

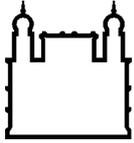
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária
Mestrado

**INVESTIGAÇÃO DE HEPATITE B OCULTA E DE TORQUE
TENO VÍRUS EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA
COM E SEM CARCINOMA HEPATOCELULAR**

AGATHA GABRIELLA DA SILVA ROSA

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

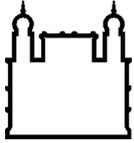
AGATHA GABRIELLA DA SILVA ROSA

Investigação de hepatite B oculta e de torque teno vírus em pacientes com hepatite
C crônica com e sem carcinoma hepatocelular

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

Orientador (es): Prof. Dr. Natalia Motta de Araujo

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: AGATHA GABRIELLA DA SILVA ROSA

**INVESTIGAÇÃO DE HEPATITE B OCULTA E DE TORQUE TENO VÍRUS EM
PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA COM E SEM CARCINOMA
HEPATOCELULAR**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Natalia Motta de Araujo

Aprovada em: 22 / 02 / 2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Monick Lindenmeyer Guimarães (IOC/FIOCRUZ) – Presidente

Prof. Dr. Edson Oliveira Delatorre (IOC/FICRUZ)

Prof. Dr. Renata de Mello Perez (UFRJ)

Prof. Dr. Francisco Campello do Amaral Mello (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Claudia Lamarca Vitral (UFF)

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2017

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

R788 Rosa, Agatha Gabriella da Silva

Investigação de hepatite B oculta e de torque tenho vírus em
pacientes com hepatite C crônica com e sem carcinoma hepatocelular /
Agatha Gabriella da Silva Rosa. – Rio de Janeiro, 2017.

xx, 103 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Parasitária, 2017.

Bibliografia: f. 72-101

1. Virologia. 2. Hepatite B oculta. 3. Torque tenho vírus. 4. Hepatite C
crônica. 5. Carcinoma hepatocelular. I. Título.

CDD 616.3623

Dedico este trabalho àqueles que, para além de inúmeras dificuldades, se entregam diariamente aos prazeres da pesquisa. Sem medir esforços, cada resposta alcançada contribui com um pequeno foco de luz para o universo da ciência.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eva e Antônio, pelo suporte, carinho e compreensão de sempre.

À Dra. Natalia Motta de Araujo, minha orientadora, por exercer com maestria sua vocação e por me incentivar sempre.

Ao Dr. Christian Niel pelo apoio científico e financeiro que foram de extrema importância para iniciar e continuar este trabalho.

Aos doutores Rodrigo Jardim e Alberto D'Avilla pelo fundamental suporte nas análises de bioinformática.

Ao Msc. Ricardo Junqueira por todo o auxílio desempenhado na Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho do IOC.

Aos membros da banca examinadora, por prontamente aceitarem nosso convite. Especialmente à Dra. Monick Lindenmeyer por aceitar ser a revisora científica deste trabalho.

Aos amigos do LVM, por todas as contribuições, científicas e além da ciência, que tornaram os meus dias na pesquisa mais prazerosos.

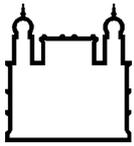
Ao Renan pelo constante incentivo e companheirismo.

À Pós-Graduação em Biologia Parasitária e ao Instituto Oswaldo Cruz pelas excelentes qualidades de ensino e infraestrutura que sustentaram a produção deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo da Vinci (1452-1519)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INVESTIGAÇÃO DE HEPATITE B OCULTA E DE TORQUE TENO VÍRUS EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA COM E SEM CARCINOMA HEPATOCELULAR

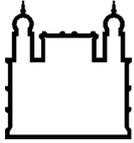
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Agatha Gabriella da Silva Rosa

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o sexto câncer mais comum em todo o mundo e a segunda principal causa de mortalidade relacionada ao câncer. Devido ao curto tempo de evolução, o tumor é geralmente detectado em um estágio avançado, aumentando a taxa de mortalidade deste câncer. Vários estudos têm sugerido que o desenvolvimento do CHC é um processo influenciado por fatores herdados e adquiridos. Os principais fatores etiológicos para o desenvolvimento do CHC são as infecções crônicas causadas pelo vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV), alcoolismo e fatores relacionados ao metabolismo e imunidade do paciente, os quais podem atuar isoladamente ou sinergicamente, acelerando, portanto, o dano hepático. Ademais, além do HBV e HCV, sabe-se que outros vírus hepatotrópicos desenvolvem infecções crônicas. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o viroma presente no soro de pacientes com e sem CHC, bem como investigar a ocorrência da infecção oculta pelo HBV e a diversidade genética do Torque teno vírus (TTV) em pacientes cronicamente infectados pelo HCV. Para a identificação do viroma circulante, amostras de soro de 37 pacientes foram selecionadas e agrupadas em 12 grupos distintos de acordo com a etiologia e o estágio da doença hepática. Os ácidos nucleicos extraídos foram submetidos a um processo de amplificação randômica, e as bibliotecas genômicas foram obtidas para posterior sequenciamento de nova geração (NGS) com abordagem metagenômica. Após a análise das sequências de NGS verificamos que nenhuma sequência viral foi recuperada a partir das bibliotecas genômicas. Além disso, um total de 151 pacientes com infecção crônica pelo HCV foi selecionado para a investigação de infecção oculta pelo HBV e de infecção pelo TTV. A ocorrência de HBV oculto foi investigada por um ensaio de PCR em *semi-nested* tendo como alvo o gene S do HBV. A diversidade genética do TTV foi analisada por uma PCR multiplex que identifica simultaneamente todos os cinco genogrupos virais. Entre os 151 pacientes com infecção crônica pelo HCV incluídos neste estudo, cinco (3,3%) apresentaram infecção oculta pelo HBV. Todos os cinco pacientes foram diagnosticados com CHC ($p=0,003$). Os genótipos de HBV encontrados foram A1 (em três pacientes), e A2 e D3 (em um paciente, cada). A prevalência de TTV encontrada no grupo de estudo foi de 45%. A infecção pelo TTV foi significativamente mais frequente em pacientes com CHC do que nos pacientes sem o câncer ($p=0,006$). Todos os cinco genogrupos de TTV foram encontrados com frequências semelhantes em pacientes com e sem CHC. O genogrupo 3 foi o mais prevalente (45% e 28%), enquanto o

genogrupo 2 foi o menos frequente (0 e 1%), em pacientes com e sem CHC, respectivamente. O resultado da análise metagenômica pode ter sido devido à ocorrência de uma possível contaminação bacteriana durante os experimentos. A presença de hepatite B oculta apenas nos pacientes com CHC sugere um fator associado ao desenvolvimento deste câncer em paciente cronicamente infectados pelo HCV. Nenhuma diferença significativa na prevalência dos genogrupos de TTV nos pacientes com e sem CHC foi encontrada. Ademais, a imunossupressão de pacientes com CHC pode ter sido o fator responsável pela maior frequência de coinfeções nestes pacientes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

OCCULT HEPATITIS B VIRUS AND TORQUE TENO VIRUS INVESTIGATION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C WITH AND WITHOUT HEPATOCELLULAR CARCINOMA

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Agatha Gabriella da Silva Rosa

The hepatocellular carcinoma (HCC) is the sixth most common cancer worldwide and the second leading cause of cancer mortality. Due to the short time of evolution, the tumor is usually detected on an advanced stage, increasing the rate of mortality of this cancer. Several studies have suggested that HCC development is a process affected by inherited and acquired factors. The main etiological factors for HCC development are the hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) chronic infections, alcoholism, and factors related to patient's metabolism and immunity, which can act isolated or synergistically, accelerating, thus, the damage of the liver. Also, besides the traditionally known HBV and HCV, other hepatotropic viruses are described to develop chronic infections. Thus, the goal of this study was to analyze the virome of patients with and without HCC, as well as, to investigate the occurrence of occult HBV and Torque teno virus (TTV) infections in patients chronically infected with HCV. For the identification of the circulating virome, serum samples from 37 patients were selected and grouped into 12 distinct groups according to the etiology and stage of liver disease. The extracted nucleic acids were submitted to a random amplification process, and the genomic libraries were obtained to after next generation sequencing (NGS) with metagenomic approach. After the analysis of the NGS sequences we verified that no viral sequence was recovered from the genomic libraries constructed. In addition, a total of 151 patients with HCV chronic infection were selected for the investigation of occult HBV and TTV infections. The occurrence of occult HBV infection was investigated by a semi-nested PCR assay targeting the S gene. The genetic diversity of TTV was analyzed by a multiplex PCR that identifies simultaneously all five genogroups. Among the 151 patients with chronic HCV infection included in this study, five (3,3%) were found to be positive for occult HBV infection. All five patients were diagnosed with HCC ($p=0.003$). HBV genotypes were A1 (in three patients), and A2 and D3 (in one patient, each). The TTV prevalence found in the study group was 45%. TTV infection was significantly more frequent in patients with HCC than without ($p=0.006$). Moreover, all five TTV genogroups were found with similar frequencies in patients with and without HCC. Genogroup 3 was the most prevalent (45% and 28%), while genogroup 2 was the less frequent (0 and 1%), in patients with and without HCC, respectively. The metagenomic analysis result could be due to a possible bacterial contamination during the experiments. The presence of occult hepatitis B only in patients with HCC suggests a factor associated with the development of this cancer in chronically HCV-infected patients. No

significant difference in the genogroup prevalence of TTV in patients with and without CHC was found. Furthermore, the immunosuppression of patients with HCC may have been the factor responsible for the higher frequency of co-infections in these patients.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1) INTRODUÇÃO	1
1.1) Carcinoma hepatocelular	1
1.1.1) Epidemiologia.....	1
1.1.2) Fatores de risco.....	2
1.1.3) Diagnóstico.....	4
1.2) Metagenômica	5
1.3) Vírus da hepatite B	7
1.3.1) Classificação taxonômica.....	7
1.3.2) Classificação morfológica.....	7
1.3.3) Organização genômica.....	9
1.3.4) Replicação viral.....	10
1.3.5) Variabilidade e epidemiologia.....	12
1.3.6) Aspectos clínicos e marcadores sorológicos.....	15
1.3.7) Hepatite B oculta.....	18
1.3.8) Relação entre a infecção pelo HBV e o carcinoma hepatocelular.....	21
1.4) Torque teno vírus	23
1.4.1) Classificação taxonômica.....	23
1.4.2) Classificação morfológica.....	23
1.4.3) Organização genômica.....	24
1.4.4) Replicação viral.....	26
1.4.5) Variabilidade e epidemiologia.....	26
1.4.6) TTV, hepatite e câncer.....	30
2) JUSTIFICATIVA	32
3) OBJETIVOS	34
3.1) Objetivo geral	34
3.2) Objetivos específicos	34
4) METODOLOGIA	35
4.1) Casuística	35

4.2) Aspectos éticos.....	35
4.3) Critérios de inclusão.....	35
4.4) Critérios de exclusão.....	36
4.5) Separação do soro do sangue periférico.....	36
4.6) Análise metagenômica.....	36
4.6.1) Amostragem.....	36
4.6.2) Enriquecimento das partículas virais.....	37
4.6.2.1) Filtragem.....	37
4.6.2.2) Tratamento com nuclease.....	37
4.6.3) Extração de DNA e RNA.....	38
4.6.4) Amplificação randômica.....	38
4.6.4.1) Transcrição reversa.....	39
4.6.4.2) Tratamento com a enzima Klenow.....	39
4.6.4.3) Amplificação do DNA.....	40
4.6.5) Eletroforese digital.....	41
4.6.6) Quantificação do material amplificado pelo método randômico.....	42
4.6.7) Construção das bibliotecas genômicas.....	42
4.6.8) Validação das bibliotecas genômicas.....	43
4.6.9) Sequenciamento de alta vazão.....	43
4.6.10) Análise das sequências de NGS.....	43
4.7) Detecção específica de HBV e TTV.....	44
4.7.1) Amostragem.....	44
4.7.2) Extração de DNA viral.....	45
4.7.3) Amplificação do HBV-DNA.....	45
4.7.4) Amplificação do TTV-DNA.....	46
4.7.5) Eletroforese.....	47
4.7.6) Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento do HBV.....	47
4.7.7) Sequenciamento de Sanger para o HBV.....	47
4.7.8) Edição das sequências obtidas e genotipagem do HBV.....	48
4.7.9) Análise estatística.....	49
5) RESULTADOS.....	50
5.1) Análise metagenômica.....	50
5.1.1) Amplificação randômica.....	50
5.1.2) Sequenciamento de nova geração.....	52

5.1.3) Análise das sequências de NGS.....	54
5.2) Detecção específica de HBV e TTV.....	56
5.2.1) Hepatite B oculta.....	56
5.2.2) (Sub)genótipos, sorotipos e marcadores sorológicos do HBV oculto.....	56
5.2.3) Prevalência da infecção pelo TTV.....	59
5.2.4) Genogrupos do TTV.....	59
5.2.5) Associação de variáveis com o CHC.....	61
6) DISCUSSÃO.....	62
7) CONCLUSÕES.....	72
8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
9) APÊNDICES.....	103
APÊNDICE A.....	103
APÊNDICE B.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxas de incidência global para o CHC no ano de 2012.....	2
Figura 2: Principais etiologias para o carcinoma hepatocelular no Brasil de acordo com as regiões geográficas.....	4
Figura 3: A) Esquema da partícula completa do HBV. B) Microscopia eletrônica dos diferentes tipos de partículas produzidas durante a replicação do HBV.....	8
Figura 4: Organização genômica do HBV.....	10
Figura 5: Ciclo replicativo do HBV.....	12
Figura 6: Prevalência mundial do marcador HBsAg do vírus da hepatite B e distribuição geográfica dos principais genótipos.....	15
Figura 7: Marcadores sorológicos da infecção aguda (A) e da infecção crônica (B) pelo HBV.....	17
Figura 8: Representação dos diferentes perfis sorológicos da hepatite B oculta.....	20
Figura 9: A) Esquema da partícula viral do TTV. B) Micrografia eletrônica de partículas agregadas de TTV.....	24
Figura 10: Organização genômica do TTV.....	25
Figura 11: a) Prevalência mundial do TTV pela região UTR. B) Prevalência mundial do TTV pela região codificante.....	29
Figura 12: Ilustração dos procedimentos moleculares necessários à amplificação randômica.....	41
Figura 13: Fluxo de trabalho utilizado na análise das sequências de NGS.....	44
Figura 14: Resultado da eletroforese digital fornecido pelo Bioanalyzer para as bibliotecas de 1 a 12 antes da amplificação randômica.....	51
Figura 15: Resultado da eletroforese digital fornecido pelo Bioanalyzer para as bibliotecas de 1 a 12 após a amplificação randômica.....	51

Figura 16: Resultado da eletroforese digital fornecido pelo Bioanalyzer para as bibliotecas 1 a 9, 11 e 12 após o processo de tagmentação.....	52
Figura 17: Índice de qualidade obtido para as onze bibliotecas analisadas.....	53
Figura 18: Gráfico comparativo dos diferentes grupos taxonômicos encontrados nas onze bibliotecas analisadas.....	55
Figura 19: Análise filogenética da região S do HBV através do método de Máxima Verossimilhança.....	58
Figura 20: Prevalência da infecção pelo TTV e dos genogrupos de TTV em pacientes com e sem carcinoma hepatocelular.....	60
Figura 21: Grau de coinfeção com diferentes genogrupos de TTV em pacientes com e sem CHC.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados no processo de amplificação randômica.....	38
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene S do HBV.....	46
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação genogrupo-específica do TTV.....	47
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento de Sanger.....	48
Tabela 5: Números absolutos de leituras obtidas por biblioteca.....	53
Tabela 6: Dados sócio demográficos e clínicos categorizados de acordo com a ocorrência ou não de hepatite B oculta em pacientes com hepatite C crônica.....	56
Tabela 7: Dados sorológicos e genéticos do HBV em pacientes crônicos para HCV com carcinoma hepatocelular e hepatite B oculta.....	58
Tabela 8: Dados sócio demográficos e clínicos categorizados de acordo com a ocorrência ou não de TTV em pacientes com hepatite C crônica.....	59
Tabela 9: Modelo final das variáveis independentemente associadas ao CHC em pacientes com hepatite C crônica.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

Anti-HBe – Anticorpo contra a proteína solúvel E viral

Anti-HBs – Anticorpo contra o antígeno de superfície viral

AAV2 – Vírus adenoassociado 2

C – Celsius

CDC – Centro de Controle de Doenças da América

cDNA – DNA complementar

cccDNA – DNA circular covalentemente fechado

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CHC – Carcinoma Hepatocelular

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Dideoxynucleotídeo trifosfato

DR – “Direct repeat”

EASL – Associação Europeia para o Estudo do Fígado

EORTC – Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer

FCB – grupo Fibrobacteres, Chlorobi e Bacteroidetes

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HBV – Vírus da hepatite B

HBcAg – Proteína do *core* viral

HBeAg – Proteína solúvel e

HBsAg – Antígeno de superfície viral

HCV – Vírus da hepatite C

HDV – Vírus da hepatite Delta

hNTCP – Receptor cotransportador de sódio e taurocolato

HUFCC – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

IARC – Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer

ICTV – Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus

INCA – Instituto Nacional do Câncer

kb – Kilobases

M – Molar

MEGAN – Analisador metagenômico

min – Minuto

NASH – Esteato-hepatite não alcoólica

NCBI – Centro Nacional para Informação Biotecnológica

NCR – Região não codificante

NGS – Sequenciamento de nova geração

nm – Nanômetro

nM – Nanomolar

ng – Nanograma

OBI – Hepatite B oculta

ORF – Fase de leitura aberta

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pb – Pare de base

pgRNA – RNA pré-genômico

pmol – Picomolar

RDA – Análise de diferença representacional

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

RT – Transcriptase reversa

SENV – Vírus SEN

TTV – Torque teno vírus

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

U – Unidade

UTR – Região não traduzida

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

WHO – Organização Mundial de Saúde

1) INTRODUÇÃO

1.1) Carcinoma hepatocelular

1.1.1) Epidemiologia

O carcinoma hepatocelular (CHC), ou hepatocarcinoma, é a condição mais frequente de tumor maligno primário de fígado no mundo, possuindo sua origem a partir dos próprios hepatócitos (El-Serag 2012). Em associação com o colangiocarcinoma, outro tipo de tumor hepático primário, é possível determinar uma incidência superior a um milhão de novos casos por ano (Lozano et al. 2012).

Segundo os últimos dados estatísticos disponibilizados pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), o CHC ocupa a sexta posição mundial em incidência (782.000 casos por ano) e a segunda em mortalidade (745.000 casos por ano), causando menos mortes apenas do que o câncer de pulmão (Ferlay et al. 2015). Esta característica é um reflexo do curto tempo de evolução e do seu diagnóstico tardio, que tornam as taxas de incidência e mortalidade muito próximas. Mais especificamente, apenas 5% dos casos diagnosticados não evoluem para a mortalidade (Parkin et al. 2005, Globocan 2012). Os dados disponíveis também sustentam a classificação do CHC como o quinto tipo de câncer que mais incide em homens (554.300) e o nono em mulheres (228.000).

O CHC segue um padrão consideravelmente heterogêneo de distribuição geográfica. Estima-se que dos mais de 780.000 casos reportados em 2012, cerca de 83% tenha ocorrido em países em desenvolvimento, e 50% deste valor apenas na China (Globocan 2012). O Leste Asiático e a África Subsaariana, que apresentam taxas de incidência maiores do que 20 indivíduos acometidos a cada 100 mil habitantes configuram as regiões de maior prevalência para o CHC. Países da Europa Meridional, como a Espanha, a Itália e a Grécia, apresentam níveis de incidência medianos, que variam de 10-20 acometidos pela doença a cada 100 mil habitantes. Por fim, as Américas do Norte e do Sul, a Europa Setentrional e a Oceania apresentam, em geral, baixa incidência para o CHC, com taxas menores do que 5 casos a cada 100 mil habitantes (Figura 1) (Ferlay et al. 2010, El-Serag 2012, Mittal & El-Serag 2013).

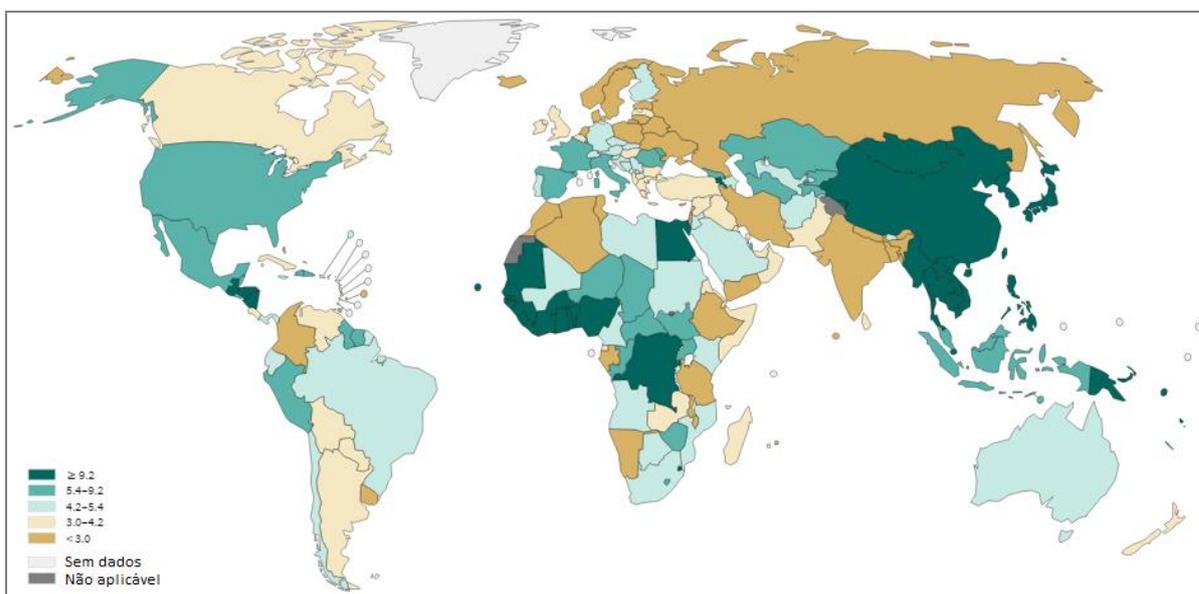


Figura 1: Taxas de incidência global para o CHC no ano de 2012. Disponível em: <gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 14 de outubro de 2016. Figura adaptada.

Apesar deste padrão de distribuição, a incidência para o CHC vem aumentando nos últimos anos em outras regiões como América do Norte, Europa Central e Austrália, possivelmente devido ao aumento dos casos de esteato-hepatite não alcoólica (NASH), frequentemente associada à obesidade, e de infecções crônicas pelo HCV (Parkin et al. 1999, El-Serag 2004).

No Brasil existem poucos dados sobre os aspectos clínicos do CHC, entretanto, segundo os dados disponibilizados pelo IARC, a incidência deste câncer em 2012 ocupou a 13ª posição no país, com mais de 9 mil casos diagnosticados, e a sexta posição em mortalidade, com aproximadamente 10 mil mortes registradas (Globocan 2012). No ano seguinte, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, cerca de 9 mil mortes pelo CHC foram reportadas, sendo mais de 5 mil em homens e quase 4 mil em mulheres (INCA 2016). Apesar disto, o Brasil é considerado um país de baixa incidência para o CHC, com uma prevalência de 2.765 casos sob o total da população (Globocan 2012).

1.1.2) Fatores de risco

O fator de risco de maior importância para a hepatocarcinogênese é a presença de cirrose hepática, que acomete de 80-90% dos pacientes com CHC (Blum 2005, Kikuchi et al. 2013). Desta forma, todos os eventos que promovam a

formação de cirrose hepática estão fortemente relacionados ao desenvolvimento do CHC (Fattovich et al. 1997). Os principais fatores etiológicos para o desenvolvimento de CHC são as infecções crônicas pelo HBV e HCV, consumo abusivo de bebidas alcoólicas, hepatite autoimune, ingestão de aflatoxina B1 (AFB1 - toxina produzida por fungos *Aspergillus*) e esteato-hepatite não alcoólica, bem como fatores genéticos e epigenéticos que possam propiciar um acúmulo de alterações em genes críticos para o desenvolvimento de câncer (Baffy et al. 2012, Liu et al. 2014, Singal & El-Serag 2015). Estes fatores podem atuar isoladamente ou em conjunto. Como exemplo, temos o risco aumentado em 30 vezes para o desenvolvimento de CHC em regiões de alta incidência para o HBV e a AFB1, devido a ação em conjunto de ambos os fatores (Srivatanakul et al. 2004, Liu & Wu 2010, Globocan 2012). Além disso, outros vírus também têm sido relatados como possíveis causas para o CHC, sendo eles o vírus da hepatite delta (HDV), Torque teno vírus (TTV) e o vírus adenoassociado 2 (AAV2) (Kew 2013, Nault et al. 2015).

Aproximadamente 80% dos casos de CHC estão associados às infecções crônicas pelo HBV e HCV, o que sustenta a distribuição geográfica coincidente de ambas as doenças (Perz et al. 2006). Nas regiões de maior incidência para o CHC a infecção pelo HBV é mais prevalente e ocorre principalmente por via vertical, acelerando em até uma década o diagnóstico do câncer. Já nas regiões de média e baixa incidência para o CHC, a principal etiologia é a infecção pelo HCV, adquirida por via parenteral (Mittal & El-Serag 2013).

A maior prevalência do CHC na população masculina, com uma taxa que se mostra de 2-4 vezes mais alta (El-Serag 2012, Mittal & El-Serag 2013), pode ser explicada porque homens possuem maior incidência de hepatites virais e cirrose alcoólica do que mulheres e o hormônio estrogênio ser capaz de proteger a população feminina contra a progressão da infecção pelo HBV (Globocan 2012, El-Serag 2012, Mittal & El-Serag 2013, Singal & El-Serag 2015). Concomitantemente, níveis de testosterona considerados superiores ao normal podem estar associados ao desenvolvimento de fibrose hepática e atividade inflamatória em homens cronicamente infectados pelo HCV (White et al. 2012).

Um estudo de caráter clínico e epidemiológico realizado em 2010 com a população brasileira determinou que, de forma geral, 54% dos casos de CHC têm como etiologia a infecção pelo HCV, 16% a infecção pelo HBV e 14% o alcoolismo. De maneira mais específica, a infecção pelo HCV foi reportada em 60% dos casos

oriundos das regiões sul e sudeste do país, seguido pela infecção pelo HBV em menos de 20% dos casos. Nas regiões norte, nordeste e centro-oeste, o HCV e o HBV foram responsáveis por menos de 50% e mais de 20% dos casos de CHC, respectivamente. Já o consumo de álcool foi considerado como a etiologia para menos de 20% dos casos de CHC em todas as regiões do país. Neste estudo foi encontrada uma prevalência de 98% de cirrose nos pacientes brasileiros com CHC (Carrilho et al. 2010).

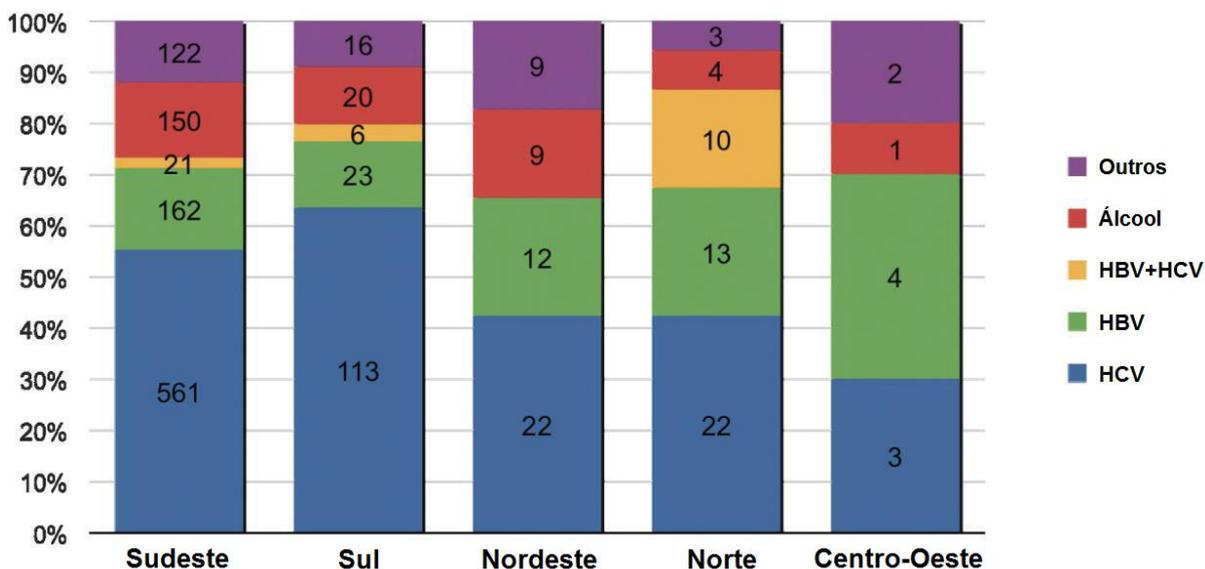


Figura 2: Principais etiologias para o carcinoma hepatocelular no Brasil de acordo com as regiões geográficas. Adaptado de Carrilho et al. (2010).

1.1.3) Diagnóstico

Segundo as últimas diretrizes publicadas pela Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL) e a Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC), o diagnóstico do CHC pode ser realizado de forma não invasiva, através de imagens obtidas por ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ressonância magnética, ou por meio da análise de biópsia histopatológica. Na grande maioria dos casos utiliza-se a técnica não invasiva, mesmo em pacientes cirróticos com nódulos maiores do que 2 cm de diâmetro. Desta maneira, o exame histopatológico fica restrito aos casos que precisem de uma confirmação (EASL-EORTC 2012).

A dosagem de α -fetoproteína (AFP), uma glicoproteína sintetizada por células hepáticas, como marcador sorológico para o diagnóstico do CHC já foi

amplamente utilizada para a triagem deste tipo de câncer. Entretanto, vem sendo considerada insatisfatória porque sua sensibilidade na predição do tumor varia de 9-50%(Daniele et al. 2004)e nem todos os tumores a secretam. Além disso, outras malignidades, como doenças neurodegenerativas, hepatite crônica e fibrose hepática, também podem levar a concentrações aumentadas deste marcador (Nakao & Ichikawa 2013, Schieving et al. 2014).

Como mencionado, a hepatocarcinogênese pode ocorrer a partir da interação de diversos fatores. Desta forma, estudos que busquem a identificação de fatores virológicos, genéticos e/ou epigenéticos que estejam em associação com a evolução do CHC são de extrema importância (Araujo et al. 2013, Araújo et al. 2016).

No início do século XXI novas tecnologias de sequenciamento genômico começaram a fornecer uma alternativa massiva e mais rápida para o estudo de genes e de agentes associados a diversas questões biológicas do que a, até então, técnica estabelecida por Sanger (Park & Kim 2016). Até o momento, este novo tipo de sequenciamento vem sendo melhorado com vistas ao aumento de seu rendimento, velocidade e diminuição dos custos por base, o que, progressivamente, levará a democratização de seu uso (van Dijk et al. 2014). Desta forma, o sequenciamento de nova geração (NGS), tem proporcionado tanto uma melhor compreensão sobre a regulação genética e epigenética de genes associados à progressão do CHC (Schulze et al. 2016), quanto também tem transformado a capacidade de investigar a composição viral associada à progressão de diversas doenças como a síndrome da imunodeficiência adquirida (Li et al. 2013), casos de febre sem causa conhecida (Yozwiak et al. 2012) e casos de hepatite B e C crônicas, hepatite autoimune e NASH(Law et al. 2013).

1.2) Metagenômica

Sendo a genômica um campo de estudo que se concentra na análise dos genomas de organismos específicos, a metagenômica veio com outro objetivo: com ela tornou-se possível a reconstrução da diversidade microbiana presente em determinado nicho biológico através do sequenciamento e montagem da totalidade de genomas presentes. Não é ao acaso que o termo *meta*, em grego, significa

“além” ou “transcendente” (Steward & Rappé 2007, NIH 2007), ultrapassando os limites impostos pela genômica.

O conceito de metagenômica foi utilizado pela primeira vez em 1998 por pesquisadores da universidade de Wisconsin que propuseram a produção sintética de moléculas bioativas de microrganismos encontrados no solo que não eram cultiváveis. A abordagem deste grupo se fundamentou no acesso direto ao material genético de tais microrganismos com posterior clonagem em outros que pudessem ser cultivados, possibilitando, assim, a produção dos produtos químicos de interesse. Neste trabalho, o coletivo de genomas de todos os microrganismos do solo foi chamado de metagenoma do solo (Handelsman et al. 1998). Com a utilização dessa abordagem os pesquisadores puderam colocar em vista aqueles organismos que ficavam mascarados por detrás de um metabolismo incompatível com o cultivo celular (Schloss & Handelsman 2005). Deste modo, podemos conceber a metagenômica como o estudo da coleção de genomas dos diferentes organismos coabitantes de determinada comunidade biológica, de forma a contornar a necessidade prévia de cultivo, podendo ser proveniente de um nicho ambiental ou de tecidos ou fluidos de hospedeiros. Frequentemente é referida como o estudo de comunidades de microrganismos (Riesenfeld et al. 2004, Ladoukakis et al. 2014) e tem sido utilizada tanto para uma abordagem de sequenciamento quanto para expressão gênica (Schloss & Handelsman 2003).

Os vírus são considerados os entes biológicos de maior ubiquidade e abundância no planeta, mas apesar disso, menos de 1% deles pode ser cultivado (Kamien 2011). Em 2002, uma pesquisa que propunha esclarecer a diversidade viral de duas comunidades marinhas foi publicada, possibilitando o surgimento da metagenômica viral (Breitbart et al. 2002). Desde então o sequenciamento de nova geração, com abordagem metagenômica, tem revolucionado a descoberta de novos vírus em humanos e animais, permitindo a especificação e diferenciação da variabilidade presente determinado nicho apenas com acesso às sequências de ácidos nucleicos (Conceição-Neto et al. 2015).

Em resumo, a metagenômica viral comporta diferentes etapas como concentração, purificação, extração, sequenciamento e bioinformática (Thurber et al. 2009). Etapa fundamental é a remoção de bactérias e células humanas, pois, mesmo que a metagenômica seja capaz de recuperar sequências em baixíssimo número de cópias (Chan et al. 2013), os RNAs ribossomais e mitocondriais são

altamente representativos no metagenoma, com potencial de mascarar as sequências virais (Law et al. 2013).

1.3) Vírus da hepatite B

1.3.1) Classificação taxonômica

Descoberto em meados da década de 60 por Blumberg et al.(1967) através da identificação de um antígeno que, como descoberto posteriormente, estava presente apenas em pacientes com hepatite sérica, o HBV pertence à família *Hepadnaviridae*, que compreende pequenos vírus de DNA replicados pelos hepatócitos. De acordo com o grau de identidade genética e a resumida quantidade de hospedeiros para infecção, a família é dividida em dois gêneros: *Orthohepadnavirus*, que infecta mamíferos, e cujo protótipo é o próprio HBV, e *Avihepadnavirus*, que infecta aves (King et al. 2011, Seeger & Mason 2015). Ambos os gêneros compartilham características como a utilização de transcrição reversa como etapa obrigatória de sua replicação, a possibilidade de integração do genoma viral no genoma do hospedeiro e o tamanho extremamente pequeno do genoma (Lamontagne et al. 2016). Quanto à identidade genética, pouca ou nenhuma homologia parece haver entre ambos os gêneros. Fato importante, e que sustenta esse ponto, é a ausência de codificação para a proteína X em *Avihepadnavirus*, que, ao contrário, mostra-se de extrema importância para o sucesso da replicação viral em *Orthohepadnavirus* (Seeger et al. 2014, Lamontagne et al. 2016)

1.3.2) Classificação morfológica

Diferentemente do que acontece com outros vírus, a replicação do HBV é capaz de gerar três tipos diferentes de partículas virais, classificadas como infecciosas ou não infecciosas. As partículas esféricas e as filamentosas possuem cerca de 20 nm de diâmetro e são consideradas subvirais (Figura 3B). Elas podem apresentar todas as proteínas de envelope que compõe o antígeno de superfície (proteínas L, M e S), mas carecem de nucleocapsídeo, que comporta o material genético e a polimerase viral, sendo, portanto, não infecciosas. O outro tipo de partícula, descoberto por Dane (1970), e levando, portanto, seu nome, é

estruturalmente completa: um vírion com diâmetro que varia de 42-47 nm, com nucleocapsídeo e antígeno de superfície (Datta et al. 2012).

Apesar de apenas vírions serem infecciosos, eles se encontram naturalmente em desvantagem. As partículas não infecciosas são produzidas em quantidades superiores pelos hepatócitos, numa proporção cerca de 100 a 1000 vezes maior do que as partículas de Dane (Ganem & Schneider 2001, Ganem & Prince 2004). Como mencionado, estas partículas possuem antígeno de superfície, o que garante sua imunogenicidade. Em vista disso, alguns estudos inferem ser esta maior quantidade de partículas subvirais um provável mecanismo de imunoevasão, pois camuflariam a infecção devido à sua alta concentração, configurando alvo majoritário de adsorção de anticorpos anti-HBs (Rizzetto 1998, Milich 2003).

Nos vírions há a presença de um nucleocapsídeo de formato icosaédrico com cerca de 27 nm de diâmetro e formado por 240 subunidades de proteínas do core. Ele é responsável por proteger uma única cópia do genoma viral e da DNA polimerase viral. Este nucleocapsídeo é imediatamente envolto por um envelope de bicamada lipídica resultante da etapa de brotamento viral, no qual se fixam as glicoproteínas de superfície (Glebe & Bremer 2013). Adicionalmente, estas glicoproteínas se apresentam em porcentagens diferentes na superfície da partícula, com predominância da proteína *Small* (S), seguida pela *Middle* (M) e, em menor proporção, a *Large* (L) (Figura 3A) (Lamontagne et al. 2016).

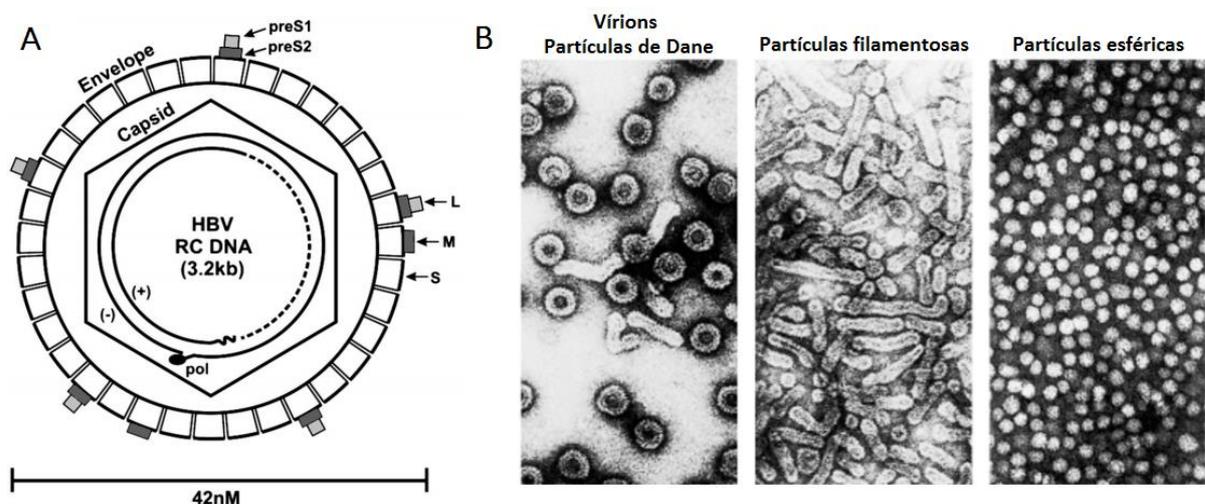


Figura 3: A) Esquema da partícula completa do HBV. Modificado de Block et al. 2007. B) Microscopia eletrônica dos diferentes tipos de partículas produzidas durante a replicação do HBV. Adaptado de Gerlich & Bruss (1993).

1.3.3) Organização Genômica

O genoma do HBV é composto por uma molécula relaxada de DNA circular parcialmente dupla fita, com aproximadamente 3.200 pares de base (pb) de extensão. Ela é codificante para quatro fases de leitura aberta (ORFs) que se encontram parcialmente sobrepostas. A fita maior é complementar ao RNA pré-genômico, sendo, por convenção, de polaridade negativa. A de polaridade positiva é incompleta, possuindo a região 5' fixa e a 3' variável em 50-90% do comprimento da sua fita complementar. Ela possui um oligômero de RNA derivado da extremidade 5' do pgRNA que funciona como iniciador para a síntese da fita negativa de DNA (Seeger et al. 1986, Lien et al. 1987). Ambas as fitas compartilham uma sobreposição coesiva na região 5' que mantém o caráter circular do genoma, uma característica exclusiva da família *Hepadnaviridae* (Gerlich & Robinson 1980, Beck 2007, Lamontagne et al. 2016). Além disso, a região 5' de ambas as fitas carrega pequenas sequências repetidas, com aproximadamente 11 nucleotídeos, que funcionam como iniciadores de cadeia. Na fita de polaridade negativa esta região se chama DR1 e na positiva, DR2. Ainda na região 5', na fita negativa encontramos o sítio de ligação covalente da DNA polimerase viral (Figura 4) (Beck 2007, Haines & Loeb 2007).

A numeração dos pares de bases do genoma do HBV mais comumente utilizada inicia a partir de um sítio único para a enzima de restrição *EcoRI*, localizado na região pré-S2 do genoma (Figura 3) (Shafritz & Lieberman 1984, Kidd-Ljunggren et al. 2002, Kay & Zoulim 2007 Seeger et al. 2014).

O genoma do HBV é extremamente compacto. Através de um engenhoso sistema de sobreposição das fases de leitura, todos os genes do vírus permanecem intimamente ligados, possibilitando a produção de até 50% mais proteínas do que o esperado para o seu tamanho (Figura 3) (Ganem & Varmus 1987, Kay & Zoulim 2007). Desta maneira, as quatro ORFs existentes no genoma do HBV codificam um total de sete proteínas: a ORF pre-S/S codifica as proteínas de superfície viral que compõem o HBsAg (L-HBsAg, M-HBsAg e S-HBsAg); a ORF pre-C/C é responsável pela síntese do "core" viral (HBcAg) e do antígeno e (HBeAg); a ORF P codifica a polimerase viral, que também possui atividade de transcriptase reversa e RNase H; e a ORF X sintetiza uma proteína regulatória homônima (HBx). A

O HBV possui um mecanismo único de replicação viral: seu genoma de DNA é replicado através da transcrição reversa de uma molécula intermediária de RNA (Ganem et al. 1994). No núcleo da célula, o genoma viral é reparado pela DNA polimerase celular, formando uma fita dupla completa, circular e covalentemente fechada (cccDNA) (Lamontagne et al. 2016). Este cccDNA é complexado às proteínas histonas celulares, assemelhando-se a um pequeno cromossomo (Glebe & Bremer 2013). Em seguida o cccDNA é transcrito em RNAs mensageiros genômicos e subgenômicos por ação da RNA polimerase II celular. Os primeiros são utilizados como molde para a síntese do DNA viral (RNA pré-genômico) e de RNAs mensageiros para a tradução de proteínas do core, da polimerase viral e do HBeAg. Os RNAs subgenômicos servem de molde para a produção das proteínas de superfície viral e da proteína HBx. Os transcritos são direcionados ao citoplasma celular para que possam entrar em contato com a maquinaria ribossomal. O sinal de encapsidação (ϵ) resulta no cingimento do RNA pré-genômico (pgRNA), ainda no citoplasma (Miyakawa et al. 2002, Glebe & Bremer 2013). A transcrição reversa ocorre dentro do capsídeo viral, dando origem à fita de polaridade negativa, em paralelo à degradação da molécula de RNA por ação da RNase H da polimerase viral. Posteriormente, a fita de polaridade positiva é sintetizada tendo como molde a negativa e, caracteristicamente, não é finalizada. A partir deste momento, o capsídeo pode ser redirecionado ao núcleo para uma autorreplicação (Tuttleman et al. 1986, Block et al. 2007), ou às membranas do retículo endoplasmático, que contém as glicoproteínas de envelope, para ser envelopado e secretado pela via constitutiva (Figura 4)(Pollack & Ganem 1993, Papatheodoridis et al. 2002, Ganem & Prince 2004). É importante ressaltar que a sinergia entre a estabilidade do cccDNA e a longa meia vida dos hepatócitos, implica em, uma vez ocorrida a infecção, o HBV perdurar indefinidamente (Zoulim 2005, Levrero et al. 2009).

O HBV vem sendo recentemente classificado como um pararetrovírus devido às similaridades que compartilha com os verdadeiros retrovírus. Sua replicação, apesar de se tratar de um vírus de DNA, é dependente do processo de transcrição reversa do pgRNA (uma forma intermediária de replicação) (Seeger & Mason 2000). Além disso, assim como os retrovírus, o HBV também é capaz de integrar seu genoma ao da célula hospedeira, entretanto, ao contrário dos verdadeiros retrovírus, esta não é uma etapa fundamental do ciclo replicativo do HBV (Levrero

et al. 2009, Raimondo et al. 2013) que, inclusive, não possui uma região codificante para uma proteína integrasse em seu genoma (Chemin & Zoulim 2009).

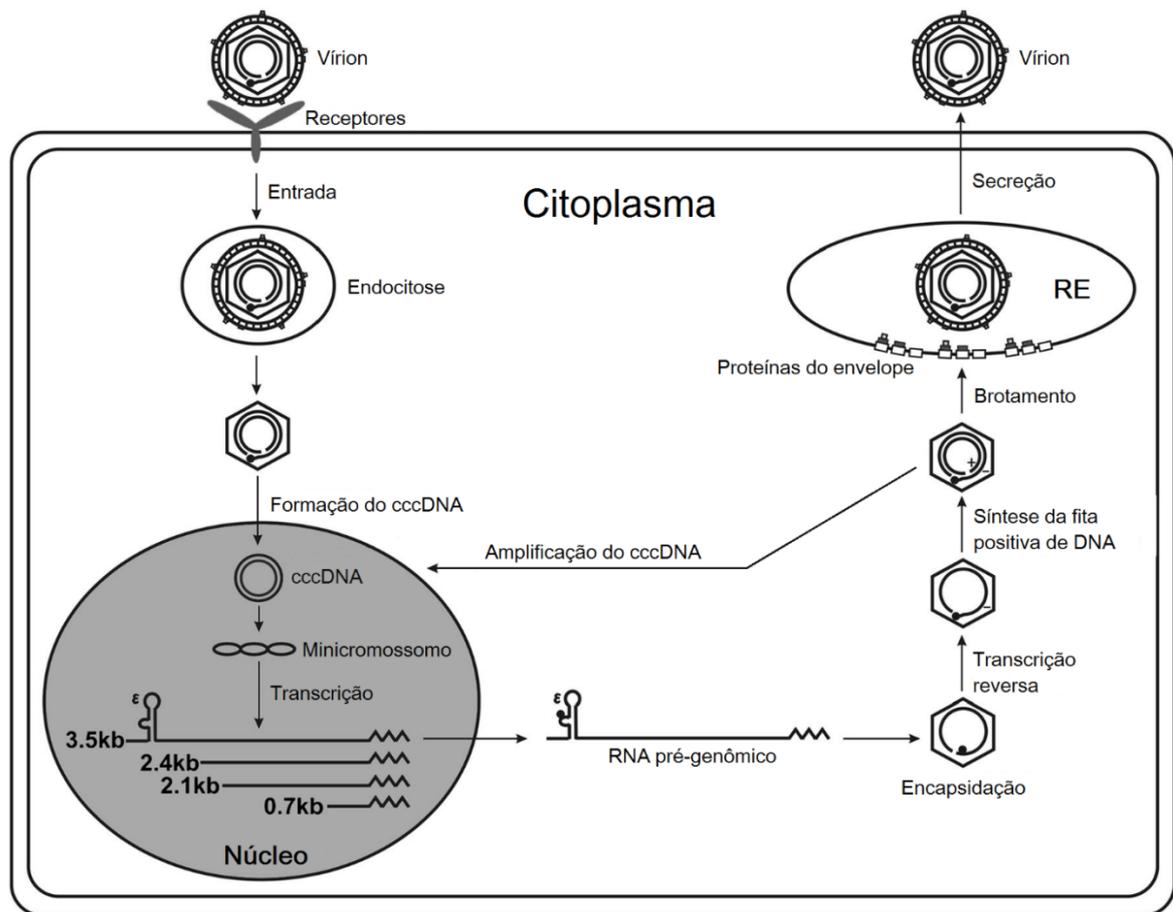


Figura 5: Ciclo replicativo do HBV. Adaptado de Block et al. 2007.

1.3.5) Variabilidade e epidemiologia molecular

Os primeiros relatos de variabilidade no HBV vieram de Le Bouvier (1971), que descreveu dois determinantes antigênicos mutuamente exclusivos, *d* e *y*. Estes determinantes encontram-se na proteína de superfície do vírus S-HBsAg, juntamente com o principal determinante antigênico *a*, localizado entre os aminoácidos 120 a 147 desta proteína (Levene & Blumberg 1969). Dois determinantes adicionais, *w* e *r*, foram descritos por Bancroft et al. (1972), que observaram que cada cepa de HBV poderia ser caracterizada como pertencente a um dos subtipos *adw*, *adr*, *ayw* ou *ayr*. Em um amplo estudo, subtipos adicionais foram caracterizados por Couroucé-Pauty et al. (1983). Os nove subtipos descritos foram *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq-* e *adrq+*. Através de

técnicas moleculares, foi possível demonstrar que substituições de aminoácidos (lisina por arginina) nas posições 122 e 160 da proteína S-HBsAg estão associadas às variações alélicas “d/y” e “w/r”, respectivamente, enquanto que no resíduo 127, estão relacionadas as subespecificidades do subdeterminante w, sendo prolina (w1/w2), treonina (w3) ou leucina (w4) (Okamoto et al. 1987, Norder et al. 1992). Os demais determinantes têm sido mapeados em aminoácidos localizados nas posições 144, 145, 158, 159, 177 e 178 (Okamoto et al. 1987, Norder et al. 1992). A subtipagem de cepas do HBV pode ser utilizada para estudos epidemiológicos e, em alguns casos, para verificar a possibilidade de infecção nosocomial. Entretanto, nos últimos anos, a subtipagem tem sido gradualmente substituída pela genotipagem.

A heterogeneidade nucleotídica é uma característica intrínseca do HBV, visto a ineficiência da polimerase viral na correção de possíveis erros de incorporação nucleotídica. De acordo com estudos filogenéticos e de genoma viral completo, o HBV é atualmente classificado em 10 genótipos (A-J). Os genótipos A-D, Fe I são subgenotipados (Araujo et al. 2011, Kramvis 2014). Convencionalmente, utiliza-se uma taxa de divergência na composição nucleotídica > 8% para se inferir um novo genótipo e de 4-8% para se inferir um novo subgenótipo (Norder et al. 1994, Butterworth et al. 2001).

O HBV tem seus genótipos com distribuição geográfica bastante característica: o genótipo D pode ser encontrado em todos os continentes; o A é encontrado principalmente na África, na Europa e nas Américas; o B e o C hegemonicamente na região asiática; o E na África Ocidental; e o F e o H nas Américas do Sul e Central, respectivamente (Kramvis 2014). Além disso, com a grande quantidade de migrações proporcionada pelo mundo globalizado, esta distribuição genotípica tem sido constantemente alterada, introduzindo genótipos diversos dos originais de cada população (Alvarado-Mora & Rebello Pinho 2013).

No Brasil, devido à alta taxa de miscigenação resultante de fatores históricos, encontramos a prevalência dos genótipos A, D e F (Mello et al. 2007, Nabuco et al. 2012). Entretanto, genótipos de presença minoritária, como C e B, podem ser encontrados nos regiões sul e sudoeste, refletindo imigrações da Ásia (Sitnik et al. 2004, Alvarado-Mora et al. 2011).

A infecção pelo HBV configura uma das principais preocupações de saúde pública mundial. São muitas as formas de contágio que se configuram possíveis,

dentre elas a sexual, a parenteral e também a vertical. Atualmente, cerca 240 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo HBV ao redor do mundo, e que poderão desenvolver cirrose e CHC, bem como mais de 680 mil morrem anualmente em decorrência desta infecção (CDC 2016, WHO 2016).

A prevalência para o marcador de superfície HBsAg do HBV varia de acordo com a localização geográfica e o que caracteriza o estado epidemiológico de uma região é a compilação de fatores como hábitos higiênicos, proporção de indivíduos em situações de risco, fatores socioeconômicos e a disponibilidade de vacinas contra o HBV (Magnius & Norder 1995). Sabidamente, a prevalência do HBV é distribuída em três diferentes faixas, sendo consideradas de endemicidade intermediária as regiões que apresentam uma variação de 2-7% da população com positividade para o HBsAg. Populações com prevalência igual ou superior a 8% e com menos do que 2% são consideradas, respectivamente, hiperendêmicas e de baixa endemicidade para o HBV (CDC 2008). Mais especificamente, as maiores taxas deste marcador são encontradas na Ásia, na África subsaariana e em parte da Oceania, onde há uma proporção de 5-8% dos adultos infectados (Figura 6) (WHO 2016). Prevalências intermediárias baixas são encontradas no Leste europeu, parte da América do Sul, parte da Oceania e na Rússia, enquanto as regiões de baixa prevalência são configuradas pelos países da América do Norte, Europa Ocidental e parte da América Latina (Gomes 2003). Na população brasileira, a prevalência do marcador HBsAg é de 0,37%, segundo o Inquérito Nacional das Hepatites Virais (Ministério da Saúde 2010), sendo, por tanto, classificado como um país de baixa endemicidade para a infecção pelo HBV. Contudo, o cerce do problema do HBV no Brasil está na região Amazônica ocidental, possivelmente por causa de fatores sociais, econômicos e de pré-disposição genética (Silva et al. 2001).

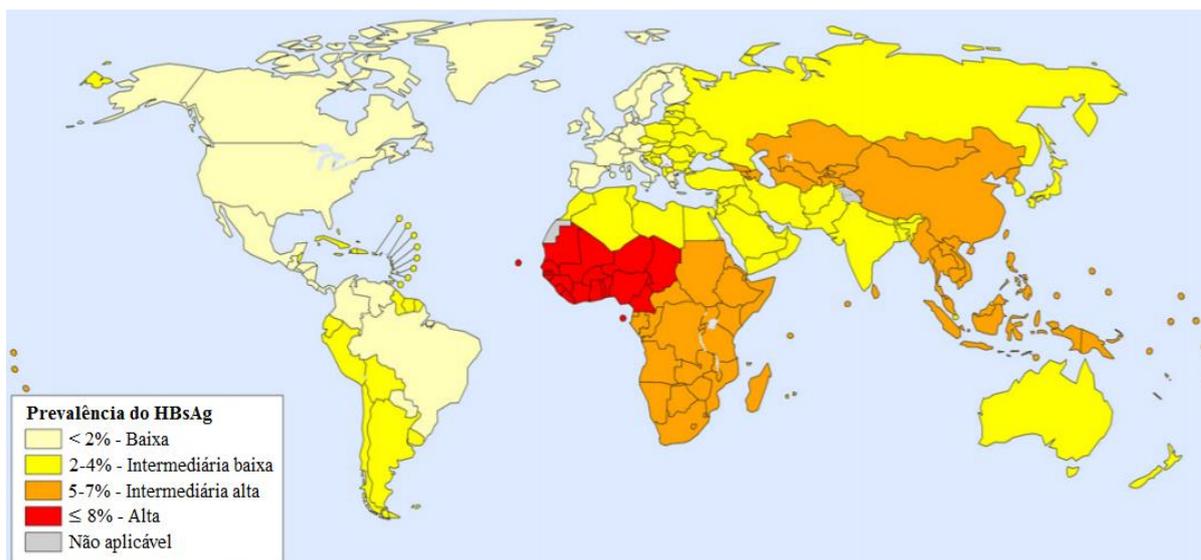


Figura 6: Prevalência mundial do marcador HBsAg do vírus da hepatite B e distribuição geográfica dos principais genótipos. Adaptado de Ott et al. (2012).

1.3.6) Aspectos clínicos e marcadores sorológicos

A infecção pelo HBV pode causar hepatite aguda, fulminante ou crônica, havendo, neste último caso, a possibilidade de progressão para um quadro de cirrose hepática e/ou CHC (Gomes 2003, Allain & Opare-Sem 2016). Os marcadores sorológicos para a infecção pelo HBV são HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe e anti-HBc IgM e IgG, distribuídos de maneira distinta nas situações clínicas supracitadas.

A hepatite B aguda é caracterizada pela detecção do antígeno de superfície HBsAg (marcador de infecção), do anticorpo anti-HBc de classe IgM, do antígeno HBeAg (marcador de replicação viral ativa) e do HBV-DNA no soro do indivíduo infectado. Concomitantemente, há a elevação dos níveis de transaminases e bilirrubina no soro, iniciando a sintomatologia. Quando o paciente entra em período de convalescença, o HBsAg e o HBeAg tendem a desaparecer, assim como os títulos de anti-HBc IgM, e dão lugar aos anticorpos anti-HBs, anti-HBe e anti-HBc IgG. O primeiro anticorpo tem caráter protetor e neutraliza a partícula viral após a infecção aguda, e cuja presença indica cura e imunidade adquirida. Em indivíduos vacinados contra o HBV o marcador anti-HBs aparece isoladamente, sendo o anti-HBc um indicador de exposição à infecção (Sjogren 1996). A maioria das infecções em adultos progride até uma etapa autolimitada, com a resolução do caso dentro de seis meses. Entretanto, uma pequena parcela (aproximadamente 1%) evolui

para a hepatite fulminante devido à morte maciça das células hepáticas por ação imunocitopática (Mendonça & Vigani 2006, Trépo et al. 2014).

A hepatite B crônica é definida pela persistência do marcador HBsAg no soro do paciente por mais de 6 meses após a infecção pelo vírus. Nesta fase, os níveis de anti-HBc IgM tornam-se indetectáveis e os marcadores de replicação viral, juntamente com as manifestações clínicas, evoluem proporcionalmente ao grau de interação vírus-células hepáticas (Sjogren 1996). Devido à persistência viral, os portadores crônicos apresentam sério risco de transmissão da doença (Flichman et al. 2014, Moresco et al. 2014). Dos indivíduos cronicamente infectados, cerca de 70% estabilizam a infecção, enquanto que 30% progridem para cirrose e destes, 5-10% desenvolve CHC (Mendonça & Vigani 2006). A Figura 7 mostra a disposição dos marcadores sorológicos encontrados na infecção aguda e na crônica pelo HBV.

A progressão da infecção pelo HBV ao estado crônico é dependente de fatores como a idade de infecção e o status imune. Recém-nascidos possuem 90% de chances de evoluírem para a hepatite crônica, em contraposição a 10% de probabilidade para adultos infectados (Strand et al. 2003). Quando o HBV é adquirido na infância, a fase de imunotolerância, caracterizada pela presença do HBeAg, altos níveis da HBV-DNA e concentrações normais de enzimas hepáticas, pode durar de 20-40 anos, com mínima progressão da doença hepática. Esta situação é provavelmente uma resposta à exposição intrauterina do feto ao HBeAg materno (Milich et al. 1990).

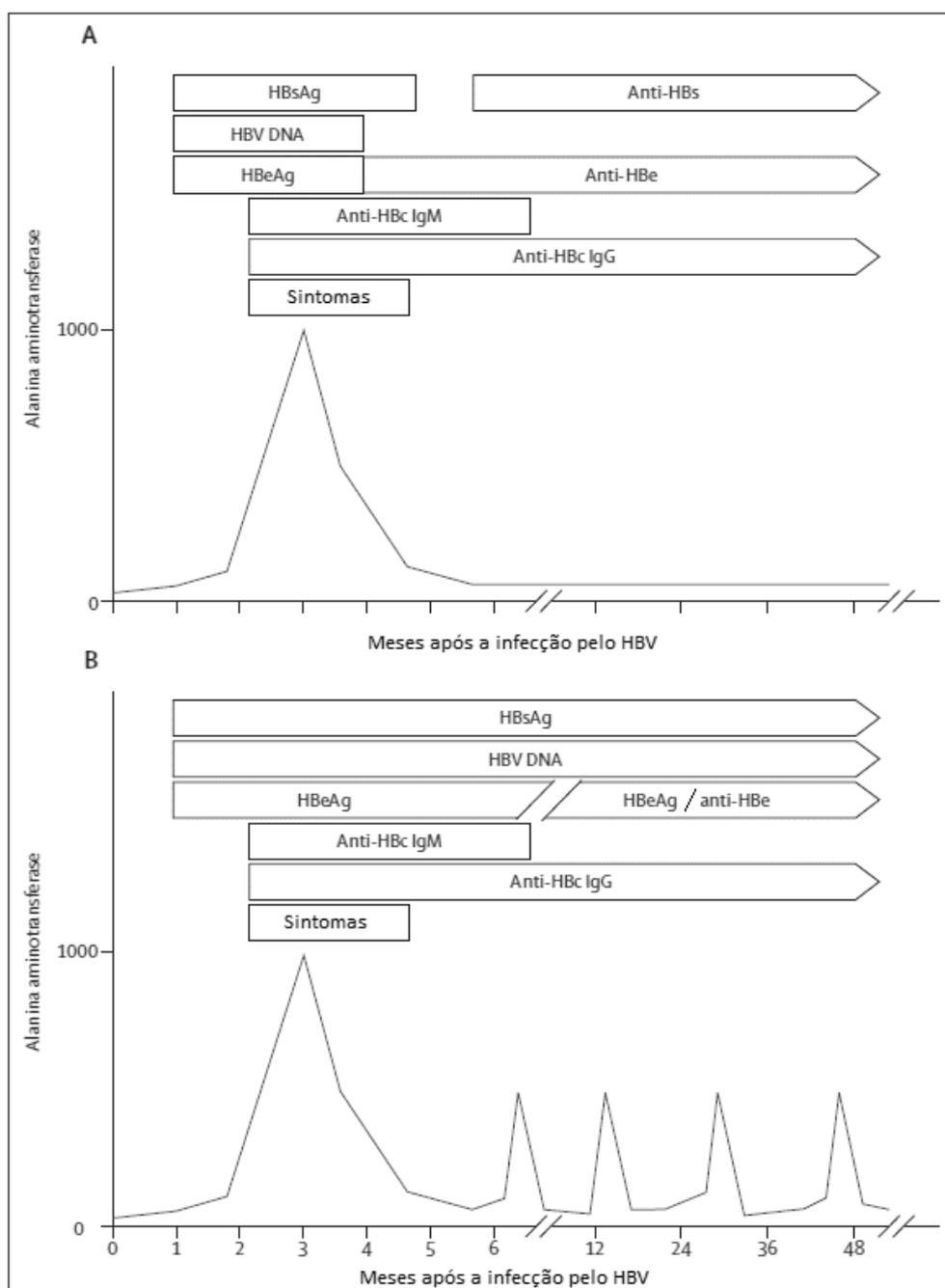


Figura 7: Marcadores sorológicos ao longo da infecção aguda (A) e da infecção crônica pelo HBV (B). Adaptado de Trépo et al. (2014).

Após a fase imunotolerante, outras fases podem ocorrer, de maneira não necessariamente subsequentes. São estas: a) fase imunorreativa, com positividade para o marcador HBeAg, menor taxa de HBV-DNA no soro e aumento do nível de aminotransferase; c) fase de carreador inativo, apresentando conversão para anti-HBe, carga viral baixa ou indetectável no soro e nível de aminotransferase normal; d) fase de hepatite B crônica com marcador HBeAg negativo, na qual encontra-se uma reativação periódica com flutuação nas taxas de HBV-DNA e aminotransferase

no soro; e) hepatite B oculta, com perda do marcador HBsAg e persistência do HBV-DNA (EASL 2012).

1.3.7) Hepatite B oculta

Apesar de a descrição do HBV remontar a década de 1960, a hepatite B oculta só passou a configurar o tema principal de muitas pesquisas relativas à hepatologia na virada do século XX, quando houve a publicação de um trabalho na revista *The New England Journal of Medicine*, investigando o HBV-DNA na biópsia de pacientes com sorologia negativa para o HBsAg e com doença crônica do fígado (Cacciola et al. 1999). Desta forma, a condição biológica da hepatite B oculta deixou de ser atrelada a razões desconhecidas, como era até o final da década de 90, para ser apoiada por hipóteses de maior consistência, porém ainda não totalmente elucidadas (Raimondo et al. 2013).

A hepatite B oculta é tradicionalmente caracterizada pela detecção do HBV-DNA no tecido hepático acompanhada da impossibilidade de detecção do marcador de infecção HBsAg. O HBV-DNA também pode ser encontrado no soro, porém, normalmente em quantidades menores do que 200 UI/ml (Cacciola et al. 1999, Raimondo et al. 2008).

Muitas evidências sustentam fatores, tanto do hospedeiro quanto virais, como os indutores e mantenedores do status oculto da infecção pelo HBV (Raimondo et al. 2013). Dentre os primeiros fatores podemos citar os imunológicos, e os epigenéticos. Estudos indicam que o sistema imunológico possui a habilidade de suprimir a replicação do HBV, uma característica sustentada pelo fato de que qualquer condição que leve à imunossupressão também seja capaz de reativar a hepatite B oculta (Torbenon & Thomas 2002, Raimondo et al. 2007). Além disso, a memória imunológica contra os antígenos do HBV pode persistir por muitos anos após a recuperação de uma hepatite B aguda, indicando que mesmo durante uma infecção oculta o HBV seja capaz de produzir antígenos que mantenham a especificidade da resposta de células T (Penna et al. 1996, Rehmann et al. 1996). Já as modificações epigenéticas, que são capazes de alterar o padrão de expressão de um gene sem modificar a sua disposição nucleotídica (Baylin & Jones 2011), incluem o silenciamento gênico por hipermetilação das ilhas CpG do genoma do HBV (Vivekanandan et al. 2009, Levrero et al. 2009).

Possíveis fatores virais de indução da hepatite B oculta se concentram em mutações na proteína S e coinfeção com outros vírus (Raimondo et al. 2013). Sendo a hepatite B oculta caracterizada pela ausência de HBsAg detectável, mutações nas regiões de ligação com os anticorpos anti-HBs dessa proteína foram indicadas como responsáveis por limitar o seu reconhecimento pelo sistema imunológico (Raimondo et al. 2007, El Chaar et al. 2010). Além disso, outro provável mecanismo de indução da hepatite B oculta é a coinfeção com outros vírus, em especial o HCV, cuja proteína do “core” foi demonstrada como forte inibidora da replicação do HBV (Raimondo et al. 2005a), além desta condição oculta da infecção pelo HBV apresentar maior prevalência em pacientes coinfectados pelo HCV (Torbenon & Thomas 2002, Raimondo et al. 2007).

Quando consideramos os marcadores sorológicos de infecção prévia, a hepatite B oculta pode ser dividida em duas condições: hepatite B oculta soropositiva, com a expressão de anticorpos anti-HBc e/ou anti-HBs; e hepatite B oculta soronegativa, sem a expressão de marcador sorológico (Figura 8) (Raimondo et al. 2008). A primeira situação pode ser provocada tanto pela perda do HBsAg em prosseguimento a uma hepatite B aguda, quanto após anos de uma infecção crônica normal (Michalak et al. 1994, Yotsuyanagi et al. 1998, Cacciola et al. 1999, Chen et al. 2002). Já a segunda, soronegativa, pode ser ocasionada também por duas vias: pela perda progressiva dos anticorpos e por falta de produção dos mesmos no início da infecção (Raimondo et al. 2008). Desta maneira, a hepatite B oculta se apresenta num contexto de diferentes aspectos virológicos e imunológicos, sob os quais podemos presumir uma infecção pelo HBV mesmo em pacientes com negatividade para o HBsAg, positivos ou não para os marcadores de infecção prévia, como os anticorpos anti-HBs e anti-HBc (Liang et al. 1990, Zhang et al. 1993).

Além disso, também podemos mencionar a “falsa” hepatite B oculta, na qual o HBsAg torna-se indetectável, não por sua perda progressiva, mas sim, porque a variante viral que causou a infecção é considerada um mutante de escape: seu genoma codifica uma proteína de superfície modificada que impossibilita seu reconhecimento pelos kits comerciais comumente utilizados para o diagnóstico do HBV. Os níveis de HBV-DNA no soro são também comparáveis aos de pacientes com sintomas clínicos para hepatite B clássica (Hu 2002, Torbenon & Thomas 2002, Weber 2006, Gerlich et al. 2007, Raimondo et al. 2008). É importante relatar

que a maioria dos casos de hepatite B oculta é iniciada por variantes de replicação competente, mas que são suprimidas durante esta atividade, resultando em baixa viremia (Bréchet 2001, Hu 2002, Torbenson & Thomas 2002, Raimondo et al. 2007, Pollicino et al. 2007), e apenas um pequeno número dos casos de hepatite B oculta é relativo a variantes de escape viral (Blum et al. 1991, Chaudhuri et al. 2004). Vale ressaltar que os dados de prevalência da hepatite B oculta estão sujeitos à sensibilidade e especificidade dos métodos de investigação do HBV (Raimondo et al. 2013).

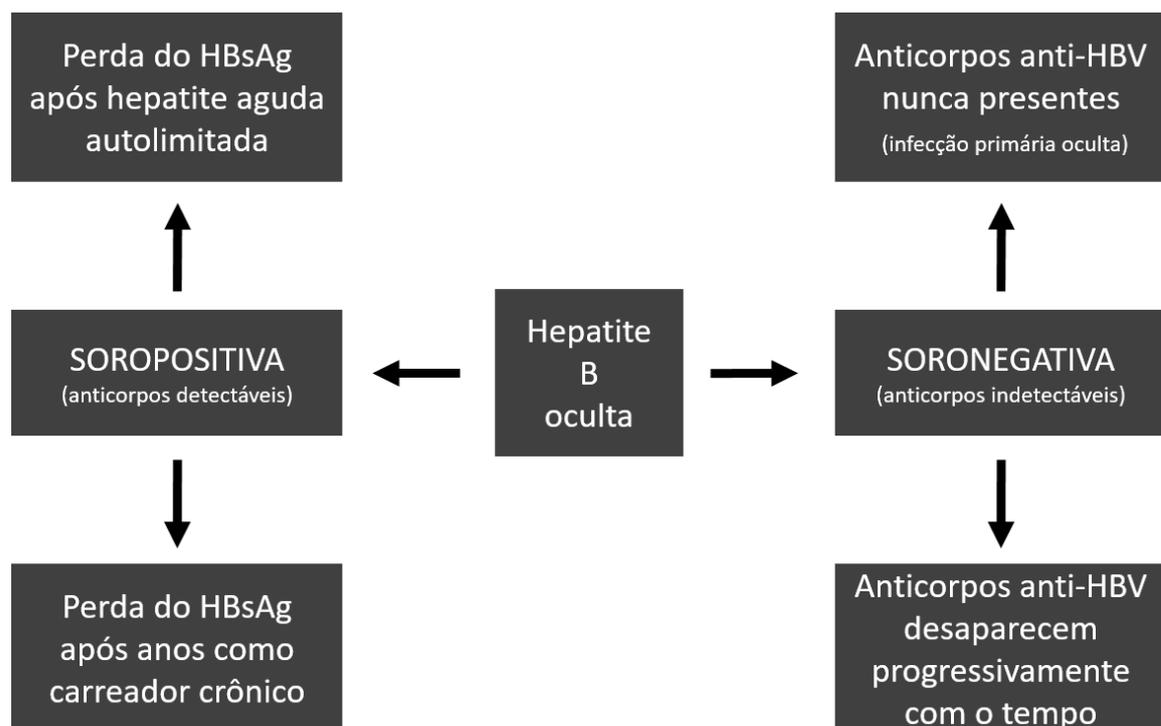


Figura 8: Representação esquemática dos diferentes perfis sorológicos da hepatite B oculta. HBsAg = antígeno de superfície do HBV, anti-HBs = anticorpo contra o antígeno de superfície viral. Modificado de Raimondo et al. 2013.

Apesar da hepatite B oculta ser considerada inofensiva em pacientes imunocompetentes, caso estes entrem em estado de imunossupressão, ela pode ser reativada e suscitar um quadro clínico clássico, e, desta forma, a transmissão de partículas virais a outra pessoa pode gerar infecções típicas pelo HBV (Bréchet 2001, 2004). A literatura também reporta a hepatite B oculta como um cofator para a hepatocarcinogênese, quando uma causa concomitante de injúria hepática estiver presente, como infecção pelo HVC ou consumo abusivo de álcool, por exemplo (Pollicino et al. 2011).

Estima-se que o HBV mantenha seu potencial oncogênico em todas as situações clínicas do percurso de sua infecção, incluindo a hepatite B oculta. Assim sendo, é de extrema importância pontuar seu potencial oncogênico, mesmo no status oculto, através de: a) persistência do HBV-DNA nos hepatócitos, tanto integrado ao genoma humano quanto na forma episomal (minicromossomo); b) manutenção da replicação viral pelas células hepáticas, mesmo que em níveis baixos; c) capacidade de contribuição para a progressão da lesão hepática em direção à cirrose, que é o principal fator de risco para o CHC (Raimondo et al. 2013). Estima-se que a existência de outras causas que levem à lesão hepática, como coinfeção com o HCV, acelere tal processo (Raimondo et al. 2005b, 2013). Vale ressaltar que o cccDNA do HBV oculto pode permanecer nos hepatócitos mesmo depois que o HBV-DNA circulante se tornar indetectável, promovendo o desenvolvimento de CHC mesmo em pacientes HBsAg e HBV-DNA negativos no soro, independentemente da eficácia de terapias antivirais (Takeda et al. 2016).

Apesar de o impacto clínico da hepatite B oculta no desenvolvimento de CHC ainda não ser totalmente estabelecido, os recentes trabalhos publicados procuram comprovar alguma possível associação. Desta forma, Coppola et al. (2015) publicou uma revisão na qual este tema foi cuidadosamente abordado, citando diversos outros estudos que investigaram o assunto, incluindo alguns que avaliaram o papel da hepatite B oculta no desenvolvimento da cirrose em pacientes cronicamente infectados pelo HCV (Cacciola et al. 1999, Silva et al. 2004, Hui et al. 2006, Mrani et al. 2007, Laguno et al. 2008, Matsuoka et al. 2009, Emara et al. 2010, Squadrito et al. 2013).

1.3.8) Relação entre a infecção pelo HBV e o carcinoma hepatocelular

O HBV é o principal agente etiológico para o desenvolvimento de CHC, sendo a sua infecção crônica a causa de 55-60% de todos os casos de CHC no mundo. Além disso, o risco de desenvolver de CHC é 100 vezes maior entre indivíduos cronicamente infectados pelo HBV quando comparados a indivíduos sem a infecção (But et al. 2008, Pollicino 2014). Já a infecção pelo HCV aumenta esse risco em 20 vezes (Sun et al. 2003, McDonald et al. 2008a). Desta maneira, a Organização Mundial de Saúde classificou o HBV como o segundo principal agente carcinogênico humano (Pollicino et al. 2011, Cogliano et al. 2011).

A transformação maligna dos hepatócitos em CHC é um processo gradual, no qual há a influência de fatores tanto herdados quanto adquiridos. O desenvolvimento do CHC pode ocorrer por diferentes mecanismos, diretos e indiretos, que possuem como resultado mudanças na estabilidade das células hepáticas (Coleman 2003). O HBV é capaz de agir por ambas vias.

O mecanismo indireto pelo qual o HBV é associado à hepatocarcinogênese está relacionado ao desenvolvimento da cirrose hepática, que pode ser desencadeada tanto por uma inflamação crônica do fígado quanto pela indução de estresse oxidativo devido à hepatite crônica, gerando lesões no tecido (Marquardt et al. 2015). Além disso, a infecção pelo HBV causa uma inflamação crônica no tecido hepático, levando a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que, por sua vez, podem induzir vários tipos de dano ao DNA, como quebras da sequência de nucleotídeos e mutações pontuais (Shibutani et al. 1991, Wink et al. 1991).

O outro mecanismo pelo qual a infecção pelo HBV pode desenvolver o câncer de fígado está associado às alterações diretas, genéticas ou relacionadas a atividade da sua proteína HBx (Schulze et al. 2016). A inserção clonal do genoma do HBV tem sido frequentemente relacionada a indução de deleções no DNA humano nos sítios de integração, promovendo a inativação de genes supressores de tumor e a instabilidade cromossômica (Hino et al. 1986). Além disso, a integração de regiões promotoras e com potencial intensificador próximo a genes envolvidos na carcinogênese pode modular a função e expressão destes (Moore & Chang 2010). Frequentemente a integração genômica do HBV em genomas de CHC tem sido reportada nos genes *TERT* (18-22%), *KMT2B* (5-10%) e *CCNE1* (5%). O primeiro é o gene que codifica a telomerase celular e a inserção do genoma viral na região promotora deste gene está associada a sua reativação, o que induz as células mutadas a adquirirem um potencial maligno e de escape da apoptose. Os outros dois são, respectivamente, o gene da histona metiltransferase e o gene da ciclina E, uma proteína que atua no ciclo celular (Jiang et al. 2012, Ding et al. 2012, Takeda et al. 2016).

A proteína HBx é frequentemente encontrada no citoplasma celular (Su et al. 1998) e atua através de interações proteína-proteína que causam a ativação da transcrição de diversos promotores celulares e virais, interferindo na expressão de genes e modulando a ação de fatores envolvidos na proliferação celular, apoptose,

inflamação e resposta imune (Tang et al. 2006, Kew 2011). Ela pode interagir com a proteína p53 e deslocá-la no citoplasma, causando a inativação de diversas vias celulares dependentes desta proteína como controle do ciclo celular e apoptose (Wang et al. 1994, Ueda et al. 1995, Takada et al. 1997, Jang et al. 2002, Mathonnet et al. 2004). Além disso, a proteína HBx também tem sido descrita como capaz de induzir a super expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Kremsdorf et al. 2006), cuja função é de extrema importância para o crescimento do tumor, modular de controle epigenético de genes celulares e virais (Park et al. 2007, Belloni et al. 2009) e causar distúrbios de segregação cromossomal por se ligar ao fuso mitótico dos hepatócitos em divisão (Kim et al. 2008, Wen et al. 2008).

1.4) Torque teno vírus

1.4.1) Classificação taxonômica

O Torque teno vírus (TTV) foi descoberto em 1997 a partir de estudos moleculares de análise de diferença representacional (RDA) de DNA proveniente do soro de um paciente com hepatite pós-transfusional de etiologia desconhecida. Parte da sua caracterização morfológica revelou um vírus não envelopado e com genoma de DNA fita simples (Nishizawa et al. 1997, Okamoto 1998). Desde 2005, o TTV pertence à família *Anelloviridae*, mais especificamente ao gênero *Alphatorquevirus* (ICTV 2015). Também neste ano foi proposto o seu atual acrônimo que, derivado do latim, emprega as palavras *torque* (colar) e *tenuis* (estreito) para fazer referência ao formato de seu genoma (Fauquet et al. 2005).

1.4.2) Classificação morfológica

A partícula viral do TTV possui uma morfologia simplificada (Figura 9A), com formato icosaédrico do nucleocapsídeo e diâmetro variável entre 30-50 nm (Mushahwar et al. 1999). A capacidade de resistir à ação de solventes e ao calor seco tipifica a ausência de um envelope viral (Okamoto et al. 1998, Ukita et al. 1999). As proteínas virais ainda não foram totalmente caracterizadas, mas acredita-

se que o capsídeo seja formado por uma única proteína estrutural (Manzin et al. 2015).

Por tratar-se de um vírus de propagação *in vitro* limitada devido à falta de um sistema celular adequado, estudos que visem sua descrição estrutural são sobremaneira escassos até o momento (Spandole et al. 2015). Uma das poucas micrografias eletrônicas disponível é de um estudo de Itoh et al. (2000), que analisou o sobrenadante de fezes e soro de pacientes infectados (Figura 9B).

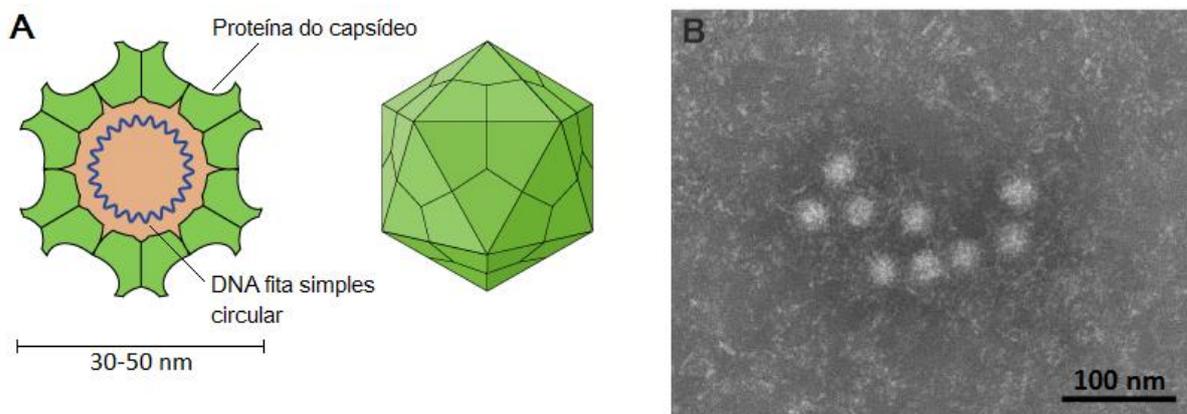


Figura 9: A) Esquema da partícula viral do TTV. Adaptado de <http://viralzone.expasy.org>. Acesso em 21/10/2016. B) Micrografia eletrônica de partículas agregadas de TTV. Retirado de Itoh et al. 2000.

1.4.3) Organização genômica

Em contraposição a pouca informação sobre sua estrutura, o genoma do TTV é o seu componente mais estudado. Ele é composto por uma macromolécula de DNA circular fita simples, com um tamanho que varia de 3,6-3,8 kb de extensão (Miyata et al. 1999, Heller et al. 2001, Peng et al. 2002). A hibridização *in vitro* do DNA genômico viral com moléculas de RNA complementar (+) foi responsável por demonstrar a polaridade negativa desta macromolécula (Mushahwar et al. 1999).

O genoma do TTV pode ser dividido em duas regiões distintas (Figura 10). A menor delas tem cerca de 1,2 kb de extensão e é não codificante, chamada UTR (do inglês *untranslated region*) ou NCR (do inglês *non coding region*). Ela possui uma região promotora *TATA Box* (Clewley et al. 2000) e um seguimento, com aproximadamente 110 nucleotídeos, rico em pares C-G, no qual estruturas

secundárias que podem atuar auxiliando o processo de replicação viral se formam (Mushahwar et al. 1999, Miyata et al. 1999, Okamoto et al. 1999b).

A outra região é codificante e apresenta pelo menos três ORFs na sua extensão de 2,6 kb (Kamada et al. 2004, Manzin et al. 2015). A ORF1 codifica um polipeptídeo que pode variar de 700-770 aminoácidos de extensão, sendo a provável proteína constitutiva do capsídeo viral (Tawara et al. 2002). Sua participação na replicação por círculo rolante também tem sido sugerida. Além disso, ela contém um motivo N22, a primeira região a ser descrita, que codifica uma proteína homônima (Erker et al. 1999, Mushahwar et al. 1999). A ORF2 codifica uma proteína de extensão bem menor, com cerca de 200 aminoácidos, e que possui um suposto motivo conservado correspondente a proteína fosfatase tirosina (Tanaka et al. 2001, Peng et al. 2002), estando, possivelmente, envolvida na regulação de proteínas celulares e virais durante a infecção natural (Zheng et al. 2007). Por fim, o produto da ORF3 é uma proteína composta por aproximadamente 280 aminoácidos, portando um domínio rico em serina na porção C-terminal. Esta característica tem sua significância, visto a semelhança com a proteína não estrutural 5A do HCV, responsável por suprimir a ação antiviral do interferon (Asabe et al. 2001).

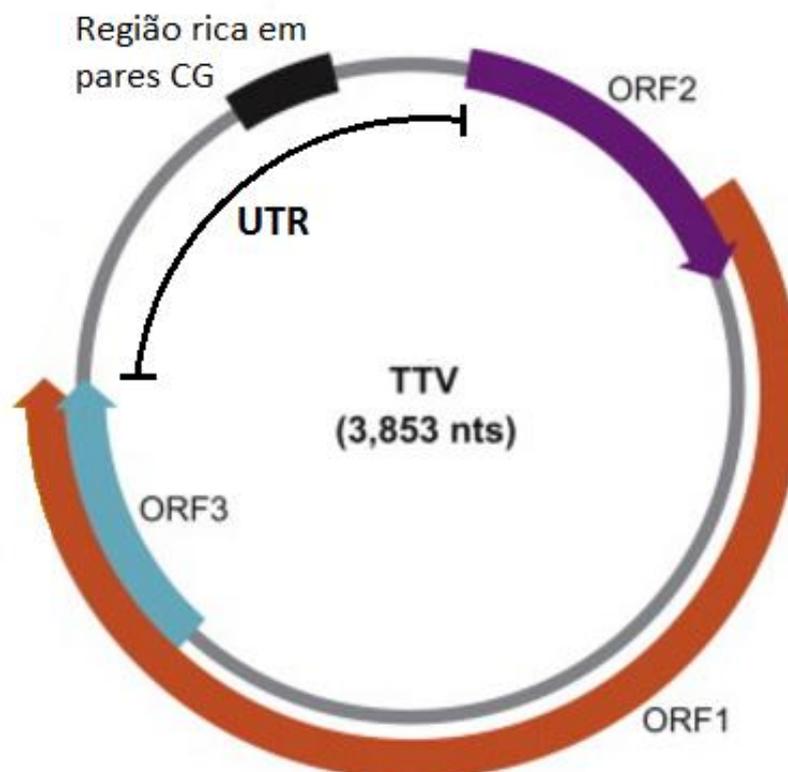


Figura 10: Organização genômica do TTV. Adaptado de Watabane et al. (2005).

1.4.4) Replicação viral

Atualmente sabe-se que o TTV pode ser replicado por células de diferentes tecidos, sendo o seu genoma já recuperado de tecidos como o hepático, o pulmonar, do rim, do baço, das células periféricas do sangue, das glândulas da tireoide e dos nódulos linfáticos (Okamoto et al. 2001, Bando et al. 2001, Mariscal et al. 2002). Essa variabilidade sugere que a partícula viral possa formar um complexo de adsorção com os mais diferentes tipos de receptores celulares (Okamoto et al. 2001).

O mecanismo responsável por replicar as partículas do TTV ainda não é conhecido em sua totalidade, mas estima-se que, por se tratar de um vírus com genoma de DNA circular fita simples, por analogia, a replicação do seu genoma siga os mesmos princípios e mecanismos utilizados durante a replicação dos circovírus, vírus de plantas e bacteriófagos, que compartilham da mesma estrutura genômica. Desta forma, o mecanismo postulado é o de círculo rolante, que utiliza de um intermediário de DNA circular fita dupla (Mushahwar et al. 1999).

1.4.5) Variabilidade e epidemiologia molecular

O TTV possui grande variabilidade genética, mesmo se tratando de um vírus de DNA (Tanaka et al. 1998, Clewley et al. 2000). Entretanto, esta variabilidade não ocorre de maneira homogênea no genoma viral, sendo a região UTR bastante conservada entre os membros da família *Anelloviridae*, o que sugere um papel importante e provavelmente relacionado à regulação da expressão genômica (Spandole et al. 2015). A variabilidade genética é mais elevada nas chamadas regiões de hipervariabilidade, que ocupa cerca de 2/3 do genoma na região codificante (Okamoto et al. 1999a).

Estudos de filogenia molecular da ORF1 têm demonstrado que o TTV é dividido em mais de 30 genótipos, com até 30% de diferença nucleotídica entre si (Okamoto et al. 1999b), que são classificados em cinco grandes grupos filogenéticos (genogrupos ou grupos genômicos), numerados de 1-5 (Peng et al. 2002). Entre os genogrupos a distância genética é superior a 60% (Nishizawa et al. 2001, Heller et al. 2001, Biagini 2004, 2009, Manzin et al. 2015). O genogrupo 1 possui seis genótipos e é representado pelo isolado viral TA280 (protótipo)

pertencente ao genótipo 1 (Okamoto 1998). O genogrupo 2 possui cinco genótipos e é representado pelo isolado PMV (Clewley et al. 2000). O genogrupo 3 é composto por onze genótipos, incluindo os isolados SANBAN e TUS01 (Hijikata et al. 1999, Okamoto et al. 1999a). Já os genogrupos 4 e 5 apresentam, respectivamente, nove e três genótipos, carecendo de um representante bem definido (Peng et al. 2002). Mais recentemente, dois novos genogrupos (6 e 7) foram descritos para o TTV (Hsiao et al. 2016).

Várias são as hipóteses que versam sobre essa extensa variabilidade. A primeira é sustentada pela alta frequência de mutações, que puderam ser observadas através de comparações temporais entre as sequências virais isoladas de um mesmo indivíduo (Gallian et al. 1999, Biagini et al. 1999, Irving et al. 1999). Entretanto, como sabido, devido à ausência de enzimas específicas, os vírus de DNA utilizam a própria maquinaria celular para a manutenção de seu genoma, sendo esta, natural e evolutivamente compatível com a prevenção de erros. As possibilidades levantadas foram a replicação com enzimas celulares com menor potencial de correção de erros e a utilização de um intermediário de RNA, assim como encontrado no vírus HBV. Entretanto, esta última hipótese foi desconsiderada pelo fato de o TTV não codificar uma transcriptase reversa (Nishizawa et al. 1999).

Um segundo mecanismo que pode sustentar a alta variabilidade do TTV são os eventos de recombinação intragenômica (Leppik et al. 2007). A variabilidade genética se mostra proeminente na ORF1 devido a existência de três regiões hipervariáveis caracterizadas por inúmeras inserções e deleções que podem, por fim, resultar numa diversidade entre os genogrupos maior do que 70%. Esta região genômica hipervariável pode estar relacionada com mecanismos de escape da resposta imune e a persistência da infecção (Jelcic et al. 2004). Sítios de recombinação também já foram relatados na região UTR (Worobey 2000).

Além disso, um extenso número de estudos tem reportado a ocorrência de coinfeções com vários isolados de TTV, que podem pertencer a diferentes genótipos e genogrupos, fortalecendo as hipóteses sobre uma possível recombinação intergenômica (Ball et al. 1999, Biagini et al. 1999, Irving et al. 1999, Sugiyama et al. 2001, Peng et al. 2002, Takács et al. 2003, Devalle & Niel 2005, Maggi et al. 2005, Kakkola et al. 2008, Pinho-Nascimento et al. 2011). Especula-se, também, que a transmissão interespecífica do TTV configure uma fonte de variabilidade, visto que partículas semelhantes ao TTV já foram isoladas em

primatas não humanos, em animais domésticos (cães e gatos), em suínos, e outros (Okamoto 2009).

Dado o exposto, o mecanismo exato pelo qual o TTV acumula essa diversidade ainda é incerto e menos fundamental do que realizar que ele, muito provavelmente, tenha coevoluído com a espécie humana, sendo este um reflexo da sua grande variabilidade (Gallian et al. 1999, Biagini et al. 1999, Pritchard et al. 1999).

As estimativas de prevalência do TTV são feitas com base na detecção do genoma viral por PCR. Entretanto, o desenho de oligonucleotídeos a partir de sequências previamente conhecidas limita a detecção de novas variantes (Ninomiya et al. 2008). Os primeiros ensaios de PCR consideravam como alvo a ORF1, altamente heterogênea, e posteriormente a região UTR. Esta última, por ser não codificante, é capaz de sustentar a detecção do TTV com menor estringência quanto aos diferentes genogrupos (Hino 2002). O desenvolvimento de técnicas de PCR mais sensíveis, como a PCR em tempo real, possibilitou a diferenciação e quantificação dos genogrupos (Hu et al. 2005, Ninomiya et al. 2008). A Figura 11 compara a prevalência do TTV pelas regiões não codificante (a) e codificante (b) do genoma viral.

O TTV possui uma alta prevalência mundial, sendo encontradas taxas que variam em 50-100% na população estudada (Takahashi 1998, Hsieh et al. 1999, Hafez et al. 2007). A presença dos cinco genogrupos tem sido relatada em estudos de diferentes regiões, sendo o 3 descrito como frequentemente o de maior prevalência, em contraposição aos genogrupos 2 e 4, que seriam os menos prevalentes (Devalle & Niel 2004, Hu et al. 2005, Biagini et al. 2006). As maiores prevalências são, ainda, reportadas em usuários de drogas e em pacientes que passaram por tratamento transfusional ou de hemodiálise, entretanto, a alta titulação é reflexo de um estado imunocomprometido (Touinssi et al. 2001). Sabe-se também que a infecção pelo TTV está fortemente associada ao avanço da idade (Hsieh et al. 1999, Saback et al. 1999, Zhong et al. 2001).

No Brasil, um estudo de prevalência realizado com doadores de sangue, indivíduos cronicamente infectados pelo HBV e indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), residentes no Rio de Janeiro, encontrou prevalências de 46%, 43%, 35%, 18% e 17% para os genogrupos 5, 3, 1, 2 e 4 (Devalle & Niel 2004). Já outro estudo, realizado com pacientes sob tratamento de

diálise na região sul do país, reportou maior frequência do genogrupo 5 (48%), seguido pelo 4 (46%) e nenhuma sequência para o genogrupo 2 foi encontrada na população estudada (Takemoto et al. 2015).

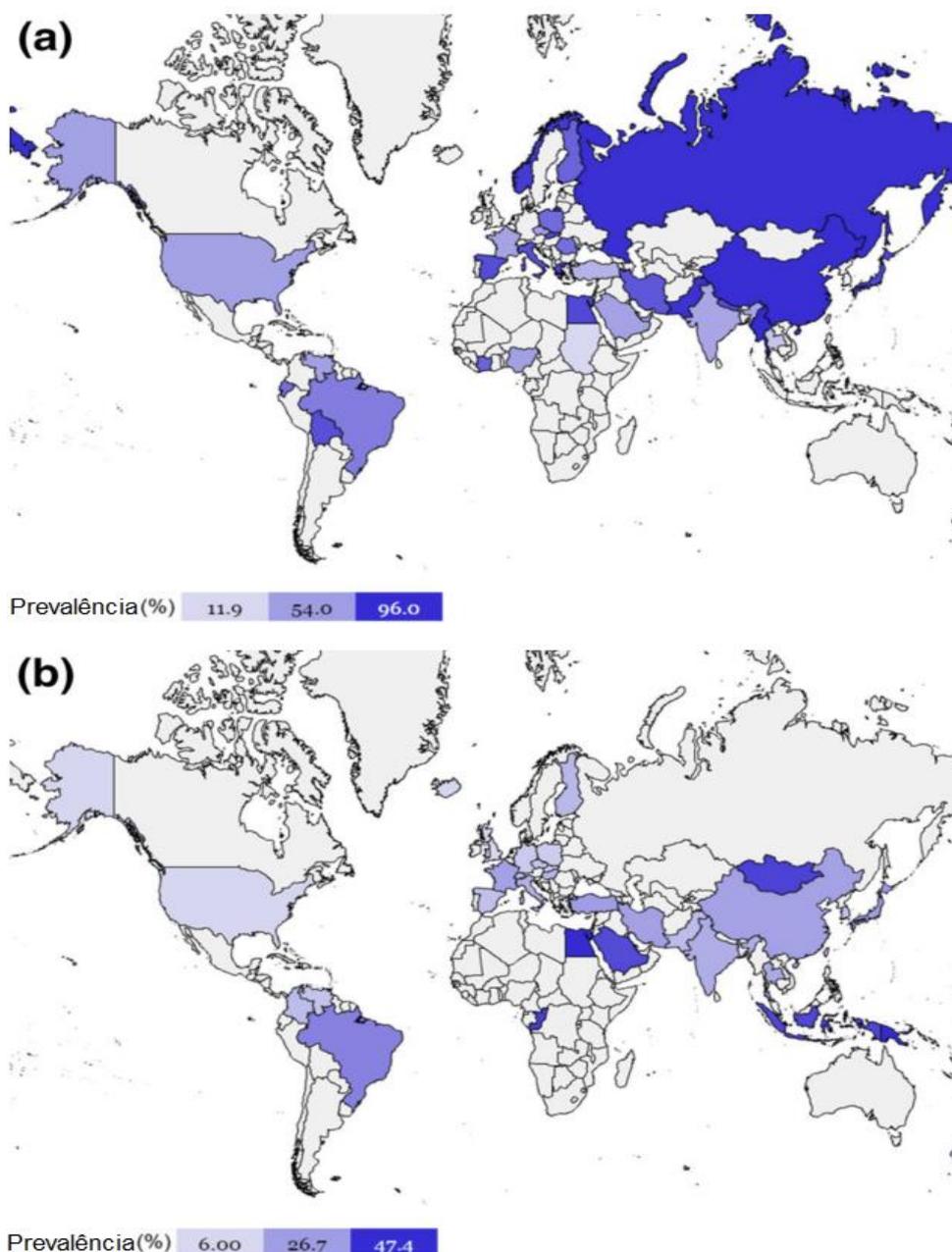


Figura 11: Prevalência mundial do TTV com base na análise das regiões genômicas UTR (a) e codificante (b). Adaptado de Spandole et al. 2015.

Acreditava-se que a principal rota de transmissão do TTV fosse a parenteral devido a frequente presença do vírus em usuários de drogas e em pessoas que tiveram exposição ao sangue contaminado (Jafari et al. 2012, Massaú et al. 2012). Entretanto, esta hipótese não é compatível com as características de alta

prevalência mundial. A fim de preencher esta lacuna, novas rotas de transmissão vêm sendo postuladas, como a salivar (Gallian et al. 2000), a respiratória (Chikasue et al. 2012), a por via hídrica (Luo & Zhang 2001) e a alimentar (Jiménez-Melsió et al. 2013). A rota de transmissão sexual também tem sido reportada como possível (Calcaterra et al. 2001), mas mostrou-se incidental visto que a infecção pelo TTV pode ocorrer anteriormente à maturidade sexual. Ademais, comparações entre amostras virais recuperadas de mãe e filho mostraram similaridades em alguns casos e divergências em outros, confirmando a aquisição do vírus tanto por via vertical quanto por via horizontal (Bagaglio et al. 2002, Lin et al. 2002).

1.4.6) TTV, hepatite e câncer

Desde sua descoberta em 1997 o debate sobre a atuação no organismo do hospedeiro e a possível patologia do TTV tem estado em aberto. Contudo, é notório que um vírus ubíquo, de alta prevalência e que já se apresenta nas fases iniciais da vida humana não seja patogênico *per se* (Nishiguchi et al. 2000). Justamente, a associação da sua alta prevalência na população geral e a capacidade de estabelecer uma infecção persistente, colocam em xeque qualquer dúvida quanto ao seu potencial patogênico. Conseqüentemente, estudos da virada do século já apontaram o TTV como um componente do viroma humano (Griffiths 1999, Simmonds et al. 1999). As pesquisas que recaem para esta falta de patogenicidade, normalmente se fundamentam no longo período de coevolução do vírus com a espécie humana e na falta de um ligante celular específico (Spandole et al. 2015). Apesar disso, o TTV tem sido potencialmente relacionado com algumas doenças como hepatite (Asim et al. 2010), desordens hematológicas (Focosi et al. 2010), doenças respiratórias (Maggi et al. 2003) e doenças autoimunes (Gergely et al. 2006).

Associado à sua descoberta, o fato de o TTV ser replicado nas células hepáticas, *in vivo* e *in vitro*, fez com que as pesquisas procurassem uma relação entre o vírus e o desenvolvimento de doença hepática (Spandole et al. 2015). Pelas causas já mencionadas, é muito improvável que o TTV não cause hepatite de maneira isolada, sem associação com outros vírus ou causas, entretanto sua presença já foi associada a casos de hepatite fulminante (Huang et al. 2000) e de cirrose em pacientes transplantados (Kazemi et al. 2015).

Enquanto algumas pesquisas mostram que os perfis clínicos de pacientes com hepatites virais crônicas em coinfeção com o TTV não são significativamente diferentes daqueles sem a coinfeção (Chattopadhyay et al. 2005), outras pesquisas mostraram que a presença do TTV em pacientes com hepatite culmina num perfil anormal do tecido hepático (Tanaka et al. 1999, Hu et al. 2002, Desai et al. 2005). Desta maneira, não se pode excluir por completo a possibilidade de o TTV favorecer a progressão da lesão hepática em pacientes previamente infectados pelo HBV ou HCV (Moriyama et al. 2001).

2) JUSTIFICATIVA

As infecções crônicas pelos vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV) são os principais fatores etiológicos para o CHC, sendo responsáveis por até 80% dos casos deste no mundo. Além dessas infecções, o alcoolismo, hepatite autoimune e NASH são fatores etiológicos não virais importantes para o desenvolvimento do CHC. Alguns estudos têm sugerido que a hepatite autoimune poderia ser ativada por vírus (Gish & Mason 2001), assim como o acúmulo de gordura no fígado nos casos de NASH ocorreria em resposta a uma infecção viral (Pasarica & Dhurandhar 2007). Alguns casos de CHC de etiologia desconhecida também têm sido descritos na literatura (Lee et al. 2013), gerando questionamentos sobre a possibilidade de outros agentes etiológicos estarem envolvidos no desenvolvimento deste tipo de câncer. Atualmente, uma série de vírus humanos hepatotrópicos que desenvolvem infecção crônica são conhecidos, como o HBV (Dane et al. 1970), o HCV (Choo et al. 1989), o vírus da hepatite D (HDV) (Rizzetto et al. 1977), o TTV (Nishizawa et al. 1997) e o vírus SEN (SENV) (Tanaka et al. 2001). Apesar de uma relação causal entre infecção viral e o desenvolvimento de CHC só ter sido estabelecida para o HBV e o HCV até o momento (Kew 2013), o estudo publicado por de zur Hausen & Villiers (2009) propõe que o TTV desempenhe um papel indireto na carcinogênese, modulando a resposta imunológica de células T. Estudos anteriores contrapõem seus resultados quanto à maior prevalência deste vírus em casos de CHC, cirrose e hepatite crônica (Poovorawan et al. 1998, Tanaka et al. 1998). Desta forma, as pesquisas sobre a atuação do TTV em casos de CHC, por ainda serem escassas, precisam ser incentivadas.

Uma alta prevalência de hepatite B oculta tem sido detectada em pacientes com CHC (Bréchet 2001, Huang & Hollinger 2014), frequentemente coinfectados pelo HCV (Cacciola et al. 1999). A ocorrência simultânea de hepatite B oculta e infecção crônica pelo HCV tem sido considerada como um fator de risco aumentado para o desenvolvimento do câncer (Donato et al. 1998, Shi et al. 2005). O status de portador crônico para o HBV é geralmente desconhecido pelo paciente nos casos de hepatite B oculta, visto que o principal marcador sorológico da infecção, o HBsAg, não está detectável. Nestes casos, somente testes moleculares de

detecção do HBV-DNA permitem determinar esta situação clínica, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) o padrão ouro (Raimondo et al. 2008).

Os ensaios convencionalmente utilizados para a detecção de agentes virais baseiam-se na especificidade de ferramentas como a PCR e os ensaios imunoenzimáticos, mas muitos casos de diagnóstico laboratorial negativo ficam indefinidos quanto ao seu agente causal. Desta maneira, o emprego da abordagem metagenômica no sequenciamento de nova geração tem contribuído sobremaneira para a caracterização do viroma de diferentes situações clínicas (Yozwiak et al. 2012, Law et al. 2013), descobrindo novos agentes, bem como associando outros sob os quais não havia especulação (Miller et al. 2013).

Desta forma, a investigação do viroma, incluindo a infecção oculta pelo vírus da hepatite B e a infecção pelo Torque teno vírus, presente em pacientes com diferentes perfis clínicos para doença hepática mostra-se de extrema importância. Seja por metagenômica ou por PCR específica, tais resultados poderão contribuir com uma melhor compreensão dos fatores virológicos associados ao desenvolvimento do CHC.

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

Determinar o viroma presente em amostras de soro de pacientes com e sem carcinoma hepatocelular através de abordagem metagenômica e PCR convencional.

3.2) Objetivos específicos

- 1) Determinar e comparar o viroma no soro de pacientes com carcinoma hepatocelular de diferentes etiologias, hepatite B ou C crônica sem câncer, e indivíduos saudáveis, através de abordagem metagenômica utilizando-se sequenciamento de nova geração;
- 2) Investigar a ocorrência de hepatite B oculta em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C, com e sem carcinoma hepatocelular;
- 3) Investigar a ocorrência de infecção pelo TTV em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C, com e sem carcinoma hepatocelular;
- 4) Determinar a prevalência de coinfeções por diferentes genogrupos de TTV em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C, com e sem carcinoma hepatocelular.

4) METODOLOGIA

4.1) Casuística

Foram selecionados para esse estudo pacientes acompanhados ambulatorialmente no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) com HBV-DNA ou HCV-RNA detectados com ou sem a presença de CHC, bem como pacientes com CHC de etiologia não viral, segundo os critérios de inclusão e exclusão. A coleta das amostras foi realizada no período de abril de 2010 a maio de 2015, com consecutiva identificação e transferência para o Laboratório de Virologia Molecular da Fiocruz, onde foram processadas para a obtenção do soro, aliquotadas e estocadas a - 20°C. Além disso, foram incluídos no estudo amostras de soro de pacientes com hepatite fulminante autoimune, gentilmente cedidas pelo Dr. Marcelo Alves Pinto do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia IOC/Fiocruz, e também amostras de soro de indivíduos saudáveis oriundas da soroteca do Laboratório de Virologia Molecular IOC/FIOCRUZ, e escolhidas segundo a ausência dos marcadores de infecção HBsAg e anti-HCV.

Duas casuísticas foram elaboradas e aplicadas: a primeira contendo amostras de soro de 37 pacientes divididas em 12 grupos distintos (conforme item 4.6.1); a segunda contendo 151 pacientes cronicamente infectados pelo HCV com e sem CHC (conforme item 4.7.1).

Um banco de dados foi formulado contendo dados demográficos e clínicos dos indivíduos incluídos no projeto, através de consulta ao prontuário e ao paciente.

4.2) Aspectos éticos

Este estudo possui aprovação nos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (nº 139/10), e do Instituto Oswaldo Cruz (nº 1.358.935).

4.3) Critérios de inclusão

Foram convidados a participar do estudo indivíduos maiores de 18 anos com diagnóstico de CHC de etiologia pelo HBV ou HCV e indivíduos com diagnóstico de

hepatite B crônica e hepatite C crônica, sem CHC, segundo testes sorológicos para os marcadores de infecção HBsAg e anti-HCV, respectivamente, e positividade para o HBV-DNA ou HCV-RNA. Adicionalmente, foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de CHC de etiologia não viral e pacientes com hepatite fulminante autoimune. Todos os pacientes que concordaram em participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.4) Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes que não tiveram condições de se submeter à coleta de sangue e pacientes que não concordaram em assinar o TCLE.

4.5) Separação do soro do sangue periférico

As amostras de soro foram obtidas a partir da coleta de sangue total em tubos plásticos estéreis de 8,5 ml da BD Vacutainer® SST II Advance, com a presença de ativador de coágulo e de gel separador. Após a coleta, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos para separar o soro dos outros componentes do sangue, tendo, em seguida, sido aliquotado e estocado a -20°C.

4.6) Análise metagenômica

4.6.1) Amostragem

Amostras de soro de 37 pacientes foram selecionadas e agrupadas em 12 grupos distintos de acordo com a etiologia e o estágio da doença hepática, bem como o uso ou não de tratamento antiviral. Para cada grupo, as amostras de soro foram misturadas em partes iguais em um volume final de 600 µL. Cada grupo corresponderá posteriormente a uma biblioteca genômica.

Grupo 1: Pacientes HCV positivos sem CHC e sem tratamento antiviral (n=3 pacientes)

Grupo 2: Pacientes HCV positivos sem CHC e com tratamento antiviral (n=3 pacientes)

- Grupo 3: Pacientes HCV positivos com CHC e sem tratamento antiviral (n=3 pacientes)
- Grupo 4: Pacientes HCV positivos com CHC e com tratamento antiviral (n=3 pacientes)
- Grupo 5: Pacientes HBV positivos sem CHC e sem tratamento antiviral (n=4 pacientes)
- Grupo 6: Pacientes HBV positivos com CHC e sem tratamento antiviral (n=3 pacientes)
- Grupo 7: Pacientes HBV positivos com CHC e com tratamento antiviral (n=3 pacientes)
- Grupo 8: Pacientes com CHC de etiologia autoimune (n=3 pacientes)
- Grupo 9: Pacientes com CHC de etiologia por esteato-hepatite não alcoólica (n=4 pacientes)
- Grupo 10: Pacientes com CHC de etiologia desconhecida (n=2 pacientes)
- Grupo 11: Pacientes com hepatite fulminante autoimune (n=3 pacientes)
- Grupo 12: Indivíduos saudáveis (n=3 indivíduos)

4.6.2) Enriquecimento das partículas virais

4.6.2.1) Filtragem

Um total de 600 μL de mistura de soro de cada grupo foi submetido ao processo de filtragem em filtro MILLEX®-FG50 estéril, descartável e com diâmetro de 0,22 μm . Ao final da filtragem, o rendimento foi de 200 μL de soro de cada grupo.

A filtragem compreendeu a primeira etapa de concentração e enriquecimento das partículas virais do soro, crucial para o estudo de metagenômica viral, pois foi responsável por reter células humanas e possíveis células bacterianas circulantes no sistema sanguíneo. O produto da filtragem passou a conter apenas partículas filtráveis, incluindo nesta parcela as partículas virais.

4.6.2.2) Tratamento com nuclease

Após a filtragem, os 200 μL de soro de cada grupo foram submetidos ao tratamento com Benzonase® Nuclease (Sigma-Aldrich) para eliminar possíveis

ácidos nucleicos não encapsidados. O tratamento foi realizado por 30 minutos à 37°C em calor úmido utilizando 50 U da enzima. Por não possuir atividade proteolítica, os ácidos nucleicos virais permaneceram protegidos dentro dos capsídeos.

4.6.3) Extração de DNA e RNA

Os ácidos nucleicos virais foram extraídos a partir dos 200 µl de soro filtrado e tratado com nuclease com o uso do kit comercial QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen), o qual é capaz de extrair simultaneamente DNA e RNA. Trata-se de um kit de extração de colunas filtrantes cuja técnica inicia com a desnaturação das partículas virais para garantir o isolamento do ácido nucleico. Posteriormente, estes ácidos nucleicos são ligados de maneira específica à membrana de sílica do filtro enquanto impurezas são retiradas com tampões de lavagem. Os procedimentos foram realizados segundo as recomendações do fabricante, excetuando-se a adição do carreador de RNA que, apesar de aumentar a afinidade das moléculas de RNA à membrana do filtro, nos casos de título viral baixo, por serem coeluídos, são potenciais causadores de artefatos no sequenciamento. Um teste prévio sem o uso do carreador mostrou que o kit foi capaz de extrair o RNA do HCV mesmo sem a adição do carreador. O material extraído dos doze grupos foi identificado e estocado a -70°C.

4.6.4) Amplificação randômica

A amplificação randômica dos ácidos nucleicos foi realizada através de múltiplas etapas de polimerização (Figura 12), incluindo o uso de diferentes enzimas e de diferentes oligonucleotídeos desenhados para o experimento (Tabela 1) (Froussard 1993). DNA e RNA foram processados conjuntamente.

Tabela 1: Iniciadores utilizados no processo de amplificação randômica.

Oligonucleotídeo	Sequência
Universal dN6	5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNNNNNN-3'
Universal	5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTC-3'

4.6.4.1) Transcrição reversa

Após a extração, o material genético foi submetido à etapa de transcrição reversa das fitas de RNA utilizando o oligonucleotídeo universal dN6 e a enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Este é composto por duas regiões distintas, sendo uma composta por seis nucleotídeos aleatórios posicionados no terminal 3' e outra de 20 nucleotídeos conhecidos e conservados no terminal 5' (Tabela 1). A porção randômica 3' pode se ligar a qualquer região dos fragmentos de ácido nucleico, fornecendo o terminal 3'-OH necessário para que a enzima inicie sua atividade. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com as instruções dos fabricantes, excetuando-se pela adição de um passo anterior de aquecimento a 95°C por 2 minutos para linearizar possíveis regiões de complementaridade de RNA. Ao final desta etapa, as fitas de cDNA passaram a apresentar na extensão do seu terminal 5' os 20 nucleotídeos fixos do primer universal dN6.

A reação de transcrição reversa foi realizada em duas etapas com mistura de reações distintas. A primeira reação foi realizada com 6 µl do material extraído, filtrado e tratado com nuclease em um volume final de 13 µl (4,5 de água, 1µl de nucleotídeos - 0,2 mM e 1,5 µl de universal dN6 - 0,1µg/µl) e subsequentemente submetida a um programa de 65°C por 5 minutos no termociclador. A segunda reação contemplou 1 µl de SuperScript III (200U/µl), 1 µl de DTT (0,1 M), 4 µl de 5x First Strand Buffer e 1 µl de RNase OUT, totalizando 20 µl, e levada ao termociclador para a performance da seguinte condição de temperatura: 50°C por 50 min, para a síntese do cDNA, seguida por 85°C por 5 min para terminar a reação de transcrição reversa.

4.6.4.2) Reação com a enzima Klenow

Após a etapa de síntese do cDNA, foi realizada uma primeira reação com a enzima Klenow Fragment (Thermo Fisher Scientific), seguindo as orientações do fabricante: uma mistura de 2 µl da enzima (150 U/µl), 2,5 µl de tampão (500mM Tris-HCl (pH 7,2), 100mM MgSO₄ e 1mM DTT) e 0,5 µl de oligonucleotídeo dN6 foram adicionados ao cDNA, à 37°C por 30 min. Esta enzima é composta apenas pelo fragmento maior da DNA polimerase I, com ausência de atividade RNase H, e trabalha em um único ciclo, utilizando como molde cDNA ou DNA para construir a

fita complementar. Desta forma, conseqüentemente, ela também acaba complementando a seqüência do oligonucleotídeo dN6, incorporado à extensão do fragmento na etapa anterior.

Depois de realizado este procedimento, as fitas de cDNA foram transformadas em DNA dupla fita com a incorporação da seqüência complementar do oligonucleotídeo dN6 na nova fita. Com o DNA ocorreu processo idêntico, sendo necessário mais uma reação com a enzima Klenow para que a dupla fita apresentasse a região conservada do oligonucleotídeo em sua extensão (Froussard 1993).

4.6.4.3) Amplificação do DNA

Para tornar a quantidade de DNA de cada mistura suficiente para iniciar a construção das bibliotecas genômicas, foi necessário a realização de PCR. Para tal, foi utilizada a enzima AmpliTaq® DNA Polimerase (Termo Fisher Scientific) e o oligonucleotídeo universal (Tabela 1). Este último possui exatamente a mesma seqüência que o universal dN6, porém, sem a região randômica, sendo absolutamente complementar ao seu reverso, produzido durante as reações com a enzima Klenow.

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 6 µL de DNA foram acrescentados a uma mistura contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,75 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,5 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 10 pmol do oligonucleotídeo universal em um volume final de 25 µL. A reação foi realizada sob as seguintes condições: 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial da fita de DNA), 40 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento dos oligonucleotídeos), 72°C por 3 minutos (extensão), seguido pelo alongamento final a 72°C durante 10 minutos.

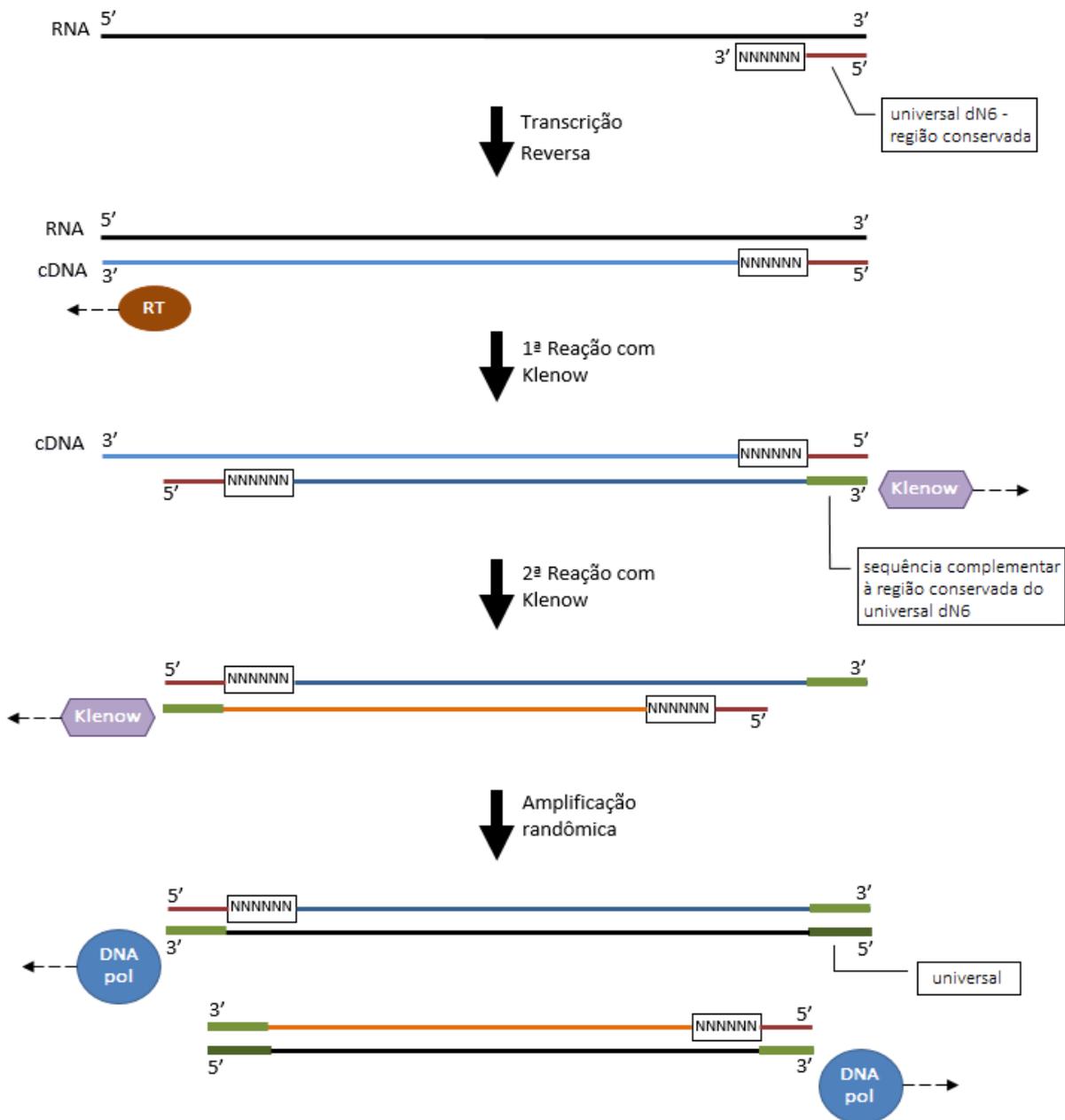


Figura 12: Ilustração dos procedimentos moleculares necessários à amplificação randômica. Primeiro as fitas de RNA são convertidas em cDNA pela ação de uma transcriptase reversa e com o uso do oligonucleotídeo universal dN6. A primeira reação com a enzima Klenow adiciona a sequência do oligonucleotídeo nas novas fitas, bem como sintetiza a sequência complementar aos 20 nucleotídeos conservados, tanto no cDNA como no DNA. A segunda reação com Klenow é necessária para que ambas as fitas do DNA passem pelo mesmo processo, visto que a transcrição reversa não tem influência sobre DNA. Por fim, na amplificação randômica, como as fitas já apresentam a sequência complementar ao oligonucleotídeo universal em sua extensão, é possível proceder com a reação em cadeia da polimerase utilizando, para tal, o oligonucleotídeo universal.

4.6.5) Eletroforese digital

Ao final da amplificação randômica espera-se que a observação por eletroforese mostre um rastro de ácidos nucleicos no lugar de bandas específicas. Para confirmar o sucesso da amplificação, foi realizada uma reação de eletroforese digital, com o uso do chip DNA LabChip® e o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), seguindo as informações do fabricante. Outras informações quanto ao procedimento estão presentes no item 4.6.8 (Validação das bibliotecas genômicas).

4.6.6) Quantificação do material amplificado pelo método randômico

A quantificação do material amplificado foi realizada no fluorômetro Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) com os reagentes do kit comercial Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific). A técnica é baseada na mistura do material a ser quantificado ao reagente previamente diluído e posterior leitura da concentração no equipamento, sendo altamente específica para a quantificação de DNA dupla fita.

4.6.7) Construção das bibliotecas genômicas

O DNA metagenômico amplificado randomicamente de cada grupo foi utilizado como material inicial para a construção das bibliotecas genômicas com o kit Nextera® XT DNA Library Preparation (Illumina). Este kit é desenvolvido para a utilização de 1 ng de DNA inicial e foram seguidas as recomendações do fabricante.

Esse processo consiste em múltiplas etapas com foco na fragmentação e adição de adaptadores às sequências molde de DNA numa única reação chamada tagmentação. A enzima responsável é um transposon geneticamente modificado para realizar simultaneamente as duas ações mencionadas. Posteriormente, o DNA tagmentado foi amplificado numa reação que possibilitou a adição de diferentes pares de indicadores (um para cada amostra), necessários à formação dos “clusters” na célula de fluxo do sequenciamento e para a identificação das leituras após o mesmo. Por fim, as bibliotecas foram purificadas com um sistema de microesferas magnéticas da Agencourt® AMPure XP (Beckman Coulter Inc.), providenciando uma seleção dos fragmentos de maior tamanho.

4.6.8) Validação das bibliotecas genômicas

Uma nova etapa de quantificação foi necessária, tendo como objetivo identificar a quantidade de DNA de cada biblioteca para posterior normalização. Utilizou-se novamente o kit comercial Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific).

Uma variedade maior de tamanhos é esperada para os fragmentos de ácidos nucleicos após a reação de tagmentação de construção das bibliotecas genômicas. As bibliotecas foram validadas quanto sua qualidade e tamanho médio dos fragmentos segundo os resultados obtidos por uma segunda reação de eletroforese eletrônica no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), utilizando o kit DNA LabChip® (Agilent Technologies).

As informações da quantidade e do tamanho médio dos fragmentos permitiram identificar a concentração de DNA de cada biblioteca, sendo uma informação necessária para a etapa de normalização. Nesta última etapa foi feito o equilíbrio da quantidade de cada biblioteca de forma a garantir uma representação equânime de cada uma na mistura final que foi colocada na célula de fluxo do sequenciamento.

4.6.9) Sequenciamento de nova geração

As bibliotecas normalizadas foram subsequentemente misturadas numa única mistura, submetidas à formação dos agrupamentos genômicos, segundo as recomendações do kit HiSeq SR Rapid Cluster V2 (Illumina), e ao sequenciamento no equipamento Illumina HiSeq 2500, segundo as instruções do kit HiSeq Rapid SBS v2 de 200 ciclos (Illumina).

4.6.10) Análise das sequências de NGS

As análises de bioinformática foram realizadas na plataforma online para tratamento de dados genômicos *Stingray@Galaxy* (Wagner et al. 2014). Ela possui um sistema de fácil manuseio baseado no contexto de fluxos de trabalho, concebidos para facilitar o tratamento de dados oriundos de sequenciamentos de Sanger e de nova geração. Não foi realizado o processo de limpeza das leituras.

Após a inserção dos dados do sequenciamento das bibliotecas genômicas na plataforma, as sequências brutas passaram por um controle de qualidade através da ferramenta FastQC (Andrews 2010), que foi capaz de fornecer um resultado rápido e universal sobre possíveis problemas ocorridos no sequenciamento e que pudessem dificultar o prosseguimento das análises.

A estratégia utilizada para analisar os dados consistiu em converter o formato das sequências fastq para fasta e concatená-las em um único arquivo para serem processadas pelo programa CD-HIT (incluso na plataforma). Este programa foi responsável por filtrar a redundância das sequências que foram, então, utilizadas na busca por similaridade contra o banco de dados curado RefSeq do NCBI, através do BlastN (Figura 13). O resultado de cada biblioteca foi importado para o software MEGAN versão 6 (Huson et al. 2016), fora do ambiente Stingray@Galaxy, para a realização dos mapeamentos taxonômicos. A comparação do perfil taxonômico entre as 11 bibliotecas foi feita usando a opção Compare do MEGAN.

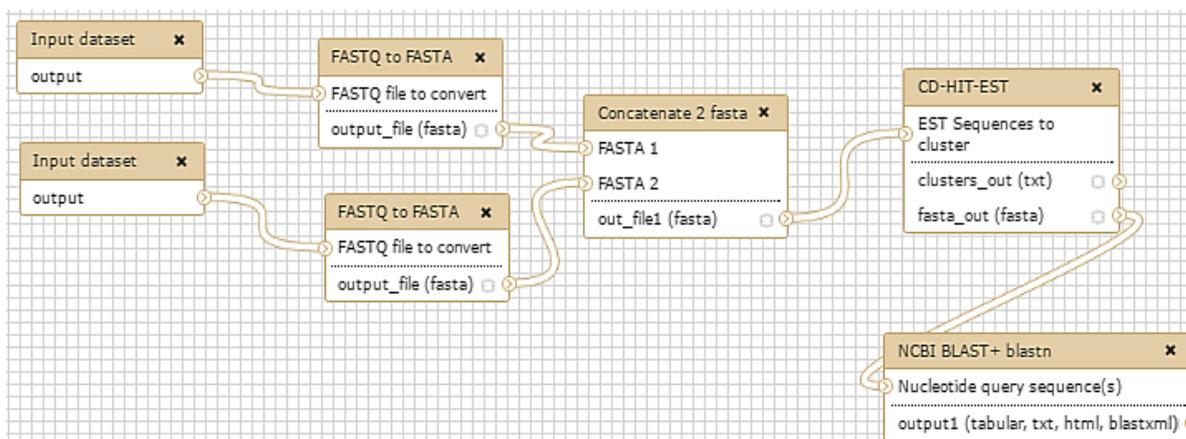


Figura 13: Fluxo de trabalho utilizado na análise das sequências de NGS.

4.7) Detecção específica de HBV e TTV

4.7.1) Amostragem

Participaram deste estudo 151 pacientes com hepatite C crônica, sendo 49 com diagnóstico de CHC e 102 sem CHC.

Tanto a quantificação da carga viral quanto a presença de marcadores sorológicos de infecção prévia foram identificadas em colaboração com o Laboratório Central Noel Nutels do Rio de Janeiro.

4.7.2) Extração de DNA viral

Os ácidos nucleicos virais foram extraídos a partir de 200 µl de soro, utilizando-se o kit comercial QIAamp Viral DNA mini kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Este procedimento consiste em múltiplos passos cujo cerne se encontra na lise celular das amostras com posterior estabilização e seletiva adsorção dos ácidos nucleicos à membrana de sílica do filtro das colunas de lavagem, através de tampões apropriados. Após as etapas de lavagem, o DNA obtido foi eluído em 50 µl de tampão de baixa concentração de sal.

4.7.3) Amplificação do HBV-DNA

A amplificação da região genômica S do HBV foi realizada em duas etapas através de uma PCR em *semi-nested*, utilizando-se o termociclador GeneAmp Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). Na primeira etapa, 2 µL de DNA foram acrescentados a uma mistura contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 0,75 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,5 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 10 pmol dos oligonucleotídeos PS1 e SR (Tabela 2) em um volume final de 25 µL. A reação foi realizada sob as seguintes condições: 94°C por 2min (desnaturação inicial da fita de DNA), 35 ciclos de 94°C por 30seg (desnaturação), 57°C por 40seg (anelamento dos oligonucleotídeos), 72°C por 2min (extensão), seguido pelo alongamento final a 72°C durante 7min. O produto final obtido foi de 1.099 pb. Para a segunda etapa de amplificação, utilizou-se 4 µL do produto amplificado na primeira etapa, 1U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e os oligonucleotídeos S1 e SR (Tabela 2) em um volume final de 50µL utilizando-se as mesmas condições descritas para a primeira etapa. Esta segunda etapa de amplificação gerou um produto final de 580 pb.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene S do HBV.

Oligonucleotídeo	Polaridade	Posição no genoma *	Sequência (5'-3')
PS1	senso	2826-2845	CCATATTCTTGGGAACAAGA
S1	senso	120-143	CTTCTCGAGGACTGGGGACC
SR	antissenso	704-685	CGAACCACTGAACAAATGGC

*Posição considerando um genoma de 3.221 pb, sendo a posição 0 o sítio para *EcoRI* presente na região pre-S2.

4.7.4) Amplificação do TTV-DNA

O DNA extraído das amostras de soro foi submetido à amplificação dos diferentes genogrupos do TTV, em uma reação amplificativa de caráter *nested* e *multiplex*, padronizada por Devalle & Niel (2005). Os oligonucleotídeos senso e antissenso usados no primeiro ciclo são ditos “universais” para o genoma do TTV, pois amplificam uma região conservada entre todos os genogrupos investigados, gerando um fragmento que abrange, aproximadamente, 80% do genoma viral. Já no segundo ciclo foi utilizada uma mistura de seis oligonucleotídeos ditos grupo-específicos, desenhados para reconhecer os isolados de um mesmo genogrupo, porém diferenciando entre os cinco. Tais oligonucleotídeos foram propostos por Devalle & Niel (2004) e estão dispostos na Tabela 5.

Na primeira etapa 2 µL de DNA foram acrescentados a uma mistura contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,75 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,5 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 10 pmol dos oligonucleotídeos T1S e T1A (Tabela 3) em um volume final de 25 µL. O produto final foi de aproximadamente 2600 pb. Para a segunda etapa de amplificação, utilizou-se 4 µL do produto amplificado na primeira etapa, 1U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e os oligonucleotídeos T2S, T2G1A, T2G2A, T2G3A, T2G4A E T2G5A (Tabela 3) em um volume final de 50 µL, utilizando-se as mesmas condições descritas para a primeira etapa. As condições de temperatura para ambos os ciclos foram: 94°C por 3 min (desnaturação inicial), 30 ciclos de 94°C por 30 seg (desnaturação), 59°C por 30 seg (anelamento dos oligonucleotídeos) e 72°C por 75 seg (extensão), seguido por um alongamento final a 72°C por 7 min. Ao final do segundo ciclo os tamanhos de bandas esperadas foram de 397, 700, 885, 111 e 785 pb para os genogrupos de 1 a 5, respectivamente (Devalle & Niel 2004).

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação genogrupo-específica do TTV.

Oligonucleotídeo	Polaridade	Posição no genoma*	Sequência (5'-3')	Genogrupo
T1S	senso	180-201	CCGDAGGTGAGYTTACACACCG	universal
T1A	antissenso	3372-3352	AGGCCYTATGGCGAAGTCTGG	universal
T2S	senso	203-222	AGTCAAGGGGCAATTCGGGC	universal
T2G1A	antissenso	599-578	CCATAGGCCATGGTGCTCKATC	1
T2G2A	antissenso	897-878	GTGGTRCCCGTTCCACAGAT	2
T2G3A	antissenso	1083-1063	CCTGTATCTGGCCAGGTCTAG	3
T2G4A	antissenso	319-302	CGGCGGTCTCCACGGCAT	4
T2G5A	antissenso	678-658	TCYGCGAAGTCKGCCACGGGT	5

D = A, G ou T; Y = C ou T; K = G ou T; R = A ou G

* Posição considerando os seguintes isolados de referência: TA278 (para os 4 primeiros oligonucleotídeos), PMV, SANBAN, KC009 e CT39F, respectivamente

4.7.5) Eletroforese

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% (PCR do HBV) ou 3% (PCR do TTV). O gel foi feito utilizando-se 2g ou 3g, respectivamente, 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).

4.7.6) Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento do HBV

Os produtos da amplificação do gene S do HBV foram purificados utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), para a remoção do excesso de nucleotídeos e oligonucleotídeos. O DNA se liga a membrana de sílica na presença de sais caotrópicos e o DNA é eluído em água livre de nucleases.

4.7.7) Sequenciamento de Sanger para o HBV

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). 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. 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 o gene S do HBV foram utilizados quatro oligonucleotídeos (Tabela 4). A reação foi submetida a 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação de sequenciamento, foi realizada uma precipitação com 80 µl de 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 4.000 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 minutos sob abrigo da luz, e armazenada até ser submetida ao sequenciamento. A leitura automática das sequências foi realizada no sequenciador automático de 96 capilares ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) da Plataforma de sequenciamento de DNA da FIOCRUZ.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento de Sanger.

Oligonucleotídeo	Polaridade	Posição no genoma*	Sequência (5'-3')
S1	senso	120-143	CTTCTCGAGGACTGGGGACC
S4	senso	416-436	TGCTGCTATGCCTCATCTTCT
S3	antissenso	545-523	CCTTGAGCAGGAGTCGTGCAGGT
SR	antissenso	704-685	CGAACCACTGAACAAATGGC

*Posição considerando um genoma de 3.221 pb, sendo a posição 0 o sítio para *EcoRI* presente na região pre-S2.

4.7.8) Edição das sequências obtidas e genotipagem do HBV

Os eletroferogramas das sequências resultantes do sequenciamento automático foram visualizados através da função Trace/Editor (incluso do MEGA), e editadas e analisadas manualmente usando o software MEGA versão 7.0.18 (Kumar et al. 2016). A sequência consenso foi produzida através de alinhamentos com o programa Muscle, incorporado ao software. Os genótipos do HBV foram

determinados por análise filogenética, utilizando sequências de referência disponíveis no GenBank. A análise filogenética das sequências de HBV foi realizada pelo método da Máxima Verossimilhança, também incorporado ao software MEGA. A subgenotipagem foi realizada pela ferramenta online Geno2pheno (Max Planck Institute for Informatics 2016), que baseia seus resultados através de alinhamento com um genoma de referência do HBV de genótipo D, e os sorotipos do HBV foram identificados segundo a ferramenta HVDR Small Genome (Bell & Kramvis 2015).

4.7.9) Análise estatística

Para a análise comparativa entre os grupos foram utilizados os testes de Mann-Whitney ou teste T de *student* para as variáveis numéricas e os testes Chi-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher para as variáveis categóricas, quando apropriado. O valor de significância adotado é de 5%. A análise de regressão logística multivariada foi realizada definindo o carcinoma hepatocelular (presença/ausência) como variável dependente. As covariáveis selecionadas incluídas no modelo foram aquelas com um valor de $p < 0,20$ na análise univariada. Este modelo foi ajustado para gênero e idade. Os resultados foram apresentados como *odds ratios* (OR) com seus intervalos de confiança (IC) de 95%. As análises foram realizadas utilizando-se o programa SPSS versão 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5) RESULTADOS

5.1) Análise metagenômica

5.1.1) Amplificação randômica

A amplificação randômica dos ácidos nucleicos virais, utilizada para aumentar a concentração de DNA dupla fita antes da construção das bibliotecas genômicas, teve sua eficácia avaliada segundo os resultados fornecidos pela eletroforese digital no Bioanalyzer. Dois ensaios foram comparados e estão dispostos nas Figuras 14 e 15.

Nas Figuras 14 e 15 estão apresentados, respectivamente, os resultados das eletroforeses digitais para as bibliotecas de 1 a 12 antes e depois da amplificação randômica. Especificamente, a Figura 14 corresponde ao momento pós-tratamento com a enzima Klenow e a Figura 15 foi após a reação de amplificação randômica, onde foi possível observar inúmeras bandas de amplificação randômica. A biblioteca 10 (pacientes com diagnóstico de CHC de etiologia indeterminada), não apresentou amplificação do material genético, e, portanto, foi descartada das etapas subsequentes.

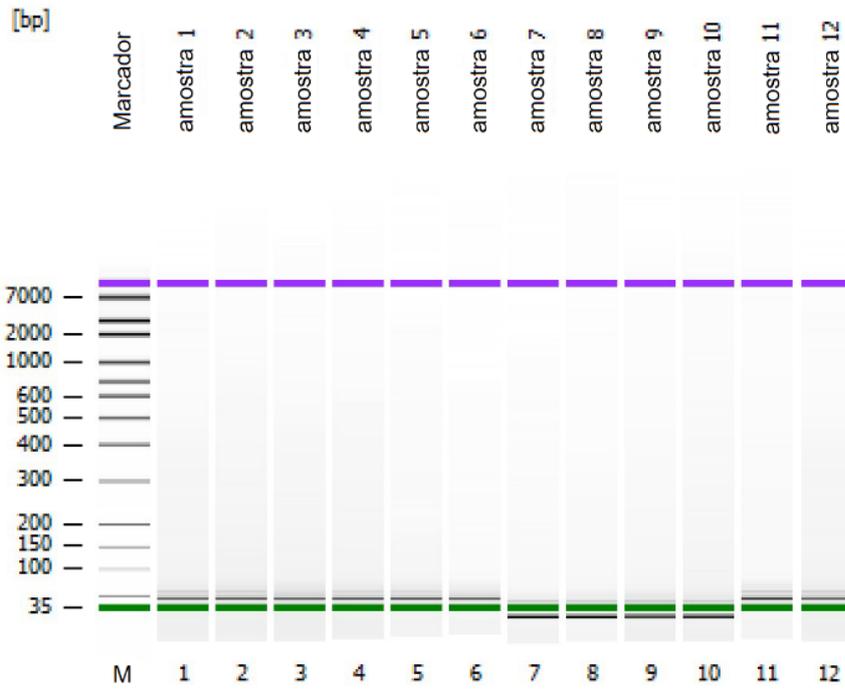


Figura 14: Resultado da eletroforese digital fornecido pelo Bioanalyzer para as bibliotecas de 1 a 12 antes da amplificação randômica.

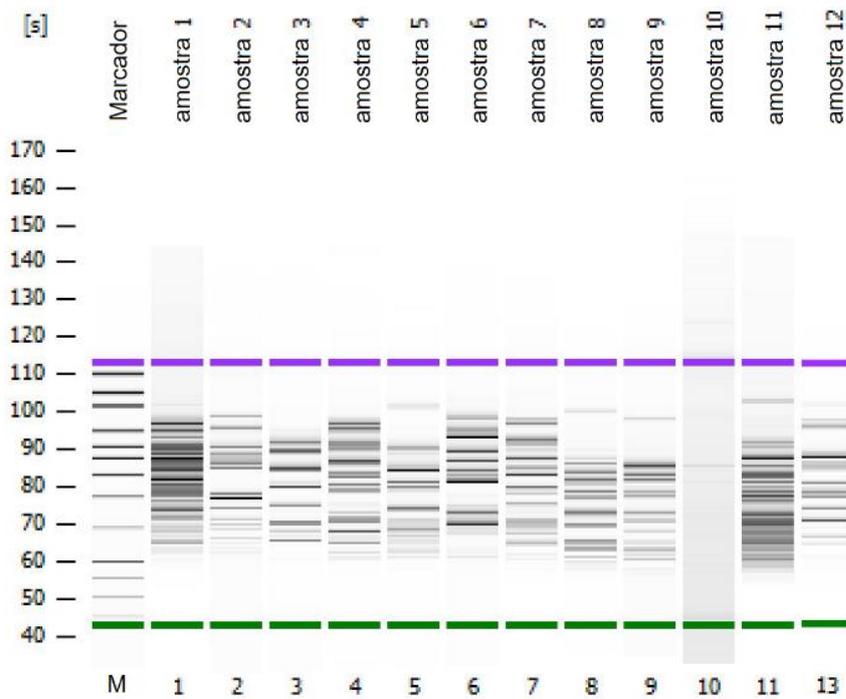


Figura 15: Resultado da eletroforese digital fornecido pelo Bioanalyzer para as bibliotecas de 1 a 12 após a amplificação randômica.

Além deste resultado, também utilizamos a eletroforese digital para averiguar se o procedimento de tagmentação havia funcionado. De acordo com o esperado, as bandas de dispersão irregular foram fragmentadas o suficiente para passarem a apresentar um padrão mais contínuo. A Figura 16 mostra este outro padrão de dispersão do material genético.

A média da quantidade de DNA das bibliotecas construídas foi de 4,58 ng/μl, sendo a menor quantidade de 3,60 ng/μl e a maior de 5,97 ng/μl.

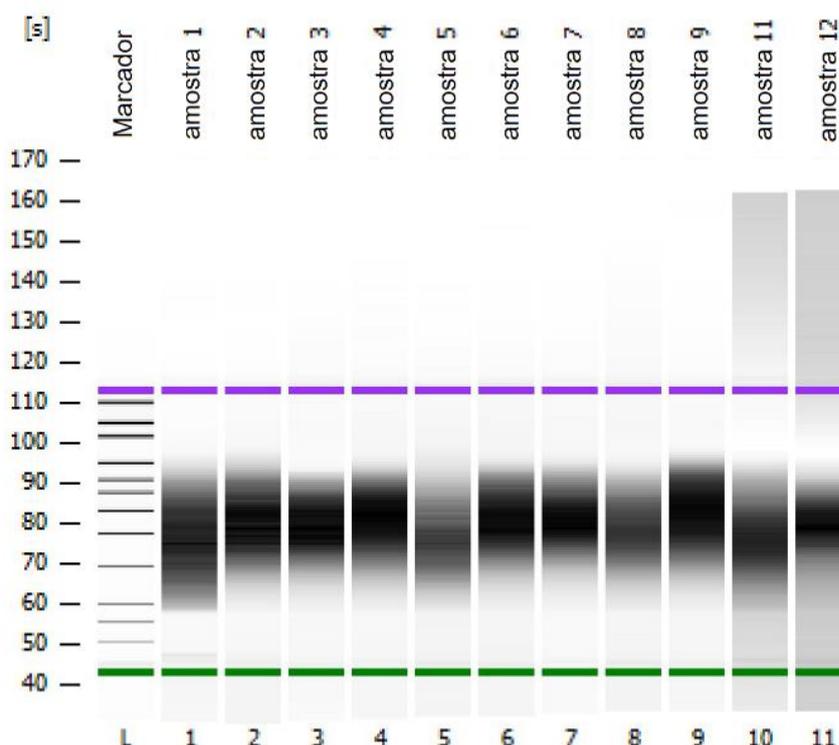


Figura 16: Resultado da eletroforese digital fornecido pelo Bioanalyzer para as bibliotecas 1 a 9, 11 e 12 após o processo de tagmentação.

5.1.2) Sequenciamento de nova geração

O sequenciamento das 11 bibliotecas gerou um total de 488.120.942 seqüências. Cerca de 98% destas leituras puderam ser identificadas pelo software do sequenciador. Como foi procedido um sequenciamento do tipo “paired-end”, cada biblioteca gerou dois arquivos de mesma quantidade com cada “read” alcançando até 100 pb. A Tabela 5 mostra a quantidade de leituras para cada biblioteca sequenciada.

Tabela 5: Números absolutos de leituras obtidas por biblioteca.

Biblioteca	Leituras por arquivo	Leituras concatenadas	Leituras únicas	Leituras com Hit	% Hits
1	27.200.696	54.401.392	145.804	68.583	47%
2	21.940.621	43.881.242	125.322	54.701	44%
3	23.504.744	47.009.488	99.199	44.999	45%
4	21.340.580	42.681.160	112.820	51.524	46%
5	14.322.575	28.645.150	65.242	32.466	50%
6	21.346.736	42.693.472	101.218	40.864	40%
7	22.721.825	45.443.650	134.280	54.062	40%
8	23.562.867	47.125.734	111.586	49.747	45%
9	22.896.477	45.792.954	135.468	58.567	43%
11	24.868.322	49.736.644	236.763	74.892	32%
12	20.355.028	40.710.056	229.871	45.720	20%

O controle de qualidade realizado pela ferramenta FastQC mostrou que as sequências brutas, de ambos os arquivos, de todas as bibliotecas, obtiveram o mesmo padrão (Figura 17), com os valores medianos, a extensão interquartil e os valores médios de todos os 100 pb permanecendo no quadrante verde, de máxima qualidade.

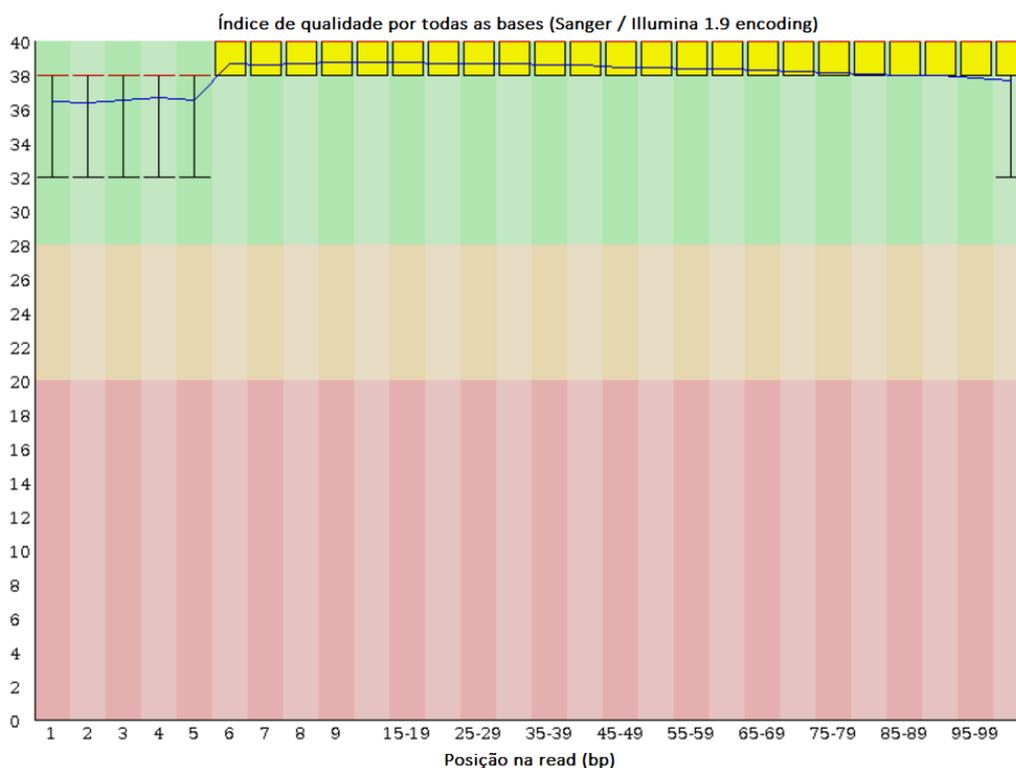
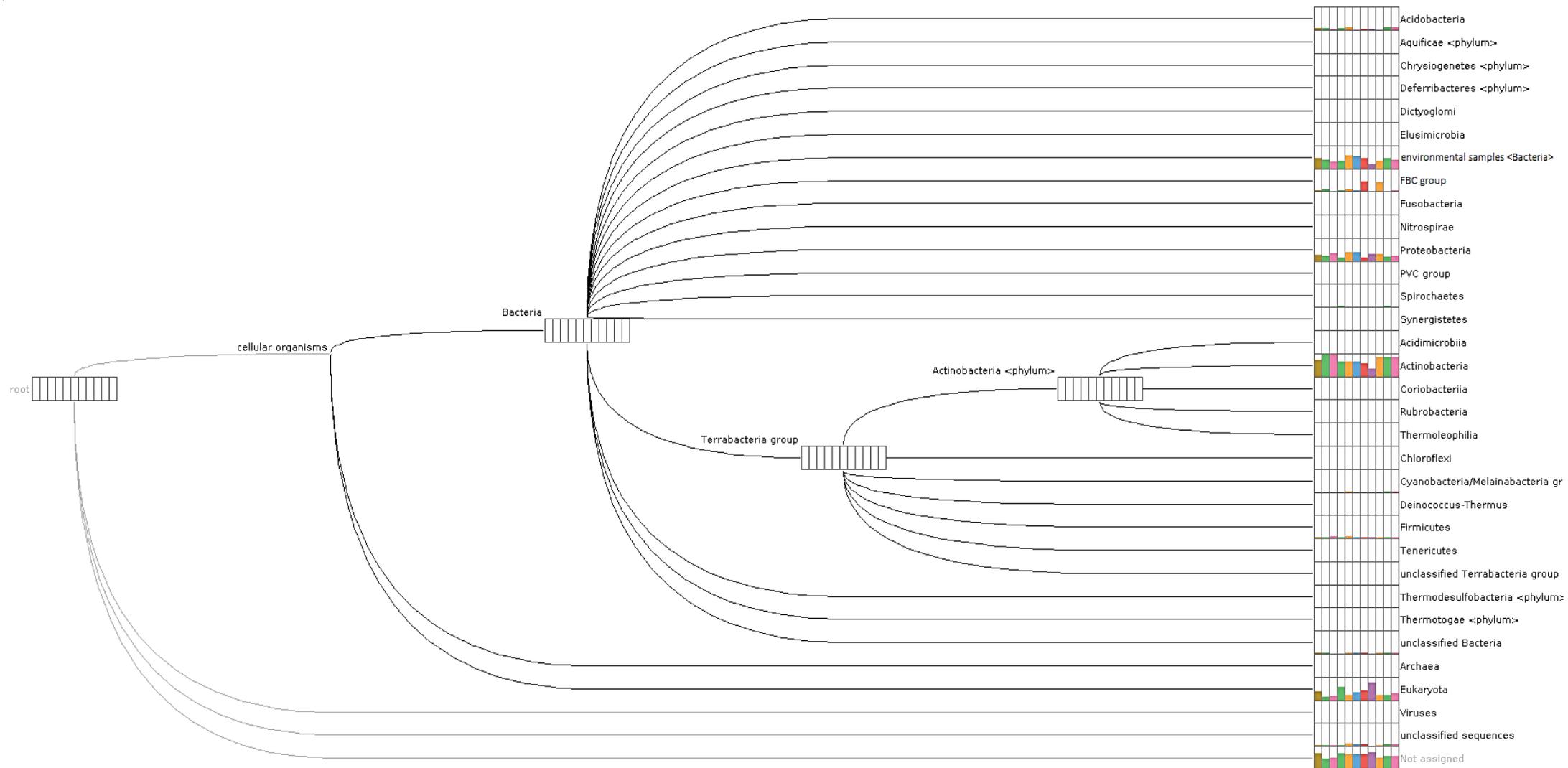


Figura 17: Índice de qualidade obtido para das onze bibliotecas sequenciadas.

5.1.3) Análise das sequências de NGS

De acordo com a estratégia de bioinformática realizada, uma árvore comparativa de todos grupos taxonômicos presentes nas onze bibliotecas sequenciadas foi estabelecida (Figura 18). Foi possível recuperar sequências de organismos celulares como Acidobacteria, bactérias ambientais, Fibrobacteres, Chlorobi e Bacteroidetes (grupo FCB), Proteobacteria, Spirochaetes, Actinobacteria, Cyanobacteria e Firmicutes, bem como sequências de procariotos não classificadas, sequências de eucariotos, sequências não classificáveis e sequências não identificadas. Após a análise das sequências de NGS verificamos que não foi possível recuperar sequências de origem viral.



Legenda
 Biblioteca 1 Biblioteca 12 Biblioteca 2 Biblioteca 3 Biblioteca 4 Biblioteca 5 Biblioteca 6 Biblioteca 11 Biblioteca 7 Biblioteca 8 Biblioteca 9

Figura 18: Gráfico comparativo dos diferentes grupos taxonômicos encontrados nas onze bibliotecas analisadas.

5.2) Detecção específica do HBV e TTV

5.2.1) Hepatite B oculta

A ocorrência de hepatite B oculta foi detectada em 5/151 (3,3%) pacientes com infecção crônica para o HCV. Todos os pacientes que apresentaram hepatite B oculta tinham diagnóstico positivo para o CHC ($p=0.003$). Para as demais variáveis, tais como, idade, sexo, reatividade para anti-HBc, e reatividade para anti-HBs, não foi observada uma diferença significativa com relação à presença ou ausência de hepatite B oculta ($p>0.05$) (Tabela 6).

Tabela 6: Dados sócio demográficos e clínicos categorizados de acordo com a ocorrência ou não de hepatite B oculta em pacientes com hepatite C crônica.

	HBV-DNA oculto positivo (n=5)	HBV-DNA oculto negativo (n=146)	<i>p</i> valor
Idade ^a			
<60	1 (20%)	64 (46.4%)	0.377
≥60	4 (80%)	74 (53.6%)	
Sexo			0.658
Masculino	3 (60%)	65 (44.5%)	
Feminino	2 (40%)	81 (55.5%)	
Diagnóstico de CHC			0.003
Positivo	5 (100%)	44 (30.1%)	
Negativo	0 (0)	102 (69.9%)	
Anti-HBc			0.070
Reativo	3 (60%)	30 (20.5%)	
Não reativo	2 (40%)	116 (79.5%)	
Anti-HBs			1.000
Reativo	2 (40%)	59 (40.4%)	
Não reativo	3 (60%)	87 (59.6%)	

^aIdade não informada em oito pacientes

5.2.2) (Sub)genótipos, sorotipos e marcadores sorológicos do HBV oculto

A análise filogenética da região genômica S do HBV revelou que 4/5 (80%) pacientes com hepatite B oculta estavam infectados por isolados do genótipo A. Em apenas um paciente (20%), o HBV foi classificado como pertencente ao genótipo D

(Figura 19). Pela análise filogenética foi possível classificar 1/5 (20%) isolado como pertencente ao subgenótipo A2 e 1/5 (20%) D3. Três isolados do genótipo A não puderam ser subgenotipados por análise filogenética. Porém, a utilização da ferramenta online Geno2pheno (Max Planck Institute for Informatics 2016) classificou estes três isolados (3/5 60%) como sendo do subgenótipo A1, e confirmou os resultados de subgenotipagem dos demais isolados (Figura 19 e Tabela 7). Com relação aos sorotipos virais, 4/5 (80%) foram classificados como *adw2* e 1/5 (20%) *ayw2* (Tabela 7). Nenhuma mutação previamente associada a casos de hepatite B oculta “falsa” foi observada na região codificante do HBsAg dos cinco isolados virais que pudesse ser responsável pela não detecção deste antígeno. Como esperado, a carga viral do HBV em todos os pacientes foi baixa (<200 UI/ml). Dos cinco casos de hepatite B oculta identificados, 3 (60%) apresentaram algum marcador sorológico para o HBV (hepatite B oculta soropositiva), e 2 (40%) não apresentaram marcador sorológico para o HBV (hepatite B oculta soronegativa) (Tabela 7).

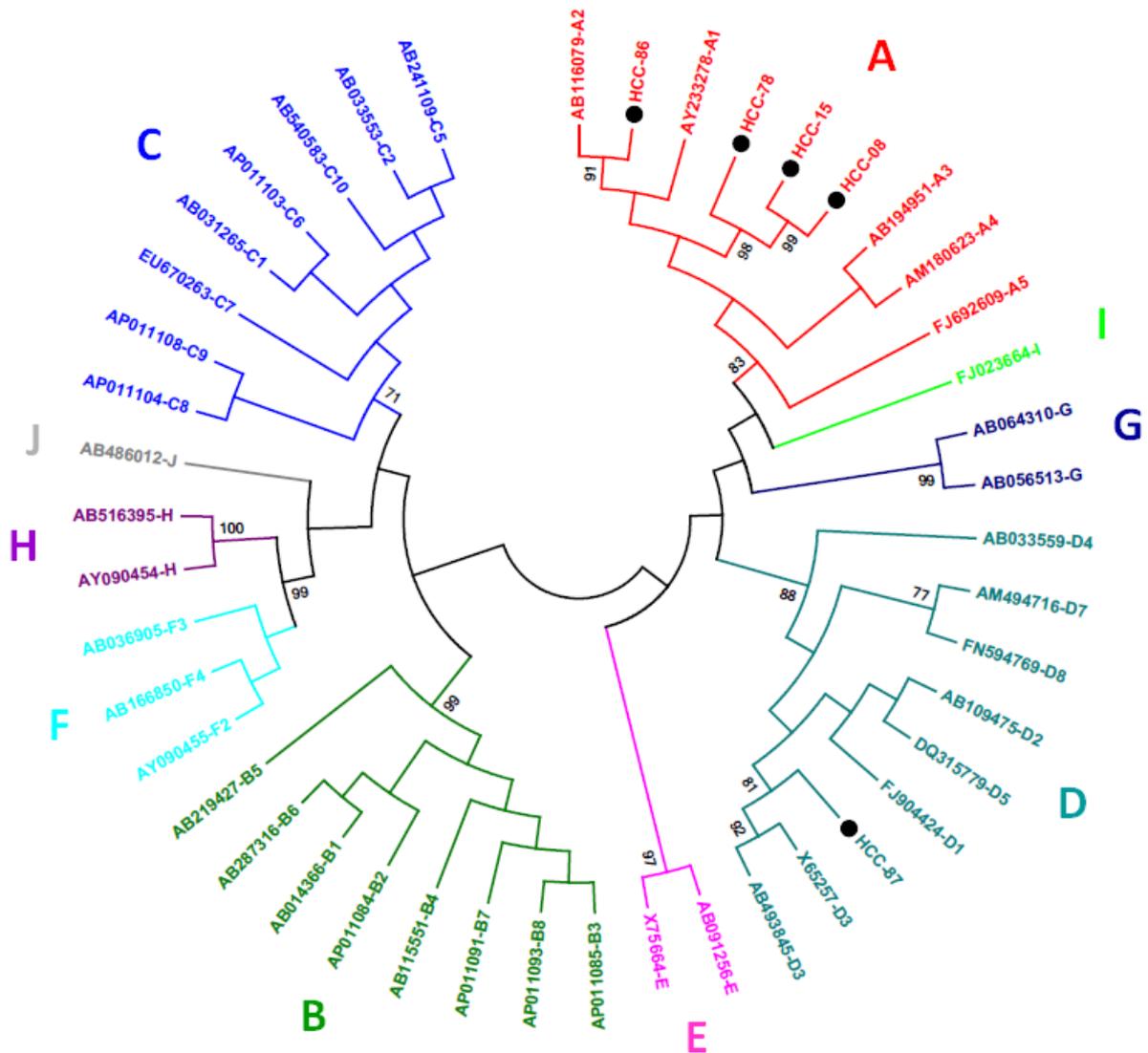


Figura 19: Cladograma da região S do HBV através do método de Máxima Verossimilhança. As sequências de referência estão indicadas por seus números de acesso do GenBank seguidos pelo subgenótipo. Letras de A-J representam os genótipos do HBV. As sequências geradas neste estudo estão identificadas por uma circunferência preta. Os valores internos (mostrados acima de 70%) dos ramos indicam a confiabilidade de 1000 repetições (bootstrap).

Tabela 7: Dados sorológicos e genéticos do HBV em pacientes crônicos para HCV com carcinoma hepatocelular e hepatite B oculta.

Paciente	Genótipo	Subgenótipo	Sorotipo	Marcadores sorológicos	Mutações no HBsAg	Carga viral (UI/ml)
CHC-08	A	A1	<i>adw2</i>	Anti-HBc; anti-HBs	nenhuma	<200
CHC-15	A	A1	<i>adw2</i>	Anti-HBc; anti-HBs	nenhuma	<200
CHC-78	A	A1	<i>adw2</i>	Nenhum	nenhuma	<200
CHC-86	A	A2	<i>adw2</i>	Anti-HBc	nenhuma	<200
CHC-87	D	D3	<i>ayw2</i>	Nenhum	nenhuma	<200

5.2.3) Prevalência da infecção pelo TTV

A ocorrência de infecção pelo TTV foi detectada em 68/151 (45%) pacientes com infecção crônica para o HCV. Os pacientes com idade ≥ 60 anos foram significativamente mais frequentes no grupo de pacientes TTV positivos (69,2%) do que no grupo de TTV negativos (42,3%) ($p=0.005$). Da mesma forma, a frequência de pacientes com CHC foi significativamente mais alta no grupo de pacientes TTV positivos (44,1%) do que no grupo de TTV negativos (22,9%) ($p=0.006$). Para as demais variáveis, tais como sexo, presença de hepatite B oculta, reatividade para anti-HBc, e reatividade para anti-HBs, não foi observada uma diferença significativa com relação à presença ou ausência de infecção pelo TTV ($p>0.05$) (Tabela 8).

Tabela 8: Dados sócio demográficos e clínicos categorizados de acordo com a ocorrência ou não de TTV em pacientes com hepatite C crônica.

	TTV DNA positivo (n=68)	TTV DNA negativo (n=83)	p valor
Idade ^a			
<60	20 (30.8%)	45 (57.7%)	0.005
≥ 60	45 (69.2%)	33 (42.3%)	
Sexo			
Masculino	34 (50%)	34 (41%)	0.267
Feminino	34 (50%)	49 (59%)	
Diagnóstico de CHC			
Positivo	30 (44.1%)	19 (22.9%)	0.006
Negativo	38 (55.9%)	64 (77.1%)	
HBV oculto			
Positivo	3 (4.4%)	2 (2.4%)	0.658
Negativo	65 (95.6%)	81 (97.6%)	
Anti-HBc			
Reativo	16 (23.5%)	17 (20.5%)	0.652
Não reativo	52 (76.5%)	66 (79.5%)	
Anti-HBs			
Reativo	24 (35.3%)	37 (44.6%)	0.257
Não reativo	44 (64.7%)	46 (55.4%)	

^aIdade não informada em oito pacientes

5.2.4) Genogrupos do TTV

A frequência da infecção pelo TTV foi de 61,2% (30/49) nos pacientes com CHC e de 37,3% (38/102) nos pacientes sem CHC (Figura 20). Todos os cinco

genogrupos do TTV foram detectados nos pacientes sem CHC, enquanto nos pacientes com CHC, apenas o genogrupo 2 não foi identificado. A prevalência dos diferentes genogrupos foi similar entre os pacientes com e sem CHC, sendo o genogrupo 3 o mais frequente (45% e 28%, respectivamente) (Figura 20).

A Figura 21 ilustra o grau de coinfeção dos genogrupos de TTV nos pacientes com e sem CHC. A maioria dos pacientes com e sem CHC estava infectada por um único genogrupo (60% e 66%, respectivamente). As coinfeções com 3 e 4 genogrupos foram observadas mais frequentemente nos pacientes com CHC (13% e 3%) do que nos pacientes sem CHC (8% e 0) (Figura 21).

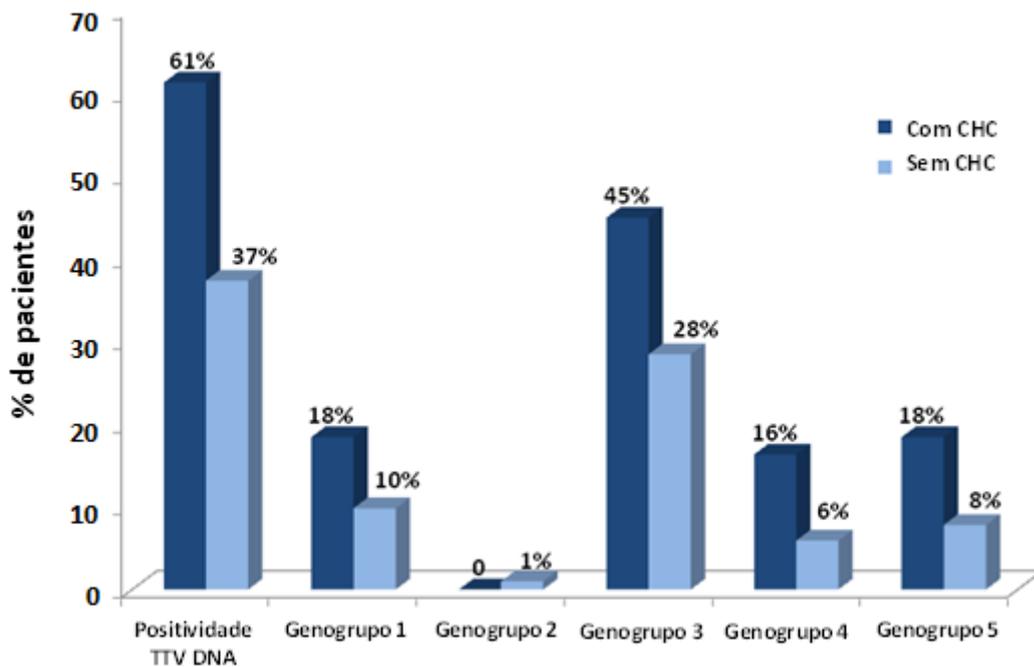


Figura 20: Prevalência da infecção pelo TTV e dos genogrupos de TTV em pacientes com e sem CHC.

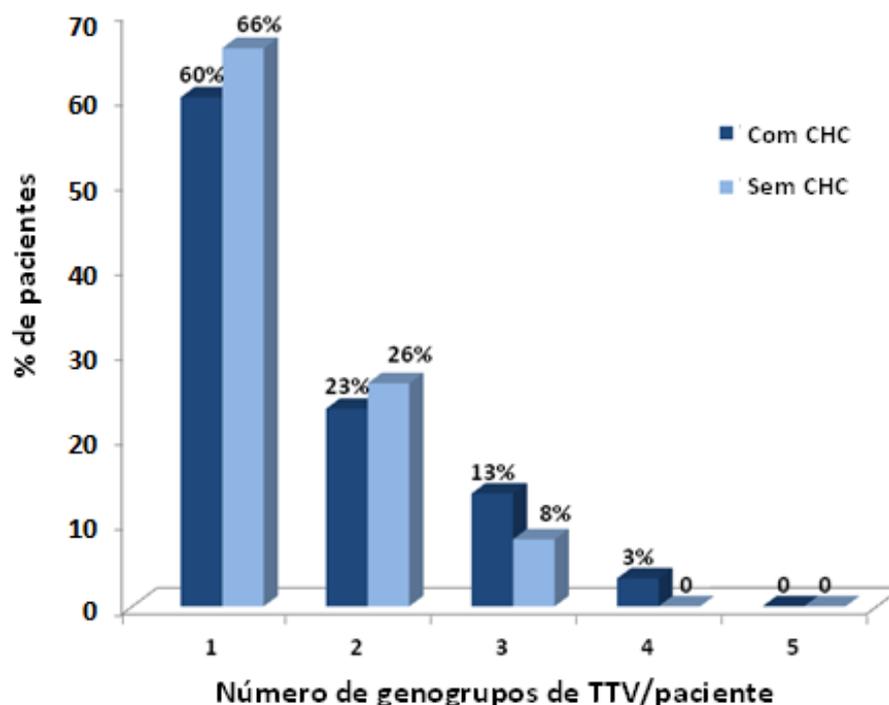


Figura 21: Grau de coinfeção com diferentes genogrupos de TTV em pacientes com e sem CHC. As colunas representam a porcentagem de pacientes infectados com 0, 1, 2, 3, 4, e 5 genogrupos, respectivamente.

5.2.5) Associação de variáveis com o CHC

A análise estatística multivariada demonstrou que a infecção pelo TTV e a idade foram variáveis independentemente associadas ao CHC no grupo de pacientes com hepatite C crônica. No modelo final, a idade ≥ 60 anos, bem como a infecção pelo TTV tiveram, respectivamente, 2,829 e 2,164 vezes mais chances de ocorrer em pacientes com CHC do que em pacientes sem este câncer (Tabela 9).

Tabela 9: Modelo final das variáveis independentemente associadas ao CHC em pacientes com hepatite C crônica.

Variáveis ^a	<i>p</i> valor	OR	IC 95%
Idade	0.009	2.829	1.298 - 6.166
Sexo (feminino)	0.24	0.645	0.310 - 1.341
TTV-DNA positivo	0.038	2.164	1.045-4.483

^aAjustado para idade e sexo

OR, *odds ratio*

IC, intervalo de confiança

6) DISCUSSÃO

Hoje a ciência nos permite afirmar que somos apenas 50% humanos. Numa proporção de 1:1, somos superorganismos formados, na verdade, por uma quantidade muito maior de células de microrganismos, como bactérias, fungos e arqueias do que células eucarióticas, e a esse conjunto também se adicionam as partículas virais. Assim sendo, nossos 23 mil genes não controlam nossos corpos sozinhos, mas sim em sinergia com os mais de quatro milhões de genes que formam o nosso microbioma (Collen 2016, Sender et al. 2016).

O corpo humano é composto por diversas comunidades, anatomicamente específicas, que podem abrigar diferentes microrganismos (Dethlefsen et al. 2007). A nossa microbiota da pele é significativamente distinta da intestinal (Collen 2016). O sangue é um desses micronichos, e por consequência o soro, no qual podemos encontrar uma microbiota própria, mesmo em indivíduos saudáveis (Nikkari et al. 2001). Assim, o viroma de um indivíduo compreende o conjunto de todos os vírus que nele podem ser encontrados, comensais, oriundos de algum surto ou mesmo bacteriófagos. Este viroma, segundo é relatado pela literatura (Xu et al. 2011, Yozwiak et al. 2012), pode estar associado ao prognóstico e progressão de diversas doenças.

Neste estudo investigamos o viroma presente no soro de pacientes com doença hepática de diferentes etiologias utilizando a abordagem metagenômica do sequenciamento de nova geração.

No entanto, nenhuma sequência viral pôde ser recuperada, mesmo nas bibliotecas de pacientes sabidamente infectados pelo HBV ou HCV. Apesar dos vírus serem um componente dinâmico e abundante da microbiota humana, o estudo específico de suas sequências requer muita diligência, visto que a maneira pela qual as amostras são preparadas antes do sequenciamento é modificada para incorporar etapas extras que versem sobre o enriquecimento viral, como a filtração e o tratamento com nucleases (Allander et al. 2001, Thurber et al. 2009).

A centrifugação é amplamente utilizada em estudos de metagenômica viral como uma etapa anterior a filtração (Norman et al. 2015, Xia et al. 2015). Apesar de ensejar a precipitação celular e dos complexos ribossomais, ela também pode precipitar as partículas virais maiores (Conceição-Neto et al. 2015). Por este motivo, nosso estudo iniciou o preparo das amostras pela filtração, que é,

reconhecidamente, o procedimento mais utilizado para enriquecimento das partículas virais em estudos de metagenômica. O tamanho de poro de 0,22 μm que utilizamos é sustentado pela literatura como um dos mais utilizados para este tipo de abordagem (Sachsenröder et al. 2012). Entretanto, a estringência que ele traz pode tanto remover vírus de maior tamanho, como mimivírus e alguns herpesvírus, como também pode não eliminar complexos ribossomais que possuam tamanho inferior a 20 μm (Conceição-Neto et al. 2015). Apesar de serem úteis para diminuir a interferência de sequências humanas e oriundas de bactérias, principalmente quando se trata de amostras de maior complexidade como soro, plasma e tecido (Allander et al. 2001, Delwart 2007), métodos de enriquecimento viral como a filtragem e o tratamento com nuclease também podem diminuir o número de sequências virais pré-sequenciamento. É possível que, durante o preparo das amostras, ocorra a formação de agregados de partículas virais que permaneçam retidos no filtro, ocasionando a perda do material genético proveniente destes vírus. Também há a possibilidade de que ocorra o desnudamento do ácido nucleico viral diante de uma hipersensibilidade à solução dos reagentes da nuclease (Li et al. 2015).

A amplificação randômica é outra etapa fundamental quando a quantidade de ácido nucleico total é insuficiente para iniciar a construção das bibliotecas genômicas. A quantidade de vírus hepatotrópicos circulante no soro, apesar de refletir a diversidade intra-hepática, é relativamente menor do que a encontrada no próprio tecido hepático. Furuta et al. (2015) mostrou que seu trabalho de descrição do viroma de plasma de pacientes com elevados níveis de aminotransferases no soro obteve baixa sensibilidade provavelmente porque não procedeu com a amplificação do material genético antes do sequenciamento. Kohl et al. (2015) mostrou que a amplificação realizada com os oligonucleotídeos universais que utilizamos no nosso estudo, ou seja, com uma porção fixa na região 5' e uma degenerada na 3', é a mais indicada para a amplificação randômica de genomas virais. Apesar da quantidade de ácidos nucleicos ter sido amplificada em nosso estudo, o fato das sequências virais não terem sido recuperadas após as análises de bioinformática, sugere consonância com algumas pesquisas que reportam haver a produção de artefatos através da amplificação randômica, mais frequentemente em amostras com pouca quantidade de material genético (Lusk 2014, Perlejewski et al. 2015) para iniciar a construção das bibliotecas.

A sensibilidade de identificação de genomas virais por metagenômica é proporcional à quantidade de outros ácidos nucleicos presentes na amostra, que podem variar largamente de acordo com o nicho biológico (Li et al. 2015). Apesar do sequenciamento de nova geração possibilitar a análise de qualquer material genético que componha o metagenoma, inclusive os que estejam em baixa representação, a universalidade da análise pode ser prejudicada pela ocorrência de contaminações, mais especificamente quando atentamos para o tamanho médio menor dos genomas virais em comparação ao tamanho médio dos genomas bacterianos (Breitbart et al. 2008). Assim, vale ressaltar que, considerando-se que a metagenômica seja um campo de estudo ainda novo, nem todas as rotas de contaminação estão completamente traçadas.

É inegável que, antes da construção das bibliotecas para o sequenciamento, o material genético viral passa por diversos procedimentos diferentes que promovem o seu enriquecimento. Muitas são as vias de contaminação já descritas na literatura, como kits, reagentes e água de PCR (Rand & Houck 1990, Kulakov et al. 2002, Newsome et al. 2004, Bohus et al. 2011, Kéki et al. 2013). Nestes casos, os principais táxons bacterianos encontrados são aqueles associados a ambientes aquáticos ou de solo, frequentemente relacionados à fixação de nitrogênio. Uma possível explicação foi proposta por Kulakov (2002), a partir da utilização do nitrogênio, em vez de ar, no estoque de água ultrapura.

A gráfico gerado pelo programa MEGAN forneceu um panorama taxonômico bastante conciso sobre a origem das sequências identificadas. A maioria dos grupos taxonômicos bacterianos relatados é passível de ser encontrada na nossa microbiota, assim como também no solo. O táxon Acidobacteria, por exemplo, é predominantemente encontrado na superfície do solo e é capaz de assimilar nitrogênio, assim como Firmicutes e Proteobacteria também podem ser encontrados em sedimentos de caverna e em resíduos de gotejamento, respectivamente, (Kielak et al. 2016). No grupo FCB, o táxon Fibrobacteres, apesar de ser reconhecidamente associado à digestão de ligninocelulose em ruminantes, também tem sido reportado como mantenedor desta atividade em outros ambientes anóxicos como aterros sanitários (McDonald et al. 2008b), sedimentos lacustres (McDonald et al. 2009) e em solos (Nüsslein & Tiedje 1999, Saul et al. 2005). Já o Bacteroidetes, sendo um filo amplamente distribuído, também possui membros que habitam o solo (Kielak et al. 2016). Interessantemente, a literatura tem reportado

um caráter rizosférico (de associação à raízes de plantas) e fixador de nitrogênio de muitos grupos componentes do filo Actinobacteria (Trujillo et al. 2015). Já o filo Cyanobacteria pode ser encontrado em diversos locais, incluindo no solo úmido, e seus componentes possuem a habilidade de fixar o nitrogênio atmosférico (Lesser 2008). Assim sendo, tais características são compatíveis com o que foi proposto por Kulakov et al. (2002) no estoque de água ultrapura. É importante destacar que o gráfico gerado apresentou um padrão de microrganismos bastante semelhante entre as 11 bibliotecas analisadas, sustentando, portanto, um forte indício de contaminação.

A distinção entre uma possível bacteremia do paciente e a contaminação das amostras é sustentada pelas espécies de microrganismos que são encontradas. Os microrganismos são frequentemente divididos em dois grupos: patogênicos, que são raros em casos de contaminação, e comensais, que são raros em casos de bacteremia (Weinstein et al. 1997). Um estudo recente, elaborado por Miller et al. (2016), procurou ressaltar a importância do zelo procedimental em estudos de metagenômica, visto sua suscetibilidade de contaminação. Neste estudo, o microbioma total do plasma de 25 pacientes com encefalomielite mialgica e síndrome da fadiga crônica foi comparado ao microbioma encontrado no plasma de pacientes com o diagnóstico de outras doenças, bem como com o plasma de indivíduos saudáveis. As sequências de alguns grupos taxonômicos como Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes, que também puderam ser recuperados em nosso estudo, foram encontradas tanto nas amostras de plasma quanto nos controles negativos livres de plasma. Muitos estudos mostram a suscetibilidade de contaminação de experimentos metagenômicos, oriundo tanto de água ultrapura (Laurence et al. 2014), quanto dos kits de extração (Naccache et al. 2013, Salter et al. 2014). Desta forma, torna-se essencial o uso de controles positivos, que possam confirmar a capacidade do método em detectar o microbioma da amostra, bem como de negativos, que possam revelar a ocorrência de contaminação. De maneira mais contundente, para determinar em qual etapa ocorreu a contaminação, será necessário que estudos posteriores se resguardem com a inclusão de um controle negativo a cada etapa de manipulação das amostras. Em nosso estudo utilizamos um controle negativo na etapa de amplificação randômica, porém, este controle não foi utilizado na etapa de sequenciamento, devido ao número limitado de amostras que poderiam ser

sequenciadas. O resultado do sequenciamento do controle negativo em nosso estudo poderia ter ajudado a esclarecer o que ocorreu em nosso experimento.

Acessar a qualidade das sequências brutas é de extrema importância, pois diminui a possibilidade de as análises iniciarem com leituras de baixa qualidade e que possam interferir em etapas posteriores. A ferramenta FastQC oferece um ponto de controle de qualidade simples e rápido para dados oriundos de sequenciamento de nova geração. Estudos recentes que trabalham com sequenciamento de nova geração utilizam este programa (Li et al. 2016), incluindo estudos de metagenômica (Frey et al. 2014). Apesar do manual do programa afirmar que frequentemente há uma diminuição nos valores de qualidade ao final das sequências, o sequenciamento de todas as onze bibliotecas apresentou o mesmo padrão de qualidade, com os valores de cada base restritos ao quadrante verde, de máxima qualidade.

Em nosso estudo também investigamos a ocorrência de hepatite B oculta em pacientes com hepatite C crônica com e sem carcinoma hepatocelular. Nossos resultados mostraram uma prevalência de 3,3% (5/151) nestes pacientes. A literatura relata haver variabilidade na prevalência de hepatite B oculta em pacientes cronicamente infectados pelo HCV. Os dados publicados por Sagnelli et al. (2008) mostraram que, investigando amostras de plasma, células mononucleares de sangue periférico e tecido hepático de 89 pacientes com infecção crônica para o HCV e negativos para o marcador HBsAg, o HBV-DNA pôde ser encontrado em 60% dos pacientes positivos para os marcadores anti-HBs e anti-HBc, em 80% dos pacientes positivos apenas para o marcador de infecção prévia anti-HBc e em apenas 10% dos pacientes negativos para ambos os marcadores. Alguns trabalhos que corroboram a baixa prevalência encontrada em nosso estudo são o de Emara et al. (2010), que encontrou uma prevalência de 3,9% (6/155) de hepatite B oculta no soro de pacientes egípcios cronicamente infectados pelo HCV e o de Chen et al. (2010), que encontrou 4,7% (6/126) de prevalência no soro de pacientes de Taiwan sob tratamento para o HCV. No Brasil, os estudos de Alencar et al. (2008) e Ferrari et al. (2014) também acharam prevalências bastante baixas, sendo 0 (0/33) e 5,9% (1/17), respectivamente. Entretanto, recentemente Chen et al. (2016), ao rastrear o HBV-DNA no soro de pacientes também de Taiwan com infecção crônica para o HCV, encontrou uma prevalência de 30,6% (56/183) de hepatite B oculta. Em consonância com esta alta

prevalência há os resultados obtidos por Squadrito et al. (2013) que encontrou uma prevalência de 39,2% (128/326) e de Pollicino et al. (2004) que encontrou 36,6% de hepatite B oculta em pacientes cronicamente infectados pelo HCV. Além disso, a prevalência de hepatite B oculta em pacientes com HCV crônico e CHC encontrada em nosso estudo foi de 10,2% (5/49), menor do que tem sido reportado pela literatura. Os estudos de Pollicino et al. (2004) e Tanaka et al. (2004) encontraram, respectivamente, 61,6% (45/73) e 50% (25/50), já o brasileiro de Alencar encontrou 5,9% (1/17).

Variações na prevalência de hepatite B oculta entre os diferentes estudos podem ocorrer devido ao tipo de amostra biológica utilizada (soro ou tecido hepático), ao grupo populacional estudado e/ou a diferenças na sensibilidade dos métodos de detecção. Visto ser a hepatite B oculta caracterizada por uma forte supressão da atividade do HBV, responsável pela ausência de HBsAg, é possível que os níveis de HBV-DNA sejam muito baixos, ou até mesmo indetectáveis, no soro. Além disso, alguns estudos demonstram que uma porcentagem considerável de pacientes que são negativos para o HBV-DNA no soro, podem apresentá-lo no tecido hepático (Mariscal et al. 2004, Fabris et al. 2004).

De acordo com os nossos resultados, 100% dos casos de hepatite B oculta ocorreram em pacientes com câncer ($p=0.003$). A presença de hepatite B oculta não é rara em pacientes cronicamente infectados pelo HCV e alguns estudos procuram associar a sua ocorrência com a progressão da doença hepática, incluindo a evolução para o CHC (Bläckberg & Kidd-Ljunggren 2000, Carreño et al. 2008). Ademais, um estudo de meta-análise realizado por Shi et al. (2012) confirmou que a hepatite B oculta é um importante fator de risco para o desenvolvimento de CHC, tanto em pacientes cronicamente infectados pelo HCV como em não infectados. Em desacordo, um estudo recente realizado por Chen et al. (2016) mostrou que a ocorrência de hepatite B oculta em pacientes asiáticos cronicamente infectados pelo HCV não é clinicamente significativa. Dois estudos de um mesmo grupo italiano mostram que a hepatite B oculta leva à progressão para cirrose em pacientes crônicos para hepatite C (Cacciola et al. 1999, Squadrito et al. 2013), enquanto que outros mostram não haver esta associação (Evangelista et al. 2008). Desta forma, a literatura ainda está em uma etapa bastante conflitante quanto à possibilidade da hepatite B oculta agravar o prognóstico de doença hepática em associação com infecção crônica pelo HCV. Em nosso estudo, a

pouca quantidade de pacientes positivos para hepatite B oculta (n=5) impossibilitou a realização de uma análise estatística multivariada.

Os genótipos A e D do HBV são amplamente distribuídos pelo mundo e no Brasil, um país que reflete a mistura étnica de sua população, podemos encontrar o genótipo A como o de maior prevalência, seguido pelo D e o F (Mello et al. 2007). No nosso estudo foram detectados 80% do genótipo A e 20% do D, corroborando os resultados prévios sobre a distribuição dos genótipos do HBV no país.

Apesar de a literatura inferir o sequenciamento do genoma completo como a forma mais conclusiva de genotipagem e subgenotipagem do HBV (Bartholomeusz & Schaefer 2004), este é um método relativamente caro e demorado (Pourkarim 2014). A nossa genotipagem foi realizada utilizando a região S do genoma do HBV, a qual permite a correta genotipagem do vírus (Hardie & Williamson 1997), entretanto, não é capaz de diferenciar todos os subgenótipos do HBV (Pourkarim 2014). Dessa forma, uma ferramenta adicional de subgenotipagem do HBV (Geno2pheno) foi utilizada, confirmando os resultados de subgenotipagem da análise filogenética.

Outro objetivo do nosso estudo foi investigar a prevalência da infecção pelo TTV e dos cinco diferentes genogrupos em pacientes com hepatite C crônica com e sem CHC. Nossos resultados identificaram uma prevalência de 45% (68/151) da infecção pelo TTV neste grupo de pacientes. Tal prevalência parece estar em consonância com a literatura, visto que há uma estimativa de que cerca de mais de 50% da população mundial seja portadora crônica do TTV (Hsieh et al. 1999, Hafez et al. 2007). Quando comparamos nosso resultado com outras publicações na mesma linha de investigação, encontramos prevalências similares e mais altas. O estudo realizado por Irving et al. (1999) encontrou uma prevalência de 48,7% (58/119) de TTV no soro de pacientes infectados pelo HCV no Reino Unido, enquanto que os estudos realizados por Al-Qahtani et al. (2016) e Hussain et al. (2012), encontraram uma prevalência de 86,8% (46/53) e 90% (90/100) de TTV no plasma de pacientes infectados pelo HCV no Qatar e no Paquistão, respectivamente. Todos os estudos utilizaram a região URT como alvo para a amplificação.

Outros estudos sobre a prevalência do TTV na população brasileira e mundial mostram haver uma grande variabilidade. O recente estudo realizado por Takemoto et al. (2015) encontrou uma prevalência de 54% (27/50) e 36% (43/118)

de TTV no sangue periférico de pacientes com histórico de transplante renal e submetidos à diálise, respectivamente, no estado do Paraná. Neste estudo foi utilizada a mesma abordagem de PCR genogrupo específica que no nosso estudo, porém sem caráter multiplex. Outro estudo, realizado por Massaú et al. (2012), revelou uma prevalência mais alta ao investigar a presença do TTV no plasma de doadores de sangue no estado do Rio Grande do Sul, encontrando uma taxa positiva de 73% (74/101). A técnica utilizada foi a de amplificação da região UTR do genoma viral. Outros estudos, de grupos internacionais, que também utilizaram o alvo UTR para a PCR obtiveram prevalências bastante altas: Ninomiya et al. (2008) encontrou uma prevalência de 95% de TTV no Japão, Vasilyev et al. (2009) uma prevalência de 94% na Rússia e Hsiao et al. (2016) reportou 95%. Todas as pesquisas foram realizadas com soro de indivíduos saudáveis.

Diferenças globais nas porcentagens de prevalência do TTV podem ser explicadas pelo método de investigação utilizado por cada estudo, visto que a escolha da região alvo da PCR influencia consideravelmente os níveis de detecção. A utilização da região UTR do genoma viral sustenta uma detecção menos estridente e com maior taxa de cobertura, visto seu alto grau de conservação nos diferentes genogrupos (Takahashi 1998, Hino 2002), possibilitando a detecção do TTV de maneira mais ampla. Para embasar, temos o estudo realizado por Tokita et al. (2002), que investigando a prevalência do TTV em pacientes com doença hepática crônica pelo HCV, encontrou porcentagens bastante discrepantes de acordo com a região genômica amplificada. Ao utilizar oligonucleotídeos para a região UTR do genoma viral, uma prevalência de 92% (215/237) foi encontrada, enquanto que ao amplificar a região N22 (presente na região genômica codificante da ORF1) a prevalência diminuiu para 30% (72/237). Além disso, em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro que investigou a prevalência do TTV no soro de indivíduos doadores de sangue, cronicamente infectados pelo HBV e infectados pelo HIV-1, encontrou, respectivamente, 83% (20/24), 67% (16/24) e 100% (24/24) de prevalência quando o alvo da PCR foi a região UTR do genoma, e 46% (11/24), 54% (13/24) e 100% (24/24) quando a PCR era genogrupo específica. Nosso estudo utilizou uma técnica de PCR capaz de reconhecer diferenças genéticas entre os cinco genogrupos (Devalle & Niel 2004).

Além disso, em nosso estudo a infecção pelo TTV foi significativamente mais frequente ($p=0.005$) em pacientes com idade ≥ 60 anos do que nos demais

pacientes. Este resultado é corroborado por estudos prévios que mostraram uma maior prevalência do TTV em indivíduos com idade mais avançada (Hsieh et al. 1999, Saback et al. 1999, Zhong et al. 2001).

Apesar de uma recente pesquisa inferir a existência de mais dois genogrupos para o TTV (Hsiao et al. 2016), todos os cinco tradicionalmente reconhecidos pela literatura puderam ser identificados pelo método de PCR multiplex empregado em nossa metodologia. Os genogrupos de maior e menor prevalência foram, respectivamente, o 3 (45% e 28%, em pacientes com e sem CHC, respectivamente) e o 2 (0 e 1%, em pacientes com e sem CHC, respectivamente). Um estudo realizado por Maggi et al. (2003) conseguiu recuperar todos os genogrupos, exceto o 2, de secreções nasais de crianças italianas. Já em um estudo realizado por Cancela et al. (2016), os genótipos 2, 4 e 5 não foram detectados na população uruguaia analisada. Esses dados sustentam a estimativa da literatura quanto ao genogrupo 2 ser o de menor prevalência mundial, e o 3 o mais prevalente (Maggi et al. 2003, Biagini et al. 2006, Pinho-Nascimento et al. 2011). Divergentemente, o estudo realizado por Devalle & Niel (2004) com indivíduos brasileiros, encontrou maior prevalência do genogrupo 5, seguido pelo 3, 1, 2 e 4.

Outro resultado de nosso estudo foi a maior prevalência de coinfeções em pacientes com CHC. Dos pacientes com CHC, 13% estavam coinfectados por 3 genogrupos e 3% por 4 genogrupos, enquanto que os pacientes sem CHC, a frequência de coinfeção por 3 e 4 genogrupos foi de 8% e zero, respectivamente. Muitos estudos reportam a ocorrência de coinfeções (Biagini et al. 1999, Devalle & Niel 2004, 2005, Jelcic et al. 2004, Ninomiya et al. 2008), parte deles sustenta haver uma relação de cooperação entre os diferentes genogrupos, visto que apenas alguns isolados virais possuiriam todos os elementos necessários para o estabelecimento de uma infecção (Khudyakov et al. 2000, Luo et al. 2002). Já o estudo realizado por Devalle & Niel (2005) concluiu que a ocorrência de coinfeções foi de 62% (29/47) em pacientes saudáveis e de 100% (8/8) em pacientes com AIDS, sugerindo uma concordância com a literatura acerca da maior prevalência de coinfeções em pessoas imunocomprometidas (Shibayama et al. 2001). Provavelmente a imunossupressão dos pacientes com carcinoma hepatocelular tenha sido o fator responsável pela detecção de um maior número de coinfeções de genogrupos de TTV nestes pacientes.

Em nosso estudo, a prevalência do TTV foi significativamente mais alta em pacientes com CHC (44,1%) do que em pacientes sem câncer (22,9%) ($p=0.006$). Alguns estudos prévios sugerem uma correlação entre a infecção pelo TTV e o desenvolvimento do CHC (Tokita et al. 2002, Hafez et al. 2007). Tokita et al. (2002) comparou a viremia de TTV em pacientes com e sem CHC, encontrando uma prevalência significativamente mais alta nos pacientes com câncer (81%) do que nos pacientes sem câncer (50%). Em outro estudo, realizado por Hafez et al. (2007), foi encontrada uma prevalência de 46,7% (14/30) em pacientes com CHC e 36,7% (11/30) em indivíduos saudáveis. Por outro lado, alguns estudos sugerem que títulos mais altos de TTV seriam um reflexo do estado imunológico comprometido do paciente (Touinssi et al. 2001). Segundo o estudo realizado por Devalle & Niel (2004), todos os pacientes imunocomprometidos pela infecção com o HIV-1 estavam concomitantemente infectados por algum genótipo do TTV. Outro estudo revelou que a carga viral do TTV parece aumentar enquanto os pacientes caminham para um prognóstico de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Thom & Petrik 2007).

Por fim, através de análise multivariada, foi possível estabelecer uma associação entre a infecção pelo TTV e a presença de CHC, independentemente de idade e sexo, com uma *odds ratio* de 2,1. Nosso resultado é corroborado pelo estudo de Tokita et al. (2002), que também encontrou o TTV como uma variável independentemente associada ao CHC em pacientes infectados pelo HCV. O conhecimento sobre a patogenicidade do TTV é ainda escasso, sendo necessário que investigações mais profundas sobre o tema posicionem a infecção pelo TTV como causa do CHC ou consequência da imunossupressão resultante desta malignidade.

7) CONCLUSÕES

- Através da análise metagenômica empregada neste estudo e por conta da contaminação não foi possível identificar o viroma presente nas 11 bibliotecas genômicas analisadas. Provavelmente, a ocorrência de uma contaminação bacteriana durante os experimentos de preparação das bibliotecas foi a causa para esta falha.
- A detecção de hepatite B oculta apenas em pacientes com carcinoma hepatocelular corrobora o fato de que este tipo de infecção pelo HBV possa estar associado ao desenvolvimento deste câncer em pacientes com infecção crônica pelo HCV.
- A coinfeção pelo TTV foi um fator independentemente associado a presença de carcinoma hepatocelular e, portanto, pode ter uma significância prognóstica em pacientes com infecção crônica pelo HCV.
- Nenhuma diferença significativa na frequência dos genogrupos do TTV entre pacientes com e sem carcinoma hepatocelular foi identificada.

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Qahtani AA, Alabsi ES, AbuOdeh R, Thalib L, Nasrallah GK 2016. Prevalence of anelloviruses (TTV, TTMDV, and TTMV) in healthy blood donors and in patients infected with HBV or HCV in Qatar. *Viol. J.* 13: 208.
- Alencar RSM, Gomes MMS, Sitnik R, Pinho JRR, Malta FM, Mello IMVGC, Mello ES, Bacchella T, Machado MCC, Alves VAF, Carrilho FJ 2008. Low occurrence of occult hepatitis B virus infection and high frequency of hepatitis C virus genotype 3 in hepatocellular carcinoma in Brazil. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* 41: 235–240.
- Allain J-P, Opare-Sem O 2016. Screening and diagnosis of HBV in low-income and middle-income countries. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 643–653.
- Allander T, Emerson SU, Engle RE, Purcell RH, Bukh J 2001. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 11609–11614.
- Alvarado-Mora M V., Rebello Pinho JR 2013. Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antivir. Ther.* 18: 459–465.
- Alvarado-Mora MV, Santana RAF, Sitnik R, Ferreira PRA, Manguiera CLP, Carrilho FJ, Pinho JRR 2011. Full-length genomic sequence of hepatitis B virus genotype C2 isolated from a native Brazilian patient. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106: 495–498.
- Andrews S 2010. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.
- Araujo NM, Araujo OC, Silva EM, Villela-Nogueira CA, Nabuco LC, Parana R, Bessone F, Gomes SA, Trepo C, Kay A 2013. Identification of novel recombinants of hepatitis B virus genotypes F and G in human immunodeficiency virus-positive patients from Argentina and Brazil. *J. Gen. Virol.* 94: 150–158.
- Araújo OC, Rosa AS, Fernandes A, Niel C, Villela-Nogueira CA, Pannain V, Araujo NM 2016. RASSF1A and DOK1 Promoter Methylation Levels in Hepatocellular Carcinoma, Cirrhotic and Non-Cirrhotic Liver, and Correlation with Liver Cancer in Brazilian Patients (IA Chemin, Ed.). *PLoS One* 11: e0153796.
- 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.
- Asabe S, Nishizawa T, Iwanari H, Okamoto H 2001. Phosphorylation of Serine-Rich Protein Encoded by Open Reading Frame 3 of the TT Virus Genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286: 298–304.
- Asim M, Singla R, Gupta RK, Kar P 2010. Clinical & molecular characterization of human TT virus in different liver diseases. *Indian J. Med. Res.* 131: 545–554.
- Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH 2012. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. *J. Hepatol.* 56: 1384–1391.
- Bagaglio S, Sitia G, Prati D, Cella D, Hasson H, Novati R, Lazzarin A, Morsica G 2002. Mother-to-child transmission of TT virus: Sequence analysis of non-coding region of TT virus in infected mother-infant pairs. *Arch. Virol.* 147: 803–812.
- Ball JK, Curran R, Berridge S, Grabowska AM, Jameson CL, Thomson BJ, Irving WL, Sharp PM 1999. TT virus sequence heterogeneity in vivo: Evidence for co-infection with multiple genetic types. *J. Gen. Virol.* 80: 1759–1768.
- Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK 1972. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J. Immunol.* 109: 842–848.
- Bando M, Ohno S, Oshikawa K, Takahashi M, Okamoto H, Sugiyama Y 2001. Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Med.* 95: 935–942.
- Bartholomeusz A, Schaefer S 2004. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev. Med. Virol.* 14: 3–16.
- Baylin SB, Jones PA 2011. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer* 11: 726–734.
- Beck J 2007. Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol.* 13: 48.
- Bell TG, Kramvis A 2015. Bioinformatics tools for small genomes, such as hepatitis B virus. *Viruses* 7: 781–797.
- Belloni L, Pollicino T, Nicola F De, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, Raimondo G, Levrero M 2009. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 19975–19979.
- Biagini P 2004. Human circoviruses. *Vet. Microbiol.* 98: 95–101.
- Biagini P 2009. Classification of TTV and Related Viruses (Anelloviruses). In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, pp. 21–33.

- Biagini P, Gallian P, Attoui H, Cantaloube JF, Micco P de, Lamballerie X de 1999. Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates. *J. Gen. Virol.* 80: 419–424.
- Biagini P, PierreGallian P, Cantaloube J-F, Attoui H, Micco P de, Lamballerie X de 2006. Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in French blood donors. *J. Med. Virol.* 78: 298–304.
- Bläckberg J, Kidd-Ljunggren K 2000. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. *J. Hepatol.* 33: 992–997.
- Blanchet M, Sureau C 2007. Infectivity Determinants of the Hepatitis B Virus Pre-S Domain Are Confined to the N-Terminal 75 Amino Acid Residues. *J. Virol.* 81: 5841–5849.
- Block TM, Guo H, Guo J-T 2007. Molecular Virology of Hepatitis B Virus for Clinicians. *Clin. Liver Dis.* 11: 685–706.
- Blum HE 2005. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J. Gastroenterol.* 11: 7391–7400.
- Blum HE, Galun E, Liang TJ, Weizsäcker F von, Wands JR 1991. Naturally occurring missense mutation in the polymerase gene terminating hepatitis B virus replication. *J. Virol.* 65: 1836–1842.
- Blumberg BS 1967. A Serum Antigen (Australia Antigen) in Down's Syndrome, Leukemia, and Hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 66: 924.
- Bohus V, Kéki Z, Márialigeti K, Baranyi K, Patek G, Schunk J, Tóth E 2011. Bacterial communities in an ultrapure water containing storage tank of a power plant. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 58: 371–382.
- Bouvier GL Le 1971. The heterogeneity of Australia antigen. *J. Infect. Dis.* 123: 671–675.
- Bréchet C 2001. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: Clinically significant or purely “occult”? *Hepatology* 34: 194–203.
- Bréchet C 2004. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology* 127: S56-61.
- Breitbart M, Haynes M, Kelley S, Angly F, Edwards RA, Felts B, Mahaffy JM, Mueller J, Nulton J, Rayhawk S, Rodriguez-Brito B, Salamon P, Rohwer F 2008. Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Res. Microbiol.* 159: 367–

373.

- Breitbart M, Salamon P, Andresen B, Mahaffy JM, Segall AM, Mead D, Azam F, Rohwer F 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 14250–14255.
- But DYK, Lai CL, Yuen MF 2008. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 14: 1652–1656.
- Butterworth LA, Suzuki S, Ueda R, Kato H, Kimura Y, Ohno T, Orito E, Cooksley WGE, Mizokami M, Sugauchi F 2001. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: complete genome sequence and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.* 82: 883–892.
- Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G 1999. Occult Hepatitis B Virus Infection in Patients with Chronic Hepatitis C Liver Disease. *N. Engl. J. Med.* 341: 22–26.
- Calcaterra S, Zaniratti MS, Serraino D, Peroni M, Abbate I, Cappiello G, Piselli P, Pavia C, Rezza G, Ippolito G, Capobianchi MR 2001. Cervicovaginal shedding of TT virus in HIV-infected women. *J. Hum. Virol.* 4: 343–345.
- Cancela F, Ramos N, Mirazo S, Mainardi V, Gerona S, Arbiza J 2016. Detection and molecular characterization of Torque Teno Virus (TTV) in Uruguay. *Infect. Genet. Evol.* 44: 501–506.
- Carreño V, Bartolomé J, Castillo I, Quiroga JA 2008. Occult hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. *Rev. Med. Virol.* 18: 139–157.
- Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Goncalves CS, Mattos AA de, Brazilian HCC Study Group 2010. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics (Sao Paulo).* 65: 1285–1290.
- CDC 2008. *Recommendations for Routine Testing and Follow-up for Chronic Hepatitis B Virus (HBV) Infection.*
- CDC 2016. HBV FAQs for Health Professionals | Division of Viral Hepatitis | CDC.
- Chaar M El, Candotti D, Crowther RA, Allain JP 2010. Impact of hepatitis B virus surface protein mutations on the diagnosis of occult hepatitis B virus infection. *Hepatology* 52: 1600–1610.
- Chan JZ-M, Sergeant MJ, Lee OY-C, Minnikin DE, Besra GS, Pap I, Spigelman M, Donoghue HD, Pallen MJ 2013. Metagenomic Analysis of Tuberculosis in a Mummy. *N. Engl. J. Med.* 369: 289–290.
- Chattopadhyay S, Das BC, Gupta RK, Kar P 2005. Presence of TT virus infection in

- chronic hepatitis patients from a hospital in New Delhi, India. *Indian J. Med. Res.* 122: 29–33.
- Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda SK 2004. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology* 127: 1356–1371.
- Chemin I, Zoulim F 2009. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 286: 52–59.
- Chen L-W, Chien R-N, Yen C-L, Chang J-J, Liu C-J, Lin C-L 2010. Therapeutic effects of pegylated interferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients with occult hepatitis B virus dual infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25: 259–263.
- Chen Y, Sheen I –Shya., Chu C, Liaw Y 2002. Prognosis following spontaneous HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients with or without concurrent infection. *Gastroenterology* 123: 1084–1089.
- Chen H-Y, Su T-H, Tseng T-C, Yang W-T, Chen T-C, Chen P-J, Chen D-S, Kao J-H, Liu C-J 2016. Impact of occult hepatitis B on the clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C virus infection: A 10-year follow-up. *J. Formos. Med. Assoc.*: 1–8.
- Chikasue K, Kimura M, Ikeda K, Ohnishi T, Kawanishi S, Iio T, Kataoka M, Arao Y 2012. Detection of torque teno virus DNA in exhaled breath by polymerase chain reaction. *Acta Med. Okayama* 66: 387–397.
- Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science (80-)*. 244: 359–362.
- Clewley JP, Hallett RL, Teo CG, McKiernan PJ, Bobet F 2000. Characterization of a highly divergent TT virus genome. *J. Gen. Virol.* 81: 2273–2279.
- Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi F El, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Wild CP 2011. Preventable Exposures Associated With Human Cancers. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 103: 1827–1839.
- Coleman WB 2003. Mechanisms of Human Hepatocarcinogenesis. *Curr. Mol. Med.* 3: 573–588.
- Collen A 2016. *10% Humano - como os microrganismos são a chave para a saúde do corpo e da mente.* Sextante.
- Conceição-Neto N, Zeller M, Lefrère H, Bruyn P De, Beller L, Deboutte W, Yinda

- CK, Lavigne R, Maes P, Ranst M Van, Heylen E, Matthijnsens J 2015. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Sci. Rep.* 5: 16532.
- Coppola N 2015. Role of occult hepatitis B virus infection in chronic hepatitis C. *World J. Gastroenterol.* 21: 11931.
- Couroucé-Pauty AM, Plançon A, Soulier JP 1983. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang.* 44: 197–211.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1: 695–698.
- Daniele B, Bencivenga A, Megna AS, Tinessa V 2004. α -fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127: S108–S112.
- Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R 2012. Molecular Biology of the Hepatitis B Virus for Clinicians. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2: 353–365.
- Delwart EL 2007. Viral metagenomics. *Rev. Med. Virol.* 17: 115–131.
- Desai MM, Pal RB, Banker DD 2005. Molecular Epidemiology and Clinical Implications of TT Virus (TTV) Infection in Indian Subjects. *J. Clin. Gastroenterol.* 39: 422–429.
- Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA 2007. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature* 449: 811–818.
- Devalle S, Niel C 2004. Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients. *J. Med. Virol.* 72: 166–173.
- Devalle S, Niel C 2005. A multiplex PCR assay able to simultaneously detect Torque teno virus isolates from phylogenetic groups 1 to 5. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 38: 853–860.
- Dijk EL van, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 30: 418–426.
- Ding D, Lou X, Hua D, Yu W, Li L, Wang J, Gao F, Zhao N, Ren G, Li L, Lin B 2012. Recurrent Targeted Genes of Hepatitis B Virus in the Liver Cancer Genomes Identified by a Next-Generation Sequencing–Based Approach (HS Scott, Ed.). *PLoS Genet.* 8: e1003065.
- Donato F, Boffetta P, Puoti M 1998. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing

- hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 75: 347–354.
- EASL 2012. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 57: 167–185.
- EASL-EORTC 2012. EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 56: 908–943.
- El-Serag HB 2004. Hepatocellular carcinoma: Recent trends in the United States. *Gastroenterology* 127: S27–S34.
- El-Serag HB 2012. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 142: 1264–1273.e1.
- Emara MH, El-Gammal NE, Mohamed LA, Bahgat MM 2010. Occult hepatitis B infection in egyptian chronic hepatitis C patients: prevalence, impact on pegylated interferon/ribavirin therapy. *Virology* 7: 324.
- Erker JC, Leary TP, Desai SM, Chalmers ML, Mushahwar IK 1999. Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J. Gen. Virol.* 80: 1743–1750.
- Evangelista S, Michele I, Nicola C, Raffaella P, Caterina S, Vincenzo M, Guido P, Maria S, Marika B, Giovanni M, Nunzio C, Giuseppe P, Camillo DVB 2008. Diagnosis and clinical impact of occult hepatitis B infection in patients with biopsy proven chronic hepatitis C: A multicenter study. *J. Med. Virol.* 80: 1547–1553.
- Fabris P, Brown D, Tositti G, Bozzola L, Giordani MT, Bevilacqua P, Lalla F de, Webster GJM, Dusheiko G 2004. Occult hepatitis B virus infection does not affect liver histology or response to therapy with interferon alpha and ribavirin in intravenous drug users with chronic hepatitis C. *J. Clin. Virol.* 29: 160–166.
- Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer J, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm S, Realdi G 1997. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: A retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 112: 463–472.
- Fauquet CM, Mayo M a, Maniloff J, Desselberger U, Ball L a 2005. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Res.* 83: 221–222.
- Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127: 2893–2917.

- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136: E359–E386.
- Ferrari TCA, Xavier MAP, Vidigal PVT, Amaral NS, Diniz PA, Resende AP, Miranda DM, Faria AC, Lima AS, Faria LC 2014. Occult hepatitis B virus infection in liver transplant patients in a Brazilian referral center. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* 47: 990–994.
- Flichman DM, Blejer JL, Livellara BI, Re VE, Bartoli S, Bustos JA, Ansola CP, Hidalgo S, Cerda ME, Levin AE, Huenul A, Riboldi V, Mc Treviño E, Salamone HJ, Nuñez FA, Fernández RJ, Reybaud JF, Campos RH 2014. Prevalence and trends of markers of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human Immunodeficiency virus in Argentine blood donors. *BCM Infect. Dis.* 14: 1–9.
- Focosi D, Maggi F, Albani M, Macera L, Ricci V, Gagnani S, Beo S Di, Ghimenti M, Antonelli G, Bendinelli M, Pistello M, Ceccherini-Nelli L, Petrini M 2010. Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution. *J. Clin. Virol.* 47: 189–192.
- Frey KG, Herrera-Galeano J, Redden CL, Luu T V, Servetas SL, Mateczun AJ, Mokashi VP, Bishop-Lilly KA 2014. Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. *BMC Genomics* 15: 96.
- Froussard P 1993. rPCR: A Powerful Tool for Random Amplification of Whole RNA Sequences. *PCR Methods Appl.* 2: 185–190.
- Furuta RA, Sakamoto H, Kuroishi A, Yasiui K, Matsukura H, Hirayama F 2015. Metagenomic profiling of the viromes of plasma collected from blood donors with elevated serum alanine aminotransferase levels. *Transfusion* 55: 1889–1899.
- Gallian P, Berland Y, Olmer M, Raccah D, Micco P de, Biagini P, Simon S, Bouchouareb D, Mourey C, Roubicek C, Touinssi M, Cantaloube JF, Dussol B, Lamballerie X de 1999. TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2538–2542.
- Gallian P, Biagini P, Zhong S, Touinssi M 2000. TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *J. Clin. Virol.* 17: 43–

49.

- Ganem D, Pollack JR, Tavis J 1994. Hepatitis B virus reverse transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. *Infect. Agents Dis.* 3: 85–93.
- Ganem D, Prince AM 2004. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. *N. Engl. J. Med.* 350: 1118–1129.
- Ganem D, Schneider R 2001. Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P (Eds.), *Field's Virol.*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2923–2969.
- Ganem D, Varmus HE 1987. The Molecular Biology of the Hepatitis B Viruses. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 651–693.
- Gergely P, Perl A, Poór G 2006. Possible pathogenic nature of the recently discovered TT virus: Does it play a role in autoimmune rheumatic diseases? *Autoimmun. Rev.* 6: 5–9.
- Gerlich WH, Bruss V 1993. Functions of hepatitis B virus proteins and molecular targets for protective immunity. In: Ellis R (Ed.), *Hepat. B vaccines Clin. Pract.*, Dekker, New York, pp. 41–82.
- Gerlich WH, Robinson WS 1980. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21: 801–809.
- Gerlich WH, Wagner FF, Chudy M, Harritshoj LH, Lattermann A, Wienzek S, Glebe D, Saniewski M, Schüttler CG, Wend UC, Willems WR, Bauerfeind U, Jork C, Bein G, Platz P, Ullum H, Dickmeiss E 2007. HBsAg non-reactive HBV infection in blood donors: Transmission and pathogenicity. *J. Med. Virol.* 79: S32–S36.
- Gish RG, Mason A 2001. Autoimmune liver disease. Current standards, future directions. *Clin. Liver Dis.* 5: 287–314.
- Glebe D 2006. Attachment sites and neutralising epitopes of hepatitis B virus. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 52: 3–21.
- Glebe D, Bremer C 2013. The Molecular Virology of Hepatitis B Virus. *Semin. Liver Dis.* 33: 103–112.
- Globocan 2012. GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: liver Cancers.
- Gomes SA 2003. O genoma do vírus da hepatite B. In: Focaccia R (Ed.), *Tratado de Hepatites Virais*, Atheneu, São Paulo, pp. 119–125.
- Griffiths P 1999. Time to consider the concept of a commensal virus? *Rev. Med. Virol.* 9: 73–74.
- Hafez MM, Shaarawy SM, Hassan A a, Salim RF, Abd El Salam FM, Ali AE 2007.

- Prevalence of transfusion transmitted virus (TTV) genotypes among HCC patients in Qaluobia governorate. *Viol. J.* 4: 135.
- Haines KM, Loeb DD 2007. The Sequence of the RNA Primer and the DNA Template Influence the Initiation of Plus-strand DNA Synthesis in Hepatitis B Virus. *J. Mol. Biol.* 370: 471–480.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: R245–R249.
- Hardie DR, Williamson C 1997. Analysis of the preS1 gene of hepatitis B virus (HBV) to define epidemiologically linked and un-linked infections in South Africa. *Arch. Virol.* 142: 1829–1841.
- Hausen H zur, Villiers EM de 2009. TT viruses: oncogenic or tumor-suppressive properties? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 331: 109–116.
- Heller F, Zachoval R, Koelzer A, Nitschko H, Froesner GG 2001. Isolate KAV: A New Genotype of the TT-Virus Family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 937–941.
- Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S 1999. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 260: 17–22.
- Hino S 2002. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev. Med. Virol.* 12: 151–158.
- Hino O, Shows TB, Rogler CE 1986. Hepatitis B virus integration site in hepatocellular carcinoma at chromosome 17;18 translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 8338–8342.
- Hsiao K-L, Wang L-Y, Lin C-L, Liu H-F 2016. New Phylogenetic Groups of Torque Teno Virus Identified in Eastern Taiwan Indigenes (PC Woo, Ed.). *PLoS One* 11: e0149901.
- Hsieh SY, Wu YH, Ho YP, Tsao KC, Yeh CT, Liaw YF 1999. High prevalence of TT virus infection in healthy children and adults and in patients with liver disease in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1829–1831.
- Hu K-Q 2002. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J. Viral Hepat.* 9: 243–257.
- Hu Y-W, Al-Moslih MI, Ali MT Al, Khameneh SR, Perkins H, Diaz-Mitoma F, Roy JN, Uzicanin S, Brown EG 2005. Molecular Detection Method for All Known

- Genotypes of TT Virus (TTV) and TTV-Like Viruses in Thalassemia Patients and Healthy Individuals. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3747–3754.
- Hu Z-J, Lang Z-W, Zhou Y-S, Yan H-P, Huang D-Z, Chen W-R, Luo Z-X 2002. Clinicopathological study on TTV infection in hepatitis of unknown etiology. *World J. Gastroenterol.* 8: 288–293.
- Huang H-C, Chen C-C, Chang W-C, Tao M-H, Huang C 2012. Entry of Hepatitis B Virus into Immortalized Human Primary Hepatocytes by Clathrin-Dependent Endocytosis. *J. Virol.* 86: 9443–9453.
- Huang X, Hollinger FB 2014. Occult hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: a systematic review. *J. Viral Hepat.* 21: 153–162.
- Huang, Wu, Chiang, Chan, Huo, Huang, Hwang, Chang, Lee 2000. Detection and viral nucleotide sequence analysis of transfusion-transmitted virus infection in acute fulminant and non-fulminant hepatitis. *J. Viral Hepat.* 7: 56–63.
- Hui C-K, Lau E, Monto A, Kim M, Luk JM, Poon RTP, Leung N, Lo C-M, Fan S-T, Lau GKK, Wright TL 2006. Natural History of Patients with Recurrent Chronic Hepatitis C Virus and Occult Hepatitis B Co-Infection after Liver Transplantation. *Am. J. Transplant.* 6: 1600–1608.
- Huson DH, Beier S, Flade I, Górska A, El-Hadidi M, Mitra S, Ruscheweyh H-J, Tappu R 2016. MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data (T Poisot, Ed.). *PLOS Comput. Biol.* 12: e1004957.
- Hussain T, Manzoor S, Waheed Y, Tariq H, Hanif K 2012. Phylogenetic analysis of torque teno virus genome from Pakistani isolate and incidence of co-infection among HBV/HCV infected patients. *Virol. J.* 9: 320.
- ICTV 2015. ICTV Virus Taxonomy 2015.
- INCA 2016. Portal - Instituto Nacional de Câncer - INCA.
- Irving WL, Ball JK, Berridge S, Curran R, Grabowska AM, Jameson CL, Neal KR, Ryder SD, Thomson BJ 1999. TT Virus Infection in Patients with Hepatitis C: Frequency, Persistence, and Sequence Heterogeneity. *J. Infect. Dis.* 180: 27–34.
- Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, Shibayama T, Ishikawa T, Tsuda F, Tanaka T, Nishizawa T, Okamoto H 2000. Visualization of TT Virus Particles Recovered from the Sera and Feces of Infected Humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 718–724.

- Jafari M, Afkari R, Pirouzi A, Mohsenzadeh M, Azadi M 2012. Molecular detection of TT virus and SEN virus infections in hemodialysed patients and blood donors in south of Iran. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 55: 478.
- Jang KL, Lee C-W, Sung Y-C, Jung EY, Kwun HJ, Ahn JY 2002. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *J. Gen. Virol.* 83: 2765–2772.
- Jelcic I, Hotz-Wagenblatt A, Hunziker A, Hausen H zur, Villiers E-M de 2004. Isolation of Multiple TT Virus Genotypes from Spleen Biopsy Tissue from a Hodgkin's Disease Patient: Genome Reorganization and Diversity in the Hypervariable Region. *J. Virol.* 78: 7498–7507.
- Jiang Z, Jhunjhunwala S, Liu J, Haverty PM, Kennemer MI, Guan Y, Lee W, Carnevali P, Stinson J, Johnson S, Diao J, Yeung S, Jubb A, Ye W, Wu TD, Kapadia SB, Sauvage FJ De, Gentleman RC, Stern HM, Seshagiri S, Pant KP, Modrusan Z, Ballinger DG, Zhang Z 2012. The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. *Genome Res.* 22: 593–601.
- Jiménez-Melsió A, Parés S, Segalés J, Kekarainen T 2013. Detection of porcine anelloviruses in pork meat and human faeces. *Virus Res.* 178: 522–524.
- Kakkola L, Bondén H, Hedman L, Kivi N, Moisala S, Julin J, Ylä-Liedenpohja J, Miettinen S, Kantola K, Hedman K, Söderlund-Venermo M 2008. Expression of all six human Torque teno virus (TTV) proteins in bacteria and in insect cells, and analysis of their IgG responses. *Virology* 382: 182–189.
- Kamada K, Kamahora T, Kabat P, Hino S 2004. Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology* 321: 341–348.
- Kamien RD 2011. Knot Your Simple Defect Lines? *Science (80-.)*. 333: 46–47.
- Kay A, Zoulim F 2007. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* 127: 164–176.
- Kazemi MJ, Yaghobi R, Iravani Saadi M, Geramizadeh B, Moayedi J 2015. Association Between TT Virus Infection and Cirrhosis in Liver Transplant Patients. *Hepat. Mon.* 15: e28370.
- Kéki Z, Grébner K, Bohus V, Márialigeti K, Tóth E 2013. Application of special oligotrophic media for cultivation of bacterial communities originated from ultrapure water. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 60: 345–357.

- Kew MC 2011. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26: 144–152.
- Kew MC 2013. Hepatitis viruses (other than hepatitis B and C viruses) as causes of hepatocellular carcinoma: an update. *J. Viral Hepat.* 20: 149–157.
- Khudyakov YE, Cong M -e., Nichols B, Reed D, Dou X-G, Viazov SO, Chang J, Fried MW, Williams I, Bower W, Lambert S, Purdy M, Roggendorf M, Fields H a 2000. Sequence Heterogeneity of TT Virus and Closely Related Viruses. *J. Virol.* 74: 2990–3000.
- Kielak AM, Barreto CC, Kowalchuk GA, Veen JA van, Kuramae EE 2016. The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes. *Front. Microbiol.* 7: 1–16.
- Kikuchi L, Chagas AL, Alencar RS, Paranaguá-Vezozzo DC, Carrilho FJ 2013. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Antivir. Ther.* 18: 445–449.
- Kim S, Park SY, Yong H, Famulski JK, Chae S, Lee JH, Kang CM, Saya H, Chan GK, Cho H 2008. HBV X protein targets hBubR1, which induces dysregulation of the mitotic checkpoint. *Oncogene* 27: 3457–3464.
- King A, Lefkowitz E, Adams M, Carstens E 2011. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: *Ed. by King, AMQ, Adams, J. Lefkowitz, E.. Amsterdam Elsevier Elsevier, Elsevier, Amsterdam, pp. 1–1326.*
- Kohl C, Brinkmann A, Dabrowski PW, Radonić A, Nitsche A, Kurth A 2015. Protocol for Metagenomic Virus Detection in Clinical Specimens. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 48–57.
- Kramvis A 2014. Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus. *Intervirology* 57: 141–150.
- Kremsdorf D, Soussan P, Paterlini-Brechot P, Brechot C 2006. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* 25: 3823–3833.
- Kulakov LA, McAlister MB, Ogden KL, Larkin MJ, O'Hanlon JF 2002. Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1548–1555.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–1874.

- Kwee L, Lucito R, Aufiero B, Schneider RJ 1992. Alternate translation initiation on hepatitis B virus X mRNA produces multiple polypeptides that differentially transactivate class II and III promoters. *J. Virol.* 66: 4382–4389.
- Ladoukakis E, Kolisis FN, Chatziioannou AA 2014. Integrative workflows for metagenomic analysis. *Front. Cell Dev. Biol.* 2: 70.
- Laguno M, Larrousse M, Luis Blanco J, Leon A, Milinkovic A, Martínez-Rebozler M, Loncá M, Martinez E, Sanchez-Tapias JM, Lazzari E de, Maria Gatell J, Costa J, Mallolas J 2008. Prevalence and Clinical Relevance of Occult Hepatitis B in the Fibrosis Progression and Antiviral Response to INF Therapy in HIV–HCV-Coinfected Patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24: 547–553.
- Lamontagne RJ, Bagga S, Bouchard MJ 2016. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Res.* 2: 163.
- Laurence M, Hatzis C, Brash DE 2014. Common Contaminants in Next-Generation Sequencing That Hinder Discovery of Low-Abundance Microbes (T Gilbert, Ed.). *PLoS One* 9: e97876.
- Law J, Jovel J, Patterson J, Ford G, O’keefe S, Wang W, Meng B, Song D, Zhang Y, Tian Z, Wasilenko ST, Rahbari M, Mitchell T, Jordan T, Carpenter E, Mason AL, Wong GK-S 2013. Identification of Hepatotropic Viruses from Plasma Using Deep Sequencing: A Next Generation Diagnostic Tool (N Shomron, Ed.). *PLoS One* 8: e60595.
- Lee SS, Jeong S-H, Byoun Y-S, Chung SM, Seong MH, Sohn HR, Min B, Jang ES, Kim J-W, Park GJ, Lee YJ, Lee KH, Ahn S 2013. Clinical features and outcome of cryptogenic hepatocellular carcinoma compared to those of viral and alcoholic hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 13: 335.
- Leppik L, Gunst K, Lehtinen M, Dillner J, Streker K, Villiers E-M de 2007. In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses. *J. Virol.* 81: 9346–9356.
- Lesser MP 2008. Effects of ultraviolet radiation on productivity and nitrogen fixation in the Cyanobacterium, *Anabaena* sp. (Newton’s strain). *Hydrobiologia* 598: 1–9.
- Levene C, Blumberg BS 1969. Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. *Nature* 221: 195–196.
- Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M 2009. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 51: 581–592.
- Li L, Deng X, Linsuwanon P, Bangsberg D, Bwana MB, Hunt P, Martin JN, Deeks

- SG, Delwart E 2013. AIDS Alters the Commensal Plasma Virome. *J. Virol.* 87: 10912–10915.
- Li L, Deng X, Mee ET, Collot-Teixeira S, Anderson R, Schepelmann S, Minor PD, Delwart E 2015. Comparing viral metagenomics methods using a highly multiplexed human viral pathogens reagent. *J. Virol. Methods* 213: 139–146.
- Li W, Han Y, Yuan X, Wang G, Wang Z, Pan Q, Gao Y, Qu Y 2016. Metagenomic analysis reveals the influences of milk containing antibiotics on the rumen microbes of calves. *Arch. Microbiol.*: 1–11.
- Liang TJ, Blum HE, Wands JR 1990. Characterization and biological properties of a hepatitis B virus isolated from a patient without hepatitis B virus serologic markers. *Hepatology* 12: 204–212.
- Lien JM, Petcu DJ, Aldrich CE, Mason WS 1987. Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J. Virol.* 61: 3832–3840.
- Lin H-H, Kao J-H, Lee P-I, Chen D-S 2002. Early acquisition of TT virus in infants: Possible minor role of maternal transmission. *J. Med. Virol.* 66: 285–290.
- Liu M, Jiang L, Guan X-Y 2014. The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein Cell* 5: 673–691.
- Liu Y, Wu F 2010. Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment. *Environ. Health Perspect.* 118: 818–824.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, AlMazroa MA, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Abdulhak A Bin, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, Vaccaro KC de, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, Leo D De, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Jarlais DC Des, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman

- S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J-P, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Memish ZA, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nasser K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, León FR De, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh P-H, Yip P, Zabetian A, Zheng Z-J, Lopez AD, Murray CJ 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2095–2128.
- Luo K, He H, Liu Z, Liu D, Xiao H, Jiang X, Liang W, Zhang L 2002. Novel variants related to TT virus distributed widely in China. *J. Med. Virol.* 67: 118–126.
- Luo K, Zhang L 2001. Enteric transmission of transfusion-transmitted virus. *Chin. Med. J. (Engl)*. 114: 1201–1204.
- Lusk RW 2014. Diverse and Widespread Contamination Evident in the Unmapped Depths of High Throughput Sequencing Data (T Gilbert, Ed.). *PLoS One* 9: e110808.
- Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Fornai C, Vatteroni M, Pistello M, Presciuttini S, Bendinelli M 2005. Relationships between Total Plasma Load of Torquetenovirus (TTV) and TTV Genogroups Carried. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4807–4810.
- Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Pietrobelli A, Boner A, Pistello M, Bendinelli M 2003. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J. Virol.* 77: 2418–2425.

- Magnius LO, Norder H 1995. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 38: 24–34.
- Manzin A, Mallus F, Macera L, Maggi F, Blois S 2015. Global impact of Torque teno virus infection in wild and domesticated animals. *J. Infect. Dev. Ctries.* 9: 562–570.
- Mariscal LF, López-Alcorocho JM, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, Lucas S de, Bartolomé J, Carreño V 2002. TT Virus Replicates in Stimulated but Not in Nonstimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Virology* 301: 121–129.
- Mariscal LF, Rodriguez IE, Bartolome J, Castillo I, Ortiz MN, Navacerrada C, Pardo M, Perez MA, Graus J, Carreno V 2004. Hepatitis B infection of the liver in chronic hepatitis C without detectable hepatitis B virus DNA in serum. *J. Med. Virol.* 73: 177–186.
- Marquardt JU, Andersen JB, Thorgeirsson SS 2015. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15: 653–667.
- Massaú A, Martins C, Nachtigal GC, Araújo AB, Rossetti ML, Niel C, Silva CMD da 2012. The high prevalence of Torque teno virus DNA in blood donors and haemodialysis patients in southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107: 684–686.
- Mathonnet G, Lachance S, Alaoui-Jamali M, Drobetsky EA 2004. Expression of hepatitis B virus X oncoprotein inhibits transcription-coupled nucleotide excision repair in human cells. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 554: 305–318.
- Matsuoka S, Nirei K, Tamura A, Nakamura H, Matsumura H, Oshiro S, Arakawa Y, Yamagami H, Tanaka N, Moriyama M 2009. Influence of Occult Hepatitis B Virus Coinfection on the Incidence of Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. *Intervirology* 51: 352–361.
- Max Planck Institute for Informatics 2016. Geno2pheno [hbv].
- McDonald S a, Hutchinson SJ, Bird SM, Robertson C, Mills PR, Dillon JF, Goldberg DJ 2008a. A record-linkage study of the development of hepatocellular carcinoma in persons with hepatitis C infection in Scotland. *Br. J. Cancer* 99: 805–810.
- McDonald JE, Lockhart RJ, Cox MJ, Allison HE, McCarthy AJ 2008b. Detection of novel Fibrobacter populations in landfill sites and determination of their relative

- abundance via quantitative PCR. *Environ. Microbiol.* 10: 1310–1319.
- McDonald JE, Menezes AB de, Allison HE, McCarthy AJ 2009. Molecular Biological Detection and Quantification of Novel Fibrobacter Populations in Freshwater Lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5148–5152.
- Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira C a, Coelho H, Franz H, Saraiva J, Virgolino H a, Motta-Castro A, Melo MM, Martins RM, Gomes S a 2007. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol.* 7: 103.
- Mendonça JS, Vignani AG 2006. História natural da hepatite B aguda e crônica. *A Rev. Bras. Doenças Infecç.* 10: 15–18.
- Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari F V 1994. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J. Clin. Invest.* 93: 230–239.
- Milich D 2003. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 38: 1075–1086.
- Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A 1990. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 6599–6603.
- Miller RR, Montoya V, Gardy JL, Patrick DM, Tang P 2013. Metagenomics for pathogen detection in public health. *Genome Med.* 5: 81.
- Miller RR, Uyaguari-Diaz M, McCabe MN, Montoya V, Gardy JL, Parker S, Steiner T, Hsiao W, Nesbitt MJ, Tang P, Patrick DM 2016. Metagenomic Investigation of Plasma in Individuals with ME/CFS Highlights the Importance of Technical Controls to Elucidate Contamination and Batch Effects (WM Switzer, Ed.). *PLoS One* 11: e0165691.
- Ministéria da Saúde 2010. *Estudo da prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil.*
- Mittal S, El-Serag HB 2013. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *J. Clin. Gastroenterol.* 47: S2–S6.
- Miyakawa Y, Kidd-Ljunggren K, Kidd AH 2002. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J. Gen. Virol.* 83: 1267–1280.
- Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan MA, Murakami J, Kamahora T, Shiraki K, Hino S 1999. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first

- human circovirus. *J. Virol.* 73: 3582–3586.
- Moore PS, Chang Y 2010. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer* 10: 878–889.
- Moresco MN dos S, Virgolino H de A, Morais MPE de, Motta-Passos I da, Gomes-Gouvêa MS, Assis LMS de, Aguiar KR de L, Lombardi SCF, Malheiro A, Cavalheiro N de P, Levi JE, Torres KL 2014. Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. *Vox Sang.* 107: 19–25.
- Moriyama M, Matsumura H, Shimizu T, Shioda A, Kaneko M, Miyazawa K, Miyata H, Tanaka N, Uchida T, Arakawa Y 2001. Histopathologic impact of TT virus infection on the liver of type C chronic hepatitis and liver cirrhosis in Japan. *J. Med. Virol.* 64: 74–81.
- Mrani S, Chemin I, Menouar K, Guillaud O, Pradat P, Borghi G, Trabaud MA, Chevallier P, Chevallier M, Zoulim F, Trépo C 2007. Occult HBV infection may represent a major risk factor of non-response to antiviral therapy of chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 79: 1075–1081.
- Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff a S, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, Dexai SM 1999. Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 3177–3182.
- Nabuco LC, Mello FCDA, Gomes SDA, Perez RM, Soares JAS, Coelho HSM, Nogueira CAV 2012. Hepatitis B virus genotypes in Southeast Brazil and its relationship with histological features. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107: 758–789.
- Naccache SN, Greninger AL, Lee D, Coffey LL, Phan T, Rein-Weston A, Aronsohn A, Hackett J, Delwart EL, Chiu CY 2013. The Perils of Pathogen Discovery: Origin of a Novel Parvovirus-Like Hybrid Genome Traced to Nucleic Acid Extraction Spin Columns. *J. Virol.* 87: 11966–11977.
- Nakao K, Ichikawa T 2013. Recent topics on α -fetoprotein. *Hepatol. Res.* 43: 820–825.
- Nault J-C, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, Mallet M, Couchy G, Letouzé E, Pilati C, Verret B, Blanc J-F, Balabaud C, Calderaro J, Laurent A, Letexier M, Bioulac-Sage P, Calvo F, Zucman-Rossi J 2015. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.* 47: 1–15.
- Newsome T, Li B-J, Zou N, Lo S-C 2004. Presence of Bacterial Phage-Like DNA

- Sequences in Commercial Taq DNA Polymerase Reagents. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2264–2267.
- NIH 2007. The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet. In: *NIH*,
- Nikkari S, McLaughlin IJ, Bi W, Dodge DE, Relman DA 2001. Does Blood of Healthy Subjects Contain Bacterial Ribosomal DNA? *J. Clin. Microbiol.* 39: 1956–1959.
- Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, Shimosegawa T, Okamoto H 2008. Development of PCR Assays with Nested Primers Specific for Differential Detection of Three Human Anelloviruses and Early Acquisition of Dual or Triple Infection during Infancy. *J. Clin. Microbiol.* 46: 507–514.
- Nishiguchi S, Enomoto M, Shiomi S, Tanaka M, Fukuda K, Tamori A, Tanaka T, Takeda T, Seki S, Yano Y, Otani S, Kuroki T 2000. TT virus infection in patients with chronic liver disease of unknown etiology. *J. Med. Virol.* 62: 392–398.
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M 1997. A Novel DNA Virus (TTV) Associated with Elevated Transaminase Levels in Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241: 92–97.
- Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, Aikawa T, Sugai Y, Konishi K, Akahane Y, Ukita M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M 1999. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J. Virology* 73: 9604–9608.
- Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Kishimoto J, Okamoto H, Peng Y, Wang Y 2001. Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaia and comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates. *J. Gen. Virol.* 82: 2041–2050.
- Norder H, Couroucé A-M, Magnius LO 1992. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J. Gen. Virol.* 73: 3141–3145.
- Norder H, Couroucé A-M, Magnius LO 1994. Complete Genomes, Phylogenetic Relatedness, and Structural Proteins of Six Strains of the Hepatitis B Virus, Four of Which Represent Two New Genotypes. *Virology* 198: 489–503.
- Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, Kambal A, Monaco CL, Zhao G, Fleshner P, Stappenbeck TS, McGovern DPB, Keshavarzian A, Mutlu EA, Sauk J, Gevers D, Xavier RJ, Wang D, Parkes M,

- Virgin HW 2015. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160: 447–460.
- Nüsslein K, Tiedje JM 1999. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3622–3626.
- Okamoto H 1998. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol. Res.* 10: 1–16.
- Okamoto H 2009. TT Viruses in Animals. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, pp. 35–52.
- Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M 1998. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J. Med. Virol.* 56: 128–132.
- Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M 1987. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J. Virol.* 61: 3030–3034.
- Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Asabe S, Tsuda F, Yoshikawa A 2001. Heterogeneous Distribution of TT Virus of Distinct Genotypes in Multiple Tissues from Infected Humans. *Virology* 288: 358–368.
- Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, Takahashi M, Fukuda M, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M 1999a. The Entire Nucleotide Sequence of a TT Virus Isolate from the United States (TUS01): Comparison with Reported Isolates and Phylogenetic Analysis. *Virology* 259: 437–448.
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M 1999b. Marked Genomic Heterogeneity and Frequent Mixed Infection of TT Virus Demonstrated by PCR with Primers from Coding and Noncoding Regions. *Virology* 259: 428–436.
- Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST 2012. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 30: 2212–2219.
- Papatheodoridis G V, Dimou E, Papadimitropoulos V 2002. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance. *Am. J. Gastroenterol.* 97: 1618–1628.

- Park ST, Kim J 2016. Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *Int. Neurobiol. J.* 20: S76-83.
- Park IY, Sohn BH, Yu E, Suh DJ, Chung YH, Lee JH, Surzycki SJ, Lee YI 2007. Aberrant Epigenetic Modifications in Hepatocarcinogenesis Induced by Hepatitis B Virus X Protein. *Gastroenterology* 132: 1476–1494.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P 2005. Global Cancer Statistics, 2002. *CA. Cancer J. Clin.* 55: 74–108.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J 1999. Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 49: 33–64.
- Pasarica M, Dhurandhar N V. 2007. Infectobesity: Obesity of Infectious Origin. In: *Adv. Food Nutr. Res.*, pp. 61–102.
- Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H 2002. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch. Virol.* 147: 21–41.
- Penna a, Artini M, Cavalli a, Levrero M, Bertoletti a, Pilli M, Chisari F V, Reherrmann B, Prete G Del, Fiaccadori F, Ferrari C 1996. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J. Clin. Invest.* 98: 1185–1194.
- Perlejewski K, Popiel M, Laskus T, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Lipowski D, Pollak A, Lechowicz U, Caraballo Cortés K, Stępień A, Radkowski M, Bukowska-Ośko I 2015. Next-generation sequencing (NGS) in the identification of encephalitis-causing viruses: Unexpected detection of human herpesvirus 1 while searching for RNA pathogens. *J. Virol. Methods* 226: 1–6.
- Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J. Hepatol.* 45: 529–538.
- Pinho-Nascimento CA, Leite JPG, Niel C, Diniz-Mendes L 2011. Torque teno virus in fecal samples of patients with gastroenteritis: Prevalence, genogroups distribution, and viral load. *J. Med. Virol.* 83: 1107–1111.
- Pollack JR, Ganem D 1993. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J. Virol.* 67: 3254–3263.
- Pollicino T 2014. Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 20: 5951.

- Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C, Squadrito G, Levrero M, Raimondo G 2007. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 45: 277–285.
- Pollicino T, Saitta C, Raimondo G 2011. Hepatocellular carcinoma: The point of view of the hepatitis B virus. *Carcinogenesis* 32: 1122–1132.
- Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Cacciola I, Raffa G, Craxì A, Farinati F, Missale G, Smedile A, Tiribelli C, Villa E, Raimondo G 2004. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology* 126: 102–110.
- Poovorawan Y, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Kaew-in N, Hirsch P, Tangkitvanich P 1998. Hepatitis TT virus infection in high-risk groups. *Infection* 26: 355–358.
- Pourkarim MR 2014. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: Revised classification hurdles and updated resolutions. *World J. Gastroenterol.* 20: 7152.
- Pritchard DI, Smith DB, MacDonald DM, McClure MO, Riley EM, Mokili J, Hamid S, Saeed AA, Prescott LE, Davidson F, Simmonds P, Arnot DE, Greenwood BM 1999. Sequence diversity of TT virus in geographically dispersed human populations. *J. Gen. Virol.* 80: 1751–1758.
- Raimondo G, Allain J-P, Brunetto MR, Buendia M-A, Chen D-S, Colombo M, Craxì A, Donato F, Ferrari C, Gaeta GB, Gerlich WH, Levrero M, Locarnini S, Michalak T, Mondelli MU, Pawlotsky J-M, Pollicino T, Prati D, Puoti M, Samuel D, Shouval D, Smedile A, Squadrito G, Trépo C, Villa E, Will H, Zanetti AR, Zoulim F 2008. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 49: 652–657.
- Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, Pollicino T 2013. Occult HBV infection. *Semin. Immunopathol.* 35: 39–52.
- Raimondo G, Cacciamo G, Saitta C 2005a. Hepatitis B virus and hepatitis C virus co-infection: additive players in chronic liver disease? *Ann. Hepatol.* 4: 100–106.
- Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G 2007. Occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 46: 160–170.
- Raimondo G, Pollicino T, Squadrito G 2005b. What is the clinical impact of occult hepatitis B virus infection? *Lancet* 365: 638–640.

- Rand KH, Houck H 1990. Taq polymerase contains bacterial DNA of unknown origin. *Mol. Cell. Probes* 4: 445–450.
- Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari F V 1996. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat. Med.* 2: 1104–1108.
- Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J 2004. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annu. Rev. Genet.* 38: 525–552.
- Rizzetto M 1998. Viral hepatitis in the third millennium. *Res. virology* 149: 251–256.
- Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 18: 997–1003.
- Saback FL, Gomes SA, Paula VS de, Silva RRS da, Lewis-Ximenez LL, Niel C 1999. Age-specific prevalence and transmission of TT virus. *J. Med. Virol.* 59: 318–322.
- Sachsenröder J, Twardziok S, Hammerl JA, Janczyk P, Wrede P, Hertwig S, Johne R 2012. Simultaneous Identification of DNA and RNA Viruses Present in Pig Faeces Using Process-Controlled Deep Sequencing (H Attoui, Ed.). *PLoS One* 7: e34631.
- Sagnelli E, Imperato M, Coppola N, Pisapia R, Sagnelli C, Messina V, Piai G, Stanzione M, Bruno M, Moggio G, Caprio N, Pasquale G, Vecchio Blanco C Del 2008. Diagnosis and clinical impact of occult hepatitis B infection in patients with biopsy proven chronic hepatitis C: a multicenter study. *J Med Virol* 80: 1547–1553.
- Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, Turner P, Parkhill J, Loman NJ, Walker AW 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 12: 87.
- Saul DJ, Aislabie JM, Brown CE, Harris L, Foght JM 2005. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 141–155.
- Schieving JH, Vries M de, Vugt JMG van, Weemaes C, Deuren M van, Nicolai J, Wevers RA, Willemsen MA 2014. Alpha-fetoprotein, a fascinating protein and biomarker in neurology. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 18: 243–248.

- Schloss PD, Handelsman J 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 303–310.
- Schloss PD, Handelsman J 2005. No Title. *Genome Biol.* 6: 229.
- Schulze K, Nault J-C, Villanueva A 2016. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J. Hepatol.* 65: 1031–1042.
- Seeger C, Ganem D, Varmus HE 1986. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232: 477–484.
- Seeger C, Mason WS 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 51–68.
- Seeger C, Mason WS 2015. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* 479–480: 672–686.
- Seeger C, Zoulim F, Mason WS 2014. Hepadnaviruses. In: DM K, PM H (Eds.), *Field's Virol.*, Lippicott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, pp. 3376–3436.
- Sender R, Fuchs S, Milo R 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* 14: e1002533.
- Shafritz DA, Lieberman HM 1984. The Molecular Biology of Hepatitis B Virus. *Annu. Rev. Med.* 35: 219–232.
- Shi Y, Wu YH, Wu W, Zhang WJ, Yang J, Chen Z 2012. Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Liver Int.* 32: 231–240.
- Shi J, Zhu L, Liu S, Xie W 2005. A meta-analysis of case–control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China. *Br. J. Cancer* 92: 607–612.
- Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, Okamoto H, Shibayama T 2001. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS* 15: 563–570.
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman a P 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349: 431–434.
- Silva W, Braga M, Brasil LM, Auxiliadora R, Souza B De, Da M, Castilho C, José E, Fonseca C Da 2001. Ocorrência da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e delta (VHD) em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas. *Med. Trop.* 34: 349–355.
- Silva C Da, Gonçalves NSL, Pereira JSF, Escanhoela CAF, Pavan MHP, Gonçalves

- FL 2004. The influence of occult infection with hepatitis B virus on liver histology and response to interferon treatment in chronic hepatitis C patients. *Brazilian J. Infect. Dis.* 8: 431–439.
- Simmonds P, Prescott LE, Logue C, Davidson F, Thomas AE, Ludlam CA 1999. TT Virus—Part of the Normal Human Flora? *J. Infect. Dis.* 180: 1748–1749.
- Singal AG, El-Serag HB 2015. Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 2140–2151.
- Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, Silva LC Da, Carrilho FJ 2004. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2455–2460.
- Sjogren MH 1996. Serologic diagnosis of viral hepatitis. *Med. Clin. North Am.* 80: 929–956.
- Spandole S, Cimponeriu D, Berca LM, Mihăescu G 2015. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Arch. Virol.* 160: 893–908.
- Squadrito G, Cacciola I, Alibrandi A, Pollicino T, Raimondo G 2013. Impact of occult hepatitis B virus infection on the outcome of chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 59: 696–700.
- Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S 2004. Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 5: 118–125.
- Steward GF, Rappé MS 2007. What's the “meta” with metagenomics? *ISME J.* 1: 100–102.
- Strand RT, Franque-ranque M, Bergström S, Weiland O 2003. Infectious Aetiology of Jaundice Among Pregnant Women in Angola. *Scand. J. Infect. Dis.* 35: 401–403.
- Su Q, Schröder CH, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P 1998. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 27: 1109–1120.
- Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Yokoyama T 2001. Highly diverse TTV population in infants and their mothers. *Virus Res.* 73: 183–188.
- Sun C-A, Wu D-M, Lin C-C, Lu S-N, You S-L, Wang L-Y, Wu M-H, Chen C-J 2003. Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan. *Am. J. Epidemiol.* 157: 674–682.

- Takács M, Balog K, Tóth G, Balogh Z, Szomor KN, Brojnás J, Rusvai E, Minárovits J, Berencsi G 2003. TT virus in Hungary: Sequence heterogeneity and mixed infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35: 153–157.
- Takada S, Kaneniwa N, Tsuchida N, Koike K 1997. Cytoplasmic retention of the p53 tumor suppressor gene product is observed in the hepatitis B virus X gene-transfected cells. *Oncogene* 15: 1895–1901.
- Takahashi K 1998. Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatol. Res.* 12: 233–239.
- Takeda H, Takai A, Inuzuka T, Marusawa H 2016. Genetic basis of hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma: linkage between infection, inflammation, and tumorigenesis. *J. Gastroenterol.*: 1–13.
- Takemoto AY, Okubo P, Saito PK, Yamakawa RH, Watanabe MAE, Veríssimo da Silva Junior W, Borelli SD, Bedendo J 2015. Torque teno virus among dialysis and renal-transplant patients. *Brazilian J. Microbiol.* 46: 307–311.
- Tanaka M, Nishiguchi S, Tanaka T, Enomoto M, Takeda T, Shiomi S, Kuroki T, Otani S 1999. Prevalence of TT virus in patients with fulminant hepatic failure in Japan. *J. Gastroenterol.* 34: 589–593.
- Tanaka H, Okamoto H, Luengrojanakul P, Chainuvati T, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M 1998. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. *J. Med. Virol.* 56: 234–238.
- Tanaka Y, Primi D, Wang RYH, Umemura T, Yeo AET, Mizokami M, Alter HJ, Shih JW 2001. Genomic and Molecular Evolutionary Analysis of a Newly Identified Infectious Agent (SEN Virus) and Its Relationship to the TT Virus Family. *J. Infect. Dis.* 183: 359–367.
- Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S 2006. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci.* 97: 977–983.
- Tawara A, Yoshikawa A, Fukai K, Takahashi M, Nishizawa T, Muramatsu U, Naito Y, Okamoto H 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J. Gen. Virol.* 83: 1291–1297.
- Thom K, Petrik J 2007. Progression towards AIDS leads to increased torque teno virus and torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J.*

Med. Virol. 79: 1–7.

- Thurber R V, Haynes M, Breitbart M, Wegley L, Rohwer F 2009. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nat. Protoc.* 4: 470–483.
- Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, Okamoto H 2002. High TT virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J. Med. Virol.* 67: 501–509.
- Torbenson M, Thomas DL 2002. Occult hepatitis B. *Lancet Infect. Dis.* 2: 479–486.
- Touinssi M, Gallian P, Biagini P, Attoui H, Vialettes B, Berland Y, Tamalet C, Dhiver C, Ravaux I, Micco P De, Lamballerie X De 2001. TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. *J. Clin. Virol.* 21: 135–141.
- Trépo C, Chan HLY, Lok A 2014. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 384: 2053–2063.
- Trujillo ME, Riesco R, Benito P, Carro L 2015. Endophytic Actinobacteria and the Interaction of Micromonospora and Nitrogen Fixing Plants. *Front. Microbiol.* 6: 1–15.
- Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J 1986. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47: 451–460.
- Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi JD, Kappel C a, Ngo L, Feitelson M a, Jay G 1995. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat. Genet.* 9: 41–47.
- Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y, Mayumi M 1999. Excretion into Bile of a Novel Unenveloped DNA Virus (TT Virus) Associated with Acute and Chronic Non-A–G Hepatitis. *J. Infect. Dis.* 179: 1245–1248.
- Vasilyev E V, Trofimov DY, Tonevitsky AG, Ilinsky V V, Korostin DO, Rebrikov D V 2009. Torque Teno Virus (TTV) distribution in healthy Russian population. *Virol. J.* 6: 134.
- Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M 2009. Methylation regulates hepatitis B viral protein expression. *J. Infect. Dis.* 199: 1286–1291.
- Wagner G, Jardim R, Tschoeke DA, Loureiro DR, Ocaña KA, Ribeiro AC, Emmel VE, Probst CM, Pitaluga AN, Grisard EC, Cavalcanti MC, Campos ML, Mattoso M, Dávila AM 2014. STINGRAY: system for integrated genomic resources and analysis. *BMC Res. Notes* 7: 132.

- Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson M a, Gu JR, Harris CC 1994. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 2230–2234.
- Watanabe M, Miranda H, Oliveira K de, Oliveira C de, Tristão F, Duarte L, Silva L, Corte A, Guarnier F, Kaminami M 2005. Aspectos patológicos, imunológicos e propriedades moleculares do TT vírus Pathological and immunological aspects and molecular properties of TT virus. *J Bras Patol Med Lab* 41: 223–228.
- Weber B 2006. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. *J. Med. Virol.* 78: S59–S65.
- Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB 1997. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin. Infect. Dis.* 24: 584–602.
- Wen Y, Golubkov VS, Strongin AY, Jiang W, Reed JC 2008. Interaction of hepatitis B viral oncoprotein with cellular target HBXIP dysregulates centrosome dynamics and mitotic spindle formation. *J. Biol. Chem.* 283: 2793–2803.
- White DL, Tavakoli-Tabasi S, Kuzniarek J, Pascua R, Ramsey DJ, El-Serag HB 2012. Higher serum testosterone is associated with increased risk of advanced hepatitis C-related liver disease in males. *Hepatology* 55: 759–768.
- WHO 2016. WHO | Hepatitis B. *WHO*.
- Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews A, Allen JS 1991. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science (80-)*. 254: 1001–1003.
- Worobey M 2000. Extensive Homologous Recombination among Widely Divergent TT Viruses. *J. Virol.* 74: 7666–7670.
- Xia H, Hu C, Zhang D, Tang S, Zhang Z, Kou Z, Fan Z, Bente D, Zeng C, Li T 2015. Metagenomic Profile of the Viral Communities in Rhipicephalus spp. Ticks from Yunnan, China (BS Schneider, Ed.). *PLoS One* 10: e0121609.
- Xu B, Liu L, Huang X, Ma H, Zhang Y, Du Y, Wang P, Tang X, Wang H, Kang K, Zhang S, Zhao G, Wu W, Yang Y, Chen H, Mu F, Chen W 2011. Metagenomic Analysis of Fever, Thrombocytopenia and Leukopenia Syndrome (FTLS) in Henan Province, China: Discovery of a New Bunyavirus (G Palacios, Ed.). *PLoS Pathog.* 7: e1002369.

- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1: e00049.
- Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K 1998. Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology* 27: 1377–1382.
- Yozwiak NL, Skewes-Cox P, Stenglein MD, Balmaseda A, Harris E, DeRisi JL 2012. Virus Identification in Unknown Tropical Febrile Illness Cases Using Deep Sequencing (R Rico-Hesse, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1485.
- Zhang Y-Y, Hansson BG, Kuo LS, Widell A, Nordenfelt E 1993. Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg. *Hepatology* 17: 538–544.
- Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, Kong L, Wang W, Zeng Y, Ye L, Wu Z, She Y, Zhou X 2007. Torque Teno Virus (SANBAN Isolate) ORF2 Protein Suppresses NF- κ B Pathways via Interaction with I κ B Kinases. *J. Virol.* 81: 11917–11924.
- Zhong S, Yeo W, Lin CK, Lin X-R, Tang MW, Johnson PJ 2001. Quantitative and genotypic analysis of TT virus infection in Chinese blood donors. *Transfusion* 41: 1001–1007.
- Zoulim F 2005. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J. Hepatol.* 42: 302–308.

9) APÊNDICES

APÊNDICE A - Parecer do comitê de ética



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

RESEARCH ARTICLE

RASSF1A and DOK1 Promoter Methylation Levels in Hepatocellular Carcinoma, Cirrhotic and Non-Cirrhotic Liver, and Correlation with Liver Cancer in Brazilian Patients

Oscar C. Araújo¹, Agatha S. Rosa¹, Arlete Fernandes², Christian Niel¹, Cristiane A. Villela-Nogueira³, Vera Pannain², Natalia M. Araujo^{1*}

1 Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Department of Pathology, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Hepatology Division, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* nmaraujo@ioc.fiocruz.br



 OPEN ACCESS

Citation: Araújo OC, Rosa AS, Fernandes A, Niel C, Villela-Nogueira CA, Pannain V, et al. (2016) RASSF1A and DOK1 Promoter Methylation Levels in Hepatocellular Carcinoma, Cirrhotic and Non-Cirrhotic Liver, and Correlation with Liver Cancer in Brazilian Patients. PLoS ONE 11(4): e0153796. doi:10.1371/journal.pone.0153796

Editor: Isabelle A Chemin, CRCL-INSERM, FRANCE

Received: February 11, 2016

Accepted: April 4, 2016

Published: April 14, 2016

Copyright: © 2016 Araújo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (<http://cnpq.br>), grant number 444071/2014-8, to NMA, and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (<http://www.faperj.br>), grant number E-26/111.528/2013, to NMA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second most common cause of cancer mortality worldwide. Most cases of HCC are associated with cirrhosis related to chronic hepatitis B virus or hepatitis C virus infections. Hypermethylation of promoter regions is the main epigenetic mechanism of gene silencing and has been involved in HCC development. The aim of this study was to determine whether aberrant methylation of *RASSF1A* and *DOK1* gene promoters is associated with the progression of liver disease in Brazilian patients. Methylation levels were measured by pyrosequencing in 41 (20 HCC, 9 cirrhotic, and 12 non-cirrhotic) liver tissue samples. Mean rates of methylation in *RASSF1A* and *DOK1* were 16.2% and 12.0% in non-cirrhotic, 26.1% and 19.6% in cirrhotic, and 59.1% and 56.0% in HCC tissues, respectively, showing a gradual increase according to the progression of the disease, with significantly higher levels in tumor tissues. In addition, hypermethylation of *RASSF1A* and *DOK1* was found in the vast majority (88%) of the HCC cases. Interestingly, *DOK1* methylation levels in HCC samples were significantly higher in the group of younger (<40 years) patients, and higher in moderately differentiated than in poorly differentiated tumors ($p < 0.05$). Our results reinforce the hypothesis that hypermethylation of *RASSF1A* and *DOK1* contributes to hepatocarcinogenesis and is associated to clinicopathological characteristics. *RASSF1A* and *DOK1* promoter hypermethylation may be a valuable biomarker for early diagnosis of HCC and a potential molecular target for epigenetic-based therapy.

Introduction

Liver cancer is the second leading cause of cancer-related mortality, with an estimated 700,000 deaths each year worldwide [1]. Hepatocellular carcinoma (HCC) is by far the most common