde utilizaram a filogeografia do subgenótipo A1 do HBV (HBV/A1) para traçar as migrações humanas para dentro e fora da África. Utilizando sequências da região S para a reconstrução filogeográfica, eles observaram que a origem mais provável do HBV/A1 seria o Sul da África, e propuseram prováveis rotas de migração do HBV/A1 que estão representadas na Figura 1.13. Dentre elas, uma das origens do subgenótipo A1 no Brasil teria sido Moçambique. Na Bélgica, esse subgenótipo teria sido introduzido por sequências da África Central. Os isolados circulantes na Tanzânia, Uganda e na República Central Africana podem estar refletindo expedições em terra dos traficantes de escravos árabes de Zanzibar. Parece ter havido múltiplas introduções do HBV/A1 no Haiti, a partir do Malawi, Índia e da América Latina.

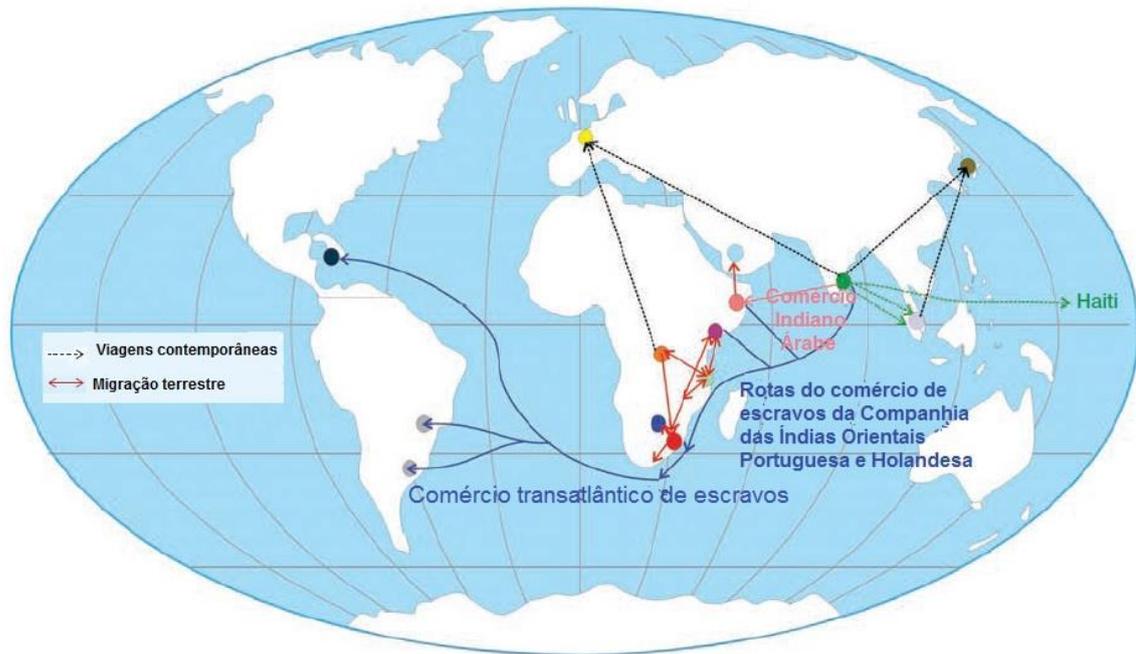


Figura 1.13: Prováveis locais de origem e rotas de migração do HBV/A1. (Fonte: Kramvis e Paraskevis, 2013).

Andernach e colaboradores (Andernach *et al.*, 2013) realizaram a reconstrução filogeográfica do genótipo E do HBV (HBV/E) utilizando sequências de genoma completo com data de coleta informada. A referida análise apontou a Nigéria como local de origem do HBV/E. A partir dessa região o vírus parece ter se espalhado ao longo da costa oeste da África, na região da Guiné para a República Centro-Africana e, posteriormente, para os países orientais e meridionais, como o Sudão, Angola e República Democrática do Congo (Figura 1.14).

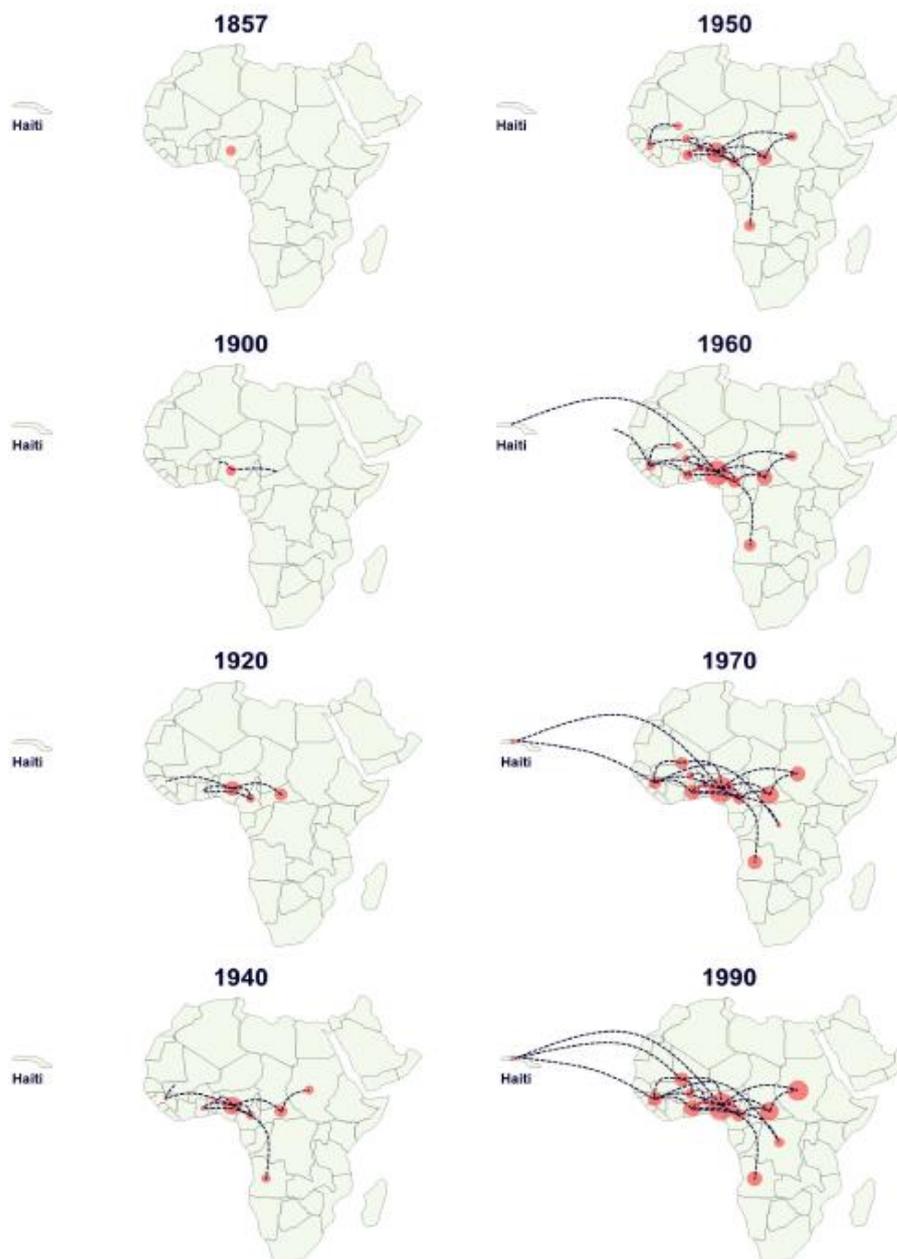


Figura 1.14: Dispersão filogeográfica do HBV/E. (Fonte: Andernach *et al.*, 2013).

Também em 2013, Mello e colaboradores publicaram um estudo onde realizaram a reconstrução filogeográfica do genótipo F do HBV (HBV/F) no Brasil utilizando sequências de genoma completo do HBV/F e uma taxa evolutiva fixa de $1,0 \times 10^{-5}$ (Torres *et al.*, 2011). Os autores sugeriram que a Venezuela tenha sido a origem do HBV/F2a no Brasil, que depois se espalhou pelo País seguindo um fluxo de Norte para Sul. Já os subgenótipos HBV/F1b e HBV/F4 teriam se espalhado pelo Brasil do Sul para o Norte após ter sido introduzido pela Argentina no Brasil.

A filogeografia do HBV/D foi abordada em dois estudos distintos. O primeiro, publicado em 2012 (Zehender *et al.*, 2012a), fez uma reconstrução espacial do HBV/D na Europa e na Bacia Mediterrânea, utilizando sequências do gene da polimerase dos principais subgenótipos de D circulantes nessa região (D1, D2, D3, D5 e D7). O resultado obtido por eles sugere que, por volta do século XIX, o ancestral do HBV/D saiu do Subcontinente Indiano chegando a Ásia Central, onde os subgenótipos D1, D2 e D3 divergiram. A Ásia Central foi provavelmente a fonte de dispersão do HBV/D para Europa e para a região Mediterrânea, de onde o vírus teria seguido pelo menos duas rotas, uma cruzando o Oriente Médio e atingindo o norte da África e o sudeste do Mediterrâneo, e outra que teria cruzado a antiga União Soviética chegando a Europa Oriental e ao Mediterrâneo através da Albânia (Figura 1.15).

Outra investigação que utilizou a filogeografia para o HBV/D foi publicada, em 2013, por Ciccozzi e colaboradores. Nessa, os autores tinham como objetivo reconstruir a história epidemiológica do HBV/D1 na Turquia. Utilizando sequências do gene da polimerase do HBV/D1, os autores observaram ausência de uma separação geográfica significativa das sequências D1, sugerindo uma inserção relativamente recente do HBV/D1 na região da Turquia por meio de múltiplos eventos de introdução, provavelmente resultado de migrações com países da fronteira. Também foi observada uma grande importância epidemiológica da Turquia na dispersão do HBV/D1 na região da Eurásia (Figura 1.16). Não há estudos publicados que tenham realizado reconstrução filogeográfica do HBV/D nas Américas.



Figura 1.15: Prováveis rotas de dispersão do HBV/D suportadas por um Fator de Bayes ≥ 6 . (Fonte: Zehender *et al.*, 2012a)



Figura 1.16: Rotas epidemiológicas do HBV/D1 com Fator de Bayes > 3 . (Fonte: Ciccozzi *et al.*, 2013).

II- JUSTIFICATIVA

Diversos estudos têm demonstrado que o quadro clínico, a resposta ao tratamento e o prognóstico da hepatite B são distintos dependendo do genótipo/subgenótipo do vírus que tenha infectado o paciente (assunto revisado em McMahon, 2009). O genótipo D é o mais amplamente disseminado pelo mundo e tem sido associado, juntamente com o genótipo C, a um pior prognóstico da doença hepática e ao desenvolvimento mais frequente de cirrose e hepatocarcinoma (Thukar *et al.*, 2002; McMahon, 2009; Lin e Kao, 2011). Além disso, um estudo demonstrou que mutações associadas ao hepatocarcinoma, tais como A1762T e G1764A no promotor basal do *core*, são mais frequentes em determinados subgenótipos de D do que em outros (Yousif & Kramvis, 2013). Portanto, é de grande valia conhecer quais são os subgenótipos de D circulantes nos diferentes países do continente Americano e a frequência das mutações associadas ao hepatocarcinoma nos diferentes subgenótipos identificados.

Estudos de filogeografia viral envolvem análises de uma árvore filogenética em seu contexto espacial. Tais estudos são ferramentas importantes de monitoramento e controle epidemiológico, pois são capazes de fornecer informações sobre locais de origem de alguns vírus, bem como localidades emergentes e difusões futuras para populações de hospedeiros (Holmes, 2008). Esse tipo de abordagem tornou-se possível apenas recentemente devido, dentre outros fatores, ao aumento da quantidade de sequências disponibilizadas nos bancos de dados biológicos. Contudo, são poucas as sequências disponíveis de genoma completo do HBV de isolados brasileiros, havendo para o genótipo D apenas 15 sequências. Portanto, a contribuição de sequências do Brasil nos estudos filogenéticos do HBV é ainda limitada. Dessa maneira, o sequenciamento do genoma completo realizado nesta dissertação de isolados do HBV do genótipo D oriundos das cinco regiões geográficas brasileiras, além de permitir uma melhor compreensão da diversidade e variabilidade do HBV no Brasil, contribuirá para os futuros estudos filogenéticos desse vírus.

III- OBJETIVOS

III.1 - Objetivo Geral:

Analisar a distribuição geográfica e variabilidade genética do genótipo D do HBV nas Américas e investigar a origem e disseminação desse genótipo e seus subgenótipos no continente sob o enfoque da evolução molecular e filogeografia.

III.2 – Objetivos específicos:

- Identificar quais são os subgenótipos de D e as suas frequências nos países do continente Americano, por meio da construção de uma base de dados com todas as sequências do genótipo D destas localidades disponíveis no GenBank;
- Fazer o sequenciamento do genoma completo de isolados do HBV provenientes das cinco regiões geográficas do Brasil e representativas dos subgenótipos de D circulantes no País;
- Determinar a frequência de mutações associadas ao desenvolvimento do hepatocarcinoma nos diferentes subgenótipos de D identificados nas Américas;
- Identificar os subtipos presentes nos principais subgenótipos de D circulantes nas Américas;
- Realizar análise filogeográfica para reconstruir a dinâmica espacial e temporal do genótipo D e seus subgenótipos nas Américas.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

IV.1 - Levantamento dos Subgenótipos de D Circulantes no Continente Americano

Foi realizada uma busca no *GenBank* por sequências de HBV do genótipo D provenientes de países do continente Americano utilizando como palavras-chave: 1) *Hepatitis B Virus*, 2) *genotype D*, 3) *country*= “nome do país”. Foram adicionadas ao banco de dados sequências de genoma completo, sequências da região pré-S/S, do gene S e da região pré-core/core que possuíam subgenótipo de D determinado e local de origem informado. No caso de sequências brasileiras, também foi necessária a informação da região geográfica de origem da sequência. Sequências sem subgenótipo determinado, mas com local de origem informado e mais de 1000 nucleotídeos (nt) foram submetidas a uma análise filogenética utilizando o método de Neighbor-Joining com 1000 replicatas usando o programa MEGA v.6.0 (Tamura *et al.*, 2013), para classificação em subgenótipos.

IV.2 - Amostragem

Cento e vinte e duas amostras de soro estocadas em freezer a -20°C no Laboratório de Virologia Molecular, contendo isolados do HBV previamente genotipados como sendo do genótipo D, foram utilizadas neste estudo para a amplificação do genoma completo do HBV. Estas amostras foram coletadas no período de 2003 a 2013 e são provenientes de pacientes crônicos para o HBV (com sorologia positiva para o HBsAg), sendo alguns pacientes oriundos de hospitais e outros de LACENs localizados nas diferentes regiões geográficas brasileiras. Dessas amostras, 10 são do Estado do Amazonas, sete do Amapá, 12 de Goiás, 42 do Mato Grosso do Sul, três de Pernambuco, 13 do Rio de Janeiro, 33 de Santa Catarina e duas do Rio Grande do Sul.

Aspectos éticos: A utilização dessas amostras de soro para o estudo da variabilidade genética do HBV teve a aprovação no CONEP (nº de registro 9604, nº do parecer 736/2004), no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (nº protocolo 139/10) e no Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (nº do parecer 1.358.935) (arquivos em anexo).

IV.3 - Extração do DNA Viral

O DNA do HBV foi extraído a partir de 200 µL de soro utilizando o *High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche Diagnostics, Alemanha). Esta técnica consiste na lise viral por meio de incubação da amostra com tampão de ligação juntamente com a enzima proteinase K. Posteriormente, os ácidos nucleicos se ligam especificamente à fibra de vidro na matriz da coluna na presença de sais caotrópicos. Após lavagem dos contaminantes, o DNA é eluído em solução com baixa concentração de sal.

IV.4 - Amplificação do Genoma Completo

O DNA extraído foi amplificado por PCR (reação da polimerase em cadeia) utilizando os oligonucleotídeos P1 e P2 (Tabela 4.1) (Gunther *et al.*, 1995), para obtenção do genoma completo do HBV/D (3182 nt). Quatro microlitros de DNA foram adicionados à mistura de reação contendo 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo e 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, San Diego, CA), em um volume final de 50 µL. A mistura foi submetida as seguintes condições: uma desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguido de 10 ciclos (94°C - 40 seg, 55°C - 1 min, 72°C - 3 min), 10 ciclos (94°C - 40 seg, 60°C - 1 min, 72°C - 5 min), 10 ciclos (94°C - 40 seg, 62°C - 1 min, 72°C - 7 min) e 10 ciclos (94°C - 40 seg, 62°C - 1 min, 72°C - 9 min), seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Tabela 4.1: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do genoma completo do HBV/D

Oligonucleotídeos	Sequência	Direção	Posição
P1	CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTTCACCTCTGCCTAATCA	Senso	1821 - 1841 nt
P2	CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG	Antisenso	1823 - 1806 nt

Oligonucleotídeos publicados em Gunther *et al.*, 1995.

IV.5 - Eletroforese

Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel foi feito utilizando-se 1g de agarose em 100 ml de TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X (TrisBase 6,95 mM, EDTA 25 mM pH 8,0, ácido acético glacial 19,9 mM) e 5 µL de brometo

de etídio (10 mg/mL). As corridas foram realizadas em uma cuba com o tampão de corrida TAE 1X. As bandas de DNA no gel foram visualizadas sob luz ultravioleta no transiluminador *MultiDoc-it Imaging System* (UVP, Upland, CA).

IV.6 - Purificação dos Produtos de PCR para Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, WI, USA), para a remoção do excesso de nucleotídeos e oligonucleotídeos. A purificação do DNA foi realizada diretamente do produto de PCR, ou a partir do corte da banda do produto de PCR no gel de agarose a 1% (no caso de haver a presença de bandas inespecíficas) após corrida eletroforética. O DNA se liga a membrana de sílica na presença de sais caotrópicos e o DNA é eluído em água livre de nucleases.

IV.7 – Sequenciamento e Análise do Genoma Completo do HBV/D

Os produtos de PCR purificados foram submetidos a reação de sequenciamento utilizando o kit comercial *Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Em uma placa de 96 poços, foram aplicados 2,5 µL do produto de PCR purificado, 1 µL do oligonucleotídeo a 3,2 pmol e 4 µL de água Mili-Q para completar um volume final de 7,5 µL por poço ou tubo. Em seguida, foram adicionados 2,5 µL da mistura de reação (1 µL do BigDye + 1,5 µL do tampão de diluição 5X). Para sequenciar todo o genoma do HBV, foram utilizados 16 oligonucleotídeos que flanqueiam em diferentes regiões o genoma viral (Tabela 4.2). A reação foi submetida a 40 ciclos de 94°C por 10s, 50°C por 5s e 60°C por 4 min. Após a reação de sequenciamento, foi realizada uma precipitação com isopropanol 75% das amostras, para a retirada de nucleotídeos livres que poderiam interferir na leitura da sequência de DNA.

Em seguida, a placa (protegida da luz) foi incubada a temperatura ambiente por 15 min e então centrifugada a 4000 rpm por 45 min. Após a centrifugação, a placa foi vertida para que o isopropanol fosse totalmente removido. Foram adicionados 50 µL de etanol 75% em cada poço, em seguida a placa foi centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e a placa aquecida a 60°C por 10 min sob abrigo da luz, e armazenada até ser submetida ao sequenciamento. A leitura automática das sequências foi realizada no sequenciador automático de 48 capilares ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) da Plataforma de sequenciamento de DNA do Instituto Oswaldo Cruz.

Tabela 4.2: Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento do genoma completo do HBV/D

Oligonucleotídeos	Sequência	Direção	Posição
PS1	CCATATTCTTGGGAACAAGA	Senso	2826 – 2845 nt
PS2	GGTCCCCAGTCCTCGAGAAG	Antisenso	143 – 124 nt
PS4	ACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTG	Senso	3194 - 3218 nt
S1	CTTCTCGAGGACTGGGGACC	Senso	124 – 143 nt
S2	GGGTTTAAATGTATACCCAAAGA	Antisenso	841 – 819 nt
S18	GGATGATGTGGTATTGGGGGCCA	Senso	743 – 765 nt
P3	AAAGCCCCAAAAGACCCACAA	Antisenso	1019 – 1000 nt
C8	GAGGGAGTTCTTCTTAGG	Antisenso	2391–2371 nt
C1	CTGTGGAGTTACTCTCGTTTTTGC	Senso	1935 – 1958 nt
P1	CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTTCACCTCTGCCTAATCA	Senso	1821 1841 nt
P2	CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG	Antisenso	1825 – 1806 nt
X1	ACCTCCTTTCCATGGCTGCT	Senso	1363 – 1382 nt
X5	ACTCTTGGACTCBCAGCAATG	Senso	1662 – 1682 nt
PS8	TTCCTGAACTGGAGCCACCA	Antisenso	82 – 63 nt
P01	GGACTCATAAGGTGGGGAA	Senso	2470 – 2488 nt
S4	TGCTGCTATGCCTCATCTTCT	Senso	416 – 436 nt

IV.8 – Análise e Edição das Sequências Obtidas

Após o sequenciamento automático, as sequências geradas foram editadas e analisadas manualmente no programa MEGA v.6.0 (Tamura *et al.*, 2013). As sequências foram então alinhadas usando o programa ClustalW implementado no programa MEGA v.6.0. Para verificar a possível presença de recombinação, as sequências dos genomas completos foram submetidas ao programa Simplot versão 3.5.1 (Lole *et al.*, 1999).

IV.9 – Distância Genética e Análise Filogenética dos Genomas Completos Brasileiros

Para calcular a distância genética dos genomas completos brasileiros em relação aos genomas completos de outros países, foram criados arquivos com os genomas completos brasileiros gerados neste estudo, além de todas as sequências de genoma completo dos

subgenótipos D1 a D4 disponíveis no *GenBank* e com local de origem informado. A distância genética intersubgenotípica das sequências brasileiras em relação às dos outros países foi então calculada pelo modelo "Maximum Composite Likelihood" implementado no programa MEGA v.6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Os genomas completos recuperados neste trabalho foram alinhados com sequências de referência dos subgenótipos de D, além dos outros genótipos do HBV, utilizando a ferramenta de alinhamento ClustalW inclusa no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). O modelo de substituição nucleotídica (GTR+I+G) foi selecionado pelo programa JmodelTest v. 2.1.4 (Posada, 2008) de acordo com *Akaike Information Criterion* (AIC; Akaike, 1974). A análise filogenética foi realizada utilizando o método de Máxima Verossimilhança com o programa PhyML (Guindon e Gascuel, 2003) usando o servidor *online* (Guindon *et al.*, 2010). O suporte dos ramos foi estimado com o *approximate likelihood-ratio test* (aLRT) (Anisimova and Gascuel, 2006).

IV.10 – Inferência Bayesiana de Eventos Migratórios

Para a análise filogeográfica, foram obtidas do *GenBank* sequências de genoma completo do HBV pertencentes aos principais subgenótipos de D circulantes nas Américas e que possuíam informação da data de coleta e do local de origem. A busca foi realizada utilizando como palavras-chave: 1) *Hepatitis B Virus*, 2) *genotype D*, 3) *country*= "nome do país", 4) *complete genome*. Foram criados quatro *datasets*, um para cada subgenótipo de D circulante nas Américas (D1, D2, D3 e D4), onde foram adicionados os genomas completos brasileiros recuperados neste trabalho e duas sequências do genótipo E como grupo externo. Localidades super-representadas foram submetidas ao servidor *online* CD-HIT, que identifica sequências similares e as agrupa. Sequências com similaridade maior que 97,2% para o subgenótipo D1, e maior que 99% para o subgenótipos D2 e D3 foram agrupadas pelo CD-HIT e apenas um representante (o com data de coleta mais antiga) foi mantido no *dataset* (Tabela 4.3), para evitar que houvesse super-representação dessas localidades, o que poderia causar um viés na estimativa da localização do ancestral. No caso do subgenótipo D1, além do limiar de similaridade, também foi imposto um limiar para o número total de sequências, que não poderia ultrapassar vinte sequências por localidade. O total de sequências por localidade no *dataset* final está representado na Tabela 4.4. As sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW inserido no MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

A taxa de evolução do genoma completo, assim como as possíveis rotas de dispersão do HBV/D, foram simultaneamente estimadas usando o programa BEAST v.1.8 (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) (Drummond *et al.*, 2012). Para estas reconstruções, foi utilizado o método bayesiano de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) implementado no BEAST. O modelo de substituição nucleotídica que melhor se adapta a cada *dataset* (GTR+I+G) foi selecionado pelo programa JmodelTest v.2.1.4 (Posada, 2008) de acordo com *Akaike Information Criterion* (AIC; Akaike, 1974). Foi usado um modelo de coalescência flexível, o *Bayesian Skyline Plot* (BSP) (Drummond *et al.*, 2002, Drummond *et al.*, 2005), e um modelo de dispersão geográfica discreto e reversível (Lemey *et al.*, 2009). Para identificar localidades com uma significativa relação epidemiológica, usamos o método de *Bayesian Stochastic Search Variable Selection* (BSSVS), que identifica a descrição mais parcimoniosa do processo de difusão filogeográfica e constrói um teste de fator de Bayes (BF) entre as localidades. São consideradas significativas as transições que apresentem $BF > 3$, fortemente apoiadas as que possuem $BF > 10$ e conclusivas as transições com $BF > 100$ (Kass e Raftery, 1995). O BF das rotas migratórias foi calculado utilizando o programa SPREAD v.1.0.6 (Bielejec *et al.*, 2011).

A taxa de evolução foi calculada baseando-se na heterogeneidade da data de coleta das sequências, utilizando um modelo de relógio molecular relaxado (*Uncorrelated Lognormal relaxed clock*) e utilizando intervalo de 10^{-4} a 10^{-6} , referente as taxas de evolução calculadas anteriormente para o HBV (Paraskevis *et al.*, 2012; Zehender *et al.*, 2012a). Este modelo permite variações na taxa de evolução ao longo da filogenia sem assumir uma autocorrelação de taxas entre ramos ancestrais e descendentes (Drummond *et al.*, 2006).

As análises de MCMC correram entre 70 e 820 milhões de gerações, amostrando a cada 7 a 82 mil gerações. A convergência das cadeias foi avaliada pelo cálculo do *Effective Sample Size* (ESS) após um *burnin* de 10% usando o programa Tracer v.1.6. Foram aceitos apenas ESS's ≥ 200 . A árvore de máxima credibilidade (*Maximum Clade Credibility*, MCC), árvore com maior produto de probabilidades posterior, foi selecionada usando o programa TreeAnnotator (incluído no pacote do BEAST) após um *burnin* de 10%. As árvores finais foram visualizadas e manipuladas no programa FigTree v.1.4.2. Os eventos migratórios inferidos foram visualizados por meio do aplicativo SPREAD.

Tabela 4.3: Localidades super-representadas antes e depois do CD-HIT

Sequências D1			
Localidade	n antes CD-HIT	n após CD-HIT	Limiar de similaridade
Índia	60	7	99%
Irã	79	16	97,2%
Líbano	35	14	97,5%
Nova Zelândia	32	8	99%
Síria	30	18	98,8%
Turquia	42	20	97,5%

Sequências D2			
Localidade	n antes CD-HIT	n após CD-HIT	Limiar de similaridade
EUA	80	4	99%
Índia	23	10	99%
Japão	23	16	99%

Sequências D3			
Localidade	n antes CD-HIT	n após CD-HIT	Limiar de similaridade
Argentina	22	20	99%
Brasil	32	17	99%
Índia	39	11	99%
Itália	34	19	99%

Tabela 4.4: Quantidade de sequências por localidade para cada subgenótipo de D

D1		D2		D3		D4	
Localidade	n	Localidade	n	Localidade	n	Localidade	n
Argentina	9	Argentina	6	Argentina	20	Austrália	3
Brasil	1	Bélgica	4	Bélgica	7	Brasil	15
Leste Europeu (Polônia e Sérvia)	3	Brasil	10	Brasil	17	Canadá	3
Ásia Central (Cazaquistão, Tajiquistão e Uzbequistão)	5	Leste Europeu (Estônia, Polônia e Sérvia)	18	Canadá	3	Cuba	5
China	14	Ásia Central (Irã, Líbano, Síria e Turquia.)	3	Caribe (Cuba, Haiti e Martinica)	4	Índia	12
Irã	16	Espanha	6	CHN-MNG (China e Mongólia)	8	Polinésia (Fiji, Kiribati, Papua, Nova Zelândia, Samoa e Tonga)	18
Líbano	14	Índia	10	Indonésia	5	Haiti	3
Mongólia	7	Japão	16	Oriente Médio (Irã, Síria e Turquia)	7	Martinica	5
Nova Zelândia	8	Oriente Médio (Irã, Líbano, Síria e Turquia.)	14	Subcontinente Indiano (Índia e Paquistão)	12		
Subcontinente Indiano (Índia e Paquistão)	8	Nova Caledônia	5	Europa do Sul (Espanha e Itália)	21		
Europa do Sul (Espanha e Itália)	8	Rússia	14	Suécia	6		
Síria	18	Taiwan	4	EUA	8		
Tunísia	13	EUA	4				
Turquia	20						
Europa Ocidental (Bélgica e França)	13						

V – RESULTADOS

V.1 - Subgenótipos de D Circulantes no Continente Americano

A busca por sequências do genótipo D, provenientes dos países do continente americano e disponíveis no *GenBank*, gerou um total de 609 sequências (genomas completos; genes pré-S/S, S e *precore/core*). As sequências do genótipo D recuperadas foram originárias da Argentina, Brasil, Canadá, Chile, Colômbia, Cuba, Estados Unidos (EUA), Groelândia, Haiti, Martinica e Venezuela. Na Tabela 5.1, encontra-se o número de sequências obtidas por país.

Tabela 5.1: Países e quantidade de sequências do *GenBank* adicionadas ao banco de dados

País	Número de sequências
Argentina	134
Brasil	215
Canadá	17
Chile	4
Colômbia	1
Cuba	94
EUA	89
Groelândia	10
Haiti	38
Martinica	5
Venezuela	2
Total	609

As sequências obtidas do *GenBank* permitiram observar a distribuição dos subgenótipos de D circulantes no continente americano, onde foram encontrados os subgenótipos D1 (20%, 122/609), D2 (22%, 133/609), D3 (28%, 169/609), D4 (28%, 168/609) e D7 (1%, 7/609). Na Argentina, observou-se a circulação dos subgenótipos D1, D2 e D3, sendo o D1 o subgenótipo verificado em maior porcentagem (111/134, 83%). No Brasil, foram recuperadas sequências pertencentes aos subgenótipos D1, D2, D3 e D4, constatando-se o D3 como subgenótipo mais prevalente, apresentando 56% (120/215) das sequências como pertencentes a este subgenótipo. Assim como no Brasil, no Canadá, notou-se a circulação dos subgenótipos D1 (3/17, 18%), D2 (3/17, 18%), D3 (5/17, 29%) e D4 (6/17, 35%). Foram recuperadas do *GenBank* quatro sequências do Chile, uma pertencente ao subgenótipo D3 e três ao subgenótipo D2. Foi possível obter apenas uma sequência da Colômbia correspondente ao subgenótipo D3, e duas da Venezuela ao subgenótipo D4. As sequências do genótipo D cubanas pertenceram aos subgenótipos D1, D2, D3, D4 e D7, sendo o D4 o mais prevalente, com 76% (71/94) das sequências do genótipo D analisadas. Nos EUA, encontraram-se os subgenótipos D2 em 90% (80/89) e D3 (9/89) em 10% das sequências. No Haiti e Martinica, foram observados os subgenótipos D3 e D4. Em ambos os países a maioria das sequências pertencia ao subgenótipo D4 (Haiti = 32/38, 84%; Martinica = 4/5, 80%). As sequências do genótipo D da Groelândia não tiveram seu subgenótipo determinado. No estudo onde foram publicadas, formaram um clado separado dos diferentes subgenótipos de D, apresentando maior similaridade com sequências HBV/D1 e HBV/D2 (97,7% e 97,4%, respectivamente) (Kowalec *et al.*, 2013). A distribuição do genótipo D nas Américas pode ser observada na Figura 5.1.

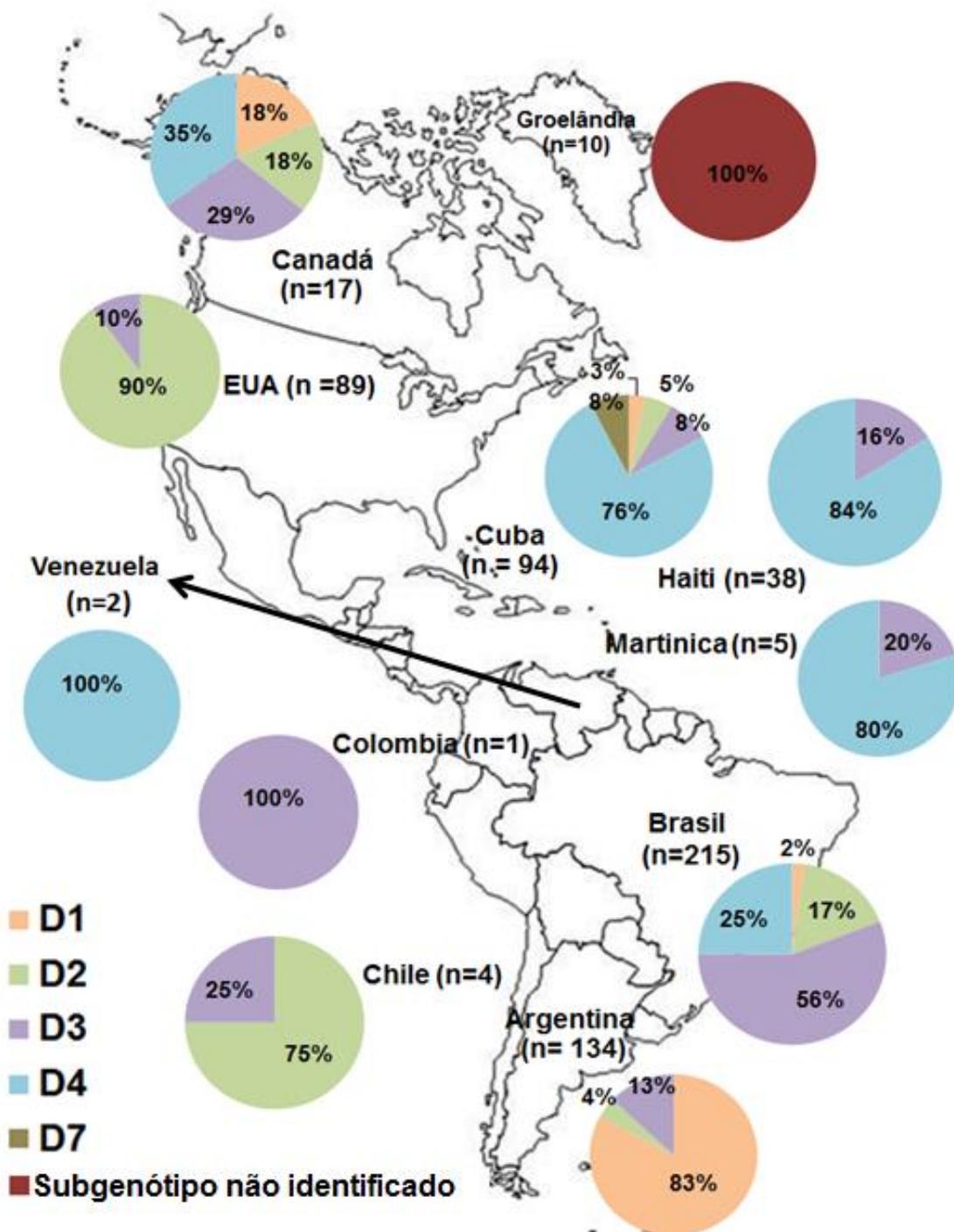


Figura 5.1: Distribuição dos subgenótipos de D nas Américas.

No Brasil, o genótipo D foi encontrado em todas as regiões geográficas. O Sul do País foi a região que deteve o maior número de sequências desse genótipo (57%, 122/215), seguida pela região Nordeste (23%, 49/215), Norte (9%, 20/215), Sudeste (9%, 19/215) e Centro-Oeste (2%, 5/215). Os subgenótipos verificados no Brasil foram: o D1, correspondendo a 2% (5/215) das sequências obtidas; D2, 17% (37/215); D3, que foi o subgenótipo mais prevalente, 56% (120/215); e D4, 25% (53/215).

Na Região Norte, 50% (10/20) das sequências pertenceram ao subgenótipo D3, 35% (7/20) ao D4 e 15% (3/20) ao D2. No Nordeste, o HBV/D4 apresentou uma alta prevalência, correspondendo à 92% (45/49) das sequências obtidas, mas também foram observados os subgenótipos D2 (2%, 1/49) e D3 (6%, 3/49). No Centro-Oeste, 80% (4/5) das sequências foram classificadas como HBV/D2 e 20% (1/5) como HBV/D3. Na Região Sudeste, foram encontrados os subgenótipos D2 (26%, 5/19) e D3 (74%, 14/19). A Região Sul foi a única a apresentar os quatro subgenótipos de D circulantes no Brasil (D1= 4%, 5/122; D2= 20%, 24/122; D3= 75%, 92/122; D4= 1%, 1/122), e a única região onde se observou o subgenótipo D1. A distribuição dos subgenótipos de D nas diferentes regiões geográficas brasileiras pode ser observada na Figura 5.2.

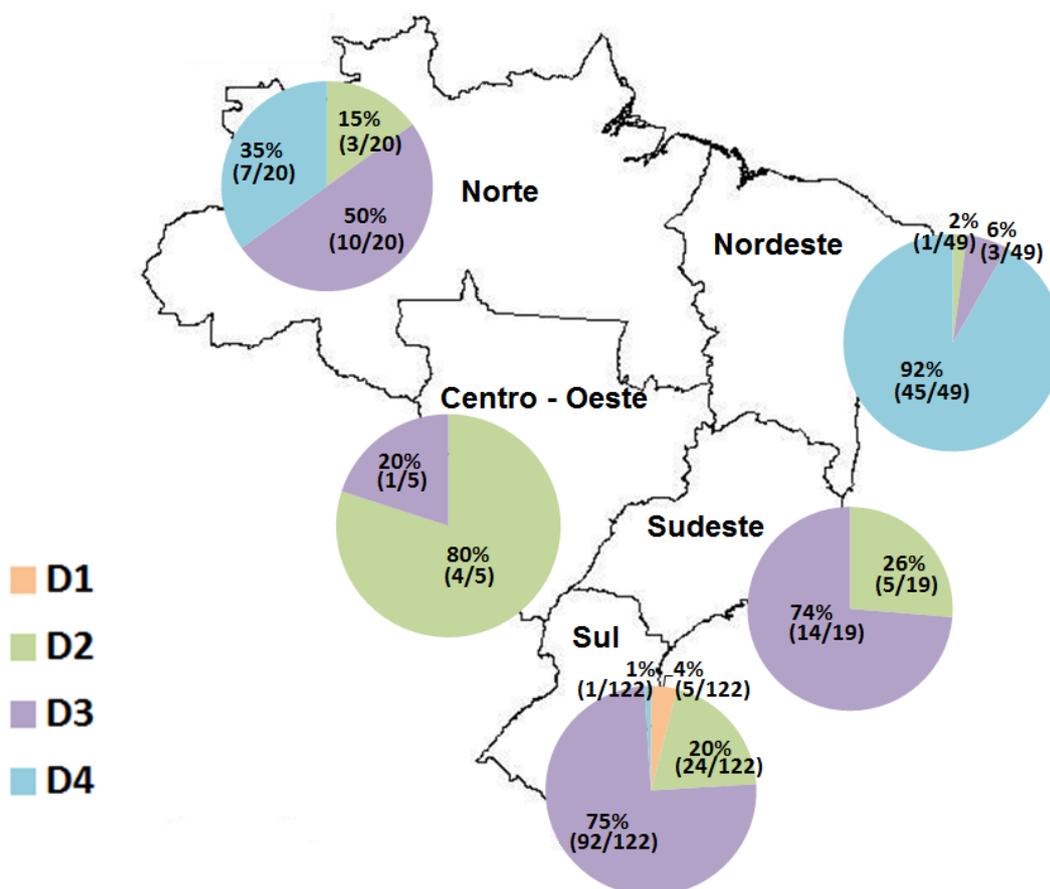


Figura 5.2: Distribuição dos subgenótipos de D nas diferentes regiões geográficas do Brasil.

V.2 – Sequenciamento de Genomas Completos Brasileiros e Filogenia

Após a identificação dos subgenótipos de D que circulam no Brasil, 122 amostras foram submetidas a reação de PCR para a amplificação do genoma completo. Destas, 45 (três do Nordeste, quatro do Sudeste, cinco do Norte, 16 do Centro-Oeste e 17 do Sul) tiveram o genoma completo do HBV amplificado e sequenciado com sucesso.

Todos os genomas completos apresentaram 3182 nt (ORF C: HBe 639 nt, HBc 552 nt; ORF X: HBx 465 nt; ORF Pré-S/S: L 1170 nt, M 846 nt, S 681 nt; ORF P: Pol 2499 nt), com exceção de uma sequência (BR 32) que apresentou genoma completo de 3062 nt por possuir uma deleção de 120 nt na região pré-S1. Os genomas completos foram subgenotipados por análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança (Figura 5.3). Das 45 sequências, uma foi classificada como D1 (proveniente da Região Sul), 11 como D2 (uma do Sudeste, três do Centro-Oeste e sete do Sul), 32 como D3 (13 do Centro-Oeste, nove do Sul, cinco do Norte, três do Nordeste e duas do Sudeste) e uma como D4 (Sudeste).

Os genomas completos HBV/D3 da Região Norte deste trabalho foram os primeiros genomas completos do HBV da Região amazônica e os primeiros genomas completos HBV/D3 do Brasil já publicados (Spitz *et al.*, 2015; Artigo em anexo).

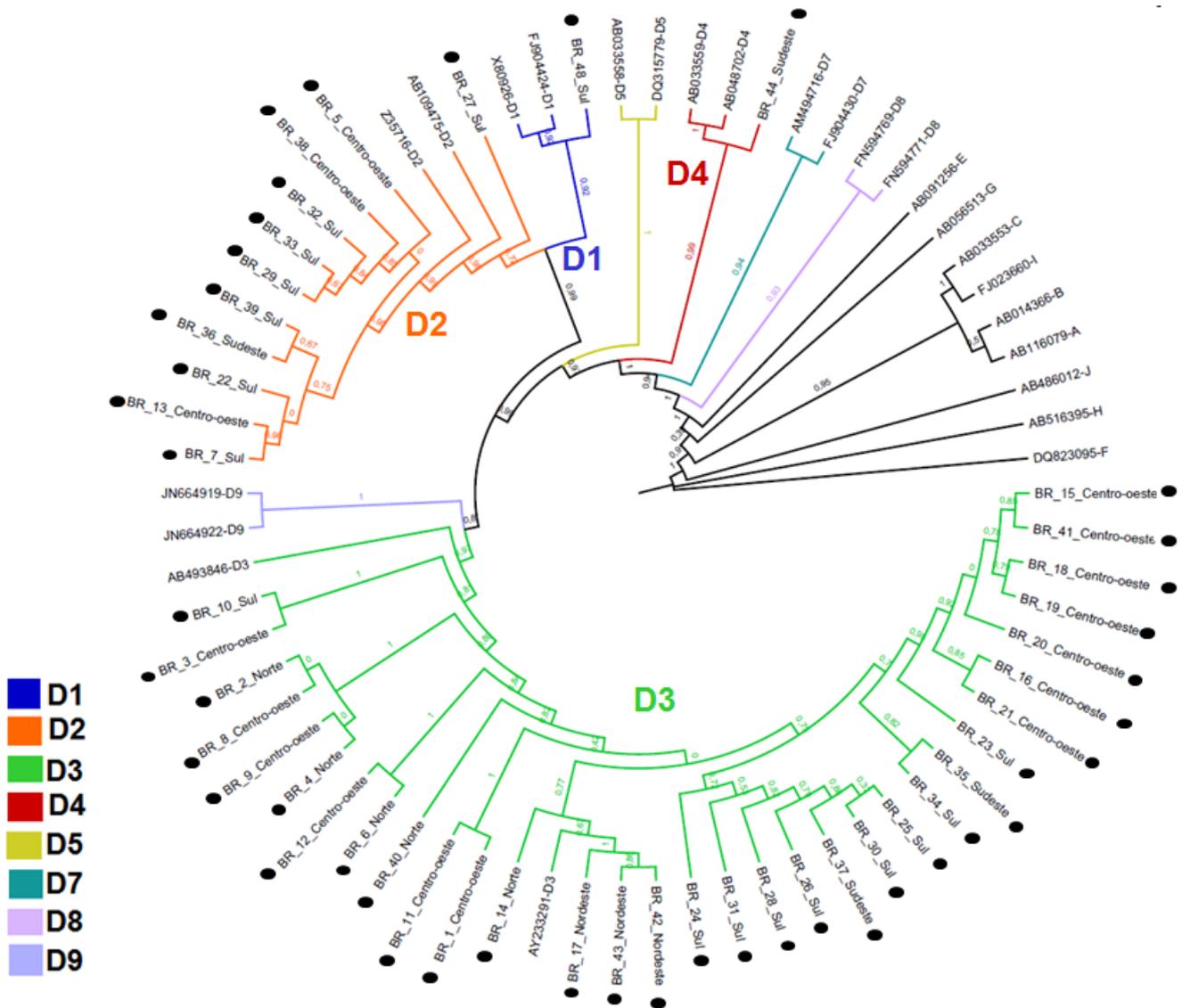


Figura 5.3: Análise filogenética baseada em seqüências do genoma completo do HBV. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança utilizando 45 genomas completos brasileiros do genótipo D do HBV recuperados neste trabalho mais 25 seqüências referência dos subgenótipos de D e dos outros genótipos do HBV. Os números nos ramos indicam o suporte estatístico aLRT. As seqüências brasileiras obtidas neste estudo estão indicadas por esferas pretas.

A distância genética intersubgenotípica entre os genomas completos brasileiros e os de outros países dos subgenótipos D1-D4 foi calculada pelo método de *Maximum Composite Likelihood*. A seqüência D1 brasileira apresentou menor distância genética em relação às seqüências argentinas (0,014). As seqüências D2 brasileiras ficaram mais próximas a uma seqüência do Cazaquistão (0,013). As seqüências do Haiti e da Índia foram

as que apresentaram menor distância genética em relação às sequências do Brasil para os subgenótipos D3 (0,013) e D4 (0,017), respectivamente (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Distância genética intersubgenotípica entre os genomas completos HBV/D Brasileiros e outros países

Subgenótipo D1		Subgenótipo D2		Subgenótipo D3		Subgenótipo D4	
País (n)		País (n)		País (n)		País (n)	
Brasil (1)		Brasil (11)		Brasil (32)		Brasil (16)	
Argentina (9)	0,014	Cazaquistão (1)	0,013	Haiti (2)	0,013	Índia (12)	0,017
Uzbesquistão (1)	0,015	Estônia (11)	0,014	Martinica (2)	0,015	Haiti (3)	0,025
Cazaquistão (1)	0,017	Rússia (14)	0,014	Cuba (1)	0,016	Papua (2)	0,027
Paquistão (2)	0,018	Tajiquistão (2)	0,018	Alemanha (1)	0,017	Samoa (2)	0,028
Síria (39)	0,018	Nova Caledônia (5)	0,019	França (2)	0,017	Tonga (1)	0,028
Índia (59)	0,019	Índia (23)	0,023	Índia (44)	0,017	Kiribati (8)	0,029
Nova Zelândia (40)	0,019	Japão (23)	0,023	Mauritius (1)	0,018	África do Sul (1)	0,03
Bélgica (14)	0,02	Bélgica (4)	0,025	Síria (1)	0,018	Cuba (5)	0,032
China (6)	0,02	Polônia (5)	0,025	Suécia (6)	0,018	Nova Zelândia (1)	0,032
Sudão (1)	0,02	Sérvia (2)	0,025	África do Sul (6)	0,019	Espanha (1)	0,033
Polônia (2)	0,021	Espanha (6)	0,028	Sérvia (3)	0,019	Fiji (4)	0,033
Mongólia (11)	0,022	Síria (2)	0,029	Japão (1)	0,02	Austrália (3)	0,034
Indonésia (1)	0,023	Argentina (7)	0,03	Paquistão (1)	0,021	Martinica (5)	0,034
Irã (147)	0,023	Irã (5)	0,03	Rússia (2)	0,021	Canadá (3)	0,039
Líbano (35)	0,023	Líbano (7)	0,031	Bélgica (7)	0,023		
Sérvia (1)	0,023	Turquia (2)	0,031	Canadá (3)	0,023		
Tunísia (14)	0,023	Malásia (2)	0,032	Indonésia (5)	0,023		
Turquia (46)	0,024	Taiwan (4)	0,033	Irã (5)	0,023		
França (1)	0,025	Cuba (1)	0,037	China (1)	0,024		
Espanha (1)	0,026			Estônia (2)	0,024		
Itália (7)	0,028			Turquia (2)	0,024		
Tajiquistão (3)	0,032			Argentina (20)	0,025		
				Espanha (2)	0,025		
				Itália (34)	0,027		
				EUA (6)	0,028		
				Mongólia (2)	0,03		
				Colômbia (1)	0,044		

V.3 – Mutações Relacionadas ao Desenvolvimento do Hepatocarcinoma

Os genomas completos do continente americano dos subgenótipos D1-D4, obtidos do *GenBank*, juntamente com as sequências geradas neste estudo, foram submetidos a uma busca pelas mutações relacionadas ao desenvolvimento do hepatocarcinoma nas posições C1653T (na região *enhancerII*); T1753A/C/G, A1762T, G1764A (promotor basal do *core*); e G1896A e G1899A (região do pré-*core*). A Figura 5.4A representa o gráfico das mutações encontradas nos subgenótipos de D circulantes nas Américas. Pode-se observar que nenhuma das mutações analisadas foi encontrada nas sequências do subgenótipo D1, enquanto o HBV/D2 apresentou todas as mutações sendo a G1899A encontrada numa maior porcentagem (27%). Assim como o HBV/D2, o HBV/D3 e o HBV/D4 apresentaram todas as mutações buscadas; no entanto, a mais encontrada foi a G1896A (HBV/D3 = 49%; HBV/D4 = 59%).

Para que fosse feita uma comparação entre o panorama geral da frequência dessas mutações no mundo e o encontrado apenas nas Américas essas mutações também foram analisadas nos genomas completos de outros países (excluindo países do continente americano) obtidos do *GenBank* (Figura 5.4B). Pode-se observar, nos demais continentes, uma maior frequência das mutações A1762T (36%), G1764A (38%), G1896A (55%), T1753 A/C/G (28%) no subgenótipo D1 do que nos outros subgenótipos. Nos quatro subgenótipos, a mutação mais frequente foi a G1896A (HBV/D1 = 55%; HBV/D2 = 36%; HBV/D3 = 44%; HBV/D4 = 34%), diferindo do perfil encontrado nas sequências americanas, onde não foi encontrada nenhuma mutação no subgenótipo D1 e a mutação mais prevalente no HBV/D2 foi a G1899A. No panorama mundial, as sequências D4 apresentaram apenas três (G1764A = 6%; G1896A = 34%; G1899A = 14%) das seis mutações pesquisadas, divergindo do perfil encontrado nas sequências D4 americanas.

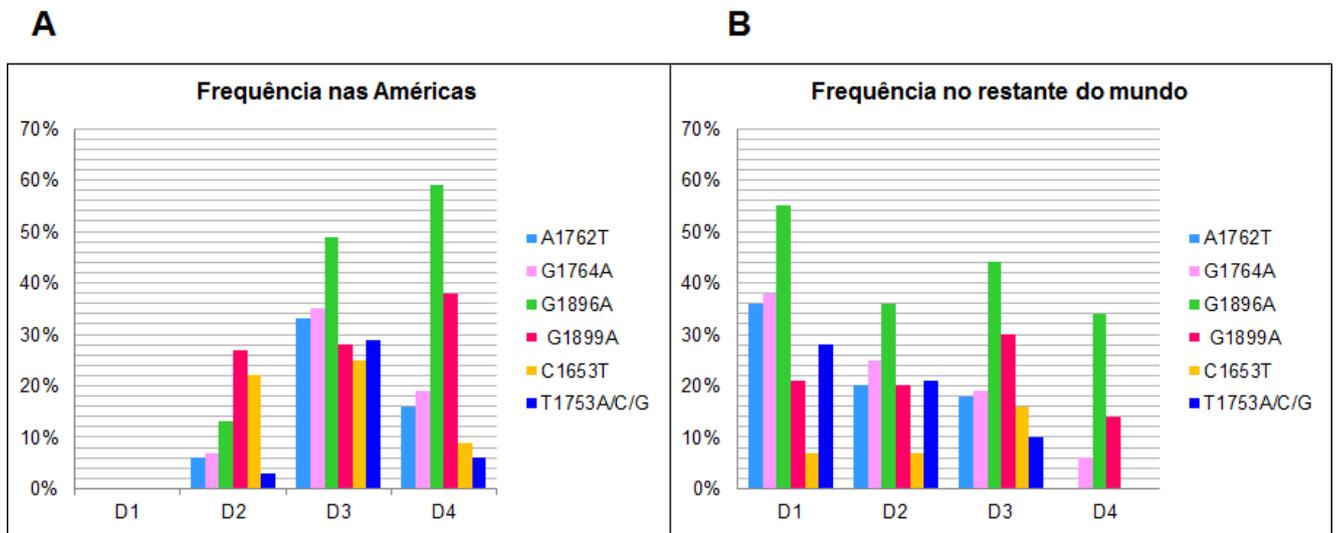


Figura 5.4: Gráfico de distribuição das mutações associadas ao desenvolvimento do hepatocarcinoma nas regiões do promotor basal do *core* e do pré-*core* nos genomas completos dos subgenótipo D1-D4 do continente americano (A) e no restante do mundo (B). O gráfico mostra a porcentagem de mutantes encontrados em cada subgenótipo. Número de sequências das Américas: D1 = 10; D2 = 98; D3 = 69 e D4 = 32. Número de sequências do mundo: D1 = 345; D2 = 118; D3 = 114 e D4 = 35.

V.4 - Subtipos do HBV do Genótipo D circulante nas Américas e Detecção do Primeiro Isolado de D do Subtipo adr_q+ no mundo

As sequências brasileiras de genoma completo do genótipo D geradas neste estudo e as demais sequências das Américas obtidas do *GenBank* foram classificadas em subtipos. Todas as sequências HBV/D1 apresentaram o subtipo ayw2. Nas sequências HBV/D2, foram detectados os subtipos ayw3 e ayw4. Surpreendentemente, um isolado brasileiro HBV/D2, sequenciado neste estudo, apresentou o subtipo adr_q+, o qual até o momento só havia sido descrito no genótipo C. Esta sequência mostrou também uma deleção de 120 nt na região pré-S1 e um *stop* códon na posição 339 da proteína de superfície. Além dessas mutações na região pré-S/S, esta sequência também contém mutações relacionadas ao desenvolvimento de hepatocarcinoma, T1753A, a dupla mutação no promotor basal do *core* A1762T/G1764A e o *stop* códon na região pré-*core* G1896A. Esta amostra é oriunda de um paciente do sexo feminino, com 38 anos, assintomática, com sorologia positiva para o HBsAg e anti-HBc e negativa para o HBeAg, e com carga viral de 3659 UI/mL (3,56 log₁₀ UI/mL).

As sequências do subgenótipo D3 apresentaram os subtipos ayw2 e ayw3, e as sequências D4 os subtipos ayw1 e ayw2 (Tabela 5.3). Os subtipos encontrados nos outros países americanos estão representados na Tabela 5.4.

Tabela 5.3: Subtipos encontrados nos subgenótipos de D circulantes no Brasil

Subgenótipo (n)	Região Geográfica (n)	Subtipo (%)
D1 (1)	Sul (1)	ayw2 (100%)
D2 (11)	Centro-Oeste (3)	ayw3 (100%)
	Sudeste (1)	ayw3 (100%)
	Sul (7)	adrq+ (14%); ayw3 (72%); ayw4 (14%)
D3 (32)	Centro-Oeste (13)	ayw2 (85%); ayw3 (15%)
	Nordeste (3)	ayw3 (100%)
	Norte (5)	ayw2 (60%); ayw3 (40%)
	Sudeste (2)	ayw2 (50%); ayw3 (50%)
	Sul (9)	ayw2 (100%)
D4 (16)	Nordeste (15)	ayw1 (13%); ayw2 (87%)
	Sudeste (1)	ayw2 (100%)

Tabela 5.4: Subtipos encontrados nos subgenótipos de D circulantes nos países americanos (excluindo o Brasil)

Subgenótipo (n)	País (n)	Subtipo (%)
D1 (9)	Argentina (9)	ayw2 (100%)
D2 (87)	Argentina (6)	ayw2 (17%); ayw3 (50%); ni* (33%)
	Cuba (1)	ayw2 (100%)
	EUA (80)	ayw3 (99%); ayw4 (1%)
D3 (37)	Argentina (21)	ayw2 (70%); ayw3 (10%); ayw4 (10%); ni* (10%)
	Canadá (3)	ayw2 (100%)
	Cuba (1)	ayw3 (100%)
	EUA (9)	ayw3 (100%)
	Haiti (2)	ayw4 (100%)
	Martinica (1)	ayw2 (100%)
D4 (16)	Canadá (3)	ayw1 (67%); ayw2 (33%)
	Cuba (5)	ayw2 (100%)
	Haiti (3)	ayw1 (33%); ayw2 (67%)
	Martinica (5)	ayw2 (80%); ayw4 (10%)

*ni – não identificado

V.5 – Análise Filogeográfica do Genótipo D nas Américas

Para investigar os movimentos migratórios que trouxeram os subgenótipos de D para as Américas, sequências obtidas do continente e de outras regiões do mundo foram analisadas no programa BEAST 1.8.2.

V.5.1 – Subgenótipo D1

A Figura 5.5 mostra a árvore de máxima credibilidade do subgenótipo D1. A taxa evolutiva do subgenótipo D1 calculada usando o modelo de relógio molecular relaxado foi de $8,9 \times 10^{-5}$ (95%HPD $5,7 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-6}$). O tMRCA do subgenótipo D1 foi estimado para a data de 1679 (95%HPD 1500 – 1762). A Turquia foi a localidade que apresentou a maior probabilidade de ser a raiz deste subgenótipo (0,97).

O tMRCA da sequência brasileira foi estimado por volta do ano 1813 (95%HPD 1675 – 1862). O local com maior probabilidade de ser a raiz da sequência brasileira foi a Síria, com probabilidade de 0,86.

As sequências argentinas formaram um clado monofilético, tendo seu ancestral comum remontando ao ano 1991 (95%HPD 1958 – 2006). A Turquia foi a localização com maior probabilidade de ser a raiz das sequências argentinas (0,76), com uma probabilidade significativamente mais alta que a da segunda localização mais provável de ser a raiz, a Ásia Central (0,19). Os tMRCAs dos clados americanos estão listados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5: tMRCAs dos principais clados americanos do subgenótipo D1

Subgenótipo	Nó	tMRCA	95%HPD tMRCA	Localização	Probabilidade
D1	Raíz	1679	1500 – 1762	Turquia	0,97
	Brasil	1813	1675 – 1862	Síria	0,86
	Argentina	1991	1958 – 2006	Turquia	0,76

tMRCA – Tempo do ancestral comum mais recente



Figura 5.5: Árvore bayesiana de máxima credibilidade com genomas completos de HBV/D1. Árvore construída com 131 genomas completos do subgenótipo D1 mais duas sequências do genótipo E provenientes da Guiné para estruturar a raiz da árvore. Os números nos ramos indicam a probabilidade posterior. O tamanho dos ramos equivale ao tempo em anos. Os ramos estão coloridos de acordo com a localização mais provável dos nós descendentes (legenda no canto superior esquerdo). A escala na parte inferior da árvore representa os anos antes da data de coleta da amostra mais recente (2012).

A análise de BSSVS aponta a existência de relações epidemiológicas significativas nas rotas migratórias do HBV/D1 com $BF \geq 3$ (Tabela 5.6; Figura 5.6). Após o cálculo do BF, pode-se visualizar a Turquia como origem da dispersão do subgenótipo D1, e a forte relação epidemiológica entre Argentina e Turquia, e do Brasil com a Síria.

Tabela 5.6: Fator de Bayes das rotas de migração do HBV/D1

Rotas de migração	Fator de Bayes (BF)
Turquia – Argentina	3,129
Turquia – Mongólia	4,740
Turquia – Nova Zelândia	14,695
Síria – Brasil	18,196
Turquia – Sul da Europa	18,737
Turquia – China	35,835
Síria – Líbano	37,660
China – Mongólia	54,414
Turquia – Líbano	234,848
Turquia – Tunísia	324,290
Turquia – Ásia Central	1333,650
Turquia – Síria	4461,009
Turquia – Irã	5354,541
Turquia – Subcontinente Indiano	5354,541
Turquia – Oeste Europeu	26799,291

$BF \geq 3$ indica relação epidemiológica significativa entre as localidades.

As rotas envolvendo países do continente americano estão destacadas em vermelho.

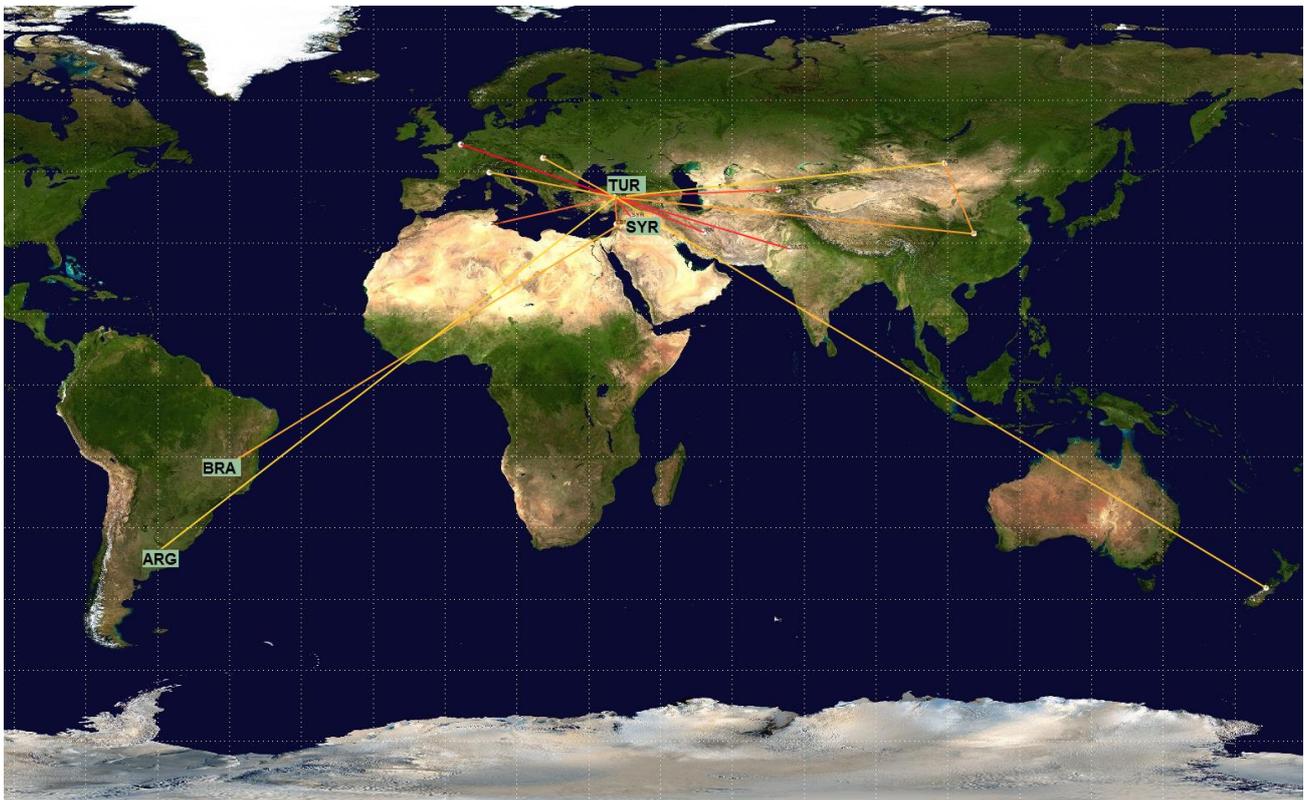


Figura 5.6: Rotas significativas da dispersão do HBV/D1. Apenas as rotas com $BF \geq 3$ estão representadas. A força do suporte está representada pelas cores das linhas: do amarelo (suporte mais fraco) para o vermelho (suporte mais forte). O mapa foi reconstruído utilizando o SPREAD. ARG = Argentina; BRA = Brasil; SYR = Síria; TUR = Turquia.

V.5.2 – Subgenótipo D2

A árvore de máxima credibilidade do D2 está representada na Figura 5.7. A taxa evolutiva do subgenótipo D2 calculada usando o modelo de relógio molecular relaxado foi de $7,4 \times 10^{-5}$ (95%HPD $1,9 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-6}$), apresentando um tMRCA datado ao ano de 1562 (95%HPD 478 – 1776). A Bélgica apresentou maior probabilidade de ser a raiz do subgenótipo D2 (0,24), seguido pela Argentina com (0,20) e Leste Europeu (0,14).

As sequências argentinas não formaram um grupo monofilético, a maioria agrupando com sequências brasileiras, e duas ficando na base da árvore tendo uma origem na Bélgica; no entanto, com baixa probabilidade (0,24 e 0,26). O clado formado pelas sequências do Brasil e da Argentina ficou relacionado às sequências do Leste Europeu e da Rússia. Já as sequências dos EUA ficaram agrupadas com sequências provenientes da Índia.

O tMRCA do clado das sequências brasileiras com as sequências argentinas foi estimado ao ano de 1857 (95% HPD 1477 – 1923). Os resultados sugerem que este subgenótipo foi inserido no Brasil no período entre 1845 (95%HPD 1390 – 1917) e 1857 (95% HPD 1409 – 1913). O Leste Europeu foi a localização que apresentou maior probabilidade de ser a raiz das sequências brasileiras (0,47), seguido pela Rússia (0,33), juntas somando uma probabilidade de 0,80. A árvore sugere que houve inserções do HBV/D2 a partir do Brasil para a Argentina com probabilidades variando de 0,92 a 0,99.

Os EUA parecem ter tido pelo menos duas introduções deste subgenótipo. A principal introdução do subgenótipo D2 nos EUA parece ter ocorrido entre 1853 (95% HPD 1470 – 1930) e 1905 (95% HPD 1642 – 1979), com origem mais provável a partir da Índia com um alto suporte (0,99). Os tMRCAs dos principais clados americanos estão representados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: tMRCAs dos principais clados americanos do subgenótipo D2

Subgenótipo	Nó	tMRCA	95% HPD tMRCA	Localização	Probabilidade
	Raíz	1562	478 – 1776	Bélgica	0,24
D2	Brasil+Argentina	1857	1477 - 1923	Leste Europeu+Rússia	0,80
	EUA	1905	1642 - 1979	Índia	0,99

tMRCA – Tempo do ancestral comum mais recente

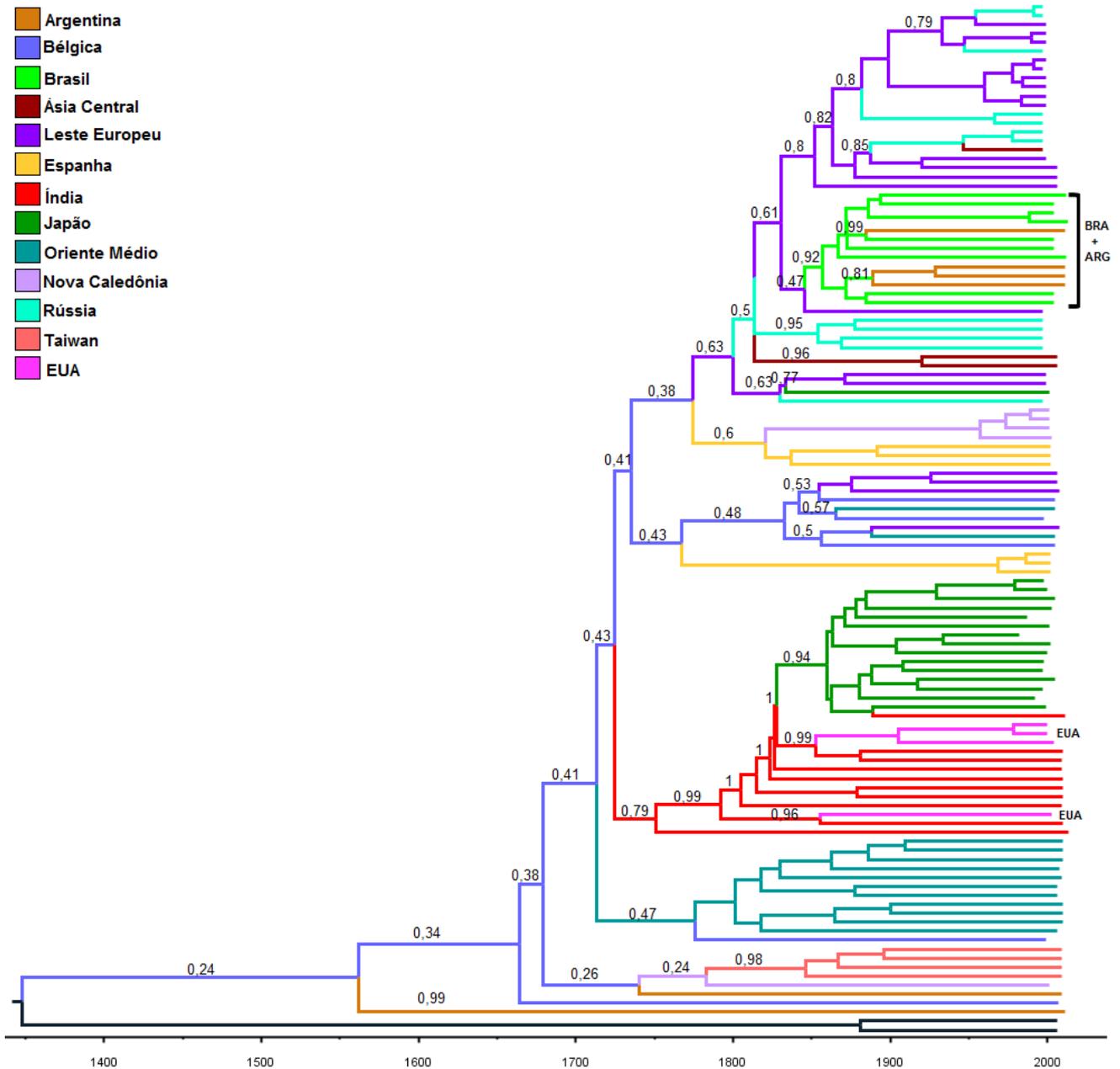


Figura 5.7: Árvore bayesiana de máxima credibilidade com genomas completos de HBV/D2. Árvore construída com 113 genomas completos do subgenótipo D2 mais duas sequências do genótipo E provenientes da Guiné para estruturar a raiz da árvore. Os números nos ramos indicam a probabilidade posterior. O tamanho dos ramos equivale ao tempo em anos. Os ramos estão coloridos de acordo com a localização mais provável dos nós descendentes (legenda no canto superior esquerdo). A escala na parte inferior da árvore representa os anos antes da data de coleta da última amostra (2013).

A análise de BSSVS aponta a existência de relações epidemiológicas significativas nas rotas migratórias do HBV/D2 com $BF \geq 3$ (Tabela 5.8; Figura 5.8). Após o cálculo do BF o Brasil apresentou relação epidemiológica significativa com a Rússia e o Leste Europeu. A relação epidemiológica entre Brasil e Argentina apresentou um alto suporte ($BF \geq 100$), assim como a rota Índia – EUA.

Tabela 5.8: BF das rotas de migração do HBV/D2

Rotas de migração	Fator de Bayes (BF)
Nova Caledônia – Taiwan	3,651
Bélgica – Índia	3,773
Leste Europeu - Ásia Central	4,087
Rússia – Brasil	4,108
Bélgica – Espanha	4,164
Leste Europeu – Oriente Médio	5,304
Leste Europeu – Brasil	5,646
Espanha – Nova Caledônia	7,886
Rússia – Ásia Central	8,608
Bélgica – Oriente Médio	12,703
Bélgica – Leste Europeu	18,701
Índia – Japão	2817,453
Brasil – Argentina	4554,744
Índia – EUA	8463,650
Leste Europeu – Rússia	59279,429

$BF \geq 3$ indica relação epidemiológica significativa entre as localidades.

As rotas envolvendo países do continente americano estão destacadas em vermelho.

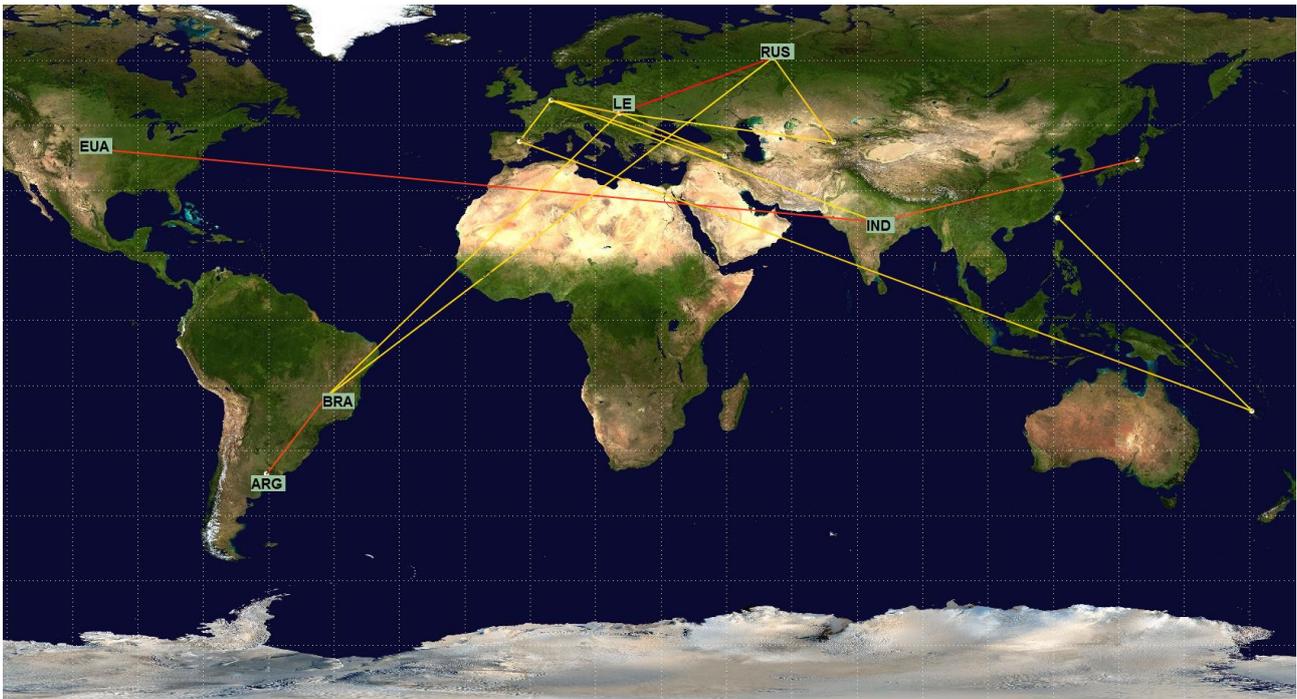


Figura 5.8: Rotas significativas da dispersão do HBV/D2. Apenas as rotas com $BF \geq 3$ estão representadas. A força do suporte está representada pelas cores das linhas: do amarelo (suporte mais fraco) para o vermelho (suporte mais forte). O mapa foi reconstruído utilizando o SPREAD. ARG = Argentina; BRA = Brasil; EUA = Estados Unidos; IND = Índia; LE = Leste Europeu; RUS = Rússia.

V.5.3 – Subgenótipo D3

Na Figura 5.9, está representada a árvore de máxima credibilidade do subgenótipo D3. A taxa evolutiva calculada usando um relógio molecular relaxado foi de $6,1 \times 10^{-5}$ (95%HPD $1,1 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-6}$). O tMRCA do subgenótipo D3 remonta ao ano de 1512 (95%HPD 832 a.c. – 1769 anos), sendo o Brasil o local com maior probabilidade de ser a raiz deste subgenótipo com probabilidade de 0,48, seguido do Subcontinente Indiano com probabilidade de 0,24.

A maioria das sequências argentinas formou um grupo junto com algumas sequências brasileiras e belgas (C1). Parece ter havido duas introduções principais do HBV/D3 na Argentina, sendo a primeira inserção entre 1647 (95% HPD 161 - 1832) e 1702 (95% HPD 215 - 1877), e uma segunda entre 1701 (95% HPD 400 - 1853) e 1741 (95% HPD 595 – 1895). Assim como as sequências argentinas, as sequências brasileiras não formaram um grupo monofilético, mas a maioria de suas sequências ficou agrupada em um

grande clado junto com sequências do Haiti, Martinica, Argentina, Bélgica, Canadá e Sul da Europa (C2), o qual apresentou tMRCA de 1661 (95% HPD 363 – 1817).

As sequências do Caribe (Cuba, Haiti e Martinica) também não formaram um grupo monofilético, ficando as sequências de Martinica e Haiti agrupadas com as brasileiras, e as de Cuba com sequências da Ásia Central, Bélgica, Subcontinente Indiano e Sul da Europa. O Brasil foi a localização com maior probabilidade de ser a raiz de todas as sequências do continente americano com probabilidade variando de 0,55 a 0,99. O tMRCA dos principais clados dos países americanos está listado na Tabela 5.9.

Tabela 5.9: tMRCAs dos principais clados americanos do subgenótipo D3

Subgenótipo	Nó	tMRCA	95%HPD tMRCA	Localização	Probabilidade
D3	Raíz	1512	832 a.c - 1769	Brasil	0,48
	Argentina (1)	1647	161 - 1832	Brasil	0,29
	Brasil	1661	363 - 1817	Brasil	-
	Argentina (2)	1702	215 - 1877	Brasil	0,47
	Cuba	1709	233 - 1861	Brasil	0,86
	Martinica	1733	401 - 1889	Brasil	0,99
	Canadá	1791	814 - 1938	Brasil	0,99
	EUA	1934	1602 - 1986	Brasil	0,82
	Haiti	2003	1977 - 2006	Brasil	0,97

tMRCA – Tempo do ancestral comum mais recente

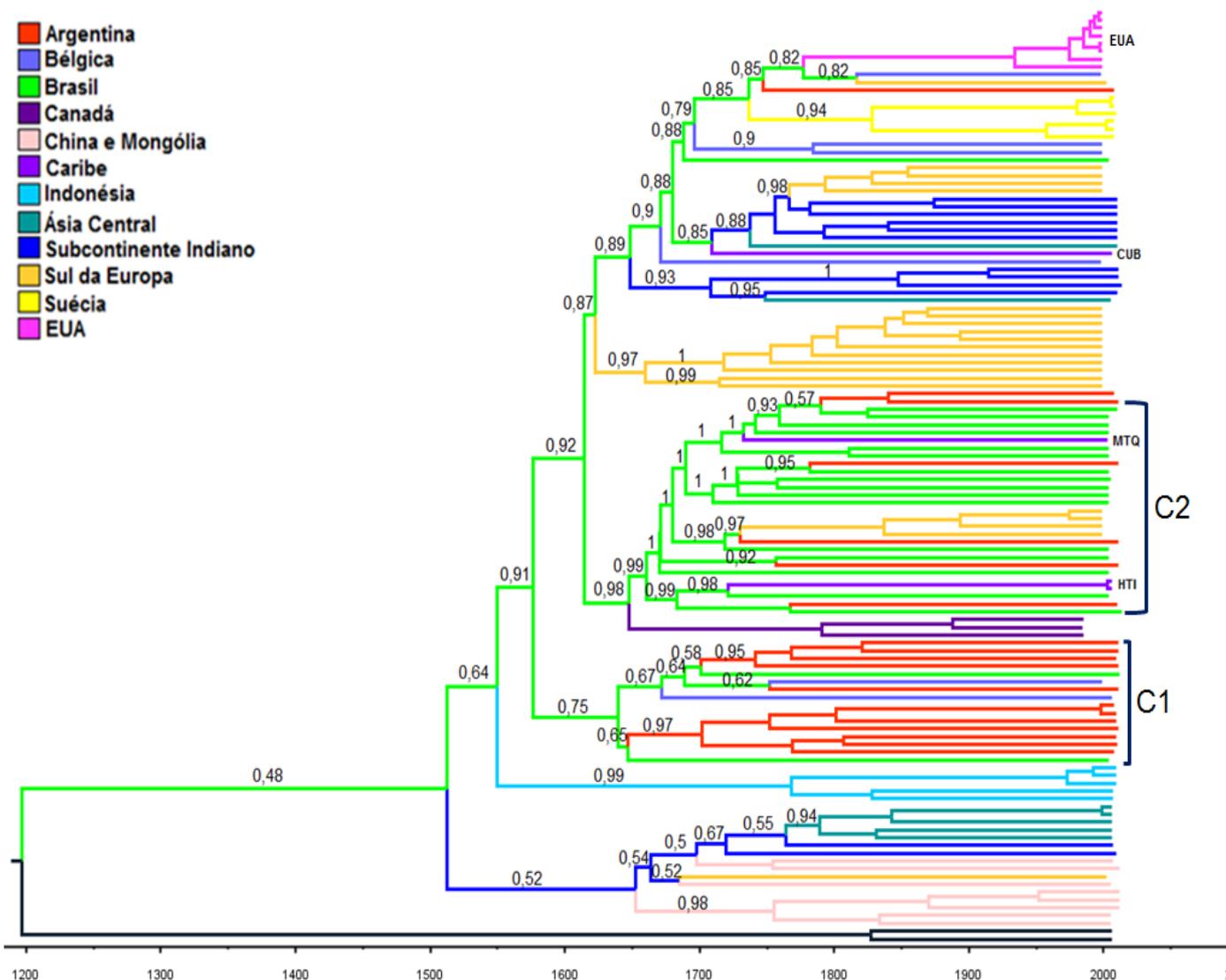


Figura 5.9: Árvore bayesiana de máxima credibilidade com genomas completos de HBV/D3. Árvore construída com 79 genomas completos do subgenótipo D3 mais duas sequências do genótipo E provenientes da Guiné para estruturar a raiz da árvore. Os números nos ramos indicam a probabilidade posterior. O tamanho dos ramos equivale ao tempo em anos. Os ramos estão coloridos de acordo com a localização mais provável dos nós descendentes (legenda no canto superior esquerdo). A escala na parte inferior da árvore representa os anos antes da data de coleta da última amostra (2013). HTI = Haiti, MTQ = Martinica, CUB = Cuba.

A análise de BSSVS aponta a existência de relações epidemiológicas significativas nas rotas migratórias do HBV/D3 com $BF \geq 3$ (Tabela 5.10; Figura 5.10). Após o cálculo do BF, o Brasil apresentou relação epidemiológica significativa com a Indonésia, EUA, Suécia, Canadá, Subcontinente Indiano, Bélgica, Sul da Europa, Caribe e Argentina.

Tabela 5.10: BF das rotas de migração do HBV/D3

Rotas de migração*	Bayes Factor (BF)
Brasil – Indonésia	3,111
Brasil – EUA	7,283
Brasil – Suécia	10,321
Subcontinente Indiano - China e Mongólia	13,799
Brasil – Canadá	15,436
Subcontinente Indiano – Sul da Europa	25,697
Brasil - Subcontinente Indiano	38,179
Subcontinente Indiano - Oriente Médio	69,951
Brasil – Bélgica	72,132
Brasil - Sul da Europa	79,452
Brasil – Caribe	225,546
Brasil – Argentina	125029,813

$BF \geq 3$ indica relação epidemiológica significativa entre as localidades.

As rotas envolvendo países do continente americano estão destacadas em vermelho.



Figura 5.10: Rotas significativas da dispersão do HBV/D3. Apenas as rotas com $BF \geq 3$ estão representadas. A força do suporte está representada pelas cores das linhas: do amarelo (suporte mais fraco) para o vermelho (suporte mais forte). O mapa foi reconstruído utilizando o SPREAD. ARG = Argentina; BEL = Bélgica; BRA = Brasil; CAN = Canadá; CAR = Caribe; EUA = Estados Unidos; IDN = Indonésia; SE = Sul da Europa; SI = Subcontinente Indiano; SWE = Suécia.

V.5.4 – Subgenótipo D4

A árvore de máxima credibilidade do subgenótipo D4 está apresentada na Figura 5.11. Ao observar a árvore, percebe-se dois grandes clados, um contendo as sequências da Polinésia, Austrália, Caribe (Cuba, Haiti e Martinica) e Canadá, e outro com as sequências do Brasil e Índia. As sequências do Canadá agruparam com as do Caribe, enquanto as sequências brasileiras e as indianas formaram clados monofiléticos.

Usando um relógio molecular relaxado, a taxa evolutiva do subgenótipo D4 foi calculada em $7,0 \times 10^{-5}$ com intervalo de confiança entre $1,3 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-6}$. O tMRCA estimado remonta ao ano de 1573 (95% HPD 323 a.c. – 1829), sendo a Martinica o local com maior probabilidade de ser a raiz deste subgenótipo (0,29), seguido pelo Brasil com (0,21) e Austrália (0,11). O tMRCA das sequências da Martinica foi calculado ao ano de

1749 (95% HPD 725 – 1891), sendo este também o tMRCA do clado caribenho agrupado com as sequências canadenses.

As sequências brasileiras formaram um clado monofilético com um tMRCA remontando ao ano de 1838 (95% HPD 1124 - 1941), sendo a Martinica a localidade com maior probabilidade (0,29) de ser a raiz do Brasil, seguido pelo próprio Brasil com probabilidade de 0,21 e Austrália (0,11).

O ancestral comum mais recente do Canadá refere-se ao ano de 1884 (95% HPD 1478 - 1960), e o local com maior probabilidade de ser a raiz das sequências canadenses foi a Martinica (0,72).

O ancestral comum mais recente de Cuba foi calculado ao ano de 1898 (95% HPD 1483 – 1963). Com uma probabilidade de 0,76, a Martinica foi a localidade com maior probabilidade de ter sido o local de origem das sequências circulantes em Cuba.

As sequências haitianas são as que apresentam um tMRCA mais recente, remontando ao ano de 1936 (95% HPD 1662 – 1995), e também apresentando a Martinica como localidade com maior probabilidade (0,73) de ser a raiz de suas sequências. O tMRCA dos principais clados americanos HBV/D4 estão listados na tabela 5.11.

Tabela 5.11: tMRCAs dos principais clados americanos do subgenótipo D4

Subgenótipo	Nó	tMRCA	95%HPD tMRCA	Localização	Probabilidade
D4	Raiz	1573	323 a.c. – 1829	Martinica	0,29
	Martinica	1749	725 - 1891	Martinica	-
	Brasil	1838	1124 - 1941	Martinica	0,29
	Canadá	1884	1478 - 1960	Martinica	0,72
	Cuba	1898	1483 - 1963	Martinica	0,76
	Haiti	1936	1662 - 1995	Martinica	0,73

tMRCA – Tempo do ancestral comum mais recente

Tabela 5.12: BF das rotas de migração do HBV/D4

Rotas de migração*	Fator de Bayes (BF)
Austrália – Polinésia	6,937
Martinica – Haiti	11,275
Martinica – Canadá	12,876
Martinica – Cuba	14,451
Brasil – Índia	26,680

BF \geq 3 indica relação epidemiológica significativa entre as localidades.

As rotas envolvendo países do continente americano estão destacadas em vermelho.

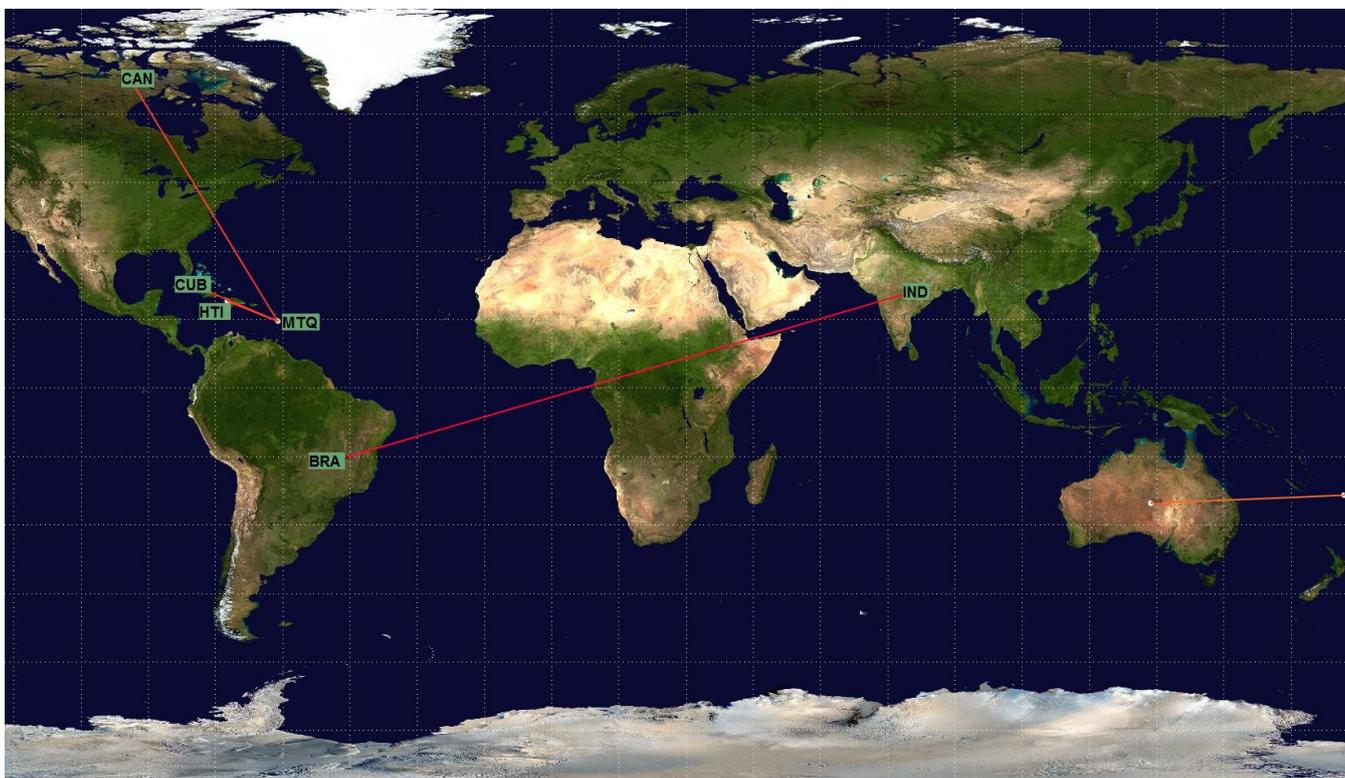


Figura 5.12: Rotas significativas da dispersão do HBV/D4. Apenas as rotas com BF \geq 3 estão representadas. A força do suporte está representada pelas cores das linhas (do amarelo (suporte mais fraco) para o vermelho (suporte mais forte)). O mapa foi reconstruído utilizando o SPREAD. BRA = Brasil; CAN = Canadá; CUB = Cuba; HTI = Haiti; IND = Índia; MTQ = Martinica.

VI – DISCUSSÃO

O genótipo D do HBV é encontrado disperso por todo o mundo, sendo o mais prevalente no nordeste da Europa, Bacia Mediterrânea, norte da África, Oriente Médio, e subcontinente Indiano (Muherkar *et al.*, 2008; Zehender *et al.*, 2008). Estudos sobre a filodinâmica deste genótipo já foram realizados na Europa e Bacia do Mediterrâneo, na Albânia, e na Turquia (Zehender *et al.*, 2012a; Zehender *et al.*, 2012b; Ciccozzi *et al.*, 2014). O presente estudo é o primeiro a investigar a origem do genótipo D no continente americano.

Para conhecer a distribuição dos subgenótipos de D nas Américas, foi realizado um levantamento das sequências do genótipo D provenientes do continente americano disponíveis no *GenBank*. Dessa forma, observou-se a presença deste genótipo na Argentina, Brasil, Canadá, Chile, Colômbia, Cuba, Estados Unidos, Groelândia, Haiti, Martinica e Venezuela. Constatou-se também que os subgenótipos que circulam nas Américas são os D1-D4 e D7.

O subgenótipo D1 foi o principal encontrado na Argentina (83%), também foi observado no Canadá (18%), em Cuba (3%) e no Brasil (2%). Este subgenótipo é o mais frequente na Grécia, Turquia e norte da África e, principalmente, no Oriente Médio (Meldal *et al.*, 2009; Kitab *et al.*, 2011; Yousif e Kramvis, 2013).

O subgenótipo D2, que circula principalmente no nordeste da Europa (Rússia, Belarus e Estônia) e Albânia (Tallo *et al.*, 2009; Zehender *et al.*, 2011), foi identificado em 4% das sequências argentinas, 5% das cubanas, 17% das brasileiras e em 18% das sequências do Canadá. Este subgenótipo foi predominante no Chile (75%) e nos EUA (90%), embora apenas quatro sequências chilenas foram analisadas.

O subgenótipo D3 foi observado em quase todos os países americanos que possuem o genótipo D, com exceção da Venezuela e Groelândia. Foi o subgenótipo prevalente no Brasil (56%), e o único encontrado na Colômbia, apesar de haver apenas uma sequência do genótipo D desse país, o que não permite determinar realmente se o HBV/D3 é o subgenótipo mais frequente na Colômbia. Este subgenótipo é amplamente distribuído pelo mundo, sendo prevalente na Itália e na Sérvia (De Maddalena *et al.*, 2007; Lazarevic *et al.*, 2007).

O HBV/D4 foi o subgenótipo mais frequentemente verificado no Haiti (84%), Cuba (76%) e Canadá (35%). No Brasil, este subgenótipo foi detectado em 25% das sequências. O HBV/D4 circula também na Venezuela (2/2) e Martinica (4/5); no entanto, o pequeno

número de sequências não permitiu determinar a prevalência do mesmo. O referido subgenótipo foi encontrado em população afrodescendente (Barros *et al.*, 2014). O HBV/D4 já foi descrito no Haiti, Marrocos, em Ruanda, Somália, Quênia e Gana (Norder *et al.*, 2004; Candotti *et al.*, 2006; Andernach *et al.*, 2009; Hübschen *et al.*, 2009; Baha *et al.*, 2012; Kwange *et al.*, 2013;), sendo o subgenótipo mais comum na Oceania (Norder *et al.*, 2004).

O HBV/D7 foi observado apenas em Cuba, descrito pela primeira vez em um país do continente americano por Loureiro e colaboradores, em 2014. Este subgenótipo circula principalmente, no Marrocos, na Tunísia e em Madagascar (Yousif e Kramvis, 2013).

As sequências do genótipo D provenientes da Groelândia são oriundas de um grupo indígena circumpolar. Ao serem submetidas a uma análise filogenética para identificação dos subgenótipos, essas sequências formaram um clado separado dos demais subgenótipos de D. No entanto, o cálculo da distância genética revelou uma similaridade de 97,7% com as sequências referência HBV/D1 e 97,4% com HBV/D2 (Kowalec *et al.*, 2012).

No Brasil, o genótipo D foi observado em todas as regiões geográficas brasileiras, sendo a maioria das sequências proveniente da Região Sul (57%). Este genótipo é o mais prevalente no Sul do País (Mello *et al.*, 2007; Bertolini *et al.*, 2012), justificando a maior porcentagem de sequências originárias desta região. Os subgenótipos de D detectados circulando no Brasil foram o D1, D2, D3 e D4. O subgenótipo mais frequente dentre as sequências brasileiras foi HBV/D3, correspondendo a 56% das sequências analisadas. Este subgenótipo foi o mais prevalente nas Regiões Sul, Sudeste e Norte (75%, 74% e 50%, respectivamente). Na Região Centro-Oeste o subgenótipo mais encontrado nas sequências obtidas do *GenBank* foi o D2 (4/5). Uma proporção diferente foi observada nos genomas completos obtidos neste estudo, onde o HBV/D3 foi mais frequente (81%; 13/16) do que o HBV/D2 (19%; 3/16). Na região Nordeste o HBV/D4 foi o subgenótipo predominante (92%).

O hepatocarcinoma é um dos tumores mais comuns do mundo (Kao e Chen, 2005). Mais da metade dos casos de hepatocarcinoma é atribuído à infecção crônica pelo HBV (Gomaa *et al.*, 2008). Alguns estudos têm demonstrado maior incidência de mutações relacionadas ao hepatocarcinoma no subgenótipo D1 do que nos demais subgenótipos de D (Sunbul *et al.*, 2013; Yousif e Kramvis, 2013). No entanto, ao buscar as mutações C1653T, T1753A/C/G, A1762T, G1764A, G1896A e G1899A nos genomas completos das sequências americanas deste estudo, encontrou-se, um resultado inesperado ao não observar a presença de tais mutações nas sequências do subgenótipo D1; diferentemente dos demais continentes, nos quais uma frequência alta destas mutações no HBV/D1 foram encontrados. Essa diferença pode sugerir que nas Américas circulam isolados do HBV/D1 menos

virulentos do que no resto do mundo. Outra explicação seria que, devido ao baixo número de sequências HBV/D1 americanas analisadas (n=10), a frequência destas mutações estaria sendo subestimada.

Com exceção das mutações C1653T e G1899A, as sequências HBV/D2 americanas apresentaram uma menor frequência das mutações analisadas quando comparadas às sequências HBV/D2 não americanas. Além disso, nas sequências HBV/D2 americanas, a mutação G1899A foi mais frequente, enquanto, nas HBV/D2 do restante do mundo, foi a substituição G1896A.

As sequências americanas e dos demais continentes HBV/D3 apresentaram perfil de mutações semelhante, sendo a mutação G1896A a mais frequente.

Nas sequências HBV/D4 americanas, foram detectadas as seis mutações pesquisadas, enquanto, nas do restante do mundo, apenas três (G1764A, G1896A e G1899A) foram observadas. Em um estudo de 2013, Yousif e Kramvis não detectaram a dupla mutação A1762T/G1764A no subgenótipo D4. Nos resultados desta investigação, as mutações A1762T e G1764A foram observadas em 16% e 19%, respectivamente, das sequências americanas. Por um outro lado, nas sequências D4 dos demais países, não foi detectada a mutação A1762T, e a G1764A foi encontrada em 6% das sequências, não havendo a presença da dupla mutação. Estes resultados podem cepas HBV/D4 com maior frequência de mutações relacionadas ao hepatocarcinoma circulando nos países americanos do que no restante do mundo.

A classificação do HBV em subtipos pode ser utilizada em estudos epidemiológicos (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002). Os subtipos mostram diferentes distribuições geográficas e afetam as características antigênicas do HBV (Le Bouvier *et al.*, 1972; Norder *et al.*, 1992). Ao classificar os genomas completos do subgenótipo HBV/D1 do continente americano em subtipos, foi observado apenas o subtipo ayw2, já descrito como o principal subtipo encontrado neste subgenótipo (Yousif e Kramvis, 2013). No HBV/D2, o subtipo mais frequente foi o ayw3, mas também foi verificado ayw2, ayw4 e adrq+. Os dois últimos ainda não haviam sido encontrados no subgenótipo D2, sendo o ayw4 já observado nos subgenótipos D1 e D3 (Yousif e Kramvis, 2013). O subtipo adrq+ só foi descrito para o genótipo C (revisado por Zehender *et al.*, 2014), sendo a primeira vez que é mostrado no genótipo D. Essa sequência também apresentou uma deleção de 120 nucleotídeos na região pré-S1 do genoma viral. Deleções na região pré-S/S são frequentemente constatadas em pacientes com hepatite B crônica de longa duração (Locarnini *et al.*, 2003), e estão associadas a um maior risco de desenvolvimento do hepatocarcinoma (Chen *et al.*, 2008; Liu

et al., 2009; Yeung *et al.*, 2011). Também foram notadas neste isolado, as mutações relacionadas ao hepatocarcinoma T1753A, a dupla mutação no promotor basal do *core* A1762T/G1764A e o *stop* códon na região pré-*core* G1896A. Apesar da presença de mutações relacionadas ao câncer de fígado, o paciente era assintomático. A sorologia negativa para o HBeAg é provavelmente devida a presença da mutação G1896A que inibe a produção deste antígeno (Carman *et al.*, 1989; Omata *et al.*, 1991).

O subgenótipo D3 apresentou os subtipos ayw2, ayw3 e ayw4. Nas sequências HBV/D4 americanas, foram encontrados os subtipos ayw1 e ayw2, além de uma sequência ayw4, sendo a maioria classificada como ayw2 (75%).

Após conhecer a variabilidade dos isolados dos subgenótipos de D circulantes nas Américas, foi feita uma reconstrução filogeográfica para saber a origem dos principais subgenótipos de D dos países americanos. Análises filogeográficas constituem uma abordagem comum em ecologia molecular, ligando processos históricos na evolução de genes amostrados em populações com diferentes distribuições espaciais (Knowles e Maddison, 2002). A taxa evolutiva calculada, a partir da heterogeneidade das datas de coleta e utilizando um modelo de relógio molecular relaxado dos subgenótipos D1-D4, foi de 10^{-5} para os quatro subgenótipos. Não existe um consenso sobre qual taxa evolutiva deve ser utilizada para o HBV, variando de 10^{-4} a 10^{-6} (Michitaka *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Paraskevis *et al.*, 2015) dependendo de qual estratégia e qual fragmento do genoma é utilizado para o cálculo. As taxas calculadas para os subgenótipos D1-D4 geraram datas de ancestrais comuns com um grande intervalo de confiança, representando a incerteza sobre o cálculo desses tMRCA. Este amplo intervalo de confiança pode ser justificado por uma falta de estrutura temporal do HBV.

A reconstrução filogeográfica do HBV/D1 mostrou que a localização mais provável de ser a origem deste subgenótipo foi a Turquia, correspondendo ao resultado obtido no estudo de Zehender e colaboradores em 2012, que também sugeriu a Turquia como origem do subgenótipo D1. De acordo com a análise filogeográfica desta investigação, a origem do HBV/D1 no Brasil se deu mais provavelmente da Síria. Este resultado é reforçado pelo fato de que o Brasil possui a maior colônia árabe fora do Oriente Médio. Estima-se que cerca de 7% da população brasileira seja de origem árabe, sendo a maioria proveniente da Síria e do Líbano. O movimento migratório desses países para o Brasil começou a ser documentado em 1870, sendo a principal causa dessa imigração a intensa perseguição religiosa que os árabes cristãos sofreram pelos muçulmanos no período do Império Otomano (Pitts, 2006). Essa onda migratória árabe provavelmente inseriu o subgenótipo D1 no Brasil. O tMRCA da

sequência brasileira foi datado ao ano 1813 (95% HPD 1675 – 1862), ano mais antigo que o ano do início da migração árabe para o Brasil. O fato de haver apenas uma sequência de genoma completo de HBV/D1 pode ter impedido um cálculo mais acurado da data do tMRCA brasileiro.

O HBV/D1 na Argentina parece ter tido apenas uma inserção, pois suas sequências formam um grupo monofilético, e esta introdução teria ocorrido a partir da Turquia. Assim como no Brasil, a Argentina recebeu um grande número de imigrantes árabes no período entre 1870 e 1930, principalmente Sírios e Libaneses, mas também egípcios, armênios, iraquianos, palestinos e turcos (Alvarez e Pinotti, 2000). Tal informação justificaria a origem turca do HBV/D1 circulante na Argentina. O cálculo do tMRCA das sequências argentinas gerou uma data mais recente do que a que condiz historicamente com a imigração árabe no país (1991, 95% HPD 1958 – 2006). Provavelmente as sequências argentinas compiladas nesta análise não reflitam a diversidade da população ancestral inserida naquela localidade representando isolados recentes circulantes no país.

Para o subgenótipo D2, a análise filogeográfica sugeriu que a localização mais provável de ser a raiz da árvore é a Bélgica; no entanto, com um suporte muito baixo, o que não permitiu afirmar que esse país seria a raiz do HBV/D2. No estudo de Zehender e colaboradores de 2012, onde se buscava a dinâmica espacial do genótipo D no mediterrâneo, foi sugerido que o subgenótipo D2 se originou em algum lugar entre a Ásia Central e a Rússia. Na análise desta investigação as sequências da Argentina e do Brasil formaram um clado que parece ter sua origem no Leste Europeu e Rússia, com um tMRCA remontando ao ano de 1857 (95% HPD 1477 – 1923). O período de 1889 - 1914 foi marcado por intenso fluxo de migração para o Brasil, e, dentre os imigrantes estavam lituanos, bielorrussos, ucranianos, alemães, judeus e russos (Dembicz e Smolana, 1993; Kawka, 1996), que poderiam então ter introduzido o subgenótipo D2 no Brasil.

Os Estados Unidos apresentaram a Índia como a localidade com maior probabilidade de ser a origem do HBV/D2 circulante nesse país, tendo sua principal introdução ocorrido entre 1853 (95% HPD 1470 – 1930) e 1905 (95% HPD 1642 – 1979). Os EUA começaram a receber imigrantes Indianos em 1820, mas um fluxo maior começou em 1990, tornando-os o segundo maior grupo de imigrantes no país. Em 2013, mais de 2 milhões de indianos moravam nos Estados Unidos (Zong e Batalova, 2015). Além disso, o genótipo D é muito prevalente na Índia, que possui pelo menos cinco subgenótipos de D circulantes, (D1, D2, D3, D4 e D5) (Banerjee *et al.*, 2006; Chandra *et al.*, 2009; Banerjee *et al.*, 2014), o que torna provável a introdução desse subgenótipo por imigrantes indianos.

Surpreendentemente, a análise filogeográfica do HBV/D3, realizada neste estudo, propôs que a raiz desse subgenótipo seria o Brasil (com uma baixa probabilidade), sendo o segundo local mais provável o subcontinente Indiano. A origem deste subgenótipo é difícil de determinar, talvez devido a sua grande variabilidade e dispersão pelo mundo. No estudo de Zehender e colaboradores (2012), não foi possível estabelecer com certeza um local de origem para o HBV/D3, mas sugeriu-se como provável origem deste subgenótipo a Ásia Central e a Índia. Este subgenótipo é o mais prevalente no Brasil e, ao observar a análise filogeográfica do genoma completo, percebe-se que as sequências brasileiras ficaram dispersas por toda a árvore, demonstrando a grande variabilidade do subgenótipo, causada provavelmente por múltiplas inserções do D3 no País.

Tendo em vista que já é determinado que os únicos genótipos originários do continente americano F e H (Paraskevis *et al.*, 2013), propõe-se a hipótese que as sequências brasileiras estariam espelhando sequências de populações imigrantes que teriam introduzido este subgenótipo no País. Acredita-se que o HBV/D3 tenha sido trazido ao Brasil por imigrantes europeus. Na investigação de Bertolini e colaboradores (2012), foi sugerido que o genótipo D tenha sido introduzido na Região Sul do Brasil pelos imigrantes europeus que chegaram em massa entre os séculos XIX e XX. Antes da introdução da vacina contra o HBV, identificava-se uma prevalência de intermediária a alta do HBV na Europa, especialmente na Itália (Stroffolini *et al.*, 1988). Segundo o IBGE, mais de 3 milhões de europeus chegaram ao Brasil apenas no período entre 1884 e 1933, havendo entre eles provavelmente portadores crônicos do HBV. Um estudo recente (Gusatti *et al.*, 2015) realizado em Chapecó, no Sul do Brasil, sugere que o HBV/D3 brasileiro tenha sido introduzido por imigrantes italianos, uma vez que a maioria dos infectados com o genótipo D possuía sobrenomes italianos e aproximadamente 66% dos isolados do HBV pertenciam ao subgenótipo D3. O Brasil e a Argentina apresentaram uma forte relação epidemiológica após o cálculo do fator de Bayes. A Argentina, assim como o Brasil, recebeu um grande número de imigrantes Italianos durante os séculos XIX e XX, tendo sido o HBV/D3 provavelmente inserido na Argentina por esses imigrantes. Os tMRCAs calculados mostraram datas antigas, não corroborando com os dados históricos e apresentaram um amplo intervalo de confiança, o que demonstra a incerteza dos cálculos destes tMRCAs. A falta de sequências representando toda a variabilidade do HBV/D3 europeu pode ter limitado esta análise, fazendo com que o Brasil fosse proposto como origem deste subgenótipo.

A reconstrução filogeográfica do HBV/D4 sugeriu que a raiz deste subgenótipo estaria na Martinica. Esta teria sido a origem do HBV/D4 no Haiti, Cuba e Canadá; no

entanto, não houve suporte para a relação epidemiológica entre Brasil e Martinica. A origem do subgenótipo D4 na Martinica não seria compatível com os dados epidemiológicos e, portanto, o mesmo argumento utilizado para a origem do subgenótipo D3 no Brasil poderia ser também aplicado neste caso. No continente americano, este subgenótipo foi encontrado principalmente em populações afrodescendentes onde predomina o subgenótipo africano A1, com exceção de Cuba onde o A2 foi o subgenótipo de A mais detectado (Andernach *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Brichler *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2014; Loureiro *et al.*, 2015), e na população indígena Dene, localizada no oeste da região ártica do Canadá (Osioy *et al.*, 2011). O HBV/D4 foi o subgenótipo dominante na Oceania (Norder *et al.*, 2004) e também descrito no Marrocos (Baha *et al.*, 2012), em Ruanda (Hübschen *et al.*, 2009), na Somália (Norder *et al.*, 2004), no Quênia (Kwange *et al.*, 2013) e em Gana (Candotti *et al.*, 2006). O subgenótipo A1 foi encontrado na maioria dos países da África Oriental, sendo o principal subgenótipo na Somália, Quênia e Ruanda (Kramvis e Knew, 2007; Hübschen *et al.*, 2009), países africanos onde o HBV/D4 também circula. Todavia, o continente africano é subestudado e não há sequências de genoma completo do HBV/D4 de países africanos disponíveis, apenas sequências do gene S.

Brasil e Caribe receberam um grande número de escravos africanos entre os séculos XVI e XIX (Schwartz, 1988; Alencastro, 2000). O Caribe, no século XVIII, já apresentava uma população majoritariamente negra devido aos imensos canaviais baseados na mão-de-obra escrava (Emmer, 1991). Diversos portos de embarque de escravos foram utilizados desde o início do regime escravocrata no Brasil, até sua abolição, no final do século XIX. Cada um desses portos recebia escravos provenientes de uma grande região da África que ia até centenas de quilômetros para o interior do continente. Portanto, a origem étnica dos escravos recebidos no Brasil é muito variada, além de se ter alterado ao longo dos séculos de tráfico (Lago, 2014). A maioria dos escravos trazidos ao Brasil foi proveniente da África Ocidental e Central. No entanto, cerca de 300 a 400 mil escravos foram trazidos do Sudeste da África para o Brasil entre 1837 e 1856, para contornar as leis e tratados que proibiam o comércio transatlântico de escravos (Beachey, 1976; Eltis e Richardson, 2010). Com base nestas evidências, propõe-se uma hipótese para a origem do subgenótipo D4 nas Américas, uma vez que este subgenótipo teria sido introduzido no continente durante o período de tráfico negreiro. Portanto, a origem do HBV/D4 na Martinica demonstrada na árvore filogeográfica estaria espelhando essa população africana ancestral. Outros estudos também sugeriram uma origem africana do HBV/D4 (Andernach *et al.*, 2009; Barros *et al.*,

2014), porém nenhum realizou análise filogeográfica, apenas basearam-se em fatos históricos.

Estes resultados demonstram a importância de se analisar cada subgenótipo separadamente, como foi observado neste estudo eles podem apresentar origens e características distintas. Além disso, é necessário ter cautela ao analisar o resultado da filogeografia, combinando-os com conhecimentos históricos e epidemiológicos.

VII – CONCLUSÕES

- A pesquisa de sequências genômicas do HBV de genótipo D das Américas disponíveis no GenBank identificou a circulação deste genótipo nos seguintes países: Argentina, Brasil, Canadá, Chile, Colômbia, Cuba, EUA, Groelândia, Haiti, Martinica e Venezuela;
- Foi identificado, a circulação dos subgenótipos D1, D2, D3, D4, e D7 nas Américas, com frequências distintas nos países do continente. No Brasil, circulam os subgenótipos D1, D2, D3 e D4, com uma maior frequência do D3 (56%);
- Foram sequenciados 45 genomas completos brasileiros, provenientes das cinco regiões geográficas brasileiras e representativos dos quatro subgenótipos circulantes no País (D1 = 1; D2 = 11; D3 = 32; D4 = 1);
- Nenhuma mutação relacionada ao hepatocarcinoma foi detectada nas sequências analisadas do subgenótipo D1 das Américas, o que pode sugerir que no continente circulariam isolados de D1 com menor potencial carcinogênico do que no restante do mundo;
- O subgenótipo D1 apresentou apenas o subtipo ayw2; para o D2 foram detectados os subtipos ayw2, ayw3, ayw4 e, surpreendentemente, o adr_q+, descrito anteriormente apenas para o genótipo C; D3 apresentou os subtipos ayw2, ayw3, ayw4; e D4 ayw1, ayw2, ayw4;
- Pela análise filogeográfica foi possível sugerir que o subgenótipo D1 teria entrado nas Américas inicialmente pelo Brasil a partir da Síria e, posteriormente, na Argentina pela Turquia. Já a introdução do subgenótipo D2 teria ocorrido pelo Brasil e Argentina com origem a partir do Leste Europeu e Rússia. As sequências D2 dos EUA seriam mais recentes e com origem na Índia;
- Não foi possível por meio da filogeografia identificar a origem dos subgenótipos D3 e D4 nas Américas. Entretanto, baseando-se em dados históricos e epidemiológicos, propõe-se a hipótese de que o D3 teria sido introduzido no continente por imigrantes europeus, enquanto o D4 por escravos africanos.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdou Chekaraou M, Brichtler S, Mansour W, Le Gal F, Garba A, Dény P, Gordien E. A novel hepatitis B virus (HBV) subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains. *J Gen Virol.* 2010; 91: 1609-1620.

Akaike H. A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on.* 1974; 19(6): 716-723.

Alencastro LF. O trato dos viventes. Formação do Brasil no Atlântico Sul, séculos XVI e XVII. São Paulo: Companhia das Letras, 2000, p. 69.

Alestig E, Soderstrom A, Norkrans G, Lindh M. Genetic diversity of genotype D3 in acute hepatitis B. *J Med Virol.* 2013; 85:1148-1154.

Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia-antigen positive hepatitis. *Lancet.* 1971; 2(7736):1225-1227.

Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. *J Gen Virol.* 2010; 91: 501-508.

Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, Pinho JR. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: a Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol.* 2011; 11: 103-108.

Alvarado-Mora MV, Pinho JR. Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antivir Ther.* 2013; 18(3 Pt B):459-465.

Alvarez M e Pinotti L. A la mesa. Ritos y retos de la alimentación argentina. Buenos Aires, Grijalbo, 2000.

Andernach IE, Nolte C, Pape JW, Muller CP. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:1222–1228.

Andernach IE, Hunewald OE, Muller CP. Bayesian inference of the evolution of HBV/E. *PLoS One.* 2013; 29;8(11):e81690.

Andersson MI, Low N, Irish CJ, Carrington D, Hickman M, Myers R, *et al.* Molecular epidemiology of a large community-based outbreak of hepatitis B in Bristol, U.K. *J Clin Virol.* 2012;53(2):125-129.

Anisimova M e Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol.* 2006 Aug;55(4):539-552.

Anzola M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat.* 2004; 11(5):383-393.

Araujo NM, Mello FC, Yoshida CF, Niel C, Gomes SA. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B Virus. *Arch Virol.* 2004; 149(7):1383-1395.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnus LO. Genotype F prevails in HBV infected patients of Hispanic origin in Central America and may carry the *precore* stop mutant. *J Med Virol.* 1997; 51:305-312.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* 2002; 83: 2059-2073.

Asim M, Malik A, Sarma MP, Polipalli SK, Begum N, Ahmad I, *et al.* Hepatitis B virus BCP, *Precore/core*, X gene mutations/genotypes and the risk of hepatocellular carcinoma in India. *J Med Virol.* 2010; 82: 1115-1125.

Avice, J. *Phylogeography: The History and Formation of Species.* USA: President and Fellows of Harvard College. 2000. ISBN 0-674-66638-0.

Baha W, Ennaji MM, Lazar F, Melloul M, El Fahime E, ElMalki A, *et al.* HBV genotypes prevalence, *precore* and basal *core* mutants in Morocco. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1157-1162.

Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via fecal-oral route. *Intervirology;* 1983; 20(1):23-31.

Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol.* 1972; 109(4):842-48.

Banerjee A, Kurbanov F, Datta S, Chandra PK, Tanaka Y, Mizokami M, Chakravarty R. Phylogenetic relatedness and genetic diversity of hepatitis B virus isolates in Eastern India. *J Med Virol.* 2006; 78: 1164-1174.

Banerjee P, Mondal RK, Nandi M, Ghosh S, Khatun M, Chakraborty N, *et al.* A rare HBV subgenotype D4 with unique genomic signatures identified in North-Eastern India – An Emerging Clinical Challenge? *Plos One.* 2014; 9(10): e109425.

Barros LMF, Gomes-Gouvea M, Kramvis A, Mendes-Correa MCJ, Dos Santos A, Souza LA, *et al.* High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhao state, Northeast Brazil. *Infect genet Evol.* 2014;24C:68-75.

Bayer ME, Blumberg BS, Werner B. Particles associated with Australian antigen in the sera of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature;* 1968; 218, 1057-1059.

Beachey RW. The slave trade of eastern Africa. London: Rex Collings. 1976; 324 p

Beasley RP, Hwang LY, Lee GC, Lan CC, Roan CH, Huang FY, *et al.* Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. *Lancet.* 1983; 2(8359):1099-1102.

Beasley RP e Hwang L-Y. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, editors. *Viral Hepatitis and Liver Disease.* Orlando, FL: Grune & Stratton. 1984; 209-244.

Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol.* 2006 Jun;87(Pt 6):1439-1449.

Bertolini DA, Gomes-Gouvêa MS, Carvalho-Mello IM, Saraceni CP, Sitnik R, Graziotin 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; 12:1295–1304

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A “new” antigen in leukemic sera. *JAMA;* 1965.15; 191:541-546.

Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, *et al.* A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med.* 1967; 66(5):924-931.

Blumberg BS, Larouze B, London WT, Werner B, Hesser JE, Millman I, *et al.* The relation of infection with the hepatitis B virus to primary hepatic carcinoma. *Am J Pathol.* 1975; 81: 669–682.

Bollyky PL, Rambaut A, Grassly N, Carman WF, Holmes EC. Hepatitis B virus has a recent new world evolutionary origin. *J Hepatol*; 1998; 28: 96.

Bosh FX, Ribes J, Diaz M, Veries R. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127:S5-16.

Bozdayi G, Türkyilmaz AR, Idilman R, Karatayli E, Rota S, Yurdaydin C, Bozdayi AM. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from Turkish patients with chronic HBV infection. *J Med Virol*.2005; 76: 476-481.

Brasil, Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. 2011

Brichler S, Lagathu G, Chekaraou MA, Le Gal F, Edouard A, Dény P, *et al*. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J Gen Virol*. 2013; 94(Pt 10):2318-2329.

But DY, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(11):1652-1656.

Buti M, Rodriguez-Frias F, Jardi R, Esteban R. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of precore mutants and HBV genotypes. *J Clin Virol*. 2005; 34 Suppl 1: S79-S82.

Candotti D, Opare-Sem O, Rezvan H, Sarkodie F, Allain JP. Molecular and serological characterization of hepatitis B virus in deferred Ghanaian blood donors with and without elevated alanine aminotransferase. *J Viral Hepat*. 2006; 13:715–724.

Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*. 1989; 2: 588-591.

Casey JL, Niro GA, Engle RE, Vega A, Gomez H, McCarthy M, Watts DM, Hyams KC, Gerin JL. 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: 920-926.

Castilho Mda C, Oliveira CM, Gimaque JB, Leão JD, Braga WS. Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus infection in isolated villages in the Western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87(4):768-774.

- Chan HL, Hui AY, Wong ML, Tse AM, Hung LC, Wong VW, Sung JJ. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2004; 53(10):1494-1498.
- Chan HL, Tse CH, Mo F, Koh J, Wong VW, Wong GL, *et al*. High viral load and hepatitis B virus subgenotype ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008; 26(2):177-182.
- Chandra PK, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Panigrahi R, *et al*. Subgenotypes of hepatitis B virus genotype D (D1, D2, D3 and D5) in India: differential pattern of mutations, liver injury and occult HBV infection. *J Viral Hepat*. 2009; 16: 749-756.
- Chen CH, Changchien CS, Lee CM, Hung CH, Hu TH, Wang JH, *et al*. Combined mutations in pre-s/surface and *core* promoter/precore regions of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma: a case control study. *J Infect Dis*. 2008;198:1634-1642.
- Chen CJ, Yang HI, Su J *et al*. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. 2006; 295(1):65-73.
- Chen WN e Oon CJ. Human hepatitis B virus mutants: significance of molecular changes. *FEBS Lett*. 1999 Jun 25;453(3):237-242.
- Chisari FV e Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*.1995; 13: 29-60.15.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, *et al*. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989; 244(4902):359-362.
- Cooper RD, Wiebe N, Smith N, Keiser P, Naicker S, Tonelli M. Systematic review and meta-analysis: renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis*. 2010; 51(5):496-505.
- Christensen PB, Krarup HB, Niesters HG, Norder H, Schaffalitzky de Muckadell OB, Jeune B, *et al*. Outbreak of Hepatitis B among injecting drug users in Denmark. *J Clin Virol*. 2001;22(1):133-141.
- Ciccozzi M, Babakir-Mina M, Lo Presti A, Salpini R, Cella E, Gabanelli E, Teoharov P, Kevorkyan A, Perno CF, Zehender G, Ciotti M. Molecular analysis of hepatitis B virus in Bulgaria. *J Med Virol*. 2013; 85: 49-54.

Ciccozzi M, Ciccaglione AR, Lo Presti A, Equestre M, Cella E, *et al.* Evolutionary dynamics of HBV-D1 genotype epidemic in Turkey. *J Med Virol.* 2014; 86(1):109-116.

Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med.* 2003; 3(6):573-588.

Couroucé-Pauty AM, Plançon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang.* 1983; 44: 197-211.

Coursaget P, LeCann P, Leboulleux D, Diop MT, Bao O, Coll AM. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in HBsAg negative Senegalense patients suffering from cirrhosis or primary liver cancer. *FEMS Microbiol Lett.*1991; 67:35-39.

Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R. Molecular Biology of the hepatitis B Virus for clinicians. *J Clin Exp Hepatol.* 2012; 2(4):353-365.

De Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E, Colzani D, Schiavini M, Milazzo L, *et al.* High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology.*2007;365(1):113-124.

Dembicz A e Smolana K. La presencia polaca en América Latina. Varsóvia: Centro de Estudos Latino-Americanos/Universidade de Varsóvia. 1993.

Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, Poblete F, Gutierrez MF, Botto C, Pujol FH. Subgenotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol.* 2008; 80: 20-26.

Di Lello FA, Piñeiro Y Leone FG, Muñoz G, Campos RH. Diversity of hepatitis B and C viruses in Chile. *J Med Virol.* 2009; 81: 1887-1894.

Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 2006; 4:e88.

Drummond A, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol.* 2012; 22:1185-1192.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012; 29:1969-1973.

Dryden KA, Wieland SF, Whitten-Bauer C, Gerin JL, Chisari FV, Yeager M. Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol Cell.*2006;22(6):843–850

Elghouzzi MH, Couroucé AM, Magnius LO, *et al.* Transmission of hepatitis B virus by HBV-negative blood transfusion. *Lancet*. 1995; 7;346(8980):964.

Eltis D, Richardson D. Atlas of the transatlantic slave trade. New Haven and London: Yale University Press. 2010; 307 p.

Emmer PC. "The Dutch and the making of the second atlantic system". In: Solow B. (org.). Slavery and the rise of the Atlantic System. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

EASL. European Association for the Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2012; 57: 167–185.

Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ, Wei SC, Chen QY, Fang KX, *et al.* Hepatitis B virus pre-S deletion mutations are a risk factor for hepatocellular carcinoma: a matched nested case-control study. *J Gen Virol*. 2008; 89(Pt 11):2882-2890.

Fares MA, Holmes EC. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol*. 2002; 54: 807-814.

Farrel GC. Chronic viral hepatitis. *Gastroenterology*. 1998; 168:619-626.

Fattovich G, Giustina G, Favarato S, Ruol A. A survey of adverse events in 11,241 patients with chronic viral hepatitis treated with alfa interferon. *J Hepatol*. 1996; 24(1):38-47.

Fattovich G, Giustina G, Realdi G, Corrocher R, Schalm SW. Long-term outcome of hepatitis B e antigen-positive patients with compensated cirrhosis treated with interferon alfa. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). *Hepatology*. 1997; 26(5):1338-42.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger, U, Ball, LA, eds. Virus Taxonomy: Eight report of the International Committee of Taxonomy of viruses. Hepadnaviridae. San Diego, Calif: Elsevier Academic Press; 2005; 373-384.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*. 1973; 182(116):1026-1028.

Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene*. 2002; 21(16):2593-604.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM, GLOBOCAN 2000. Cancer incidence mortality and prevalence worldwide. IARC Press. 2001.

Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol.* 2003; 39 Suppl 1: S36-S42.

Fisker N, Pedersen C, Lange M, Nguyen NT, Nguyen KT, Georgsen J, *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis B virus infections in Denmark. *J Clin Virol.* 2004;31(1):46-52.

Flichman DM, Blejer JL, Livellara BI, Re VE, Bartoli S, *et al.* Prevalence and trends of markers of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human Immunodeficiency virus in Argentine blood donors. *BMC Infect Dis.* 2014 Apr 23;14(1):218.

Forbi JC, Vaughan G, Purdy MA, Campo DS, Xia GL, Ganova- Raeva LM, *et al.* Epidemic history and evolutionary dynamics of hepatitis B virus infection in two remote communities in rural Nigeria. *PLoS One.* 2010; 5: e11615

François G, Kew M, Van Damme P, Mphahlele MJ, Meheus A. Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications. *Vaccine;* 2001; 19:3799-3815.

Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, *et al.* Outbreak of infections by hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in patients coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol.* 2011; 49:1017-1024.

Gaillard RK, Barnard J, Lopez V, Hodges P, Bourne E, Johnson L, *et al.* Kinetic analysis of wild-type and YMDD mutant hepatitis B virus polymerases and effects of deoxyribonucleotide concentrations on polymerase activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(4):1005-1013.

Ganem D. Hepadnaviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PN, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Strauss SE. *Fields Virology.* Filadélfia: Lippincott-Raven, 1996, 2703-2737.

Ganem D e Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med.* 2004; 350:1118-1129.

Ganem D e Varmus HE. The molecular biology of hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem;* 1987; 56:651-693.

Garcia P, Ou J, Rutter WJ, Walter P. Targeting of precore protein of hepatitis B virus to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol.* 1988; 106: 1093-1104.

Gardner HT. A note on the history of epidemic viral hepatitis in Germany. *Am J Med.*1950; 8: 561-564.

Garmiri P, Rezvan H, Abolghasemi H, Allain JP. Full genome characterization of hepatitis B virus strains from blood donors in Iran. *J Med Virol.*2011; 83: 948-952.

Gerlish WH e Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell*; 1980; 21:801-809.

Ghosh S, Banerjee P, Deny P, Mondal RK, Nandi M, Roychoudhury A, Das K, Banerjee S, Santra A, Zoulim F, Chowdhury A, Datta S. New HBV subgenotype D9, a novel D/C recombinant, identified in patients with chronic HBeAg-negative infection in Eastern India. *J Viral Hepat.*2013; 20: 209-218.

Glebe D e Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis.* 2013; 33:103–112.

Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(27):4300-4308.

Gonçales FL. Hepatite por vírus B. In: Focaccia R. *Tratado das Hepatites Virais.* São Paulo: Atheneu, 1997, 27-49.

Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, Chevallier M, Chevallier P, Pichoud C, *et al.* Rapid detection of genotypes and mutations in the *precore* promoter and the *pre-core* region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. *J Hepatol.* 2000;33(3):430-439.

Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, and Chisari FV. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol.*1995; 69: 6158-6169.

Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, and Chisari FV. 1999. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science.*1999; 284: 825-829.

Guindon S e Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003; 52(5):696-704.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010; 59(3):307-321.

Gunther S, Li BC, Misk S, Kruger DH, Meisel H, Will H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol.* 1995; 69, 5437-5444.

Guo X, Jin Y, Qian G, Tu H. Sequential accumulation of the mutations in *core* promoter of hepatitis B virus is associated with the development of hepatocellular carcinoma in Qidong, China. *J Hepatol.* 2008; 49(5):718-725.

Gusatti CS, Costi C, Halon ML, Grandi T, Medeiros AF, Silva CM, *et al.* Hepatitis B virus genotype D isolates circulating in Chapecó, Southern Brazil, Originate from Italy. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135816.

Hadziyannis SJ e Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2001;34 (4 pt.1):617-624

Hannoun C, Horal P, Lindh M. Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. *J Gen Virol.* 2000; 81: 75-83.

Harrison A, Lemey P, Hurler M, Moyes C, Horn S, Pryor J, Malani J, Supuri M, Masta A, Teriboriki B, Toatu T, Penny D, Rambaut A, Shapiro B. Genomic analysis of hepatitis B virus reveals antigen state and genotype as sources of evolutionary rate variation. *Viruses.* 2011; 3: 83-101.

Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol.* 1984; 52(2): 396-402.

Hollinger FB. in: Fields BN, Knipe DM, *et al.* *Fields Virology.* Lippincott-Raven.1996; 2(85):2739-2807.

Holmes EC. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annu Rev Microbiol.*2008; 62:307-328.

Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, *et al.* Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology.*2013; 58: 98–107.

Hu X, Margolis HS, Purcell RH, et al. Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(4):1661-1664.

Hübschen JM, Mugabo J, Peltier CA, Karasi JC, Sausy A, Kirpach P, et al. Exceptional genetic variability of hepatitis B virus indicates that Rwanda is east of an emerging African genotype E/A1 divide. *J Med Virol*. 2009; 81(3):435-440.

Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology*. 2000; 31, 1037–1044.

Hurlburt KJ, McMahon BJ, Simonetti J, Livingston SE, Bulkow LR, Snowball MM, et al. Hepatitis B-associated vasculitis in Alaska Natives: viral genotype, clinical and serologic outcome. *Liver Int*. 2007;27:627-632.

Iannacone M, Sitia G, Isogawa M, Marchese P, Castro MG, Lowenstein PR, Chisari FV, Ruggeri ZM, and Guidotti LG. Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nat Med*. 2005; 11: 1167-1169.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Hepatitis viruses. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks. 1994; 59: 66–97.

IBGE. Brasil: 500 anos de povoamento, second ed. Rio de Janeiro. 2007.

IBGE. Brasil: 500 anos de povoamento. Apêndice: Estatísticas de 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro, 2000; p. 226.

ICTV. Virus Taxonomy: 2014 release. Hepadnaviridae. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>. Acesso em: 14 de mar. 2016.

Iqbal K, Klevens RM, Kainer MA, Baumgartner J, Gerard K, et al. Epidemiology of Acute Hepatitis B in the United States From Population-Based Surveillance, 2006-2011. *Clin Infect Dis*. 2015; 61(4):584-592.

Janssen HLA, van Zonneveld M, Senturk H, et al; HBV 99-01 Study Group. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomized trial. *Lancet* .2005; 365: 123–129.

Kahila Bar-Gal G, Kim MJ, Klein A, Shin DH, Oh CS, Kim JW, Kim TH, Kim SB, Grant PR, Pappo O, et al. Tracing hepatitis B virus to the 16th century in a Korean mummy. *Hepatology*. 2012; 56: 1671–1680.

- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*.2000; 118: 554-559.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology*. 2003; 124: 327–334.
- Kao JH e Chen DS. Changing disease burden of hepatocellular carcinoma in the Far East and Southeast Asia. *Liver Int*. 2005; 25, 696–703.
- Kao JH. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *Korean J Intern Med*. 2011; 26: 255-261.
- Kass RE e Raftery AE. Bayes Factors. *J. Amer. Statist. Assoc*. 1995; 90(430):773-795.
- Kawka M. A presença polonesa no Brasil. In *Relações entre Polônia e Brasil - Passado e presente*. Varsóvia: Centro de Estudos Latino-Americanos/Universidade de Varsóvia. 1996; ed. Andrzej Dembicz e Marcin Kula, p. 39-52.
- Kay A e Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res*. 2007; 127(2):164-176.
- Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathol Biol*. 2010; 58(4):273-277.
- Khan A, Tanaka Y, Saito H, Ebinuma H, Sekiguchi H, *et al*. Transmission of hepatitis B virus (HBV) genotypes among Japanese immigrants and natives in Bolivia. *Virus Res*. 2008; 132: 174-180.
- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol*. 2002; 83(6): 1267–80.
- Kiire CF. The epidemiology and prophylaxis of hepatitis B in sub-Saharan Africa: a view from tropical and subtropical Africa. *Gut*.1996; 38:05-12.
- Kilpatrick AM, Daszak P, Goodman SJ, Rogg H, Kramer LD, *et al*. Predicting pathogen introduction: West Nile virus spread to Galápagos. *Conserv. Biol*. 2006; 20:1224-1231.
- Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*. 1991; 351:317-320.

Kim HJ, Park JH, Park DI, *et al.* The influence of YMDD mutation patterns on clinical outcomes in patients with adefovir add-on lamivudine combination treatment. *Liver Int.* 2012; 32(2):303-310.

Kim WH, Hong F, Jaruga B, Zhang ZS, Fan SJ, Liang TJ, Gao B. Hepatitis B virus X protein sensitizes primary mouse hepatocytes to ethanol- and TNF-alpha-induced apoptosis by a caspase-3-dependent mechanism. *Cell Mol Immunol*; 2005; 2:40-48.

Kitab B, El Feydi AE, Afifi R, Derdabi O, Cherradi Y, Benazzouz M, Rebbani K, Brahim I, Salih Alj H, Zoulim F, Trepoc, Chemin I, Ezzikouri S, Benjelloun S. Hepatitis B genotypes/subgenotypes and MHR variants among Moroccan chronic carriers. *J Infect.* 2011 Jul;63(1):66-75.

Klingmuller U e Schaller H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol*, 1993, 67: 7414-7422.

Knowles LL e Maddison WP. Statistical Phylogeography. *Mol Ecol.* 2002; 11: 2623-2635.

Kobayashi M, Suzuki F, Arase Y, Akuta N, Suzuki Y, Hosaka T, *et al.* Infection with hepatitis B virus genotype A in Tokyo, Japan during 1976 through 2001. *J Gastroenterol.* 2004; 39(9):844-850.

Kowalec K, Minuk GY, Børresen ML, Koch A, McMahon BJ, Simons B and Osiowy C. Genetic diversity of hepatitis B virus genotypes B6, D and F among circumpolar indigenous individuals. *J Viral Hepatitis.* 2013; 20(2): 122–130.

Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine.* 2005; 23: 2409-2423.

Kramvis A, Paraskevis D. Subgenotype A1 of HBV-- tracing human migrations in and out of Africa. *Antivir Ther.* 2013;18(3 Pt B):513-521.

Krugman S. Hepatitis B: historical aspects. *Am J Infect Control.* 1989; 17(3):165-167.

Kwange SO, Budambula NL, Kiptoo MK, Okoth F, Ochwoto M, *et al.* Hepatitis B virus subgenotype A1, occurrence of subgenotype D4, and S gene mutations among voluntary blood donors in Kenya. *Virus Genes.* 2013; 47: 448–455.

Lago BV. Os genótipos do vírus da hepatite B na África e no Brasil: Evolução, disseminação e associação com a rota de escravos. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz; 2014.

Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB e Rico-Hesse R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 12;95(10):5757-5761.

Lara-Pezzi E, Majano PL, Gomez-Gonzalo M, Garcia-Monzo'n C, Moreno-Otero R, Levrero M, Lo'pez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes. Hepatology. 1998; 28:1013–1021.

Laub O, Rall LB, Truett M, et al. Synthesis of hepatitis B surface antigen in mammalian cells: expression of the entire gene and the coding region. J Virol; 1983; 48(1):271-280.

Lazarevic I, Cupic M, Delic D, Svirtlih NS, Simonovic J, Jovanovic T. Distribution of HBV genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes among chronically infected patients in Serbia. Arch Virol. 2007; 152: 2017-2025.

Lee MJ, Jin YH, Kim K, Choi Y, Kim HC, Park S. Expression of hepatitis B virus x protein in hepatocytes suppresses CD8⁺ T cell activity. Immune Net. 2010; 10(4):126-134.

Le Bouvier GL. The heterogeneity of Australia antigen. J Infect Dis. 1971; 123(6):671-675.

Le Bouvier GL, McCollum RW, Hierholzer WJ, Irwin GR, Krugman S, Giles JP. Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus. JAMA. 1972; 222: 928-930.

Levene C e Blumberg BS. Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. Nature. 1969; 221(5176):195-196.

Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, *et al*, Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. N Engl J Med. 2004; 351: 1521–1531.

Liaw YF, Leung N, Kao JH, Piratvisuth T, Gane E, Han KH, Guan R, Lau GK, Locarnini S. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. Hepatol Int. 2008; 2(3):263-283.

Liaw YF, Gane E, Leung N, *et al*; GLOBE Study Group. 2-Year GLOBE trial results: telbivudine is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology. 2009; 136: 486–495.

Liaw YF, Kao JH, Piratvisuth T, *et al*. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update. Hepatol Int. 2012; 6: 531-561.

Lien JM, Petcu DJ, Aldrich CE, Mason WS. Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J Virol.* 1987; 61 (12):3832-3840.

Lin CL e Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 1:123-130.

Lin S, Liu C, Shang H, Chen H, Yang B, Chen J, Chen Y, Chen D, Ou Q. HBV serum markers of 49164 patients and their relationships to HBV genotype in Fujian Province of China. *J Clin Lab Anal.* 2013; 27: 130-136.

Liu CJ e Kao JH. Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J. *Semin Liver Dis.* 2013; 33: 97-102.

Liu S, Zhang H, Gu C, Yin J, He Y, Xie J, *et al.* Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101:1066-1082.

Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE, *et al.* Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *J Infect Dis.* 2007; 195: 5-11.

Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis.* 2003; 23:5–20.

Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Biol.* 2013; 23, 561–575.

Lok AS e McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology.* 2009; 50: 661–662.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, *et al.* Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.* 1999; 73(1):152-160.

Loureiro CL, Aguilar JC, Aguiar J, Muzio V, Pentón E, Garcia D, *et al.* HBV Genotypic Variability in Cuba. *PLoS ONE.* 2015; 10(3): e0118959.

MacCallum FO. Early studies of viral hepatitis. *Br Med Bull.* 1972; 22 (2):105-13.

MacDonald DM, Holmes EC, Lewis JC, Simmonds P. Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. *J Virol.* 2000; 74: 4253-4257.

Magnius LO e Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*. 1995; 38: 24-34.

Marcellin P, Gane E, Buti M, *et al.* Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet*. 2013; 381: 468-475.

Mast EE, Alter MJ, Margolis HS. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine*. 1999; 17(13-14):1730–1733.

McDonald SA, Hutchinson SJ, Bird SM, Robertson C, Mills PR, Dillon JF, Goldberg DJ. A record-linkage study of the development of hepatocellular carcinoma in persons with hepatitis C infection in Scotland. *Br J Cancer*. 2008; 99(5):805-810.

McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, *et al.* Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis*. 1985; 151(4):599–603.

McMahon BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatology Int*. 2009; 3:334-342.

Meldal BH, Moula NM, Barnes IH, Boukef K, Allain JP. A novel hepatitis B virus subgenotype, D7, in Tunisian blood donors. *J Gen Virol*. 2009; 90: 1622-1628.

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

Mello FM, Kuniyoshi AS, Lopes AF, Gomes-Gouvêa MS, Bertolini DA. Hepatitis B virus genotypes and mutations in the basal core promoter and pre-core/core in chronically infected patients in southern Brazil: a cross-sectional study of HBV genotypes and mutations in chronic carriers. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47(6):701-708.

Mendonça JS, Vigani AG. História natural da hepatite B aguda e crônica. In: *A Revista Brasileira de Doenças Infecciosas – I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Diagnóstico e Manuseio da Hepatite B (e Delta)*; 2006; 10(1):15-18.

Michitaka K, Tanaka Y, Horiike N, Duong TN, Chen Y, Matsuura K, Hiasa Y, Mizokami M, Onji M. Tracing the history of hepatitis B virus genotype D in western Japan. *J Med Virol*. 2006; 78: 44-52.

Milich DR e McLachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. 1986; 234(4782):1398-1401.

Miyakawa Y e Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. Intervirology. 2003; 46: 329–338.

Moraes MT, Niel C, Gomes SA. A polymerase chain reaction-based assay to identify genotype F of hepatitis B virus. Braz J Med Biol Res. 1999;32(1):45-49.

Moresco MN, Virgolino HD, de Moraes MP, da Motta-Passos I, Gomes-Gouvêa MS, de Assis LM, *et al.* Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. Vox Sang. 2014; 107(1):19-25.

Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. J Gastroenterol. 2001; 36(10):651-60.

Murhekar MV, Murhekar KM, Sehgal SC. Epidemiology of hepatitis B virus infection among the tribes of Andaman and Nicobar Islands, India. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; 102: 729-734.

Nabuco LC, Mello FC, Gomes Sde A, Perez RM, Soares JA, Coelho HS, Nogueira CA. Hepatitis B virus genotypes in Southeast Brazil and its relationship with histological features. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107: 785-789.

Nassal M e 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):4307-4315.

Nassal M e Schaller H. Hepatitis B virus replication--an update. J Viral Hepat. 1996; 3(5):217-226.

Neurath AR, Kent SBH, Strick N, Parker K. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. Cell, 1986, 46: 429-436.

Ninomiya M, Takahashi M, Shimosegawa T, *et al.* Analysis of the entire genomes of fifteen torque teno midi virus variants classifiable into a third group of genus Anellovirus. Arch Virol. 2007; 152(11):1961-1975.

Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, *et al.* A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post transfusion hepatitis of unknown etiology. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 241(1):92-97.

Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 12): 3141-3145.

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

Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004; 47: 289-309.

Oh IS e Park SH. Immune-mediated Liver Injury in Hepatitis B Virus Infection. *Immune Netw*. 2015; 15(4):191-198

Okochi K e Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang*. 1968; 15(5):374-385.

Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med*; 1991; 324: 1699-1704.

Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, Gojobori T. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 7059-7062.

Osiowy C, Larke B, Giles E. Distinct geographical and demographic distribution of hepatitis B virus genotypes in the Canadian Arctic as revealed through an extensive molecular epidemiological survey. *J Viral Hepat*. 2011;18(4):e11-9.

Osiowy C, Giles E, Trubnikov M, Choudhri Y, Andonov A. Characterization of Acute and Chronic Hepatitis B Virus Genotypes in Canada. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136074.

Palumbo E, Scotto G, Faleo G, Cibelli DC, Angarano G. Prevalence of HBV genotypes in South American immigrants affected by HBV-related chronic active hepatitis. *Braz J Infect Dis*. 2007; 11: 311-313.

Panduro A, Maldonado-Gonzalez M, Fierro NA, Roman S. Distribution of HBV genotypes F and H in Mexico and Central America. *Antivir Ther*. 2013; 18(3 Pt B):475-484.

Panessa C, Hill WD, Giles E, Yu A, Harvard S, Butt G, *et al.* Genotype D amongst injection drug users with acute hepatitis B virus infection in British Columbia. *J Viral Hepat.* 2009; 16(1):64-73.

Papatheodoridis GV, Dimou E, Papadimitropoulos V. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance. *Am J Gastroenterol*; 2002; 97(7):1618-1628.

Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SY, Belshaw R, Allain JP, Hatzakis A. Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology.* 2013; 57: 908-916.

Paraskevis D, Angelis K, Magiorkinis G, Kostaki E, Ho SY, Hatzakis A. Dating the origin of hepatitis B virus reveals higher substitution rate and adaptation on the branch leading to F/H genotypes. *Mol Phylogenet Evol.* 2015; Dec; 93:44-54.

Pezzano SC, Torres C, Fainboim HA, Bouzas MB, Schroder T, Giuliano SF, *et al.* Hepatitis B virus in Buenos Aires, Argentina: genotypes, virological characteristics and clinical outcomes. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):223-231.

Piñeiro Y Leone FG, Pezzano SC, Torres C, Rodríguez CE, Eugenia Garay M, Fainboim HA, *et al.* Hepatitis B virus genetic diversity in Argentina: dissimilar genotype distribution in two different geographical regions; description of hepatitis B surface antigen variants. *J Clin Virol.* 2008;42(4):381-388.

Pitts MB Jr. Forging Ethnic Identity Through Faith: Religion And The Syrian-Lebanese Community In São Paulo. Nashville. Thesis [Master of Arts in Latin American Studies] - Faculty of the Graduate School of Vanderbilt University; 2006.

Pollack JR e Ganem D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J Virol*; 1993; 67(6):3254-3263.

Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol.* 2008 Jul; 25(7):1253-1256.

Prasetyo AA, Dirgahayu P, Sari Y, Hudiyo H, Kageyama S. Molecular epidemiology of HIV, HBV, HCV, and HTLV-1/2 in drug abuser inmates in central Javan prisons, Indonesia. *J Infect Dev Ctries.* 2013; 7: 453-467.

Quasdorff M., Hosel M, Odenthal M, Zedler U, Bohne F, Gripon P, Dienes HP, Drebber U, Stippel D, Goeser T, Protzer U. A concerted action of HNF4 α and HNF1 α links hepatitis B virus replication to hepatocyte differentiation. *Cell Microbiol.* 2008; 10: 1478-1490.

Ramachandran S, Purdy MA, Xia GL, Campo DS, Dimitrova ZE, Teshale EH, *et al.* Recent population expansions of hepatitis B virus in the United States. *J Virol.* 2014; 88(24):13971-13980.

Rehermann B e Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 215-229.

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

Rizzetto M. Viral hepatitis in the third millenium. *Res Virol.* 1998; 149: 251-256.

Robertson BH e Margolis HS. Primate hepatitis B viruses – genetic diversity, geography and evolution. *Rev Med Virol.* 2001; 12(3): 133-141.

Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol.* 1974; 14:384–391.

Robinson WS e Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B. *N Engl J Med.* 1976; 295(22):1232-1236.

Roman S e Panduro A. HBV endemicity in Mexico is associated with HBV genotypes H and G. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 5446-5453.

Roman S, Tanaka Y, Khan A, Kurbanov F, Kato H, Mizokami M, Panduro A. Occult hepatitis B in the genotype H-infected Nahuas and Huichol native Mexican population. *J Med Virol.* 2010; 82: 1527-1536.

Sagnelli C, Ciccozzi M, Pisaturo M, Zehender G, Lo Presti A, Alessio L, *et al.* Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus Genotypes Circulating in Acute Hepatitis B Patients in the Campania Region. *J Med Virol.* 2014; 86(10):1683-1693.

Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, *et al.* Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. *J Viral Hepat.* 2013; 20: e27-e36.

Sánchez LV, Maldonado M, Bastidas-Ramírez BE, Norder H, Panduro A. Genotypes and S-gene variability of Mexican hepatitis B virus strains. *J Med Virol.* 2002; 68: 24-32.

Sánchez LV, Tanaka Y, Maldonado M, Mizokami M, Panduro A. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of mexican patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G. *Intervirology.* 2007; 50: 9-15.

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

Santos DC, Martinho JM, Pacheco-Moreira LF, Araújo CC, Oliveira BC, Lago BV, *et al.* Fulminant hepatitis failure in adults and children from a Public Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2009; 13(5):323-329.

Scaglione SJ e Lok AS. Effectiveness of hepatitis B treatment in clinical practice. *Gastroenterology.* 2012; 142: 1360–1368.

Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World JGastroenterol.*2007; 13: 14-21.

Schulze-Bergkamen H, Untergasser A, Dax A, Vogel H, Buchler P, Klar E, Lehnert T, Friess H, Buchler MW, Kirschfink M, Stremmel W, Krammer PH, Muller M, and Protzer U. Primary human hepatocytes--a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2003; 38: 736-744.

Schwartz S. Segredos internos. Engenhos e escravos na sociedade colonial, 1550-1835. São Paulo: Companhia das Letras, 1988, pp. 22-73.

Schwarz KB, Cloonan YK, Ling SC, Murray KF, Rodriguez-Baez N, Schwarzenberg SJ, *et al.* Children with Chronic Hepatitis B in the United States and Canada. *J Pediatr.* 2015; 167(6):1287-1294.e2.

Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science.* 1986; 232 (4749): 477-484.

Seeger C e Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev;* 2000; 64(1):51-68.

Seitz S, Urban S, Antoni C, Böttcher B. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J.* 2007;26(18):4160–4167

Sells MA, Chen ML, and Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc. Natl Acad Sci USA. 1987; 84:1005-1009.

Servet-Delprat C, Vidalain PO, Azocar O, Le DF, Fischer A, and Rabourdin-Combe C. Consequences of Fas-mediated human dendritic cell apoptosis induced by measles virus. J Virol. 2000; 74: 4387-4393.

Shafritz DA e Lieberman HM. The molecular biology of hepatitis B virus. Annu Rev Med; 1984; 35:219-32.

Sharp PM. Origins of human virus diversity. Cell. 2002; 108:305-312.

Sherlock S. The natural history of hepatitis B. Postgrad med J. 1987; 63(2): 7-11.

Simmonds P e Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. J Virol. 2005; 79: 15467-15476.

Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. Nat Med. 1995; 1(6):564-569.

Sitia G, Aiolfi R, Di LP, Mainetti M, Fiocchi A, Mingozi F, Esposito A, Ruggeri ZM, Chisari FV, Iannacone M, and Guidotti LG. Antiplatelet therapy prevents hepatocellular carcinoma and improves survival in a mouse model of chronic hepatitis B. Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109: E2165-E2172.

Sitnik R, Pinho JR, Bertolini DA, Bernardini AP, Da Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B virus genotypes and *precore* and *core* mutants in Brazilian patients. J Clin Microbiol. 2004; 42(6):2455-2460.

Sjogren M. Serologic diagnosis of viral hepatitis. Gastroenterol Clin North Amer. 1994; 23:457-478.

Soares P, Alshamali F, Pereira JB, Fernandes V, Silva NM, Afonso C, Costa MD, Musilova E, Macaulay V, Richards MB, Cerny V, Pereira L. The expansion of mtDNA Haplogroup L3 within and out of Africa. Mol. Biol. Evol. 2012; 29, 915–927.

Spitz N, Mello FC, Araujo NM. Full-genome sequences of hepatitis B virus subgenotype D3 isolates from the Brazilian Amazon Region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(1):151-153.

Strauss RT, Franque-Ranque M, Bergström S, et al. Infectious etiology of jaundice among pregnant women in Angola. Scand J Infect Dis. 2003; 35:401-03.

Stroffolini T, Pasquini P, Mele A. HBsAg carriers among pregnant women in Italy: results from the screening during a vaccination campaign against hepatitis B. *Public Health*. 1988; 102, 329–333.

Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2000; 81(Pt1):67-74.

Su F, Theodosis CN, and Schneider RJ. Role of NF-kappa B and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol*. 2001; 75: 215-225.

Sugauchi F, Ohno T, Orito E, Sakugawa H, Ichida T, Komatsu M, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. *J Med Virol*. 2003; 70(4):537-544.

Sun CA, Wu DM, Lin CC, Lu SN, You SL, Wang LY, Wu MH, Chen CJ. Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan. *Am J Epidemiol*. 2003; 157(8):674-682.

Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, et al. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol*. 2013; 57(2):122-129.

Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov EI, et al. Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirology*. 2000; 43(2):119-123.

Tallo T, Tefanova V, Priimägi L, Schmidt J, Katargina O, Michailov M, Mukomolov S, Magnius L, Norder H. D2: major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. *J Gen Virol*. 2008; 89: 1829-1839.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30: 2725-2729.

Tanwar S e Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis? *Curr Gastroentero Rep*. 2012; 14(1):37-46.

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

Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, *et al.* Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology*.2009; 49: 1503-1514.

Terradillos O, Pollicino T, Lecoecur H, Tripodi M, Gougeon ML, Tiollais P, and Buendia MA. p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro. *Oncogene*.1998; 17: 2115-2123.

Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, and Chisari FV. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol*.2003; 77: 68-76.

Thukar V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(2):165-170.

Tiollais P, Pourcel C e Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature*; 1985; 317(6037): 489-495.

Toh H, Hayashida H, Miyata T. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature*; 1983; 305:827-829.

Torres C, Piñeiro y Leone FG, Pezzano SC, Mbayed VA, Campos RH. New perspectives on the evolutionary history of hepatitis B virus genotype F. *Mol Phylogenet Evol*. 2011; 59: 114-122.

Tran TT, Trinh TN e Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*. 2008; 82(11): 5657-5663.

Tuttleman JS, Pourcel C e Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*. 1986; 47(3): 451-460.

Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, *et al.* The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol*. 1988; 69 (Pt 6):1383-1389.

Wai CT, Fontana RJ, Polson J, Hussain M, Shakil AO, Han SH, *et al.* Clinical outcome and virological characteristics of hepatitis B-related acute liver failure in the United States. *J Viral Hepatol*. 2005;12:192-198.

WHO. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. World Health Organization. 2015.

WHO. Hepatitis B. World Health Organization. [acesso em 15/09/2015]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>>.

Will H, Reiser W, Weimer T, *et al.* Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol.* 1987; 61(3): 904-911.

Wong GL, Chan HL, Mak CW, *et al.* Entecavir treatment reduces hepatic events and deaths in chronic hepatitis B patients with liver cirrhosis. *Hepatology.*2013; 58: 1537–1547.

Wong V e Chan H. Chronic hepatitis B: a treatment update. *Semin Liver Dis.* 2013;33(2):122-129.

Xiang WQ, Feng WF, Ke W, Sun Z, Chen Z, Liu W. Hepatitis B virus X protein stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway. *J Hepatol;* 2011; Jan;54(1):26-33.

Xie JX, Zhao J, Yin JH, Zhang Q, Pu R, Lu WY, *et al.* Association of novel mutations and haplotypes in the preS region of hepatitis B virus with hepatocellular carcinoma. *Front Med China.* 2010; 4(4):419-429.

Xu J, Yun X, Jiang J, Wei Y, Wu Y, Zhang W, Liu Y, Wang W, Wen Y, Gu J. Hepatitis B virus X protein blunts senescence- like growth arrest of human hepatocellular carcinoma by reducing Notch1 cleavage. *Hepatology;* 2010; Jul;52(1):142-154.

Yang HI, Lu SN, Liaw YF *et al.* Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2002; 18;347(3):168-174.

Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, Lu SN, You SL, Chen DS, Liaw YF, Chen CJ; REVEAL-HBV Study Group. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(16):1134-1143.

Yano Y, Azuma T, Hayashi Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World J Hepatol.* 2015; 7(3): 583-592.

Yapali S, Talaat N, Lok AS. Management of hepatitis B: our practice and how it relates to the guidelines. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014; 12: 16–26.

- Yeung P, Wong DK, Lai CL, Fung J, Seto WK, Yuen MF. Association of hepatitis B virus pre-S deletions with the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Infect Dis.* 2011; 203:646–654.
- Yin J, Xie J, Liu S, Zhang H, Han L, Lu W, et al. Association between the various mutations in viral *core* promoter region to different stages of hepatitis B, ranging of asymptomatic carrier state to hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106(1):81-92.
- Yousif M e Kramvis A. Genotype D of hepatitis B virus and its subgenotypes: An update. *Hepatol Res.* 2013; 43: 355–364.
- Zehender G, De Maddalena C, Giambelli C, Milazzo L, Schiavini M, Bruno R, Tanzi E, Galli M. Different evolutionary rates and epidemic growth of hepatitis B virus genotypes A and D. *Virology.* 2008; 380: 84-90.
- Zehender G, Ebranati E, Bernini F, Lo Presti A, Rezza G, Delogu M, Galli M, Ciccozzi M. Phylogeography and epidemiological history of West Nile virus genotype 1a in Europe and the Mediterranean basin. *Infect Genet Evol.* 2011; 11:646-653.
- Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, Shkjezi R, Lai A, Sorrentino C, et al. Spatial and temporal dynamics of hepatitis B virus D genotype in Europe and the Mediterranean Basin. *PLoS One.* 2012a; 7: e37198.
- Zehender G, Shkjezi R, Ebranati E, Gabanelli E, Abazaj Z, Tanzi E, et al. Reconstruction of the epidemic history of hepatitis B virus genotype D in Albania. *Infect Genet Evol.* 2012b; 12: 291-298.
- Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, Sorrentino C, Lo Presti A, Tanzi E, et al. Enigmatic origin of hepatitis B virus: an ancient travelling companion or a recent encounter? *World J Gastroenterology.* 2014; 20(24):7622-7634.
- Zhang Q e Cao G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon.* 2011; 11(2):86-91.
- Zhang Y, Wu Y, Ye S, Wang T, Zhao R, Chen F, et al. The response to interferon is influenced by hepatitis B virus genotype in vitro and in vivo. *Virus Res.* 2013; 171(1):65-70.
- Zhou DX, Taraboulos A, Ou JH, Yen TS. Activation of class I major histocompatibility complex gene expression by hepatitis B virus. *J Virol;* 1990; 64(8):4025-4028.

Zhou Y e Holmes EC. Bayesian estimates of the evolutionary rate and age of hepatitis B virus. *J Mol Evol.* 2007; 65: 197-205.

Zhou YZ, Slagle BL, Donehower LA, *et al.*; Structural analysis of a hepatitis B virus genome integrated into chromosome 17p of a human hepatocellular carcinoma. *J Virol.* Nov. 1988;62(11):4224-4231.

Zong J, Batalova J. Indian Immigrants in the United States. *Migration Information Source.* 2015; [acesso em 19/11/2015]. Disponível em: <http://www.migrationpolicy.org/article/indian-immigrants-united-states>

Zoulim F, Perrillo R. Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy. *J Hepatol.* 2008; 48 Suppl 1:S2-19.

IX - ANEXO

IX.1 - ANEXO 1

05/05/2004 14:26

0612266453

CONEP

PAGE 01



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 736/2004

Registro CONEP: 9604 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0041.0.011.000-03

Processo nº 25000.001958/2004-81

Projeto de Pesquisa: "Estudos moleculares do vírus da Hepatite B."

Pesquisador Responsável: Dra. Selma de Andrade Gomes.

Instituição: FIOCRUZ-RJ.

Área Temática Especial: Biossegurança.

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 346/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) Foi atendida a solicitação do referido parecer;
- b) O projeto atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Brasília, 03 de maio de 2004.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MSMS

IX.2 - ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

CEP - MEMO - nº 638/12

Rio de Janeiro, 29 de maio de 2012.

Do: Coordenador do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Natalia Motta de Araújo

Assunto: Parecer sobre Emenda ao Protocolo e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

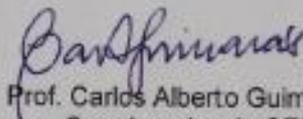
Referência: Projeto nº 139/10 – CEP

Título: "Análise da variabilidade genética dos vírus da hepatite B e da hepatite C em pacientes com hepatocarcinoma e comparação dos padrões de metilação DNA em tecidos de hepatocarcinoma de diferentes etiologias"

Sr.(a) Pesquisador(a),

Informo a V. S.a., que em reunião deste CEP realizada em 21/05/2012, foi apreciado e considerado "APROVADO", o parecer referente ao Projeto de Pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,


Prof. Carlos Alberto Guimarães
Coordenador do CEP

Full-genome sequences of hepatitis B virus subgenotype D3 isolates from the Brazilian Amazon Region

Natália Spitz¹, Francisco CA Mello², Natalia Motta Araujo^{1/*}

¹Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
²Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

The Brazilian Amazon Region is a highly endemic area for hepatitis B virus (HBV). However, little is known regarding the genetic variability of the strains circulating in this geographical region. Here, we describe the first full-length genomes of HBV isolated in the Brazilian Amazon Region; these genomes are also the first complete HBV subgenotype D3 genomes reported for Brazil. The genomes of the five Brazilian isolates were all 3,182 base pairs in length and the isolates were classified as belonging to subgenotype D3, subtypes ayw2 (n = 3) and ayw3 (n = 2). Phylogenetic analysis suggested that the Brazilian sequences are not likely to be closely related to European D3 sequences. Such results will contribute to further epidemiological and evolutionary studies of HBV.

Key words: HBV - complete genome - amino acid residues - genetic distance

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the major causes of chronic liver diseases, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma and affects over 240 million people worldwide (WHO 2014). HBV contains a partially double-stranded DNA genome approximately 3.2 kb in length. Eight confirmed (A-H) and two tentative (I and J) genotypes have been identified based on a nucleotide divergence of more than 8% for the complete genome (Araujo et al. 2011). Much diversity within genotypes exists, leading to the division of some genotypes into subgenotypes (Shiet al. 2013). Both HBV genotypes and subgenotypes have different geographic distributions (Kramvis et al. 2005) and have increasingly been associated with differences in transmission routes, disease progression, responses to antiviral therapies and clinical outcomes (McMahon 2009, Lin & Kao 2011).

Genotype D has a worldwide distribution, but is found primarily in the Mediterranean area, Eastern Europe and a region spanning from the Near East to India. It has been associated with a high risk of disease progression and a poor clinical outcome (Lin & Kao 2011). Nine subgenotypes (D1-D9) have so far been described (Ghosh et al. 2013, Shi et al. 2013). However, subgenotypes D3 and D6 were recently reclassified as a single subgenotype, D3 (Shi et al. 2013, Yousif & Kramvis 2013). This latter subgenotype has been found primarily in Northern America, Europe, South Africa and Indonesia (Yousif & Kramvis 2013).

Brazil has a highly admixed population with Caucasian, Amerindian and African origins. Genotypes A, D and F circulate among Brazilian HBV carriers (Mello et

al. 2007). Genotype D has been found in all five Brazilian geographic regions (Mello et al. 2007), with a predominance of the D3 subgenotype observed countrywide (N Spitz et al., unpublished observations). It has been proposed that the D genotype in Brazil has a European origin, because the highest rates of genotype D are found in the southern region, where an influx of immigrants from Central Europe, especially Germany and Italy, has occurred (Mello et al. 2007, Bertolini et al. 2012). The Brazilian Amazon Region is a highly endemic area for HBV (Viana et al. 2005) and 24.4% of the HBV strains isolated in this region have been shown to be of genotype D (Mello et al. 2007). However, little is known about the genetic variability of the HBV strains circulating in the Brazilian Amazon Region and no complete genome sequences from this region have been described to date. In addition, few Brazilian HBV complete genome sequences are available in the GenBank database and this has limited the contribution of Brazilian isolates to molecular epidemiological and phylogenetic studies of HBV.

In this paper, we describe the first full-length genomes of HBV isolated in the Brazilian Amazon Region; moreover, these genomes are the first complete genomes of HBV subgenotype D3 reported in Brazil.

Complete genome sequences were obtained for HBV isolates from five HBsAg-positive blood donors residing in the states of Amapá (sequences BR2, BR4 and BR6) and Amazonas (sequences BR14 and BR40). This study was approved by the Brazilian Ethical Committee for Medical Research (registration 9604/2004). HBV DNA was extracted from 0.2 mL of serum using a High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostics, Germany) and full-length HBV genomes were amplified as described previously (Gunther et al. 1995). HBV nucleotide sequences were determined using a BigDye Terminator kit (Applied Biosystems, USA) and sequencing reactions were analysed on an ABI3730 automated sequencer (Applied Biosystems). The nucleotide sequences reported here were deposited in the GenBank database under accessions KP090177-KP090181. Phylogenetic analysis was

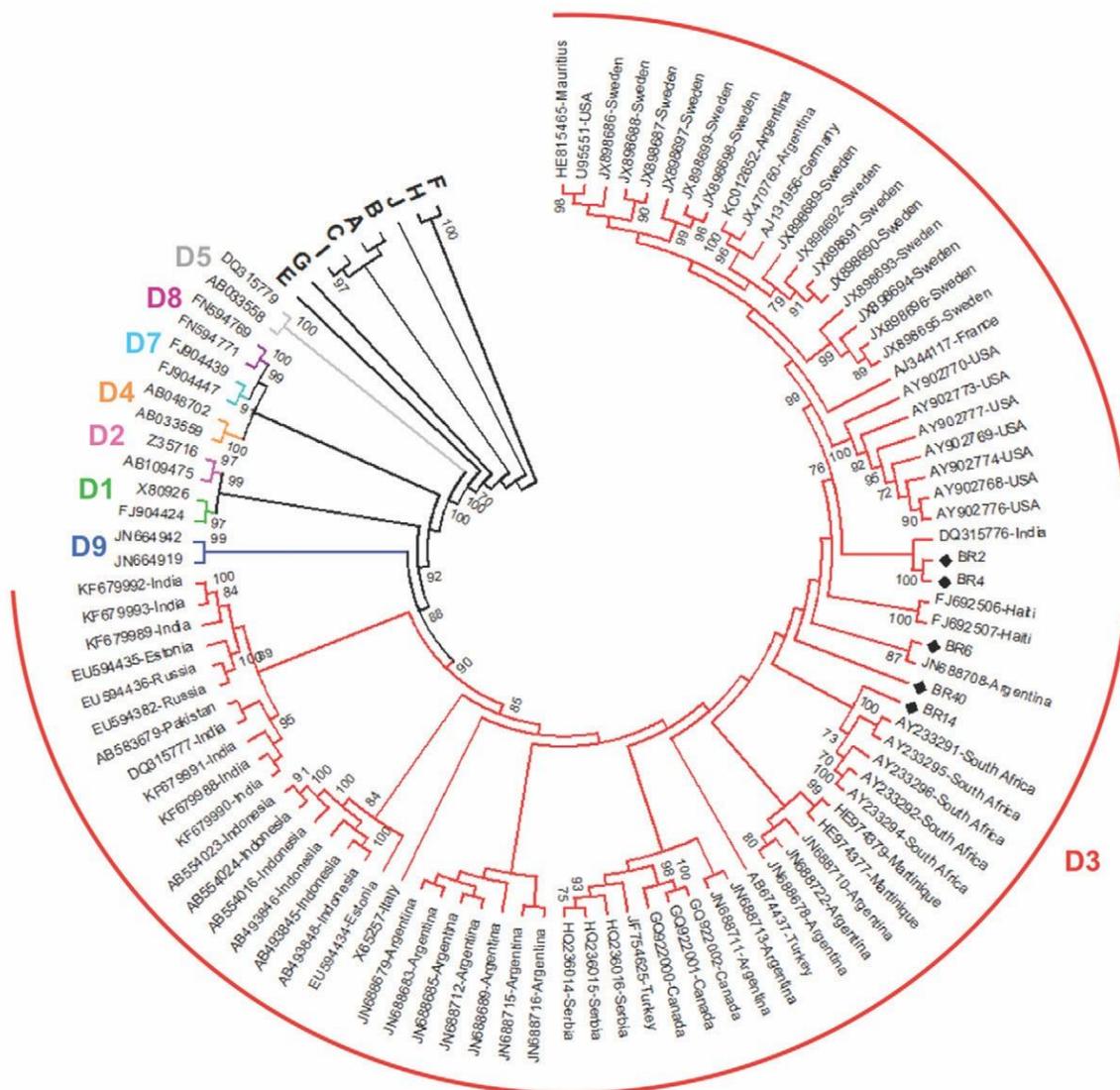
doi: 10.1590/0074-02760140426

Financial support: FAPERJ, IOC

+ Corresponding author: nmaraujo@ioc.fiocruz.br

Received 9 November 2014

Accepted 26 November 2014



Phylogenetic analysis of HBV sequences using the neighbour-joining method. GenBank accessions for the reference sequences are: genotype A, AY233278; B, D00329; C, AB112066; E, X75664; F, X69798; G, AB056513; H, AY090454; I, FJ023660; J, AB486012. Genotype D reference sequences are indicated by their accession numbers. Genotype D3 sequences are indicated by their accession numbers followed by the name of the origin country. The sequences generated in this study are denoted BR, followed by the sample number and are identified with the symbol ♦. Values at internal nodes indicate percentages of 1,000 bootstrap replicates that support the branch.

conducted using MEGA software v.6 (Tamura et al. 2013). Phylogenetic trees of the HBV full-genome sequences were obtained using the neighbour-joining method (1,000 bootstrap replicates) and mean genetic distances were estimated using the Kimura two-parameter model. Bootscan analysis software (SimPlot v.3.5.1) was used to identify intra and intergenotypic recombination (Lole et al. 1999).

All five complete HBV genome sequences were 3,182 base pairs in length and contained the canonical HBV overlapping open reading frames for C (HBe, 639 nt; HBc, 552 nt), X (HBx, 465 nt), PreS/S (LHBs, 1170 nt; MHBs, 846 nt; SHBs, 681 nt) and P (Pol, 2499 nt). The deduced amino acid sequences of the small S protein of the BR6, BR14 and BR40 isolates contained R, P and K

residues at positions 122, 127 and 160, respectively, corresponding to the ayw2 serological type (subtype); BR2 and BR4 instead had the ayw3 subtype (R122, T127, K160). Neither in-phase deletions or insertions nor the important mutations G1896A (PreC), rtM204V (lamivudine resistance mutation), A1762T and G1764A (in the basal core promoter) were detected in the sequences and no evidence of recombination was observed in the sequences, as well.

By phylogenetic analysis, it was demonstrated that the five genomes clustered together with subgenotype D3 sequences from other countries (Figure). However, Brazilian D3 sequences did not produce a single cluster, suggesting that this subgenotype may have been introduced into the country multiple times. Moreover, the

TABLE
Comparison of the amino acid residues encoded by the different subgenomic regions of Brazilian HBV subgenotype D3 isolates - correlation with the sample subtype

Sample	Subtype	Polymerase								X	PreS2			S
		sp116	sp142	rt53	rt135	rt266	rh19	rh88	17		26	31	125	
BR2	ayw3	F	S	D	Y	I	V	I	Y	C	A	M	T	
BR4	ayw3	F	S	D	Y	I	V	I	Y	C	A	M	T	
BR6	ayw2	L	N	N	S	V	A	V	C	R	T	T	P	
BR14	ayw2	L	N	N	S	V	A	V	C	R	T	T	P	
BR40	ayw2	L	N	N	S	V	A	V	C	R	T	T	P	

a: amino acid residue that distinguishes ayw2 from ayw3.

Brazilian sequences seemed not to be closely related to European sequences (Figure). It would be useful to investigate the lack of relatedness between Brazilian and European D3 sequences in further studies focusing on the phylogeography of HBV in Brazil.

The deduced amino acid sequences of the viral polymerase, X, PreS2 and S proteins of the five subgenotype D3 isolates from Brazil were compared (Table). Variations in the amino acid residues between the ayw2 and ayw3 isolates, in addition to the P127T substitution in the S gene, were observed in several positions throughout the genome: polymerase, residue sp116 (L or F), sp142 (N or S), rt53 (N or D), rt135 (S or Y), rt266 (V or I), rh19 (A or V) and rh88 (V or I); X, residue 17 (C or Y) and 26 (R or C); PreS2, 31 (T or A) and S, 125 (T or M). A larger number of complete subgenotype D3 genomes from Brazil is needed to confirm such variations in the predicted amino acid residues between the ayw2 and ayw3 isolates, as these variations may have implications for disease pathogenesis and progression.

The genetic information provided here will help us to understand better the evolutionary behaviours of HBV subgenotype D3 strains circulating in the Brazilian Amazon Region and to trace the spread of disease due to HBV in this part of the world.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Christian Niel, for comments, and to the DNA Sequencing Platform PDTIS/Fiocruz, for performing nucleotide sequencing.

REFERENCES

Araujo NM, Waizbort R, Kay A 2011. Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: how viral, host and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. *Infect Genet Evol* 11: 1199-1207.

Bertolini DA, Gomes-Gouveia MS, Carvalho-Mello IM, Saraceni CP, Sitnik R, Graziotin FG, Laurindo JP, Fagundes NJ, Carrilho FJ, Pinho JR 2012. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect Genet Evol* 12: 1295-1304.

Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, Higgins DG 2013. Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications and corrections. *Infect Genet Evol* 16: 355-361.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.

Viana S, Parana R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V 2005. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 73: 808-814.

WHO - World Health Organization 2014. Hepatitis B. Available from: who.int/.

Yousif M, Kramvis A 2013. Genotype D of hepatitis B virus and its subgenotypes: an update. *Hepatol Res* 43: 355-364.

Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H 1995. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 69: 5437-5444.

Kramvis A, Kew M, Francois G 2005. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 23: 2409-2423.

Lin CL, Kao JH 2011. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: recent advances. *J Gastroenterol Hepatol* 26 (Suppl. 1): 123-130.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73: 152-160.

McMahon BJ 2009. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 3: 334-342.

Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, Saraiva JC, Virgolino HA, Motta-Castro AR, Melo MM, Martins RMB, Gomes SA 2007. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 7: 103.

Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, Higgins DG 2013. Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications and corrections. *Infect Genet Evol* 16: 355-361.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.

Viana S, Parana R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V 2005. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 73: 808-814.

WHO - World Health Organization 2014. Hepatitis B. Available from: who.int/.

Yousif M, Kramvis A 2013. Genotype D of hepatitis B virus and its subgenotypes: an update. *Hepatol Res* 43: 355-364.