

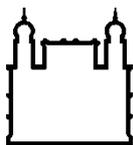
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE E EM MACACA
FASCICULARIS: DETECÇÃO ANTIGÊNICA DO HEV NA MEDULA
ÓSSEA NO CURSO AGUDO E CRÔNICO EXPERIMENTAIS, E NA
INFECÇÃO NATURAL

FERNANDA DE OLIVEIRA BOTTINO

Rio de Janeiro
Março de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

FERNANDA DE OLIVEIRA BOTTINO

Infecção pelo vírus da hepatite E em *Macaca fascicularis*: detecção antigênica do HEV na medula óssea no curso agudo e crônico experimentais, e na infecção natural

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

RIO DE JANEIRO

Março de 2018

Bottino, Fernanda de Oliveira .

Infecção pelo vírus da hepatite E em *Macaca fascicularis*: detecção antigênica do HEV na medula óssea no curso agudo e crônico experimentais, e na infecção natural / Fernanda de Oliveira Bottino. - Rio de Janeiro, 2018.

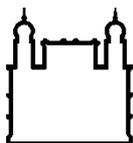
84 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientador: Marcelo Alves Pinto.

Bibliografia: f. 69-80

1. Hepatite E. 2. Medula óssea. 3. Macacos *cynomolgus*. 4. Infecção experimental. 5. Infecção natural. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

FERNANDA DE OLIVEIRA BOTTINO

Infecção pelo vírus da hepatite E em *Macaca fascicularis*: detecção antigênica do HEV na medula óssea no curso agudo e crônico experimentais, e na infecção natural

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Aprovada em: 14/03/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Renato Sergio Marchevsky - Presidente (Bio-Manguinhos/Fiocruz)

Prof^a. Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto (IOC/Fiocruz)

Prof^a. Dr^a. Claudia Esther Alicia Rocio Hassan (INCA)

Prof. Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso (IOC/Fiocruz)

Prof^a. Dr^a. Tatiana Xavier de Castro (UFF)

Rio de Janeiro, 14 de março de 2018

Dedico este trabalho aos meus avós
maternos,
Maria Luiza e Onofre Carlos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Oswaldo Cruz e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária por todo o suporte e contribuição para a minha formação acadêmica e científica;

Ao Dr. Marcelo Alves Pinto pela a orientação, suporte e ensinamentos ao longo destes dois anos. Obrigada por me proporcionar a oportunidade de trabalhar em um projeto no qual eu me identifiquei tanto e pude crescer profissionalmente;

Ao Dr. Marcelo Pelajo Machado, por toda a colaboração e empenho dedicados a mim e ao projeto. Obrigada por toda a paciência e por me receber em seu laboratório;

À Dra. Jaqueline Mendes, que mesmo com todas as atribuições da chefia do laboratório, se disponibilizou para revisar a minha dissertação e esclarecer todas as minhas dúvidas;

À Dra Noemi Rovaris Gardinali, minha amiga e mentora. Este trabalho não teria acontecido sem a sua ajuda. Muito obrigada por todo o seu apoio e orientação profissional e pessoal;

Aos membros da comissão examinadora da banca de defesa: Dr. Renato Sergio Marchevsky, Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto, Dra. Claudia Esther Alicia Rocio Hassan, Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso e Dra. Tatiana Xavier de Castro, por aceitarem o meu convite e contribuírem com este trabalho;

À minha mãe e meu pai, Beatriz e Sergio, meus maiores exemplos de vida. A vocês sou eternamente grata pela pessoa que me tornei e por tudo o que conquistei até hoje;

A toda a minha família que sempre esteve presente me apoiando e me incentivando. Em especial, aos meus irmãos, meus cunhados e meu namorado, por todo amor e companheirismo;

Aos meus amigos, Arthur Daniel e Jéssica Vasques, por todo o carinho, paciência e suporte. Vocês fizeram o meu dia-a-dia ser bem mais leve e divertido;

A todo o Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV), em especial à Sarah Beatriz, Anne Louise, Andreza Soriano e Andreza Lemos, por toda a colaboração;

A todo o Laboratório de Patologia (LABPAT), em especial à Juliane Siqueira, Igor Silva, Márcia Terra, Leonardo Oliveira, Nathália Portilho, Thalita Paschoal, Yuli

Maia, Bárbara Dias, Jéssica Ferro e Jackline Ayres, por me receberem tão bem e me incentivarem desde o início;

A toda a equipe do ICTB, em especial a Lynn Cysne e ao Fábio Silva, pelo auxílio com as coletas das amostras;

Às plataformas de Sequenciamento e de Microscopia Confocal da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo auxílio financeiro;

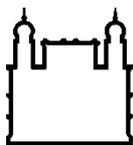
A todos os funcionários e amigos do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira (HPP) e da Secretaria Acadêmica do IOC;

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho;

Obrigada.

“Não vai demorar que passemos adiante
uma grande e bela ciência, que faz arte em
defesa da vida”.

Carlos Chagas



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

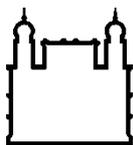
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE E EM *MACACA FASCICULARIS*: DETECÇÃO ANTIGÊNICA DO HEV NA MEDULA ÓSSEA NO CURSO AGUDO E CRÔNICO EXPERIMENTAIS, E NA INFECÇÃO NATURAL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Fernanda de Oliveira Bottino

A hepatite E (HE) crônica, causada pelo genótipo 3 do HEV, têm sido comumente associada à pacientes transplantados e imunossuprimidos. O uso do imunossupressor tacrolimo, nestes pacientes, é um fator de risco independente para a persistência do vírus no organismo. A evolução para a forma crônica da doença também foi associada ao pós-transplante alogênico de medula óssea (MO). Entretanto, pouco se sabe sobre os aspectos da infecção pelo HEV neste órgão. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de células da MO infectadas pelo HEV, no curso agudo e crônico experimentais da HE, e na infecção natural, utilizando como modelo o macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Seis animais foram experimentalmente infectados pelo HEV e divididos em dois grupos iguais: com e sem a utilização do tacrolimo. A partir da análise virológica e histológica hepática, os animais foram caracterizados como portadores de HE aguda (n=4) e crônica (n=2). Biópsias de MO foram coletadas, submetidas às técnicas de histologia e de imunofluorescência indireta e observadas, respectivamente, por microscopia de luz e confocal. Ao todo, quatro dos seis animais (66,6%) foram positivos para a detecção do antígeno do HEV (HEV Ag) em células da MO por imunomarcção. Três deles eram portadores de HE aguda e um de HE crônica. Inclusões virais em células mononucleares, vacuolizações em células de endóstio e ausência de infiltrados inflamatórios foram os principais achados histológicos. Megacariocitose e áreas de ativação e proliferação linfocitária também foram observadas, porém em um único animal. A fim de comparar as infecções experimental e natural, um animal com forte reatividade para IgG anti-HEV foi incluído neste estudo. A infecção natural foi caracterizada pela soroconversão de IgG anti-HEV por ELISA e detecção do HEV RNA no soro e nas fezes por RT-PCR e qRT-PCR. A sequência encontrada apresentou 99% de identidade nucleotídica com cepas brasileiras do HEV. A análise filogenética baseada em um segmento da ORF2 (302 pb) revelou que o isolado pertence ao genótipo 3. Os valores das transaminases hepáticas (ALT e AST) permaneceram dentro da normalidade para a espécie. O HEV Ag também foi detectado em células da MO deste animal por imunomarcção. Nossos achados fortalecem a hipótese da MO como sítio de persistência viral em indivíduos portadores de HE, sob condições experimentais e naturais. Além disso, alterações morfológicas da hematopoese, secundárias a infecção pelo HEV, foram descritas neste estudo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HEPATITIS E INFECTION IN *MACACA FASCICULARIS*: ANTIGENIC DETECTION OF HEV IN THE BONE MARROW IN THE EXPERIMENTAL ACUTE AND CHRONIC COURSE, AND IN NATURAL INFECTION

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Fernanda de Oliveira Bottino

Chronic hepatitis E (HE), caused by HEV genotype 3, has been commonly associated with transplanted and immunosuppressed patients. The use of the immunosuppressor tacrolimus in these patients is an independent risk factor for virus persistence in the body. The evolution to chronic hepatitis has also been associated with post allogeneic bone marrow (BM) transplantation. However, few is known about the aspects of HEV infection in this organ. In this way, the aim of this study was to evaluate the occurrence of HEV-infected bone marrow cells, in the acute and chronic experimental course of HE, and in natural infection, using the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) as an experimental model. Six animals were experimentally infected by HEV and divided into two equal groups: with and without immunosuppressive therapy with tacrolimus. From the virological and histological analysis, the animals were characterized as carriers of acute (n=4) and chronic (n=2) HE. BM biopsies were collected, submitted to histology and indirect immunofluorescence techniques and observed, respectively, by light and confocal microscopy. In all, four of the six animals (66.6%) were positive for HEV antigen (HEV Ag) detection in BM cells by immunostaining. Three of them were carriers of acute HE and one of chronic HE. Viral inclusions in mononuclear cells, vacuolations in endosteal cells, and the absence of inflammatory infiltrates were the main findings. Megakaryocytosis with areas of lymphocyte activation and proliferation were also observed, but in a single animal. In order to compare experimental and natural infections, an animal with strong reactivity for anti-HEV IgG was included in this study. Natural infection was characterized by anti-HEV IgG seroconversion by ELISA and detection of HEV RNA in serum and feces by RT-PCR and qRT-PCR. The sequence showed 99% nucleotide identity with Brazilian HEV strains. Phylogenetic analysis based on a segment of ORF2 (302 bp) revealed that the isolate belongs to genotype 3. The hepatic transaminases (ALT and AST) values remained within the normal range for the species. HEV Ag was also detected in BM cells by immunostaining. Our findings reinforce the hypothesis of the BM as a site of viral persistence in individuals with HE, under experimental and natural conditions. In addition, morphological changes of hematopoiesis, secondary to HEV infection, were described in this study.

ÍNDICE RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Histórico da hepatite E.....	17
1.2. Vírus da hepatite E	18
1.3. Ciclo replicativo.....	20
1.4. Classificação e genótipos	22
1.5. Epidemiologia.....	24
1.6. Transmissão	27
1.7. Hepatite E.....	30
1.8. Diagnóstico.....	32
1.9. Prevenção	33
1.10. Tratamento.....	34
1.11. Hepatite E no pós-transplante de medula óssea.....	35
1.12. Nicho da medula óssea.....	36
1.13. Células-tronco mesenquimais e hematopoéticas	37
1.14. Primatas não humanos como modelo experimental para a hepatite E	39
1.15. Justificativa.....	40
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo Geral.....	42
2.2. Objetivos Específicos	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1. Aspectos éticos.....	43
3.2. Animais com hepatite E aguda e crônica induzidas experimentalmente.....	43
3.3. Animal com hepatite E naturalmente adquirida.....	45
3.4. Coleta das amostras	45
3.5. Análise histológica.....	46
3.6. Imunofluorescência indireta.....	47
3.7. Pesquisa de anticorpos IgG anti-HEV	48
3.8. Análise bioquímica.....	48

3.9. Extração do RNA viral.....	48
3.10. Detecção do RNA viral por RT-PCR e nested RT-PCR.....	48
3.11. Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética.....	49
3.12. Detecção do RNA viral por qRT-PCR.....	50
4. RESULTADOS	51
4.1. Animais com hepatite E aguda e crônica induzidas experimentalmente.....	51
4.1.1. Detecção do antígeno viral por imunofluorescência indireta	51
4.1.2. Achados histológicos da medula óssea	55
4.2. Animal com hepatite E naturalmente adquirida.....	58
4.2.1. Soroconversão de IgG anti-HEV	58
4.2.2. Detecção do genoma viral por RT-PCR e qRT-PCR.....	58
4.2.3. Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética.....	59
4.2.4. Análise das transaminases hepáticas.....	60
4.2.5. Detecção do antígeno viral por imunofluorescência indireta	60
4.2.6. Achados histológicos da medula óssea	61
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	67
7. PERSPECTIVAS	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9. APÊNDICES E/OU ANEXOS	81
9.1. Anexo	81
9.2. Apêndice A.....	82
9.3. Apêndice B.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Modelo esquemático da organização genômica do HEV.....	19
Figura 1.2. Modelo esquemático do ciclo replicativo do HEV	20
Figura 1.3. Figura ilustrativa da relação filogenética entre os diferentes genótipos do HEV e os seus respectivos hospedeiros	23
Figura 1.4. Distribuição geográfica mundial dos quatro principais genótipos do HEV	24
Figura 1.5. Distribuição geográfica mundial do HEV de acordo com os níveis de endemicidade	26
Figura 1.6. Vias de transmissão do HEV	28
Figura 1.7. Curso clínico da infecção pelo HEV em humanos	30
Figura 1.8. Representação esquemática da hematopoese medular a partir da diferenciação de células-tronco.....	38
Figura 4.1. Detecção do antígeno do HEV em células da medula óssea de macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais	52
Figura 4.2. Quantificação de células da medula óssea infectadas pelo HEV de macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais	54
Figura 4.3. Principais achados histológicos da medula óssea de macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais.....	55
Figura 4.4. Demais achados histológicos da medula óssea de macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais.....	56
Figura 4.5 Aspecto fibrilar da medula óssea de macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais.....	57
Figura 4.6. Níveis de anticorpos IgG anti-HEV, entre os anos de 2013 e 2017, do macaco cynomolgus com hepatite E naturalmente adquirida	58
Figura 4.7. Análise filogenética de isolados do HEV de origem humana e suídea baseada em um segmento da ORF2 do genoma viral (302 pb).....	59
Figura 4.8. Detecção do antígeno do HEV em células da medula óssea do macaco cynomolgus com hepatite E naturalmente adquirida	60
Figura 4.9. Aspecto fibrilar da medula óssea do macaco cynomolgus com hepatite E naturalmente adquirida.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Classificação da família <i>Hepeviridae</i>	22
Quadro 3.1. Cronograma de imunossupressão e inoculação do HEV nos macacos cynomolgus ao longo do experimento	44
Quadro 3.2. Identificação, sexo, idade, peso e curso da hepatite E dos macacos cynomolgus experimentalmente infectados avaliados neste estudo	45
Quadro 3.3. Identificação, sexo, idade e peso do macaco cynomolgus naturalmente infectado avaliado neste estudo.....	45
Quadro 3.4. Cronograma de coleta das amostras.....	46
Quadro 4.1. Detecção do antígeno do HEV na medula óssea dos macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais.....	51
Quadro 4.2. Quantificação de células da medula óssea infectadas pelo HEV dos macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais	53
Quadro 4.3. Alterações histológicas e detecção do antígeno do HEV na medula óssea dos macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais	57
Quadro 4.4. Síntese da detecção do marcador sorológico anti-HEV, do HEV RNA no soro e nas fezes e do antígeno do HEV na medula óssea do macaco cynomolgus com hepatite E naturalmente adquirida	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µm	Micrometro
µL	Microlitro
(+)ssRNA	RNA fita simples senso positivo (<i>positive-sense single-stranded RNA</i>)
(-)ssRNA	RNA fita simples senso negativo (<i>negative-sense single-stranded RNA</i>)
AEIs	Animais experimentalmente infectados
AlotCTH	Transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio (<i>Biochemical oxygen demand</i>)
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças (<i>Centers for disease control and prevention</i>)
CM	Corpos multivesiculares
CMV	Citomegalovirus
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTH(s)	Célula(s)-tronco hematopoética(s)
CTM(s)	Célula(s)-tronco mesenquimal(is)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DBA	Anemia Diamond-Blackfan
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DILI	Lesão hepática induzida por drogas (<i>Drug Induced Liver Disease</i>)
DPI	Dias pós-inoculação
EBV	Vírus Epstein-Barr
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ESCRT	Complexos endossomais de distribuição requeridos para transporte
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G-CSF	Fator de crescimento de granulócitos
HAAA	Anemia aplástica associada à hepatite
HAV	Vírus da hepatite A
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HE	Hepatite E
Hel	RNA helicase

HEV	Vírus da hepatite E
HEV-1	Genótipo 1 do HEV
HEV-2	Genótipo 2 do HEV
HEV-3	Genótipo 3 do HEV
HEV-4	Genótipo 4 do HEV
HEV Ag	Antígeno do HEV
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSPGs	Proteoglicanos de heparan sulfato
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IV	Intravenosa
kb	Kilobase
kg	Quilogramas
MeT	Metiltransferase
mg	Miligrama
MO	Medula óssea
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeos
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)
ORF	Fases de leitura aberta (<i>Open reading frame</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCP	Cisteína protease semelhante à papaína
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNH	Primatas não humanos
PP	Probabilidade posterior
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa
RpRd	RNA-polimerase RNA-dependente
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa

RVS	Resposta virológica sustentada
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoéticas
Tsg101	Gene de susceptibilidade a tumor
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFC-GEMM	Unidade formadora de granulócitos, eritrócitos, monócitos, macrófagos e megacariócitos
UFC-Meg	Unidade formadora de megacariócitos
UFC-Mast	Unidade formadora de mastócitos e basófilos
UFC-Eo	Unidade formadora de eosinófilos
UFC-GM	Unidade formadora de granulócitos e monócitos

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico da hepatite E

O primeiro surto de hepatite E ocorreu em Nova Déli, na Índia, no ano de 1955. Milhares de pessoas se sentiram mal após a ingestão de água contaminada, supostamente pelo vírus da hepatite A (HAV). Foi apenas em meados da década de 80 que um estudo retrospectivo revelou tratar-se de hepatites não reativas ao HAV, levantando a suspeita da existência de um vírus da hepatite não-A, não-B (Viswanathan e Sidhu, 1957; Perez-Gracia *et al.*, 2016). Tal agente se assemelhava ao HAV, tanto nas manifestações clínicas, período de incubação e resultados bioquímicos, como na forma de transmissão fecal-oral (Khuroo, 1980).

A descoberta do agente etiológico ocorreu em 1983, a partir da observação de partículas *vírus-like*, por microscopia eletrônica, nas fezes de um voluntário humano experimentalmente infectado. O inóculo foi composto por uma suspensão fecal clarificada, proveniente de nove pacientes com hepatite não-A, não-B, porém de etiologia desconhecida, de uma mesma localidade. As amostras foram coletadas de um segundo episódio de hepatite, no qual os indivíduos apresentaram: icterícia, febre, aumento do fígado, vômito e elevação dos níveis séricos das transaminases hepáticas. Neste mesmo estudo, foi realizada a inoculação intravenosa da suspensão fecal humana, contendo o vírus, em macacos *cynomolgus*. Lesões histológicas e alterações enzimáticas confirmando hepatite, excreção de partículas *vírus-like* nas fezes e produção de anticorpos específicos foram observados (Balayan *et al.*, 1983).

Em 1990, Reyes e colaboradores, foram bem sucedidos em clonar o, até então, vírus da hepatite não-A, não-B (Reyes *et al.*, 1990). Em 1991, a partir da obtenção do genoma completo do vírus, foi possível realizar a caracterização molecular do mesmo, que passou a ser descrito como o vírus da hepatite E (HEV) (Tam *et al.*, 1991). No mesmo ano, foi desenvolvido o primeiro teste sorológico para a detecção de anticorpos específicos anti-HEV (Yarborough *et al.*, 1991).

A partir de 1991, pode-se observar a intensificação dos estudos sobre o HEV, que contribuíram consideravelmente para o conhecimento da organização genômica e estrutural deste vírus (Ray *et al.*, 1991; Aye *et al.*, 1992; Tsarev *et al.*, 1992).

Em meados de 1996, uma nova cepa do HEV foi isolada nos Estados Unidos de um indivíduo sem histórico de viagens recentes para áreas endêmicas (Schlauder *et al.*, 1998). Neste mesmo período, o aumento do número de casos de hepatite E em países desenvolvidos, considerados não endêmicos, levantou a hipótese de reservatórios animais do vírus (Zaaijer *et al.*, 1992; Buti *et al.*, 1995).

Em 1997, nos Estados Unidos, foi isolada a primeira cepa do HEV de origem suína, com 74% de identidade nucleotídica com as cepas clássicas isoladas de Burma e do México e 90% de identidade nucleotídica com a cepa humana isolada da mesma região (Meng *et al.*, 1997). Desde então, cepas suínas foram isoladas em diversos países industrializados e, novos reservatórios animais, como: roedores, coelhos e cervos foram descritos (Perez-Gracia *et al.*, 2015).

1.2. Vírus da hepatite E

O vírus da hepatite E pertence à família *Hepeviridae*, gênero *Orthohepevirus A* (Smith *et al.*, 2014). Possui entre 27 e 32 nanômetros (nm) de diâmetro e capsídeo de simetria icosaédrica (Emerson e Purcell, 2006). Por décadas, foi descrito como um vírus não envelopado. Entretanto, estudos recentes demonstraram que os vírions encontrados nas fezes são desprovidos de envelope, enquanto que, os vírions circulantes na corrente sanguínea são revestidos por membranas celulares do hospedeiro (vírions “*quasi*-envelopados”) (Yin *et al.*, 2016).

O genoma do HEV é constituído por uma molécula RNA fita simples polaridade positiva ((+)ssRNA), com a presença de uma “cap” 7-metilguanossina na extremidade 5' e uma cauda poliadenilada (poli-A) na extremidade 3', totalizando aproximadamente 7,2 kilobases (kb). Além disso, o RNA genômico do HEV possui pequenas regiões não codificantes nas extremidades 5'-3' e três fases de leitura aberta (ORF 1-3) (Tam *et al.*, 1991; Ahmad *et al.*, 2011).

A ORF1 codifica uma poliproteína não estrutural de 1.693 aminoácidos que, após clivagem pós-traducional, gerará múltiplas proteínas não estruturais necessárias à replicação viral, como: a enzima RNA-polimerase RNA-dependente (RpRd), a metiltransferase (MeT), uma cisteína protease semelhante à papaína (PCP) e a RNA helicase (Hel). A ORF1 também compreende alguns domínios homólogos à outros vírus genoma RNA polaridade positiva, de animais e plantas, como: a região hipervariável (poliprolina), que apresenta altos níveis de variação

nucleotídica entre os isolados de HEV, um macro-domínio e o domínio Y (Ahmad *et al.*, 2011; Holla *et al.*, 2013; Perez-Gracia *et al.*, 2015). A função da ORF1 está relacionada à replicação do HEV RNA e também a sua patogenicidade (Yin *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016) (Figura 1.1).

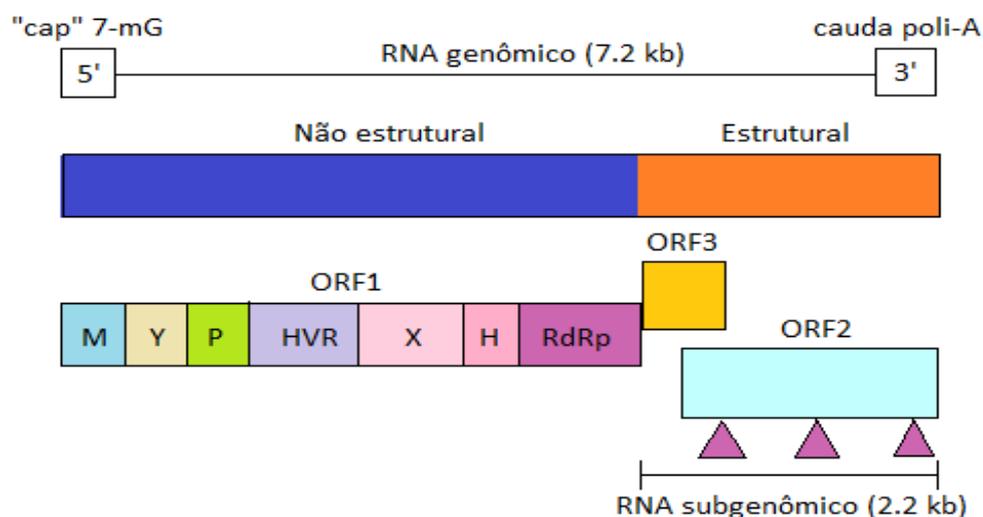


Figura 1.1. Modelo esquemático da organização genômica do HEV

“cap” 7-mG: “cap” 7-metilguanossina, M: metiltransferase; Y: domínio Y; P: cisteína protease semelhante à papaína, HVR: região hipervariável, X: macro-domínio, H: RNA helicase, RpRd: RNA-dependente RNA-polimerase.

Fonte: adaptado de Perez-Gracia *et al.*, 2015

A ORF2 se encontra próxima à extremidade 3' e codifica a proteína do capsídeo viral, com aproximadamente 660 aminoácidos (Holla *et al.*, 2013; Perez-Gracia *et al.*, 2015). Os principais epítomos imunológicos estão localizados nesta região, que é um importante candidato ao desenvolvimento de uma vacina. Além disso, a ORF2 está relacionada com funções fundamentais ao vírus como: montagem das partículas virais, infecção e interação com o hospedeiro (Yin *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016) (Figura 1.1).

A ORF3 sobrepõe a ORF2 e codifica uma proteína de 114 aminoácidos de extrema importância no egresso celular, na associação com proteínas de sinalização celular e na indução de uma potente resposta imune (Tam *et al.*, 1991; Korkaya *et al.*, 2001; Emerson *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016). Ambas as proteínas da ORF2 e ORF3 foram descritas como sendo codificadas por um RNA subgenômico bicistrônico (Graff *et al.*, 2006) (Figura 1.1).

1.3. Ciclo replicativo

A adsorção inicial do vírus com a célula alvo se dá por meio de proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs), presentes no capsídeo viral, com receptores celulares não descritos até o momento. A entrada do vírus na célula ocorre por endocitose dependente de clatrina, envolvendo a dinamina-2 e vias de colesterol da membrana, juntamente com o rearranjo do citoesqueleto da célula alvo (Debing *et al.*, 2016) (Figura 1.2).

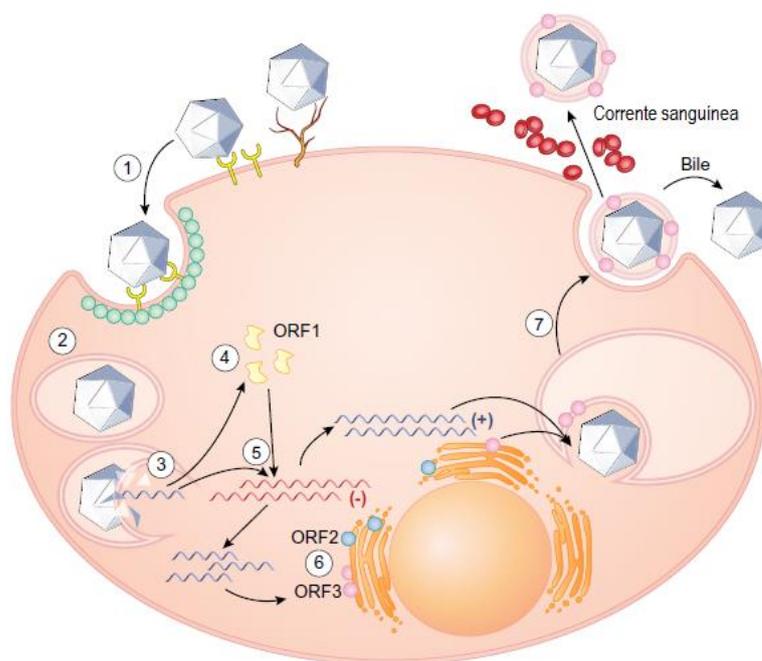


Figura 1.2. Modelo esquemático do ciclo replicativo do HEV

(1) adsorção viral, (2) endocitose mediada por clatrina, (3) liberação do (+)ssRNA viral no citoplasma da célula hospedeira, (4) tradução da proteína da ORF1, (5) replicação do (-)ssRNA intermediário e síntese do (+)ssRNA genômico (7,2 kb) e subgenômico (2,2 kb), (6) tradução do RNA subgenômico nas proteínas da ORF2 e ORF3, (7) empacotamento do RNA genômico e liberação do vírion.

Fonte: adaptado de Debing *et al.*, 2016

Após a penetração do vírus, tem-se o processo de decapsidação viral no citoplasma, com posterior liberação do (+)ssRNA genômico viral (Varma *et al.*, 2011). Para que ocorra a replicação do RNA genômico viral, se faz necessária à tradução da replicase viral pela maquinaria da célula alvo (Debing *et al.*, 2016). Além disso, a ORF1 será traduzida em um precursor de uma proteína inativada não estrutural, que será processada por proteases virais e celulares em metil-

transferase, proteases, helicases e RNA-polimerase RNA-dependente, necessárias para o processo de replicação viral (Varma *et al.*, 2011). Em seguida, tem-se a síntese de um RNA fita simples polaridade negativa (-)ssRNA complementar ao (+)ssRNA genômico, pela RpRd. A partir deste molde de (-)ssRNA, tem-se a síntese do (+)ssRNA genômico (Debing *et al.*, 2016) (Figura 1.2).

Durante a replicação viral, a RNA helicase é responsável pela separação das duas fitas de RNA, levando a formação de duas moléculas, sendo elas: o RNA genômico total ($\approx 7,2$ kb) e o RNA subgenômico ($\approx 2,2$ kb). O RNA subgenômico polaridade positiva é sintetizado pela RpRd permitindo a sua tradução nas proteínas da ORF2 (capsídeo) e ORF3 (Graff *et al.*, 2006). Posteriormente, a proteína da ORF2 empacota o (+)ssRNA genômico, levando a formação de novos vírions, enquanto que a proteína da ORF3 torna o ambiente favorável para a replicação viral (Ahmad *et al.*, 2011) (Figura 1.2).

A saída do vírus da célula aciona a via de secreção celular, juntamente com a proteína da ORF3 (Debing *et al.*, 2016). Estudos demonstram que os vírions se associam a proteína da ORF3, a qual está ligada a membranas intracelulares, levando ao egresso do vírus da célula hospedeira via complexos endossomais de distribuição requeridos para transporte (ESCRT) (Ahmad *et al.*, 2011). Vírions liberados pela região apical dos hepatócitos infectados são excretados desprovidos de envelope nas fezes via canalículo biliar. Já os vírions liberados pelo lúmen sinusoidal na circulação sanguínea são denominados vírions “*quasi-envelopados*” por serem revestidos por membranas celulares do hospedeiro (Yin *et al.*, 2016; Kamar *et al.*, 2017) (Figura 1.2).

Durante a fase final de infecção, a ORF3 interage com o gene de suscetibilidade a tumor 101 (Tsg101), componente celular do ESCRT, determinando a formação de corpos multivesiculares (CMs). Os vírions “*quasi-envelopados*” são liberados da célula infectada pela fusão entre os CMs e a membrana plasmática da célula hospedeira (Yin *et al.*, 2016).

O órgão-alvo da replicação do HEV é o fígado, entretanto sítios de replicação extra-hepáticos, como: rim, baço, estômago, intestino delgado, cólon, linfonodos, sistema nervoso central e placenta foram descritos em estudos utilizando biomodelos (Williams *et al.*, 2001; Kamar, Izopet, *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Debing *et al.*, 2016; Geng *et al.*, 2016).

1.4. Classificação e genótipos

Apesar da existência de apenas um sorotipo descrito até o momento, o HEV possui uma grande diversidade genética (Perez-Gracia *et al.*, 2015). Em 2014, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), propôs a classificação do HEV na família *Hepeviridae*, abrangendo os gêneros *Orthohepevirus* (HEV isolado de mamíferos e aves) e *Piscihepevirus* (HEV isolado de trutas) (Smith *et al.*, 2014) (Quadro 1.1).

Quadro 1.1. Classificação da família *Hepeviridae*

<i>Família</i>	<i>Gênero</i>	<i>Espécie</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Hospedeiro</i>
<i>Hepeviridae</i>	<i>Orthohepevirus</i>	<i>Orthohepevirus A</i>	1	Humanos
			2	Humanos
			3	Humanos, suídeos, coelhos, mangustos cervos e ovelhas
			4	Humanos e suínos
			5	Javalis
			6	Javalis
			7	Humanos e camelos
			8	Camelos
		<i>Orthohepevirus B</i>	-	Aves
		<i>Orthohepevirus C</i>	-	Roedores, furões e visons
		<i>Orthohepevirus D</i>	-	Morcegos
	<i>Piscihepevirus</i>	<i>Piscihepevirus A</i>	-	Trutas

Fonte: adaptado de www.ictv.global/report/hepeviridae (2017)

O gênero *Orthohepevirus* é dividido em quatro espécies, sendo elas: *Orthohepevirus A* (isolados de humanos, suínos, javalis, cervos, coelhos, ovelhas, mangustos e camelos), *Orthohepevirus B* (isolados de pássaros), *Orthohepevirus C* (isolados de ratos, ratos almiscarados, ratos gigantes da Índia, furões e visons) e *Orthohepevirus D* (isolados de morcegos) (Smith *et al.*, 2014) (Quadro 1.1). Esta nova classificação taxonômica, com a identificação de uma ampla gama de hospedeiros animais, foi possível devido ao desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento molecular (Perez-Gracia *et al.*, 2016).

A espécie *Orthohepevirus A* pode ser classificada em cinco genótipos distintos capazes de infectar humanos (1, 2, 3, 4 e 7) e três genótipos capazes de

infectar exclusivamente javalis (5 e 6) e camelos-bactrianos de duas gibas (8) (Quadro 1.1). Os genótipos 1, 2, 3 e 4 são divididos em 24 subtipos (1a-e, 2a-b, 3a-j, 4a-g) (Meng, 2011; Purdy *et al.*, 2017).

Os principais genótipos do HEV de importância na saúde pública são o 1, 2, 3 e 4 (Perez-Gracia *et al.*, 2015). Os genótipos 1 e 2 (HEV-1 e HEV-2) possuem transmissão exclusiva entre humanos pela via fecal-oral, não possuindo reservatórios descritos em outras espécies, sendo a ingestão de água contaminada a principal fonte de infecção (Ahmad *et al.*, 2011). Os genótipos 3 e 4 (HEV-3 e HEV-4) possuem caráter zoonótico, sendo o suíno o principal reservatório do vírus na natureza (Meng, 2010; Dos Santos *et al.*, 2011). Além dos suínos, o HEV-3 possui uma ampla variedade de hospedeiros animais, como mangustos, coelhos, cervos e roedores (Perez-Gracia *et al.*, 2016) (Figura 1.3).

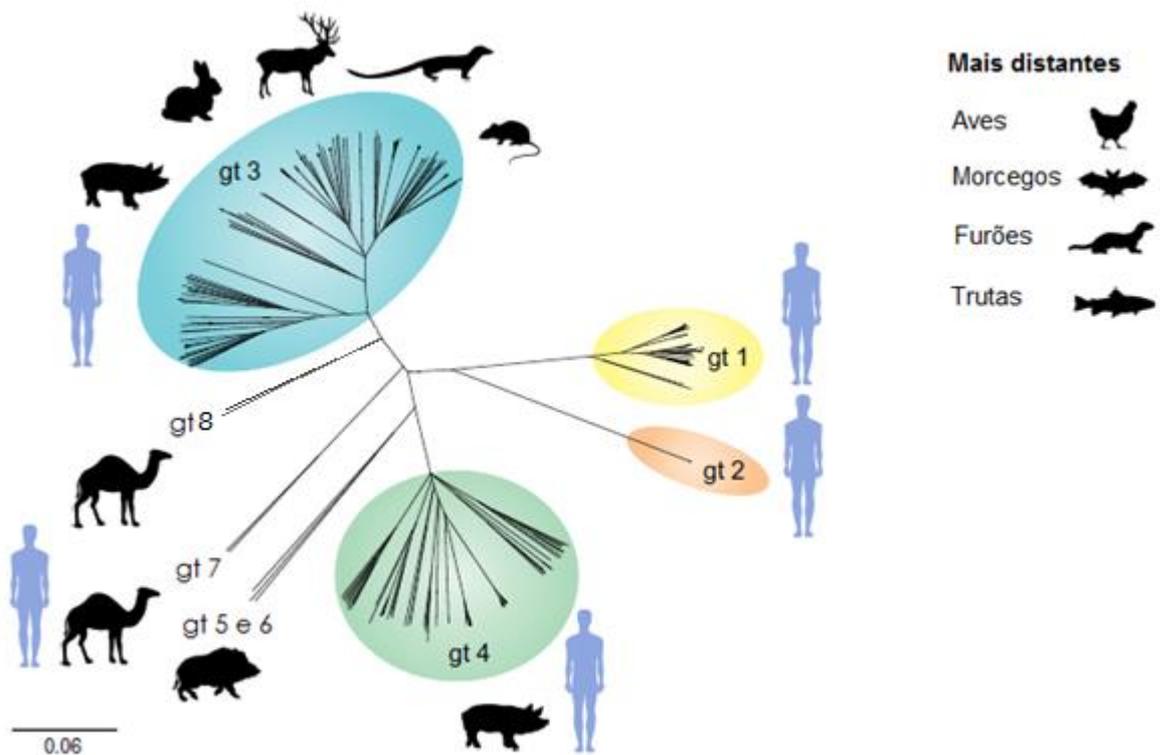


Figura 1.3. Figura ilustrativa da relação filogenética entre os diferentes genótipos do HEV e os seus respectivos hospedeiros

Fonte: adaptado de Debing *et al.*, 2016

Os genótipos 5 e 6 do HEV (HEV-5 e HEV-6) foram isolados de javalis (*Sus scrofa*), enquanto que, os genótipo 7 e 8 (HEV-7 e HEV-8) foram isolados, respectivamente, de dromedários (*Camelus dromedarius*) e camelos-bactrianos

(*Camelus bactrianus*) (Takahashi *et al.*, 2014; Woo *et al.*, 2014; Woo *et al.*, 2016). O HEV-7 foi descrito como zoonótico, a partir do relato da infecção de um indivíduo pós-transplantando do Oriente Médio, cujo consumo de carne e leite de camelídeos era frequente (Lee *et al.*, 2016). Ainda não se pode afirmar o caráter zoonótico dos demais genótipos descritos até o momento (HEV-5, 6 e 8) (Figura 1.3).

1.5. Epidemiologia

Atualmente, a hepatite E é considerada a principal causa de hepatite viral de transmissão fecal-oral no mundo, acometendo principalmente indivíduos de países menos desenvolvidos (WHO, 2015; Blasco-Perrin *et al.*, 2016). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em áreas hiperendêmicas onde prevalecem os HEV-1 e HEV-2, estima-se aproximadamente 20 milhões de novos casos de hepatite E a cada ano, com mais de três milhões de casos sintomáticos e 44 mil mortes relacionadas à doença (WHO, 2015).

Diferentes estudos mostram que o HEV possui dispersão mundial, entretanto, os genótipos encontrados variam de acordo com hábitos e condições higiênic-sanitárias de cada país (Abravanel *et al.*, 2012) (Figura 1.4).

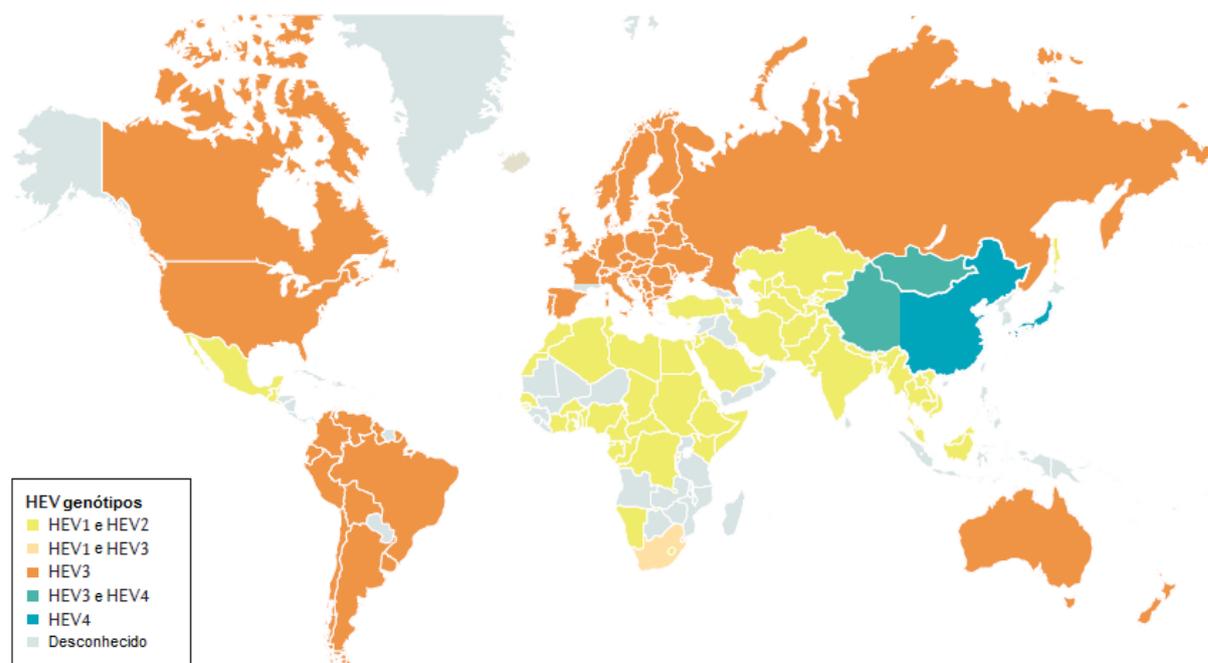


Figura 1.4. Distribuição geográfica mundial dos quatro principais genótipos do HEV

Fonte: adaptado de Kamar *et al.*, 2017

Os HEV-1 e HEV-2 são endêmicos em países em desenvolvimento, nos quais a transmissão do vírus ocorre principalmente pela via entérica, tendo origem em alimentos e água contaminados (Teshale *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011). Nestes países, os surtos estão geralmente associados à contaminação da água por dejetos humanos e de animais, durante enchentes e/ou desastres naturais (Aggarwal *et al.*, 2000). O HEV-1 abrange principalmente o norte da África e o centro-sul da Ásia, enquanto que o HEV-2 possui maior prevalência na África Ocidental e no México (Perez-Gracia *et al.*, 2016) (Figura 1.4).

Os HEV-3 e HEV-4 são encontrados principalmente em países industrializados, cuja prevalência pode ser atribuída majoritariamente aos casos autóctones de transmissão zoonótica e, em menor número, aos casos importados (Perez-Gracia *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016). O HEV-3 é encontrado principalmente nos continentes Americano e Europeu, enquanto que o HEV-4 é mais comumente encontrado na China e no Japão (Perez-Gracia *et al.*, 2016) (Figura 1.4).

Em relação aos reservatórios animais, cepas suínas do HEV-3 foram descritas na América, Europa, Ásia, Oceania e África. Apesar de cepas suínas do HEV-4 terem sido identificadas na Europa, este genótipo é mais comumente encontrado na China e no Japão (Monne *et al.*, 2015). No Brasil, observa-se a circulação do HEV-3, tanto em populações de suínos, quanto de seres humanos, sendo o subtipo 3b o mais prevalente (Dos Santos *et al.*, 2011; Gardinali *et al.*, 2012). Os subtipos 3c e 3f também foram descritos no país, identificados em amostras provenientes de suínos abatidos na Amazônia (De Souza *et al.*, 2012).

O HEV possui maior endemicidade na Ásia Central, África, Oriente Médio e México, sendo a Índia um dos países com o maior percentual de casos de hepatite viral aguda ($\approx 40\%$) (CDC, 2013; Perez-Gracia *et al.*, 2016). Nestas regiões hiperendêmicas, a principal forma de transmissão é a fecal-oral, geralmente associada a uma fonte de água contaminada (Blasco-Perrin *et al.*, 2016) (Figura 1.5).

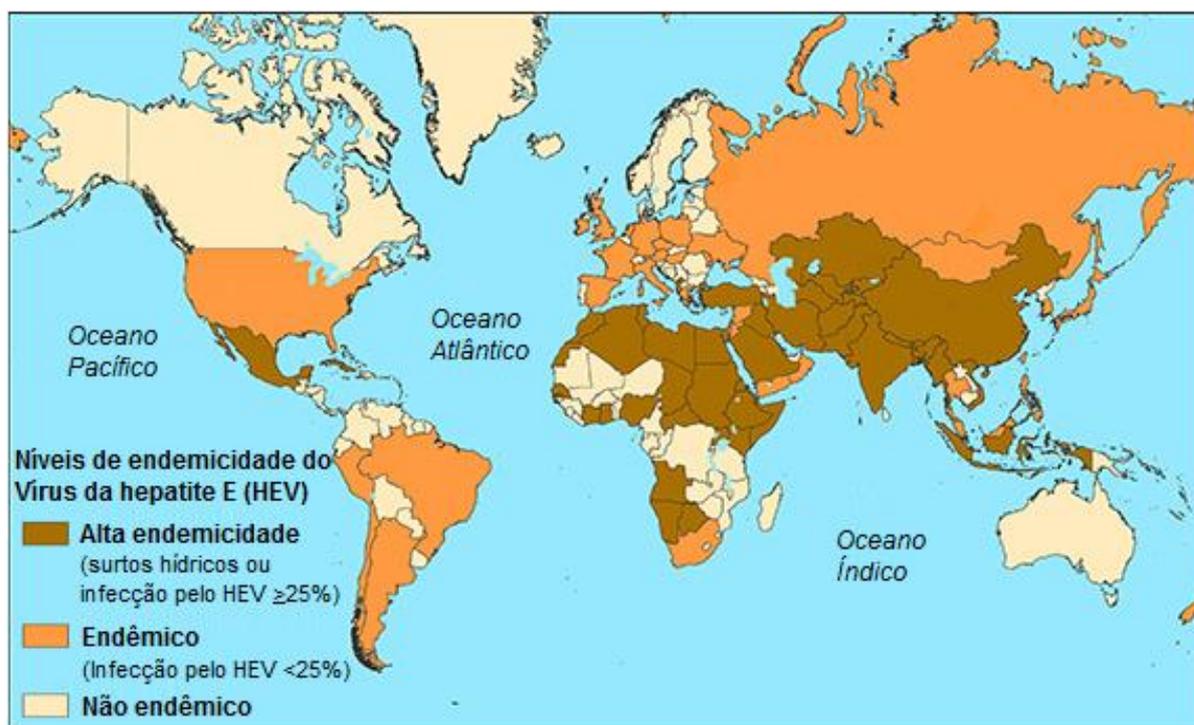


Figura 1.5. Distribuição geográfica mundial do HEV de acordo com os níveis de endemicidade

Fonte: adaptado de CDC, 2016

Em locais de moderada ou baixa endemicidade, como: países da Europa, Estados Unidos, Brasil e Japão, a principal forma de transmissão ocorre a partir do contato com animais considerados reservatórios do vírus (Meng, 2010; Park *et al.*, 2016). A transmissão zoonótica inclui: profissionais que lidam diretamente com estes animais (tratadores de suínos e veterinários) e, principalmente, indivíduos que se alimentam de vísceras ou carne crua ou mal cozida de animais infectados, como: cervos, javalis e porcos (Tei *et al.*, 2003; Dos Santos *et al.*, 2011; Meng, 2011; Di Profio *et al.*, 2016).

Em estudos soropidemiológicos realizados no Brasil, as taxas de soroprevalência de IgG anti-HEV encontradas foram de: 2,1% dos pacientes de um laboratório de análises clínicas em São Paulo; 2,4% dos indivíduos de uma comunidade urbana no Rio de Janeiro; 3,4% dos moradores de assentamentos rurais de Goiás; 6,2% dos pacientes de uma clínica de hemodiálise no Rio de Janeiro; 2,3%, 4%, 4,3%, 9,8% e 10% dos doadores de sangue no Paraná, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina, respectivamente; 8,4% dos indivíduos expostos a suínos de uma área rural do Mato Grosso e 12,9% dos indivíduos de uma comunidade rural da Amazônia (Trinta *et al.*, 2001; Santos *et al.*,

2002; Bortoliero *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012; Vitral *et al.*, 2014; Passos-Castilho *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2017; Passos-Castilho *et al.*, 2017).

Dados da prevalência da infecção pelo HEV, no Brasil, em indivíduos imunocomprometidos e no pós-transplante de órgãos ainda são escassos. Entretanto, alguns estudos asseguram a ocorrência de infecção pelo HEV em transplantados renais com a prevalência de HEV RNA variando de 3,1 a 10% (Passos *et al.*, 2013; Hering *et al.*, 2014). A infecção pelo HEV também foi descrita em uma criança no pós-transplante de fígado (Passos *et al.*, 2013).

Atualmente, o Brasil é considerado um país de baixa a moderada endemicidade para o HEV (Echevarria *et al.*, 2013). Entretanto, a infecção subclínica, reatividade cruzada com outros vírus em testes sorológicos, resultados falso-positivos e falso-negativos ou uma combinação de todos estes fatores, podem gerar percentuais que não expressam a realidade, de forma que, mais estudos de soroprevalência no país se fazem necessários (Perez-Gracia *et al.*, 2015).

Recentemente, a detecção de IgG anti-HEV-3 em 40% (314/780) dos doadores de sangue da região do planalto médio da região sul sugere, pela primeira vez, que uma região do Brasil pode ser endêmica para o HEV. Este resultado foi obtido com a utilização de um ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* (Pandolfi *et al.*, 2017). Outro dado interessante, obtido por Heldt e colaboradores, foi a detecção do HEV-3 em 36% dos produtos alimentícios de origem suína testados, enquanto que nenhuma amostra de sedimento e/ou água dos afluentes do rio dos Sinos (Rio Grande do Sul, Brasil) obteve resultado positivo. Estes resultados reforçam que a ingestão de produtos de origem suína contaminados pelo HEV seja a principal forma de transmissão do vírus no país (Heldt *et al.*, 2016).

1.6. Transmissão

A principal forma de transmissão do HEV se dá pela via fecal-oral, ocorrendo principalmente pelo consumo de água ou alimentos contaminados (Khuroo, 2011). Entretanto, outras formas de transmissão, como a zoonótica, vertical e parenteral já foram descritas (Psichogiou *et al.*, 1996; Colson *et al.*, 2007; Khuroo e Kamili, 2009; Park *et al.*, 2016) (Figura 1.6).

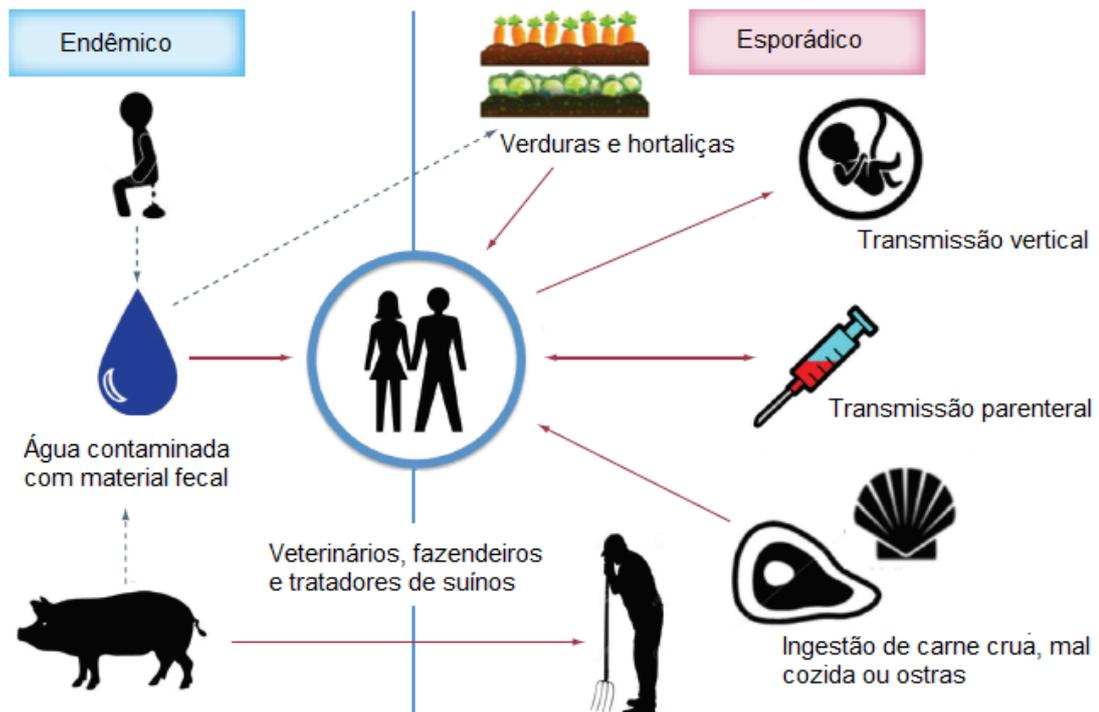


Figura 1.6. Vias de transmissão do HEV

Fonte: adaptado de Pérez-Gracia *et al.* 2016

Ao contrário do vírus da hepatite A e de outros vírus entéricos, a transmissão pela via fecal-oral direta, ou seja, exclusivamente pessoa-pessoa, é menos frequente para o HEV (Bouamra *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, foi possível observar um aumento significativo no número de estudos direcionados para a transmissão zoonótica (Pavio *et al.*, 2015; Caruso *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016). A ocorrência de um maior número de casos autóctones, sem fonte de transmissão comprovada, levantou a hipótese da circulação zoonótica do HEV, com posterior identificação de cepas animais (genótipos 3 e 4) diretamente relacionadas a cepas de HEV humanas (Pavio *et al.*, 2015).

Atualmente, os suídeos (porcos e javalis) são apontados como os principais reservatórios naturais do vírus. Outras espécies animais como cervos, coelhos e camelos, também foram descritas como reservatórios (Pavio *et al.*, 2015). A transmissão zoonótica pode ocorrer de diferentes formas: pelo contato direto de humanos com os reservatórios animais; pelo consumo de água ou alimentos contaminados por dejetos animais ou pelo consumo de carne crua, mal cozida ou de

produtos de origem animal contaminados (Perez-Gracia *et al.*, 2007; Dos Santos *et al.*, 2011).

Além disso, a transmissão vertical e a parenteral também são importantes formas de transmissão do HEV (Prasad *et al.*, 2016; Domanovic *et al.*, 2017; Izopet *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017). Até o momento, a transmissão vertical só foi descrita para genótipos 1 e 2 do vírus, tendo sido o HEV-1 associado a alta mortalidade de gestantes (Geng e Wang, 2016; Sharma *et al.*, 2017). Em oposição, a transmissão parenteral foi descrita para os quatro principais genótipos do HEV de importância na saúde pública (1 ao 4), cuja prevalência varia de acordo com a região geográfica (Domanovic *et al.*, 2017; Sazzad *et al.*, 2017).

A detecção da replicação viral na placenta durante o curso da hepatite E, associado com perda fetal ou insuficiência hepática aguda materna corrobora com os estudos de transmissão vertical (Bose *et al.*, 2014). Até o momento, sabe-se que a transmissão “*in utero*” é mais frequente no terceiro trimestre da gestação e, geralmente, está associada a complicações obstétricas (Debing *et al.*, 2016; Perez-Gracia *et al.*, 2016).

Em um dos primeiros estudos sobre transmissão vertical pelo HEV, Khuroo e colaboradores observaram a ocorrência de nascimentos prematuros e o aumento do número de natimortos (Khuroo *et al.*, 1995). Estudos mais recentes também associaram a infecção pelo HEV a complicações graves durante a gestação e a alta mortalidade neonatal (Khuroo e Kamili, 2009; Krain *et al.*, 2014). Nos nascidos, a infecção é aguda e autolimitante (Khuroo e Kamili, 2009).

Em relação a transmissão parenteral, o primeiro caso de hepatite E pós-transfusional em uma região de baixa endemicidade ocorreu em 2002 no Japão (Matsubayashi *et al.*, 2004). A partir daí, outros casos passaram a ser descritos, levando a um aumento exponencial do número de casos de hepatite E por transmissão parenteral, tanto em países industrializados, como em países em desenvolvimento (Perez-Gracia *et al.*, 2016). Diversos estudos têm demonstrado que a transmissão do HEV pode ocorrer a partir da transfusão de produtos derivados do sangue, como: plaquetas, hemácias, plasma fresco congelado, entre outros (Mirazo *et al.*, 2014; Pischke *et al.*, 2016).

1.7. Hepatite E

A hepatite E em indivíduos imunocompetentes é, geralmente, uma doença aguda, subclínica e autolimitada (Dalton *et al.*, 2016). O período de incubação da doença varia de 15 a 60 dias após a exposição ao HEV. As manifestações clínicas geralmente aparecem entre 2 a 6 semanas após o período de incubação da doença e, podem ou não, vir acompanhadas de elevação das transaminases hepáticas: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A excreção do vírus nas fezes é variável, podendo durar até duas semanas após a fase aguda. A viremia é aguda e autolimitada, podendo ser detectada 3 semanas após a exposição ou uma semana antes do aparecimento das manifestações clínicas e durar em torno de 2 semanas (CDC, 2016) (Figura 1.7).

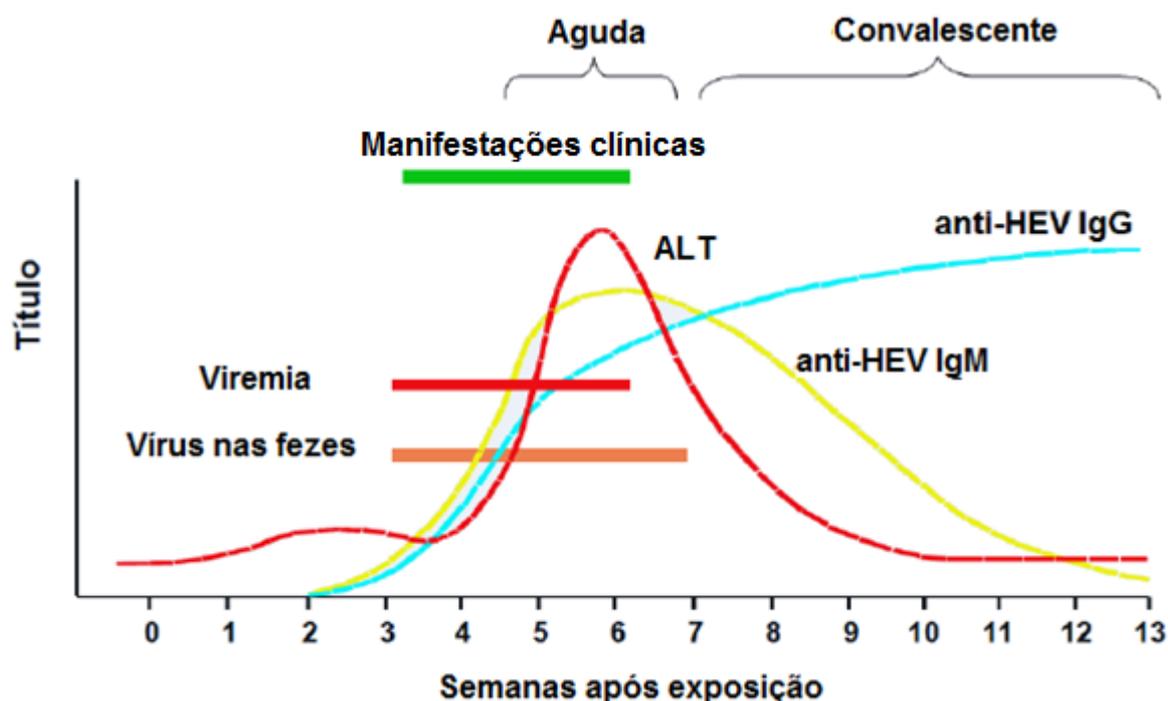


Figura 1.7. Curso clínico da infecção pelo HEV em humanos

Fonte: adaptado de CDC, 2016

A detecção de anticorpos da classe IgM anti-HEV é realizada na fase aguda da doença, geralmente junto ou logo após o pico de ALT, e pode durar de 4 a 6 meses após a infecção, sendo utilizada no diagnóstico da infecção aguda. A partir da elevação dos níveis de IgM, tem-se a detecção do IgG anti-HEV, que aumenta desde a fase aguda até a fase de convalescência, podendo ser detectado no soro

por anos após o início da doença, com relatos de detecção de IgG anti-HEV até 14 anos após a fase aguda (Dawson *et al.*, 1992; Aggarwal e Krawczynski, 2000) (Figura 1.7).

O quadro clínico pode variar desde formas assintomáticas até a falência hepática, com um índice de mortalidade em torno de 0,2 a 4% (Dao Thi *et al.*, 2016). As principais manifestações clínicas incluem: dor abdominal, náusea, vômito, anorexia, febre e icterícia (CDC, 2016).

Em indivíduos imunocomprometidos, a infecção pelo HEV-3 está comumente associada a casos de hepatite crônica, principalmente no pós-transplante de órgãos sólidos (rim, fígado, pâncreas, coração e pulmão). Nestes casos, cerca de 60% dos indivíduos desenvolvem a forma crônica da doença (Kamar *et al.*, 2011).

O tacrolimo (FK-506) é um potente imunossupressor derivado macrolídeo, isolado de *Streptomyces tsukubaensis* (Scott *et al.*, 2003). Seu mecanismo de ação envolve sua ligação a uma proteína da família da imunofilina (FKBP12), inibindo a ligação da calcineurina, uma proteína cálcio/calmodulina dependente, que participa da cascata de ativação de fatores transcricionais nucleares, como o NFAT (fator nuclear de células T ativadas). A não ativação deste complexo, leva ao bloqueio da translocação do NFAT para o núcleo. Esse fator de transcrição está relacionado à ativação de células T e à transcrição da IL-2, uma importante citocina envolvida na proliferação de linfócitos T (Kinugasa *et al.*, 2008; Thervet *et al.*, 2011).

O uso do tacrolimo e trombocitopenia no momento do diagnóstico foram considerados fatores de risco independentes para a persistência do HEV no organismo de recém-transplantados (Kamar *et al.*, 2011; Gardinali *et al.*, 2017). A progressão para a cronicidade também pode ser observada em indivíduos imunocomprometidos com doenças hematológicas ou coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) com baixa contagem de linfócitos TCD4+ (<200/mm³) (Dalton *et al.*, 2009; Ollier *et al.*, 2009). A persistência da infecção pelo HEV, com progressão para hepatite crônica, tem sido observada em indivíduos imunocomprometidos infectados com o HEV-3 (mais frequente) e com o HEV-4 (Haagsma *et al.*, 2008; Kamar, Nassim *et al.*, 2008; Geng *et al.*, 2014).

1.8. Diagnóstico

Para se realizar um diagnóstico preciso, testes laboratoriais, sorológicos e moleculares, devem ser realizados, uma vez que as manifestações clínicas da hepatite E são indistinguíveis das demais hepatites virais (CDC, 2016). Além disso, o diagnóstico diferencial para lesão hepática induzida por drogas (DILI) ou doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é de extrema importância no tratamento adequado contra a hepatite E, podendo o diagnóstico errôneo ser fatal para pacientes imunocomprometidos (Dalton *et al.*, 2007; Versluis *et al.*, 2013).

O diagnóstico sorológico, utilizando ensaios imunoenzimáticos, é realizado para detecção de anticorpos específicos IgM e IgG anti-HEV. Tais testes possuem alta aplicabilidade no diagnóstico de pacientes com hepatite aguda esporádica em áreas endêmicas para o HEV. Em regiões não endêmicas, estes testes devem ser utilizados no diagnóstico para hepatite E em indivíduos que viajaram recentemente para áreas endêmicas ou com resultados negativos para outros agentes virais também relacionados ao dano hepático, como os vírus da hepatite A, B e C (HAV, HBV e HCV), citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV) e parvovírus humano B19 (B19V) (CDC, 2016).

Atualmente, os testes sorológicos anti-HEV utilizam proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos correspondentes a epítomos imunogênicos das ORFs 2 e 3 de cepas isoladas no México ou em Burma (Perez-Gracia *et al.*, 2016).

No Brasil, um ELISA *in house* foi desenvolvido utilizando um antígeno recombinante derivado da proteína do capsídeo viral (ORF2p), de uma cepa nativa, e se mostrou muito eficaz na detecção de IgG contra o genótipo do HEV de maior circulação no Brasil (HEV-3) (De Almeida Ramos *et al.*, 2016; Pandolfi *et al.*, 2017). Os resultados de especificidade e sensibilidade encontrados foram satisfatórios, sendo eles, respectivamente, 95,9% e 91,4% (Pandolfi *et al.*, 2017). Em oposição, Kamar e colaboradores observaram resultados sorológicos falso-negativos, em indivíduos imunocomprometidos, quando comparados com os resultados obtidos pela reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) (Kamar *et al.*, 2011).

Em pacientes imunocomprometidos ou com infecção subclínica, resultados negativos em testes sorológicos devem ser analisados com cautela e, sempre que

possível, para a confirmação destes casos deve-se utilizar testes moleculares para a detecção do HEV RNA (Blasco-Perrin *et al.*, 2016).

Diversos protocolos de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) para a detecção do HEV RNA no soro ou nas fezes de pacientes vêm sendo desenvolvidos. Visando padronizar estas técnicas, a OMS vêm trabalhando no estabelecimento de uma cepa do HEV subtipo 3a (250.000 UI/mL) como referência para a produção de padrões internacionais (Baylis *et al.*, 2011). Como vantagens, esta metodologia apresenta uma maior sensibilidade (10 moléculas de cDNA/PCR) e especificidade, além de ser utilizada no monitoramento de pacientes imunossuprimidos em terapia antiviral. Entretanto, devido à grande variedade de protocolos e pelo curto período de viremia, resultados falso-negativos podem ocorrer (Perez-Gracia *et al.*, 2016).

1.9. Prevenção

A prevenção contra a hepatite E em países em desenvolvimento se baseia na melhoria das condições higiênico-sanitárias e no fornecimento de água potável para a população. Além disso, ferver ou clorar a água de consumo reduz o risco de infecção pelo HEV (Perez-Gracia *et al.*, 2016).

Nos países desenvolvidos, a principal forma de prevenção consiste em não ingerir carne crua ou mal cozida de porco, javali ou cervo, assim como dos seus derivados, como: patês, salsicha de fígado, fígado e outras vísceras (Perez-Gracia *et al.*, 2016).

A triagem dos doadores de sangue, derivados de sangue (plasma, plaquetas e hemácias) e medula óssea ainda não é um procedimento universal para a prevenção contra o HEV (Pischke *et al.*, 2016). Deve-se ressaltar que esta triagem é recomendada por muitos autores e vêm sendo realizada em bancos de sangue de alguns países, como: Inglaterra, Países Baixos, Escócia e Irlanda (Versluis *et al.*, 2013; Jaber *et al.*, 2014; Koenecke *et al.*, 2014; Frange *et al.*, 2015).

O HEV é considerado um bom candidato para o desenvolvimento de uma vacina, uma vez que possui apenas um único sorotipo e a infecção natural leva a indução de anticorpos neutralizantes (Purcell e Emerson, 2008). A vacinação nos países em desenvolvimento poderia diminuir significativamente o número de pessoas infectadas pelo HEV por transmissão hídrica (Perez-Gracia *et al.*, 2015).

Nenhuma vacina contra a hepatite E foi aprovada para uso pelo *Food and Drug Administration* (FDA) até o momento. Recentemente uma vacina recombinante chinesa, com eficácia de 95,5% em indivíduos saudáveis, foi aprovada pelas autoridades de saúde do país e vem sendo comercializada desde novembro de 2012 com o nome de Hecolin[®] (Xiamen Innovax Biotech). Entretanto, a eficácia desta vacina em pacientes imunocomprometidos e/ou infectados pelo HEV-3 ainda não foi determinada (Li *et al.*, 2015; Perez-Gracia *et al.*, 2015).

1.10. Tratamento

A infecção pelo HEV é geralmente aguda e autolimitada. Entretanto, o vírus pode persistir em alguns indivíduos, principalmente imunocomprometidos, levando ao desenvolvimento de hepatite crônica. Raros casos podem evoluir com maior gravidade para cirrose e hepatocarcinoma (Gerolami *et al.*, 2008; Kamar, N. *et al.*, 2008; Barrague *et al.*, 2017; Borentain *et al.*, 2018). A necessidade de um tratamento efetivo contra a hepatite E crônica levou à realização de estudos comprovando a eficácia da ribavirina e do α -interferon pegilado (Kamar, Rostaing, Abravanel, Garrouste, Esposito, *et al.*, 2010; Kamar, Rostaing, Abravanel, Garrouste, Lhomme, *et al.*, 2010). A ribavirina é um agente antiviral que inibe a replicação do vírus por bloquear a síntese de ácido nucleico, podendo levar a uma resposta virológica sustentada (RVS) na maioria dos pacientes. Já o α -interferon pegilado é um imunostimulador comumente utilizado no tratamento contra a hepatite B e C. Entretanto, em pacientes recém-transplantados, tem sido associado à rejeição de enxertos, de forma que o seu uso no tratamento de hepatite crônica é limitado (Perez-Gracia *et al.*, 2016).

Novas drogas terapêuticas, como o sofosbuvir e análogos nucleosídeos (20-C-methyladenosine ou 20-Cmethylcytidine), vêm sendo estudadas, uma vez que casos de resistência e falha terapêutica já foram relatados no tratamento com a ribavirina (Dao Thi *et al.*, 2016).

No caso de indivíduos imunocomprometidos, no pós-transplante de órgãos sólidos, estudos demonstraram que a RVS, em indivíduos em tratamento com a ribavirina, ocorreu apenas após a redução da dosagem da terapia imunossupressora. Além disso, a escolha do imunossupressor nestes casos é imprescindível, uma vez que, o inibidor de calcineurina, tacrolimo, está associado a

um maior risco de desenvolvimento de hepatite crônica quando comparado com a ciclosporina (Kamar *et al.*, 2011; Debing *et al.*, 2014; Ramière *et al.*, 2015). Em alguns casos, apenas a redução da dose do imunossupressor é suficiente para alcançar a RVS (Kamar *et al.*, 2011).

1.11. Hepatite E no pós-transplante de medula óssea

Apesar do aumento no número de estudos sobre hepatite E em pós-transplantados, pouco se sabe sobre a infecção pelo HEV em indivíduos imunocomprometidos no pós-transplante de medula óssea (MO), e a sua consequente evolução para hepatite crônica (Halac *et al.*, 2012; Willemse *et al.*, 2016).

Atualmente, existem quatro modalidades de transplante de MO: autólogo (células provenientes do próprio receptor), singênico (células provenientes de irmãos gêmeos), alogênico (células provenientes de doadores 100% compatíveis) e haploidêntico (células provenientes de doadores 50% compatíveis) (Takami, 2018). Além disso, a obtenção das células-tronco hematopoéticas (CTH) pode ser feita a partir de diferentes fontes: MO (fonte clássica), cordão umbilical e mobilização para o sangue periférico (Takami, 2018).

A utilização de CTH é um campo em constante expansão e investigação para o desenvolvimento de novas terapias alternativas para doenças hematológicas (Silva Junior *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2014; Sarkaria *et al.*, 2018). Esta terapia vem sendo rotineiramente utilizada, com eficácia, no tratamento de linfomas, leucemias (mieloide e linfóide), síndromes mielodisplásicas e algumas condições não malignas como imunodeficiências congênitas (Locatelli e Strahm, 2018; Takami, 2018; Wang *et al.*, 2018).

O transplante de CTH a partir do sangue periférico substituiu completamente a utilização do transplante de MO, por alguns motivos: (i) possibilidade de obtenção destas células de indivíduos com danos na MO (radiação local ou tumores); (ii) quantidade análoga ou superior de CTH no sangue periférico, quando comparado a MO, após a mobilização com fator de crescimento de granulócitos (G-CSF) ou quimioterápicos e (iii) por ser um procedimento menos invasivo, com maior volume final coletado (20 mL de MO/kg do doador x 10-20 L de sangue por sessão de leucaférese) e de recuperação mais rápida (Jansen *et al.*, 2005; Silva Junior *et al.*,

2009). Entretanto, a utilização de CTH alogênicas possui uma maior complexidade, uma vez que o sangue periférico contém mais linfócitos T do que a MO o que aumenta o risco de DECH (Jansen *et al.*, 2005).

Até o momento, o maior estudo realizado em indivíduos portadores de hepatite E no pós-transplante alogênico de células tronco hematopoéticas (aloTCTH) contou com uma coorte de 328 pacientes. Neste estudo, observou-se uma alta relação entre o aloTCTH e o risco de desenvolvimento de hepatite crônica (63%) (Versluis *et al.*, 2013). Outros estudos demonstrando esta associação também foram realizados (Le Coutre *et al.*, 2009; Koenecke *et al.*, 2014). A evolução para a forma crônica da doença também foi descrita no pós-transplante de MO (Halac *et al.*, 2012). Diante destes fatos, a triagem dos pacientes no pré e no pós-transplante, durante episódios de alteração das transaminases hepáticas, deve ser realizada para avaliar os casos de infecção e reativação pelo HEV.

É consenso que a infecção pelo HEV em pacientes imunocomprometidos, no pós-aloTCTH, representa um importante fator de risco de evolução para insuficiência hepática e óbito (Versluis *et al.*, 2013; Jaber *et al.*, 2014). Alguns autores também defendem a triagem para o HEV nos doadores de CTH, uma vez que foi descrita a detecção do HEV RNA em um doador saudável (Koenecke *et al.*, 2014). Esses estudos levantaram à hipótese de uma possível transmissão do HEV pelo transplante de MO e, também, deste órgão como um possível sítio de persistência viral.

1.12. Nicho da medula óssea

A MO é um órgão hematopoético, constituído de tecido esponjoso, altamente irrigado, difuso e muito ativo (Junqueira e Carneiro, 2013). A irrigação deste tecido é realizada por capilares sanguíneos sinusóides reticuloendoteliais da medula óssea mielóide (Sarin, 2010). A MO está localizada no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos (Junqueira e Carneiro, 2013).

O nicho de CTH gera sinais que regulam a autorrenovação, quiescência e diferenciação destas células (Calvi e Link, 2015). O estroma medular é responsável por criar um microambiente propício para a hematopoese, com a produção de fatores de crescimento necessários para a diferenciação, proliferação e maturação das células hematopoéticas. Além disso, é responsável por fornecer suporte

mecânico, uma vez que o contato físico entre as células estromais e hematopoéticas também é relevante para a manutenção destas células na MO (Parikh *et al.*, 2014; Lo Iacono *et al.*, 2017). É composto pelas células-tronco mesenquimais (CTM) e suas progênes (osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, entre outros) associadas a células endoteliais e reticulares, macrófagos e componentes da matriz extracelular (colágeno tipo III e IV, proteoglicanos e glicosaminoglicanos) (Sarkaria *et al.*, 2018).

Inicialmente, os osteoblastos foram propostos como o principal componente deste nicho (Morrison e Scadden, 2014). Entretanto, estudos recentes em modelo murino revelaram que a maioria das CTH reside em um nicho perivascular, em vez de um nicho osteoblástico (Tamplin *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016).

1.13. Células-tronco mesenquimais e hematopoéticas

As células-tronco são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares dentro de um determinado tecido (Sarkaria *et al.*, 2018). Estas células possuem três características que as distinguem dos demais tipos celulares: (i) capacidade de autorrenovação e divisão, apesar da baixa atividade mitótica; (ii) são células indiferenciadas e não especializadas e (iii) possuem a capacidade de se diferenciar em células especializadas quando expostas a fatores estimuladores (Silva Junior *et al.*, 2009). A diferenciação e a atividade de autorrenovação destas células devem ser equilibradas para alcançar a homeostasia do tecido. O excesso de diferenciação ou autorrenovação muitas vezes está associado ao processo de desenvolvimento de neoplasias (Sarkaria *et al.*, 2018).

As células-tronco dão origem a células-filhas que seguem dois possíveis caminhos: permanecem como células-tronco, mantendo a sua população original, ou se diferenciam em outros tipos celulares, com características específicas (Junqueira e Carneiro, 2013). A MO constitui o principal sítio de produção de células-tronco mesenquimais (CTM) e hematopoéticas (CTH) (Silva Junior *et al.*, 2009).

As CTM foram primeiramente descritas por Friedenstein e colaboradores em 1966 (Friedenstein *et al.*, 1966). Foram caracterizadas como células com aspecto fibroblastóide e com a capacidade de se diferenciar *in vitro* em diferentes linhagens celulares, como: osteoblastos, condroblastos, adipócitos, fibroblastos, mioblastos, células reticulares, entre outras (Dazzi *et al.*, 2006; Bianco *et al.*, 2008). A MO representa, atualmente, a principal fonte de CTM, apresentando uma baixa

frequência destas células (0,01 a 0,0001% das células mononucleares) (Souza *et al.*, 2010). Além disso, esta subpopulação celular também pode ser encontrada, em menor frequência, no sangue periférico, após mobilização com G-CSF, fígado, sangue fetal, placenta e líquido amniótico (Dazzi *et al.*, 2006).

As CTH, por sua vez, possuem a capacidade de repovoar todas as linhagens de células sanguíneas (Sarkaria *et al.*, 2018). Estas células darão origem a células progenitoras em diferentes graus de diferenciação, denominadas de unidades formadoras de colônias (UFC). As UFC originarão as células especializadas do tecido sanguíneo e do sistema imune. Existem dois diferentes caminhos para estas células progenitoras: diferenciação na linhagem linfóide (precursor linfóide comum) ou mielóide (unidades formadoras de colônia de granulócitos, eritrócitos, monócitos, macrófagos e megacariócitos (UFC-GEMM); megacariócitos (UFC-Meg); mastócitos e basófilos (UFC-Mast); eosinófilos (UFC-Eo) e granulócitos e monócitos (UFC-GM)). A partir destes progenitores, serão formadas as células maduras do tecido sanguíneo e do sistema imune: eritrócitos, megacariócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, células *natural killer* e células dendríticas (Silva Junior *et al.*, 2009) (Figura 1.8).

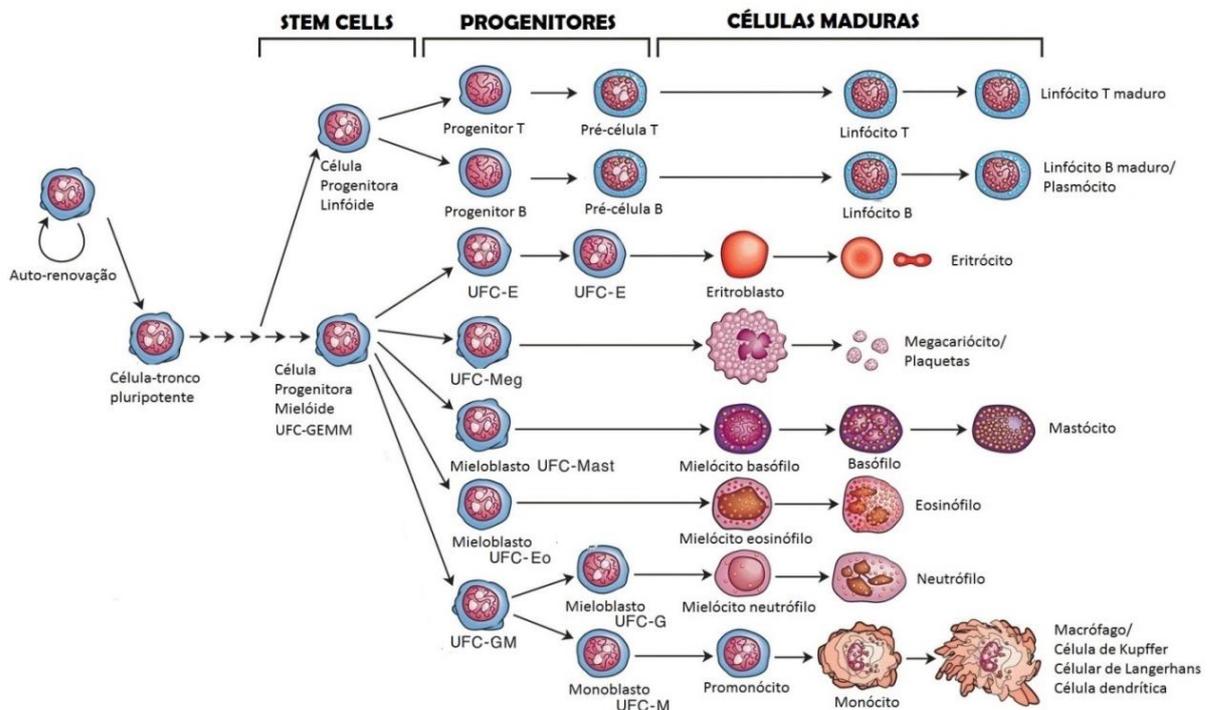


Figura 1.8. Representação esquemática da hematopoiese medular a partir da diferenciação de células-tronco

Fonte: adaptado de Metcalf, 2007

1.14. Primatas não humanos como modelo experimental para a hepatite E

Os primatas não humanos (PNH) têm sido extensivamente utilizados como modelo experimental de infecção para o HEV. Avanços significativos em estudos de patogênese e resposta imune têm sido alcançados graças ao sucesso da infecção pelo HEV neste biomodelo (Tsarev *et al.*, 1993; Aggarwal *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; De Carvalho *et al.*, 2013; Gardinali *et al.*, 2017).

Em estudos de infecção experimental, constatou-se a suscetibilidade de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) e macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) à infecção pelo HEV-3 (Tsarev *et al.*, 1993; Nanda *et al.*, 1994). A suscetibilidade deste modelo é comprovada nos achados virológicos, histopatológicos, imunológicos e bioquímicos (Balayan *et al.*, 1983; Krawczynski, 1991; Tsarev *et al.*, 1993; De Carvalho *et al.*, 2013).

Li e colaboradores avaliaram a suscetibilidade de ratos B57C/6 ao HEV-3, inoculado por via intravenosa, demonstrando claramente que o HEV não foi capaz de se multiplicar neste modelo animal (Li *et al.*, 2008).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa, comprovou a eficácia de macacos cynomolgus como modelo experimental de persistência viral (HEV-3) após terapia imunossupressora prolongada (Gardinali *et al.*, 2017). Até então, apenas os cynomolgus eram tidos como biomodelo para o estudo da patogênese da infecção aguda pelo HEV (Krawczynski *et al.*, 2011; De Carvalho *et al.*, 2013). Macacos rhesus são modelos comprovadamente eficazes na avaliação da persistência viral para o genótipo 4 do HEV (Huang *et al.*, 2016).

Nos cynomolgus a infecção pelo HEV é subclínica (Aggarwal *et al.*, 2001). Em estudos experimentais, animais com infecção aguda pelo HEV apresentaram: viremia, com ausência de RNA viral detectável em soro, fezes e fragmentos hepáticos até 69 dias pós-inoculação (dpi), excreção do vírus nas fezes, soroconversão de IgM e IgG anti-HEV e elevação transitória significativa das enzimas hepáticas ALT e AST (Aggarwal *et al.*, 2001; Gardinali *et al.*, 2017).

Gardinali e colaboradores não observaram alterações na contagem de leucócitos, linfócitos, hemácias e plaquetas (Gardinali *et al.*, 2017). A redução na contagem de linfócitos periféricos foi descrita em macacos cynomolgus experimentalmente infectados pelo HEV (De Carvalho *et al.*, 2013).

Animais com infecção crônica apresentaram padrões similares aos da infecção aguda em relação à carga viral no sangue, fígado e fezes. Entretanto, demonstram um padrão de persistência viral com replicação nos hepatócitos três meses após a infecção. Além disso, um padrão intermitente de elevação das enzimas hepáticas (ALT e AST) e soroconversão tardia de IgG anti-HEV foram observados (Gardinali *et al.*, 2017).

Na fase aguda, pode ocorrer um quadro de hepatite aguda autolimitada, com ausência de infiltrado inflamatório no parênquima hepático ao término do experimento. Dentre os achados histológicos nesta fase da infecção, destacam-se: leve a moderada esteatose (macro e microvesicular), balonização, inflamação intracinar e apoptose hepatocelular (Gardinali *et al.*, 2017). No estágio crônico constatou-se hepatite de interface, caracterizada pela invasão da placa limitante do trato portal por um infiltrado de células linfoplasmocitárias (Gardinali *et al.*, 2017).

A importância da utilização de PNH na pesquisa também se justifica devido à proximidade filogenética e a similaridade anatômica, fisiológica e bioquímica entre esses animais e os seres humanos, o que permite a extrapolação dos resultados para os pacientes humanos (Nardone *et al.*, 2017). Além disso, os macacos cynomolgus são considerados o modelo ideal para o transplante de órgãos e para avaliação de citotoxicidade de drogas, incluindo uma ampla variedade de imunossupressores, dentre eles o tacrolimo (Haustein *et al.*, 2008; Kinugasa *et al.*, 2008; Matthews *et al.*, 2015).

1.15. Justificativa

Cada vez mais o HEV-3 vem se tornando um importante agente etiológico associado a casos de hepatite crônica em pacientes transplantados e imunossuprimidos (Kamar *et al.*, 2011; Kamar *et al.*, 2017). Atualmente, a evolução para a forma crônica da doença vem sendo associada também ao pós-transplante alogênico de medula óssea (Le Coutre *et al.*, 2009; Halac *et al.*, 2012; Versluis *et al.*, 2013; Koenecke *et al.*, 2014). Entretanto, pouco se sabe sobre os aspectos da infecção pelo HEV neste órgão.

A síndrome da anemia aplástica (ou aplasia medular) associada à hepatite (HAAA) foi descrita em dois pacientes imunossuprimidos com hepatite E, sendo um no Paquistão e um na Argentina (Shah *et al.*, 2012; Zylberman *et al.*, 2015). A HAAA

também foi associada às demais hepatites virais e aos vírus: B19V, CMV e EBV (Safadi *et al.*, 2001; Rauff *et al.*, 2011). A anemia Diamond-Blackfan (DBA), um distúrbio da MO que não consegue produzir glóbulos vermelhos, foi descrita em um indivíduo com hepatite E crônica (Kenney e Meng, 2015). O presente estudo tem como um dos objetivos investigar alterações histológicas medulares e correlacioná-las com as condições de hepatite E aguda e crônica, a fim de se obter uma melhor compreensão sobre a patogênese deste vírus.

Além disso, a presença de pacientes soronegativos para o HEV, que desenvolveram a doença no pós-alotCTH levantou à hipótese de uma possível transmissão do vírus pelo enxerto contaminado (Versluis *et al.*, 2013; Koenecke *et al.*, 2014). Desta forma, a realização de um estudo que demonstre a presença do HEV em células da MO se faz de extrema importância na comprovação da necessidade de uma triagem para este vírus na rotina de bancos de sangue e de clínicas de transplante de MO, como sugerido por diversos autores (Versluis *et al.*, 2013; Jaber *et al.*, 2014; Koenecke *et al.*, 2014; Frange *et al.*, 2015; Pischke *et al.*, 2016).

Neste contexto, justifica-se a utilização de PNH como biomodelo de infecção, em razão da comprovada suscetibilidade do macaco cynomolgus à infecção pelo HEV-3, à maior facilidade na extrapolação dos resultados para pacientes humanos e por ser considerado o melhor modelo para transplante de órgãos e avaliação de citotoxicidade de drogas (Tsarev *et al.*, 1993; Gardinali *et al.*, 2017). Diante disso, nosso grupo de pesquisa vem avaliando os efeitos da infecção pelo HEV sobre a capacidade hematopoética medular e aspectos relacionados a presença do vírus em células da MO, no curso da agudo e crônico da hepatite E, utilizando o macaco cynomolgus como modelo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de células da medula óssea infectadas pelo HEV, no curso agudo e crônico experimentais da hepatite E, e na infecção natural, utilizando como modelo o macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*).

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Investigar a presença do antígeno do HEV em células da medula óssea de macacos cynomolgus;
- 2) Quantificar o número de células da medula óssea infectadas pelo HEV, no curso agudo e crônico experimentais da hepatite E;
- 3) Caracterizar as alterações histológicas medulares decorrentes da infecção pelo HEV;
- 4) Comparar a presença do HEV e de alterações histológicas medulares sob condições natural e experimental de infecção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA-Fiocruz) licenças CEUA LW-17/13 e LW-5/16 (Anexo).

3.2. Animais com hepatite E aguda e crônica induzidas experimentalmente

Um total de seis macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) clinicamente saudáveis, imunocompetentes, de ambos os sexos e soronegativos para as hepatites A e E, foram selecionados para este estudo.

Os animais foram cedidos pelo Serviço de Criação de Primatas Não Humanos (SCPrim) do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) do Instituto Oswaldo Cruz. Durante o experimento, os animais foram alojados em gaiolas individuais de aço inoxidável com sistema de contenção do tipo *squeeze back*, em um contêiner de experimentação NB2, e alimentados diariamente com ração comercial para PNH, com suplementação de legumes, verduras e frutas com acesso *ad libitum* de água. As condições ambientais da sala de experimentação eram controladas, com temperatura ambiente de 25°C e período de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Todos os animais receberam acompanhamento clínico de médicos veterinários.

Para a experimentação, os animais foram divididos em dois grupos iguais e acompanhados por um período de 160 dias:

- **Grupo 1** (*imunocompetentes e infectados com o HEV-3*): Três macacos (V12, AC11 e AE3) foram inoculados com 10^5 cópias do HEV RNA por via intravenosa. Após a constatação de uma resposta virológica sustentada, estes animais foram submetidos à imunossupressão, a partir de 91 dpi, para avaliar a hipótese de reativação da infecção, com administração diária de 2 mg/kg de tacrolimo via oral.
- **Grupo 2** (*imunossuprimidos e infectados com o HEV-3*): Três macacos (AD8, AB19 e AE6) foram induzidos e mantidos em estado de imunossupressão pelo tacrolimo, com administração diária de 3,5 mg/kg via oral, com posterior redução

para 2 mg/kg/dia a partir de 72 dpi. Após a constatação da imunossupressão, estes animais foram inoculados com 10^5 cópias do HEV RNA por via intravenosa.

O inóculo foi composto por uma suspensão fecal suína clarificada e filtrada (0,22 μ m), proveniente de um pool de amostras de suínos naturalmente infectados de uma granja comercial do estado do Paraná, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Amauri Alfieri do Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A inoculação do HEV RNA e o início e término da imunossupressão diária dos animais com tacrolimo foram realizadas seguindo um cronograma de atividades (Quadro 3.1).

Quadro 3.1. Cronograma de imunossupressão e inoculação do HEV nos macacos cynomolgus ao longo do experimento

<i>Período (dias)</i>	<i>Atividades</i>
- 43	Imunossupressão do grupo 2
0	Inoculação do HEV nos grupos 1 e 2
91	Imunossupressão do grupo 1
149	Término da imunossupressão de todos os grupos
160	Término do experimento

A detecção do HEV RNA nas amostras de soro, fezes e fragmentos hepáticos dos seis animais pela qRT-PCR foi efetuada em um estudo previamente realizado pelo nosso grupo de pesquisa e deu origem a uma nova divisão dos grupos:

- **Grupo agudo** (*grupo de animais portadores de hepatite E aguda*): quatro macacos (V12, AC11, AE3 e AD8) que apresentaram um quadro típico de hepatite aguda autolimitada, com ausência de infiltrado inflamatório ao término do experimento e resposta virológica sustentada antes de 69 dpi. A concentração plasmática de tacrolimo neste grupo variou de 4,18 a 19,97 ng/mL a partir de 91 dpi (Quadro 3.2).

- **Grupo crônico** (*grupo de animais portadores de hepatite E crônica*): dois macacos (AB19 e AE6) que apresentaram hepatite de interface ao término do experimento e cuja detecção do HEV RNA foi observada até 160 dpi. A concentração plasmática de tacrolimo neste grupo variou de 4,78 a 18,83 ng/mL (Quadro 3.2).

Quadro 3.2. Identificação, sexo, idade, peso e curso da hepatite E dos macacos cynomolgus experimentalmente infectados avaliados neste estudo

<i>Animal (ID)</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Peso (kg)</i>	<i>Hepatite E</i>
V12	F	8 anos 4 meses	3,10	Agudo
AC11	M	3 anos 4 meses	3,07	Agudo
AE3	M	1 ano 5 meses	1,55	Agudo
AD8	F	2 anos 3 meses	1,83	Agudo
AB19	M	4 anos 11 meses	3,50	Crônico
AE6	F	1 ano 2 meses	1,30	Crônico

ID: identificação; kg: quilograma; HE: hepatite E; M: macho e F: fêmea

3.3. Animal com hepatite E naturalmente adquirida

Um macaco cynomolgus clinicamente sadio, do sexo feminino e naturalmente infectado pelo HEV foi selecionado para este estudo (Quadro 3.3). O diagnóstico da infecção natural ocorreu durante a triagem sorológica (IgG anti-HEV) de três macacos cynomolgus do ICTB, selecionados para coleta de conteúdo medular, a fim de se estabelecer um cultivo celular primário para o HEV.

Quadro 3.3. Identificação, sexo, idade e peso do macaco cynomolgus naturalmente infectado avaliado neste estudo

<i>Animal (ID)</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Peso (kg)</i>
AC10	F	8 anos 4 meses	3,10

ID: identificação; kg: quilograma e F: fêmea

3.4. Coleta das amostras

Para que as coletas fossem realizadas, os animais foram sedados com uma associação de cloridrato de cetamina 20 mg/kg (Vetanarcol[®], Argentina) e cloridrato de xilazina 0,1 mg/kg (Syntec Brazil[®], Brasil) via intramuscular. Para a analgesia local, 0,2 mL de lidocaína a 2% foi injetada por via subcutânea próxima a crista ilíaca, a fim de reduzir a dor pós-operatória na fase de recuperação da anestesia geral.

Fragmentos ósseos foram coletados da crista ilíaca por biópsia de MO com agulha 14G (Ítaca Laboratórios Ltda, Brasil). As amostras foram coletadas pré (80

dias – T0) e pós-inoculação viral (160 dias – T1) dos animais experimentalmente infectados e, de um único momento (julho/2017), do animal naturalmente infectado (AC10) (Quadro 3.4).

Quadro 3.4. Cronograma de coleta das amostras

<i>Animais</i>	<i>Amostra</i>	<i>Data de coleta</i>
<i>Animais experimentalmente infectados</i>	Biópsia de MO	80 dias pré-inoculação (T0) 160 dpi (T1)
<i>Animal naturalmente infectado</i>	Biópsia de MO	07/2017
	Soro	11/2013; 04/2015; 04/2016; 07/2017; 08/2017 e 09/2017
	Fezes	09/2017

dpi: dias pós-inoculação; MO: medula óssea

A fim de caracterizar a infecção natural, amostras de sangue e fezes foram coletadas do macaco AC10. O sangue foi coletado por punção da veia femoral para posterior obtenção do soro por centrifugação a 2.000 rpm por 5 minutos. Após o diagnóstico da infecção natural pelo HEV em julho de 2017, três amostras de soro foram requeridas à soroteca do ICTB (novembro/2013, abril/2015, abril/2016), para acompanhamento retrospectivo, e duas amostras foram coletadas nos meses seguintes (agosto/2017 e setembro/2017), com simultânea coleta de fezes no último mês (setembro/2017) (Quadro 3.4).

Durante o processamento das amostras, os fragmentos ósseos foram fixados em formalina tamponada 10%, mantidas em solução descalcificadora EDTA em tampão fosfato 0,1 M e submetidas ao processamento histológico para inclusão em parafina.

3.5. Análise histológica

Cortes histológicos parafinados de cinco micrômetros da MO foram submetidos a etapas de desparafinização em xilol, hidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico e corados com Hematoxilina-Eosina (Mayer, 1903). A análise histológica foi realizada em microscópio de campo claro *Axio Observer Z1* (*Carl Zeiss*, Alemanha) e as imagens adquiridas com a câmera digital *Axiocam mRC5* (*Carl Zeiss*, Alemanha).

3.6. Imunofluorescência indireta

Cortes histológicos (5 µm) foram desparafinizados, hidratados e lavados em tampão fosfato-salino (PBS). A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão tipo Pascal (Dako, EUA) em solução de tampão-citrato 0,01 M pH 6,0 seguindo as recomendações do fabricante. Os cortes foram incubados com solução de bloqueio (2% de leite desnatado, 2,5% de albumina de soro bovino e 8% de soro fetal bovino no mesmo tampão) em uma câmara úmida durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Para a marcação primária, os cortes foram incubados em câmara úmida a 4°C *overnight* com o anticorpo monoclonal de camundongo que reconhece a ORF2 do HEV (IgG2a, 1 mg/mL) [clone ab101124] (Abcam, Reino Unido) na diluição 1:50. A marcação secundária foi realizada incubando os cortes histológicos com anticorpo policlonal de cabra anti-camundongo conjugado ao Alexa Fluor 488[®] (IgG, 2 mg/mL) [cat.: A32723] (Thermofisher[®], EUA), em estufa BOD a 37°C por 1 hora, na diluição 1:750. Em seguida, foi realizada uma contra-coloração com DAPI 1:5.000 [cat.: 03571] (Molecular Probes, EUA) por 10 minutos e uma coloração de fundo com o corante Azul de Evans 1:10.000 por 30 segundos. Entre cada uma destas etapas, os cortes histológicos foram lavados sucessivas vezes em PBS.

A titulação dos anticorpos primário e secundário foi realizada em um fragmento de fígado de um animal experimentalmente infectado pelo HEV aos 160 dpi que, posteriormente, passou a ser utilizado como controle positivo dos experimentos.

Controles negativos das imunomarcações foram realizados a partir da duplicação de cada amostra, omitindo o anticorpo primário, a fim de avaliar marcações inespecíficas resultantes do anticorpo secundário ou de outro reagente utilizado no experimento.

As lâminas foram montadas com *ProlongGold Antifade* [cat.: P36934] (Life Technologies, EUA) e analisadas na plataforma de Microscopia Confocal (POP – RPT07A-001), no Microscópio Confocal de Varredura a Laser LSM 710 (*Carl Zeiss*, Alemanha).

3.7. Pesquisa de anticorpos IgG anti-HEV

A pesquisa de anticorpos IgG anti-HEV foi realizada a partir das amostras de soro com a utilização do ensaio imunoenzimático comercial Mikrogen recomWell ELISA HEV IgG (Mikrogen Diagnostik, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

3.8. Análise bioquímica

A análise bioquímica foi realizada pela plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório do ICTB, utilizando o sistema químico Vitros DT60 II (Johnson & Johnson, EUA) para avaliar os níveis das transaminases hepáticas ALT e AST.

3.9. Extração do RNA viral

A extração de RNA das amostras de soro e fezes foi realizada com a utilização de *kits* comerciais de acordo com as instruções do fabricante. A extração do genoma viral foi realizada a partir de 200 µL de amostra utilizando o kit *QIAamp® Viral RNA mini Kit* (Qiagen, Alemanha). Ao final, foi eluído 60 µL de RNA e os tubos foram armazenados a -70°C.

3.10. Detecção do RNA viral por RT-PCR e nested RT-PCR

Para a amplificação de um segmento da ORF2 do genoma viral a partir do RNA extraído, realizou-se a RT-PCR em uma única etapa com o *kit “SuperScript® III One-Step RT-PCR System”* com *Platinum® Taq DNA Polimerase* (Invitrogen Life Technology, EUA). A mistura da reação foi preparada utilizando 11 µL de água DNase/RNase free, 25 µL de *2x reaction mix*, 2 µL de *Superscript III/Platinum Taq mix* e 1 µL dos oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos a 20 pmol/µL (Huang *et al.*, 2002). Em seguida, 10 µL de RNA extraído foi aplicado à reação. A termociclagem consistiu em uma primeira etapa para a síntese do DNA complementar (cDNA) a 55°C por 30 minutos. Em seguida, teve-se desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e mais 40 ciclos de incubação a 94°C por 15 segundos,

anelamento a 42°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 1 minuto. A extensão final se deu a 68°C por 5 minutos. Após a reação, os produtos da PCR (731 pb) foram aplicados na nested RT-PCR ou armazenados a -20°C.

Para a nested RT-PCR, a reação contou com 33,5 µL de água DNase/RNase free, 5 µL de 10x PCR Buffer, 2 µL de MgCl₂, 4 µL de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) a 10 mM (Invitrogen, EUA), 0,5 µL de *Platinum*[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen, EUA) e 1 µL dos oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos a 20 pmol/µL (Huang *et al.*, 2002). A termociclagem consistiu em 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 42°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. A extensão final se deu a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da nested RT-PCR (342 pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% (Gibco, EUA) em tampão Tris/Acetato/EDTA (TAE 1X) e corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL (Invitrogen, EUA). No gel, aplicou-se 8 µL de cada produto da PCR e 2 µL de tampão de amostra (50% de glicerol, 0,4% de azul de bromofenol, 0,4% de xileno cianol). Utilizou-se como padrão de corrida o 6LX 100 pb (Thermo Scientific, EUA) e os produtos amplificados foram visualizados por fotodocumentador Kodak Gel Logic 2200 (Hyland Scientific, EUA).

3.11. Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética

Os produtos da nested RT-PCR (342 pb) foram purificados utilizando o *kit* comercial *Wizard SV[®] Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA purificado foi quantificada por fluorimetria no sistema Qubit[®] (Invitrogen Life Technology, EUA).

As reações de sequenciamento nucleotídico foram realizadas utilizando o *kit* *BigDye 40 Terminator 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, EUA) com ciclagens no termociclador *Gen Amp PCR system 9700* (Applied Biosystems, EUA). O sequenciamento foi realizado no aparelho ABI3730xl-96 capilares (Applied Biosystems, EUA) da plataforma de sequenciamento de DNA do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde/PDTIS (Fundação Oswaldo Cruz, Brasil).

Sequências nucleotídicas similares à sequência obtida neste estudo, disponíveis no GenBank, foram obtidas por meio da ferramenta BLAST (Basic Local

Alignment Search Tool) do banco de dados do NCBI. As sequências foram alinhadas pelo método Clustal W e editadas, a fim de se retirar os trechos correspondentes aos oligonucleotídeos iniciadores, no programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). A análise filogenética foi realizada por inferência bayesiana utilizando a estrutura estatística 'Markov Chain Monte Carlo' (MCMC) implementada no pacote BEAST v1.8.1 (Drummond *et al.*, 2012), sob o modelo de substituição de nucleotídeos HKY + G. Para fins de genotipagem, sequências protótipos dos genótipos 1, 2, 3, 4 e 6 do HEV foram adicionadas à análise (Apêndice A). A sequência nucleotídica obtida neste estudo foi depositada no GenBank sob o número de acesso MG573667.

3.12. Detecção do RNA viral por qRT-PCR

As amostras negativas pela nested RT-PCR foram submetidas a qRT-PCR utilizando o *kit "AgPath-ID one-step RT-PCR"* (Applied Biosystems, EUA). A reação foi realizada com oligonucleotídeos iniciadores e sonda previamente descritos (Jothikumar *et al.*, 2006). As reações foram realizadas nas seguintes condições: transcrição reversa a 45°C por 30 minutos, desnaturação e ativação da Taq DNA polimerase a 95°C durante 15 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos (desnaturação) e 55°C por 1 minuto (hibridização e extensão).

4. RESULTADOS

4.1. Animais com hepatite E aguda e crônica induzidas experimentalmente

4.1.1. Detecção do antígeno viral por imunofluorescência indireta

O HEV Ag foi detectado em células da medula óssea (MO) de 4 dos 6 animais experimentalmente infectados (66,6%) aos 160 dpi (T1). Três animais eram portadores de hepatite E aguda e um animal de hepatite E crônica (Figuras 4.1 A-F). Nenhum destes animais foi positivo para a detecção do HEV Ag 80 dias pré-inoculação viral (T0) (Quadro 4.1).

Quadro 4.1. Detecção do antígeno do HEV na medula óssea dos macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais

<i>Animais (ID)</i>	<i>Hepatite E</i>	<i>HEV Ag (T0)</i>	<i>HEV Ag (T1)</i>
V12	Agudo	-	-
AC11	Agudo	-	+
AE3	Agudo	-	+
AD8	Agudo	-	+
AB19	Crônico	-	-
AE6	Crônico	-	+

ID: identificação; HEV Ag: antígeno do HEV; +/-: positivo/negativo

Em todos os animais positivos para a detecção do vírus, o perfil de marcação do HEV Ag foi perinuclear e perimembranar, apresentando um aspecto puntiforme (Figura 4.1 A-E). Além disso, dois perfis morfológicos de células com marcação viral foram observados. O primeiro, e de maior ocorrência, de células com núcleo periférico com cromatina frouxa, nucléolo central proeminente e cromatina condensada. Estas características, juntamente com a localização destas células, correspondem a células mielóides imaturas. O segundo perfil observado foi de células com núcleo com cromatina frouxa e nucléolo não tão proeminente, que podem ser da linhagem mieloide ou mesenquimal.

Para afirmar qual a população de células-alvo do vírus na MO, é necessária uma caracterização fenotípica das mesmas. Entretanto, é possível afirmar que eosinófilos e megacariócitos não fazem parte da população-alvo do HEV, uma vez que os mesmos foram observados durante as análises sem marcação para o vírus (Figura 4.1 E).

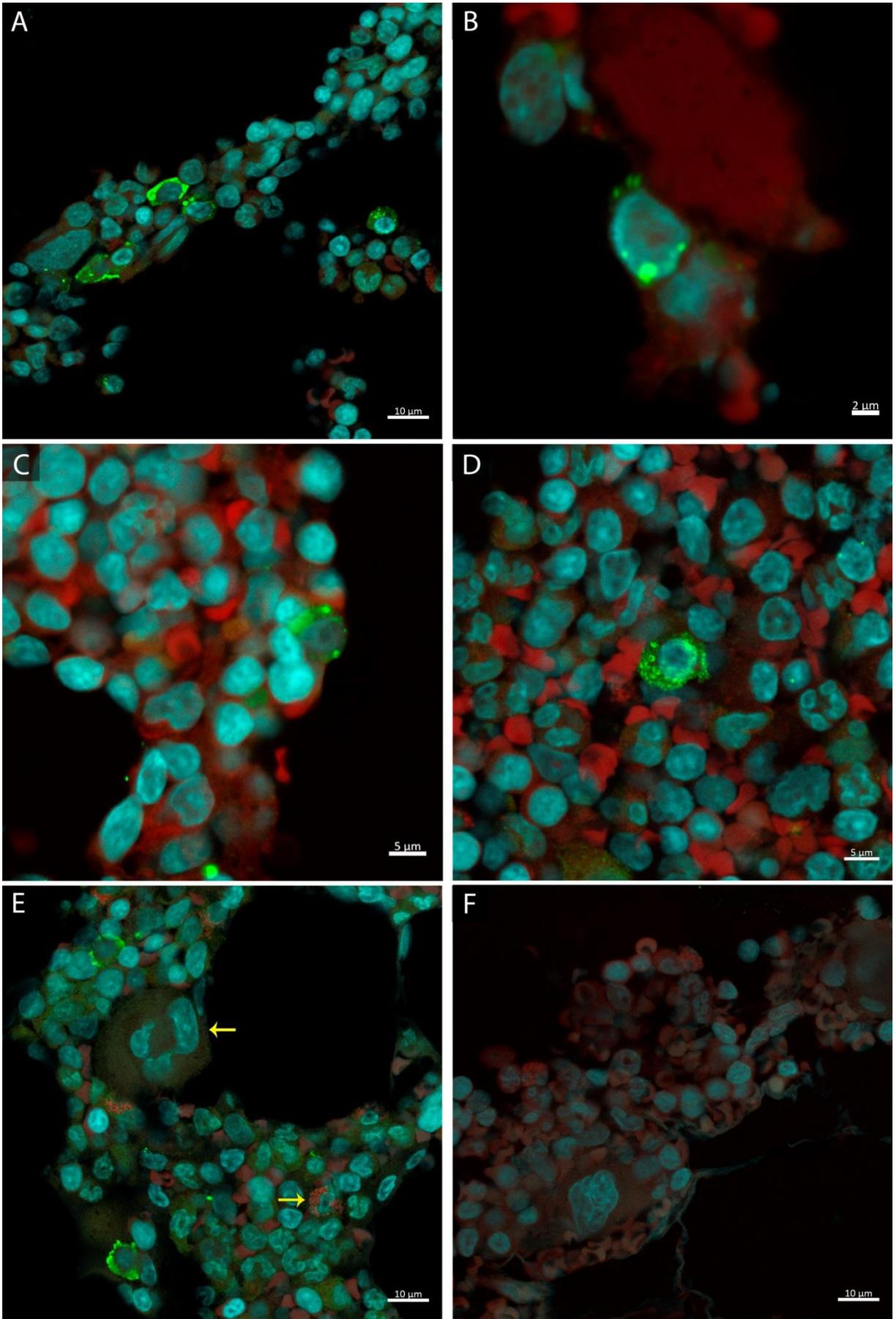


Figura 4.1. Detecção do antígeno do HEV em células da medula óssea de macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais

(A) Células infectadas pelo HEV de um animal portador de hepatite E crônica e (B-D) de três animais portadores de hepatite E aguda. (E) Megacariócito e eosinófilo (→) não infectados pelo HEV. (F) Ausência de infecção pelo HEV em células da medula óssea de um animal cronicamente infectado. Vírus da hepatite E em verde, núcleo marcado com DAPI em azul e matriz extracelular e hemácias coradas com azul de Evans em vermelho.

A quantidade de células da MO infectadas pelo HEV diferiu entre os animais portadores de hepatite E aguda e crônica (Quadro 4.2).

Quadro 4.2. Quantificação de células da medula óssea infectadas pelo HEV dos macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais

<i>Animais (ID)</i>	<i>Hepatite E</i>	<i>Células infectadas pelo HEV por campo de imagem</i>	<i>Média</i>
V12	Agudo	Ausente	1,6
AC11	Agudo	1 – 2	
AE3	Agudo	1 – 2	
AD8	Agudo	2	
AB19	Crônico	Ausente	11
AE6	Crônico	8 – 14	

ID: identificação

Nos animais com hepatite E aguda, foi possível observar um pequeno número de células marcadas para o HEV Ag (1 a 2 células/campo de imagem), disseminadas ao longo do tecido medular (Figura 4.2 A-B). Em oposição, vê-se um número maior de células infectadas pelo HEV no animal cronicamente infectado (≥ 8 células/campo de imagem) (Figura 4.2 C-D).

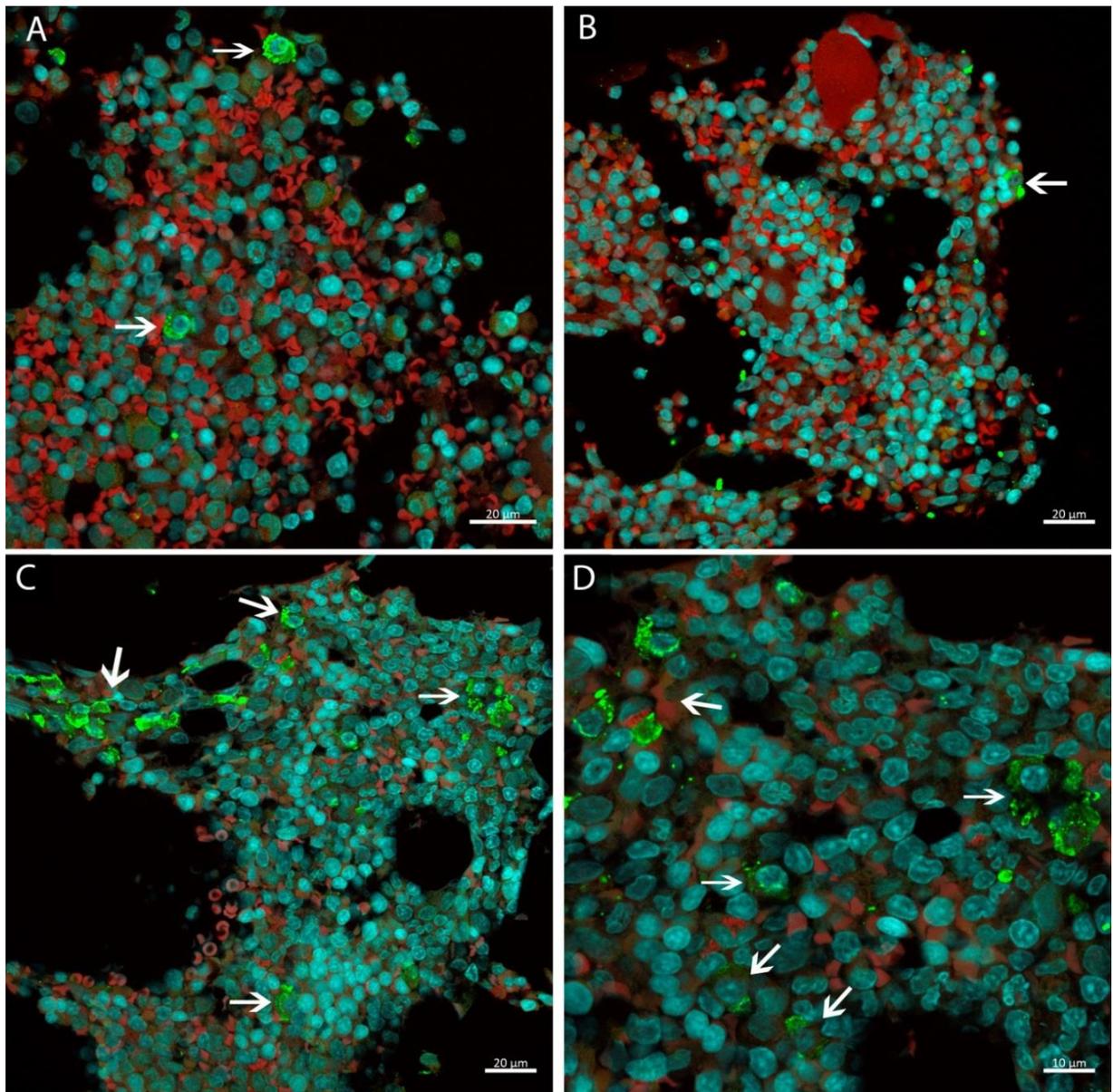


Figura 4.2. Quantificação de células da medula óssea infectadas pelo HEV de macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais

(A-B) Uma a duas células infectadas pelo HEV (→) por campo de imagem em um animal com hepatite E aguda. (C-D) Oito ou mais células infectadas pelo HEV (→) por campo de imagem em um animal com hepatite E crônica. Vírus da hepatite E em verde, núcleo marcado com DAPI e matriz extracelular e hemácias coradas com azul de Evans em vermelho.

4.1.2. Achados histológicos da medula óssea

Os principais achados histológicos da MO foram a presença de vacuolizações citoplasmáticas em células com características sugestivas de endósteo, inclusões virais em células mononucleares (Figura 4.3 A-D) e ausência de infiltrados inflamatórios.

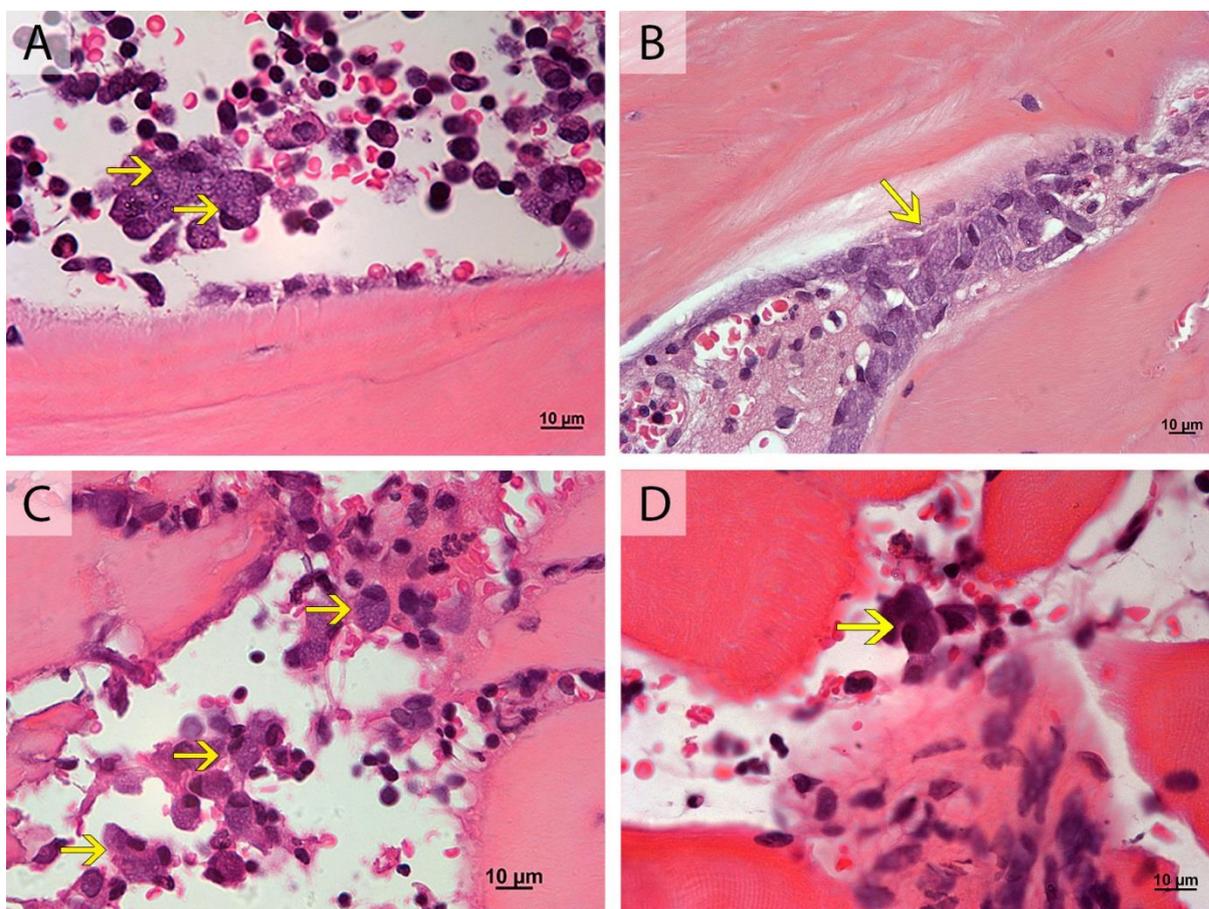


Figura 4.3. Principais achados histológicos da medula óssea de macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais

(A-B) Imagens demonstrando a presença de vacuolizações em células de endósteo (→). (C-D) Presença de inclusões virais em células mononucleares (→). (A-B) animal AE3, (C) animal AC11 e (D) animal AE6

Áreas de ativação e proliferação linfocitárias e megacariocitose (≥ 5 megacariócitos/campo de imagem) foram observadas em um único animal (AE3), portador de hepatite E aguda (Figura 4.4 A-B). Nos demais animais, não foram visualizados infiltrados inflamatórios ou megacariocitose (Figura 4.4 C-D). Estas alterações também não foram observadas nos animais pré-inoculação viral (T0).

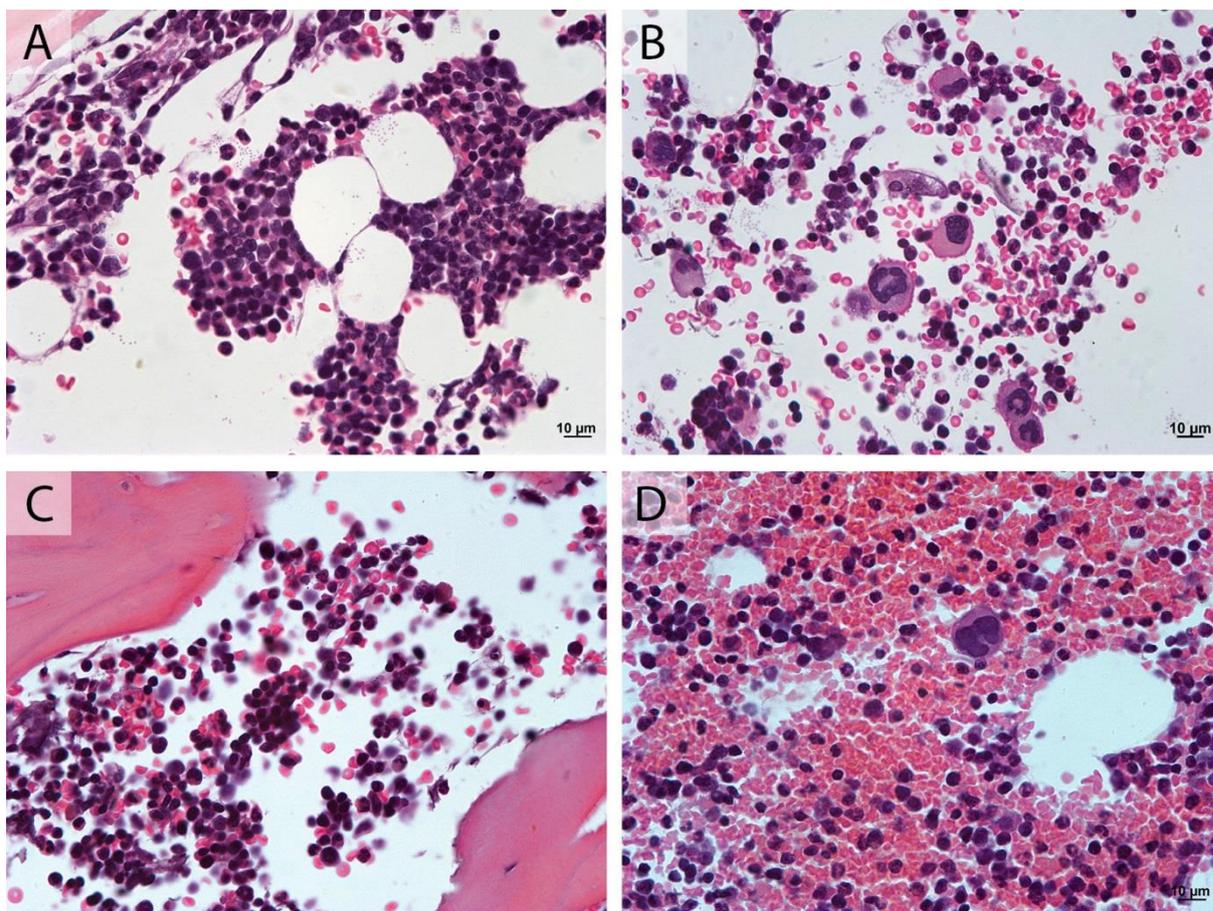


Figura 4.4. Demais achados histológicos da medula óssea de macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais

(A) Área de ativação e proliferação linfocitária. (B) Megacariocitose (≥ 5 megacariócitos/campo de imagem). (C) Ausência células inflamatórias organizadas em infiltrados. (D) Ausência de megacariocitose (0-2 megacariócitos/campo de imagem) (A-B) animal AE3 e (C-D) animal V12

Todos os 4 animais (AE6 AE3, AC11 e AD8) positivos para a detecção do HEV Ag, apresentaram alterações medulares. Em um animal (AC11), não foi possível avaliar a megacariocitose no exíguo fragmento (Quadro 4.3).

Quadro 4.3. Alterações histológicas e detecção do antígeno do HEV na medula óssea dos macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais

	<i>Megacariocitose</i>	<i>Áreas de ativação e proliferação linfocitária</i>	<i>Inclusões/vacuolizações citoplasmáticas</i>	<i>Deteção do HEV Ag</i>
<i>Animais com hepatite E crônica</i>				
AB19	-	-	-	-
AE6	-	-	+	+
<i>Animais com hepatite E aguda</i>				
V12	-	-	-	-
AC11	NR	-	+	+
AE3	+	+	+	+
AD8	-	-	+	+

HEV Ag: antígeno do HEV; NR: não realizado (pequena área disponível para análise); (+) positivo/presente; (-) negativo/ausente

A presença de um estroma medular bastante conformacionado e de aspecto fibrilar foi observado na maioria dos animais deste estudo, antes (T0) e após (T1) a inoculação viral (Figura 4.5 A-B).

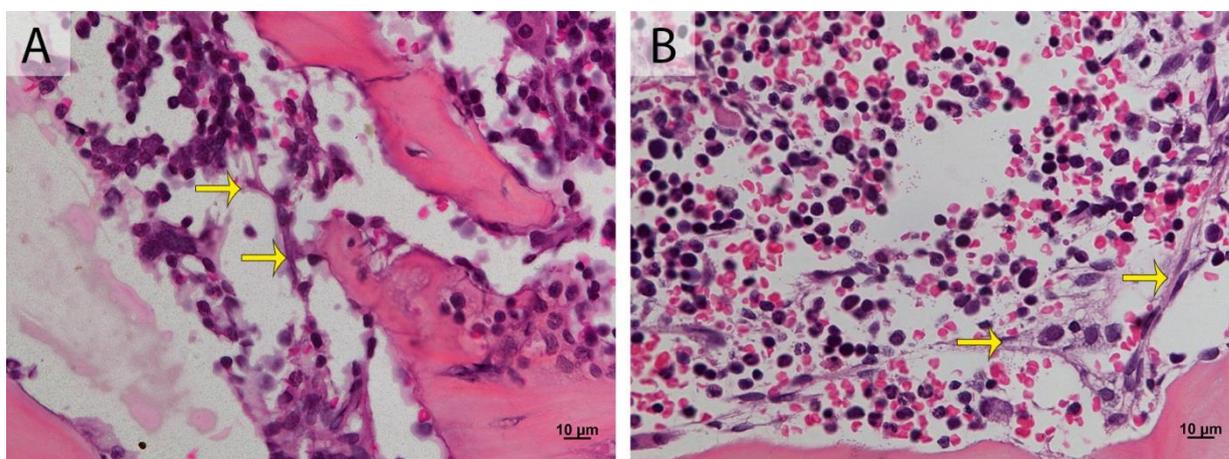


Figura 4.5 Aspecto fibrilar da medula óssea de macacos cynomolgus com hepatite E aguda e crônica experimentais

(A) Aspecto fibrilar (→) do estroma medular de animais pré-inoculação viral. (B) Aspecto fibrilar do estroma medular de animais pós-inoculação viral.

4.2. Animal com hepatite E naturalmente adquirida

4.2.1. Soroconversão de IgG anti-HEV

O animal naturalmente infectado apresentou uma soroconversão de IgG anti-HEV entre os anos de 2015 e 2016 com um acentuado aumento da concentração deste anticorpo em julho de 2017 (Figura 4.6) (Apêndice B).

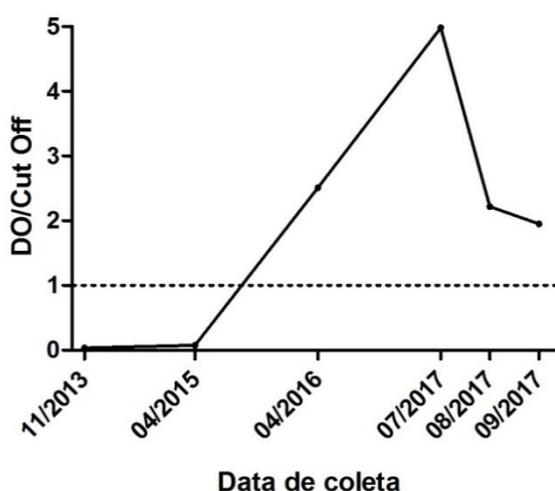


Figura 4.6. Níveis de anticorpos IgG anti-HEV, entre os anos de 2013 e 2017, do macaco cynomolgus com hepatite E naturalmente adquirida

As amostras com razão DO/cutoff acima de 1,0 foram consideradas positivas.

4.2.2. Detecção do genoma viral por RT-PCR e qRT-PCR

Utilizando o protocolo descrito por Huang e colaboradores (2002), um fragmento de 342 pares de bases (pb) da região da ORF2, foi detectado na amostra de soro coletada em julho/2017. Como controle positivo da reação, este mesmo fragmento foi amplificado em uma amostra comprovadamente positiva para o HEV. O controle negativo (água RNase free) não apresentou banda, demonstrando que não houve contaminação da reação. Um padrão de peso molecular de 100 pb foi utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. As bandas observadas no gel de agarose possuíam tamanho condizente ao esperado (342 pb). As demais amostras de soro e a amostra de fezes coletada em setembro/2017 foram negativas pela nested RT-PCR. Das amostras negativas, apenas a de agosto/2017 foi positiva pela qRT-PCR, apresentando um Ct de 34.58.

4.2.4. Análise das transaminases hepáticas

Assim que o animal AC10 foi diagnosticado com o HEV, uma nova amostra de soro (setembro/2017) foi coletada e enviada para avaliação das transaminases hepáticas ALT e AST. A análise revelou valores de ALT e AST dentro da normalidade para a espécie, sendo eles, respectivamente de: 27 e 59 UI/L.

4.2.5. Detecção do antígeno viral por imunofluorescência indireta

O HEV Ag foi detectado na MO por imunomarcacão com anticorpo específico anti-HEV. O mesmo padrão de marcação perinuclear e perimembranar com aspecto puntiforme foi observado neste animal (Figura 4.8 A) e não foi observado em um animal não infectado pelo HEV (Figura 4.8 B). Em razão da ausência de marcação do núcleo celular, não é possível sugerir, neste animal, o tipo de célula infectada pelo HEV.

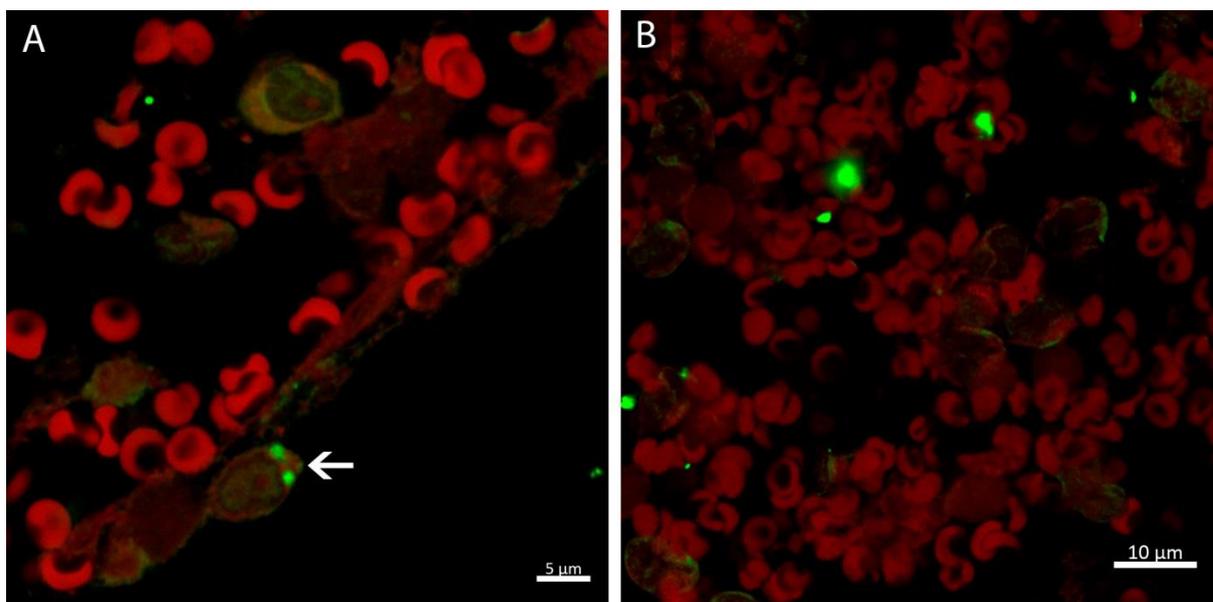


Figura 4.8. Detecção do antígeno do HEV em células da medula óssea do macaco cynomolgus com hepatite E naturalmente adquirida

(A) Célula infectada pelo HEV (→) em um animal naturalmente infectado. (B) Ausência de infecção pelo HEV em um animal saudável. Vírus da hepatite E em verde e matriz extracelular e hemácias coradas com azul de Evans em vermelho.

Os resultados obtidos na análise sorológica, molecular e na imunomarcacão foram sintetizados no Quadro 4.4.

Quadro 4.4. Síntese da detecção do marcador sorológico anti-HEV, do HEV RNA no soro e nas fezes e do antígeno do HEV na medula óssea do macaco cynomolgus com hepatite E naturalmente adquirida

11/2013	04/2015	04/2016	07/2017	08/2017	09/2017
Soro	Soro	Soro	Soro	Soro	Soro
IgG -	IgG -	IgG +	IgG +	IgG +	IgG +
	HEV RNA -	HEV RNA -	HEV RNA +	HEV RNA +	HEV RNA -
			Biópsia MO		Fezes
			HEV Ag +		HEV RNA -

(-): negativo/ausente; (+): positivo/presente; MO: medula óssea; HEV Ag: antígeno do HEV; valores de DO/CO da IgG anti-HEV podem ser conferidas no apêndice B deste trabalho

4.2.6. Achados histológicos da medula óssea

Na análise histológica, não foram observadas alterações medulares. Entretanto, um padrão intensamente fibrilar do estroma medular foi observado (Figura 4.9 A-B).

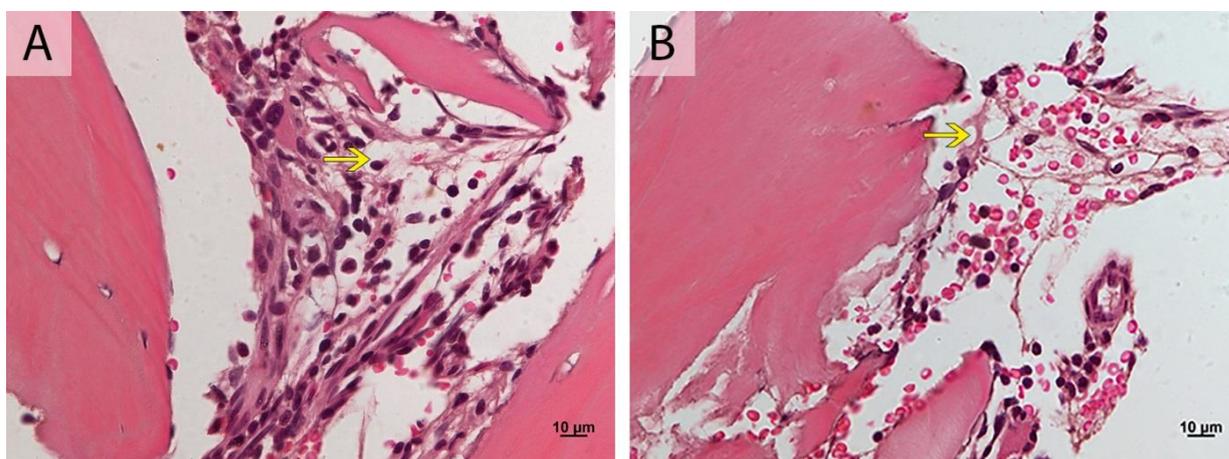


Figura 4.9. Aspecto fibrilar da medula óssea do macaco cynomolgus com hepatite E naturalmente adquirida

5. DISCUSSÃO

No Brasil, o padrão epidemiológico da hepatite E é semelhante aos dos países desenvolvidos, com circulação do HEV-3 entre humanos e suínos (Lopes Dos Santos *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2011). Até o momento, sabe-se que, aproximadamente 60% dos indivíduos no pós-transplante de órgãos sólidos, que se infectam com HEV-3, evoluem para a forma crônica da doença (Kamar *et al.*, 2011). O risco é aumentado em indivíduos em terapia imunossupressora com o tacrolimo (Kamar *et al.*, 2011; Gardinali *et al.*, 2017). O tacrolimo é um potente imunossupressor do grupo dos inibidores de calcineurina e é empregado rotineiramente no pós-transplante de órgãos sólidos (Scott *et al.*, 2003; Kamar *et al.*, 2011). Seu mecanismo de ação envolve redução moderada da ativação e principalmente polarização de monócitos e linfócitos (Scott *et al.*, 2003; Kannegieter *et al.*, 2017).

O presente estudo demonstrou a presença do antígeno do HEV (HEV Ag) na medula óssea (MO) de PNH, nos cursos agudo e crônico experimentais da HE, e na infecção natural, além de alterações histológicas associadas. Estes achados demonstram que muitos aspectos relacionados à patogenia e vias de transmissão do HEV ainda não são muito bem conhecidos. A detecção do HEV RNA e a caracterização da replicação viral nas biópsias de MO a partir da identificação do intermediário replicativo não foram possíveis pela quantidade exígua de material coletado.

A detecção do HEV Ag em células da MO corrobora com a transmissão do HEV transfusional e alerta para a possibilidade de transmissão pelo transplante de MO. Contudo, a via de infecção medular, até o momento, não foi confirmada (Mirazo *et al.*, 2014; Pischke *et al.*, 2016). É importante ressaltar que, para as hepatites A, B e C, a transmissão transfusional para pacientes imunocomprometidos agrava a condição clínica do paciente (Kawatani *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2016).

A triagem de HEV RNA em doadores de sangue é realizada na Irlanda desde 2016 e na Inglaterra, Países Baixos e Escócia desde 2017. A França e a Alemanha realizam, desde 2013 e 2016, respectivamente, uma triagem para HEV RNA em bancos de sangue e de plasma, apenas para a sua utilização em pacientes de alto risco (indivíduos com hepatite crônica, imunocomprometidos e gestantes). Suíça,

Grécia, Itália, Portugal e Espanha estão avaliando o processo. A Dinamarca decidiu não adotar o programa (Domanovic *et al.*, 2017; Izopet *et al.*, 2017).

Apesar da baixa incidência de hepatite E aguda no pós-transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (CTH), um alto risco de desenvolvimento de hepatite E crônica, com posterior evolução para insuficiência hepática, cirrose ou, até mesmo, para o óbito, foi associado à infecção pelo HEV nestes indivíduos (Versluis *et al.*, 2013; Jaber *et al.*, 2014). Entretanto, a triagem do HEV em doadores e receptores de CTH ainda não é um procedimento universal, apesar de ter sido recomendado por inúmeros autores (Versluis *et al.*, 2013; Jaber *et al.*, 2014; Koenecke *et al.*, 2014; Frange *et al.*, 2015). Os nossos resultados reforçam a necessidade desta triagem, uma vez que, neste estudo, o HEV Ag foi identificado na MO de 5 dos 7 animais (71,4%), sendo um natural e quatro experimentalmente infectados. Além disso, a transmissão do vírus para o receptor pode ser uma condição potencialmente fatal em pacientes imunocomprometidos. Casos letais de infecção pelo HEV após o transplante de CTH foram relatados (Versluis *et al.*, 2013).

Outro achado relevante foi a frequência elevada de células medulares infectadas (células HEV Ag positivas) nos PNH com hepatite E crônica, contrastando com uma frequência menor de detecção de células imunomarcadas nos animais com hepatite E aguda. A desativação de células do sistema imune pelo tacrolimo justifica a persistência viral medular (Scott *et al.*, 2003; Kannegieter *et al.*, 2016; Kannegieter *et al.*, 2017).

Os achados histológicos na MO caracterizados por núcleo periférico com cromatina frouxa, nucléolo central proeminente e cromatina densa das células HEV Ag positivas, juntamente com a localização das mesmas, sugerem que as células-alvo do HEV sejam células imaturas da linhagem mieloide conforme descrito para outros vírus hepatotrópicos (Sing *et al.*, 1993; Pham e Michalak, 2008; Hatipoglu *et al.*, 2014). Este achado coincide com o estudo que demonstra a presença de pacientes soronegativos para o HEV que desenvolveram hepatite E no pós-transplante alogênico de CTH (Versluis *et al.*, 2013). Além disso, a presença do vírus na MO de um doador de CTH infectado pelo HEV já alertava sobre esse fato (Koenecke *et al.*, 2014). Também foram observadas, em menor expressão, células imunomarcadas com características morfológicas (núcleo de cromatina frouxa e nucléolo não tão proeminente) que apontam para células mesenquimais (Ma *et al.*, 2011).

Na análise histológica, não foi constatada características de mielite ou osteomielite, como: infiltrados linfocitários, lesão de osso e infiltração neutrofílica. Entretanto, alterações morfológicas da hematopoese secundárias a infecção viral foram observadas, entre elas: vacuolização de endóstio e inclusões virais citoplasmáticas. Outras alterações medulares, como megacariocitose e áreas de ativação e proliferação linfocitárias, também foram observadas, porém em um único animal (AE3). Megacariocitose, diseritropoese e fibrose medular foram descritas em um indivíduo em tratamento prolongado (5 anos) com o tacrolimo (Yang *et al.*, 2015). O animal AE3 foi submetido a um período de imunossupressão com o tacrolimo, entretanto o mesmo foi menor (58 dias), quando comparado aos animais que evoluíram para a forma crônica da doença (149 dias) (Gardinali *et al.*, 2017).

Notou-se um aspecto fibrilar da MO, devido a presença de um estroma mais conformacionado, na maioria dos animais, antes e após a imunossupressão e a inoculação viral, e também no animal naturalmente infectado. Estes achados sugerem um padrão medular comum à espécie *Macaca fascicularis*.

Outros relatos demonstraram pacientes humanos com hepatite aguda e aplasia medular severa associadas à detecção do DNA do B19V em biópsias da MO (Weiler-Normann *et al.*, 2018). Aplasia medular também foi descrita em casos de hepatites virais (Safadi *et al.*, 2001; Rauff *et al.*, 2011). Além disso, a infecção da MO com o HBV, HCV, CMV e EBV foi associada ao aumento do risco de linfoma entre a população egípcia. No entanto, os mecanismos pelos quais a hepatite viral crônica pode contribuir para a linfomagenese não estão claros (Kadry *et al.*, 2016). Neste estudo, todos os animais envolvidos eram clinicamente saudáveis e com valores hematológicos do sangue periférico dentro dos parâmetros da normalidade para a espécie (Gardinali *et al.*, 2017).

A infecção crônica pelo HEV em humanos é definida pela persistência da replicação viral por mais de três meses — identificada pela detecção do HEV em fragmentos hepáticos, soro e fezes (Kamar *et al.*, 2013). Pela interpretação dos nossos dados laboratoriais (ausência de RNA viral nas fezes, baixos níveis de transaminases hepáticas, elevado título de IgG anti-HEV e HEV RNA detectável no soro) trata-se de uma infecção natural recente. Abordagens mais invasivas foram consideradas desnecessárias, uma vez que a reatividade sérica ao HEV e a detecção do RNA viral no soro é suficiente para o diagnóstico da hepatite E (Nakamura *et al.*, 2012).

Em geral, o período de viremia em macacos cynomolgus é de 20 a 30 dias (Aggarwal *et al.*, 2001; Gardinali *et al.*, 2017). A soroconversão de IgG anti-HEV entre os anos de 2015 e 2016 e a detecção de HEV RNA em 2017 pode sugerir a persistência da infecção pelo HEV, de modo semelhante ao observado em um macaco japonês (*Macaca fuscata*) naturalmente infectado, sem evidências de imunossupressão, em uma colônia de primatas no Japão (Yamamoto *et al.*, 2012). A não detecção do HEV RNA na amostra de 2016 poderia ser explicada pela baixa carga viral, o longo período de armazenamento e a ocorrências de ciclos de congelamento/descongelamento da amostra até o momento do teste (amostra obtida retrospectivamente). Outra hipótese plausível é a reativação do HEV, descrita apenas em humanos até o momento (Le Coutre *et al.*, 2009; Rivero-Juarez *et al.*, 2017). Em PNH infectados pelo HEV experimentalmente, a imunossupressão após a infecção aguda não foi capaz de provocar a reativação viral (Gardinali *et al.*, 2017).

Apenas por esses dados não conseguimos garantir que a MO possa ser um local de persistência viral em condições naturais de infecção. Apenas estudos de longo prazo podem sustentar esta hipótese. Experimentalmente, o HEV Ag foi observado em células da MO 160 dpi, tanto em animais portadores hepatite E aguda (resposta virológica sustentada a partir de 69 dpi), como nos animais portadores de hepatite E crônica (detecção do HEV RNA em soro, fezes e fragmentos hepáticos até 160 dpi). Estes achados sugerem a MO como sítio de persistência do vírus no organismo.

A infecção natural pelo HEV já foi relatada em colônias de PNH. Estudos realizados no Japão demonstraram a ocorrência de infecção natural em animais pertencentes a duas colônias do país (Nakamura *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2012). Em uma delas, a prevalência de IgG anti-HEV alcançou 78,5% durante o auge de um surto de hepatite E (Yamamoto *et al.*, 2012). Em macacos de vida livre, a infecção natural pelo HEV foi descrita na Índia e no Japão. Na Índia a prevalência de IgG anti-HEV foi de 36,7%, 19,1% e 2%, respectivamente, em *M. mulatta*, *M. radiata* e *Presbytes entellus* (Arankalle *et al.*, 1994). No Japão, a soroprevalência foi de 36,2%, 10,5% e 3,6%, respectivamente, em *M. fuscata*, *M. fascicularis* e *M. mullata* (Hirano *et al.*, 2003). No Brasil, não existem estudos de soroprevalência em macacos de vida livre ou de colônias.

A análise pelo BLAST revelou uma identidade nucleotídica de 99% entre a sequência obtida neste estudo e as sequências dos animais experimentalmente

infectados pelo HEV e de 90-91% com sequências de suínos de fazendas do Mato Grosso (Da Costa Lana *et al.*, 2014; Gardinali *et al.*, 2017). Mesmo com fortes evidências, não é possível afirmar a origem da contaminação devido ao tamanho reduzido (302 pb) do fragmento analisado. Desta forma, todas as formas de contaminação do HEV em colônias de PNH devem ser avaliadas como apontado por outros autores (Nakamura *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2012).

Primeiramente, deve-se levar em consideração que se trata de uma colônia *outdoor*, na qual os recintos possuem uma área externa cercada com grades de ferro galvanizado e telas. Entretanto, reservatórios naturais do HEV, como saguis e pequenos roedores circulam nas áreas próximas à colônia. Os setores da experimentação animal e da colônia de primatas possuem funcionários exclusivos, não sendo permitida a circulação dos mesmos entre as diferentes áreas. Entretanto, quebras nas barreiras de biossegurança podem acontecer (Yamamoto *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2015). O homem atuando como vetor da transmissão do HEV foi sugerido por Yamamoto e colaboradores durante um surto de hepatite E em uma colônia de primatas no Japão. Uma prevalência de IgG anti-HEV entre os tratadores de 11,8% foi observada no auge do surto, mas com ausência de detecção de IgM anti-HEV e HEV RNA (Yamamoto *et al.*, 2012). Para este estudo, não foi possível realizar a coleta de amostras dos participantes do experimento e dos tratadores.

De acordo com os testes sorológicos, a infecção do animal ocorreu entre maio de 2015 e abril de 2016, ou seja, pelo menos três meses após o final do estudo experimental. Assim, é possível que a contaminação possa ter ocorrido devido a algum erro na gestão de resíduos da área experimental, uma vez que a principal forma de transmissão de HEV é pela via fecal-oral. Finalmente, a contaminação por infecção cruzada por seres humanos ou por fômites não pode ser excluída, uma vez que o fragmento analisado é pequeno e não há um estudo abrangente sobre a caracterização de cepas moleculares no estado.

6. CONCLUSÕES

- A infecção pelo vírus da hepatite E em células da medula óssea ocorre sob condições experimentais e naturais.
- Nossos dados fortalecem a hipótese da medula óssea como local de persistência viral em indivíduos portadores de hepatite E, sendo, potencialmente, a linhagem mielóide a principal população alvo, porém, não descartando a linhagem mesenquimal como um sítio secundário de persistência.
- O vírus da hepatite E é capaz de produzir inclusões citoplasmáticas em células mononucleares na medula óssea de macacos cynomolgus.
- Alterações morfológicas da hematopoese, secundárias a infecção viral, foram observadas apenas nos animais experimentalmente infectados pelo HEV.

7. PERSPECTIVAS

- Caracterizar fenotipicamente a célula-alvo do HEV na medula óssea, assim como, comprovar a ocorrência de replicação viral por detecção do intermediário replicativo, em cultivo primário de células da medula óssea.
- Investigar a possível transmissão do HEV pelo transplante alogênico de medula óssea.
- Realizar uma triagem sorológica anti-HEV na colônia de primatas do ICTB/Fiocruz.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAVANEL, F. *et al.* Low risk of hepatitis E virus reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. **J Clin Virol**, v. 54, n. 2, p. 152-5, Jun 2012. ISSN 1386-6532.

AGGARWAL, R. *et al.* Experimental studies on subclinical hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques. **J Infect Dis**, v. 184, n. 11, p. 1380-1385, 2001. ISSN 0022-1899.

_____. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.356, 2000. p.1081-1082. ISBN 0140-6736.

AGGARWAL, R.; KRAWCZYNSKI, K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 1, p. 9-20, 2000. ISSN 0815-9319 (Print)0815-9319.

AHMAD, I.; HOLLA, R. P.; JAMEEL, S. Molecular virology of hepatitis E virus. **Virus Res**, v. 161, n. 1, p. 47-58, Oct 2011. ISSN 0168-1702.

ARANKALLE, V. A.; GOVERDHAN, M. K.; BANERJEE, K. Antibodies against hepatitis E virus in Old World monkeys. **J Viral Hepat**, v. 1, n. 2, p. 125-9, 1994. ISSN 1352-0504.

AYE, T. T. *et al.* Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 13, p. 3512, Jul 11 1992. ISSN 0305-1048.

BALAYAN, M. S. *et al.* Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. **Intervirology**, v. 20, n. 1, p. 23-31, 1983. ISSN 0300-5526.

BARRAGUE, H. *et al.* Chronic hepatitis E virus infection in a cirrhotic patient: A case report. **Medicine (Baltimore)**, v. 96, n. 39, p. e7915, 2017. ISSN 0025-7974.

BAYLIS, S. A. *et al.* Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 1234-9, Apr 2011. ISSN 0095-1137.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008. ISSN 1875-9777.

BLASCO-PERRIN, H. *et al.* Hepatitis E, the neglected one. **Liver Int**, v. 36 Suppl 1, p. 130-4, Jan 2016. ISSN 1478-3223.

BORENTAIN, P. *et al.* Hepatocellular carcinoma complicating hepatitis E virus-related cirrhosis. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 446-448, 2018. ISSN 0270-9139.

BORTOLIERO, A. L. *et al.* Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, State of Parana, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 48, n. 2, p. 87-92, 2006. ISSN 0036-4665.

- BOSE, P. D. *et al.* Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. **J Gen Virol**, v. 95, n. Pt 6, p. 1266-1271, 2014. ISSN 0022-1317.
- BOUAMRA, Y. *et al.* Emergence of autochthonous infections with hepatitis E virus of genotype 4 in Europe. **Intervirology**, v. 57, n. 1, p. 43-48, 2014. ISSN 0300-5526.
- BUTI, M. *et al.* Hepatitis E virus infection in acute hepatitis in Spain. **J Virol Methods**, v. 55, n. 1, p. 49-54, 1995. ISSN 0166-0934.
- CALVI, L. M.; LINK, D. C. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. **Blood**, v. 126, n. 22, p. 2443-51, Nov 26 2015. ISSN 0006-4971.
- CARUSO, C. *et al.* Hepatitis E Virus: A Cross-Sectional Serological and Virological Study in Pigs and Humans at Zoonotic Risk within a High-Density Pig Farming Area. **Transbound Emerg Dis**, 2016. ISSN 1865-1674.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Investigation of hepatitis E outbreak among refugees - Upper Nile, South Sudan, 2012-2013. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 62, n. 29, p. 581-6, 2013. ISSN 0149-2195.
- _____. Centers for Disease Control and Prevention | Hepatitis E. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dotw/hepatitis-e/index.html>>.
- CHEN, J. Y. *et al.* Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. **Nature**, v. 530, n. 7589, p. 223, 2016-02-10 2016. ISSN 1476-4687/1476-4687.
- COLSON, P. *et al.* Transfusion-associated hepatitis E, France. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 4, p. 648-649, 2007. ISSN 1080-6040.
- DA COSTA LANA, M. V. *et al.* Evaluation of hepatitis E virus infection between different production systems of pigs in Brazil. **Trop Anim Health Prod**, v. 46, n. 2, p. 399-404, 2014. ISSN 0049-4747.
- DA SILVA, S. G. *et al.* A Rare Case of Transfusion Transmission of Hepatitis A Virus to Two Patients with Haematological Disease. **Transfus Med Hemother**, v. 43, n. 2, p. 137-41, 2016. ISSN 1660-3796 (Print)1660-3796.
- DALTON, H. R. *et al.* Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. In: (Ed.). **N Engl J Med**. United States, v.361, 2009. p.1025-7. ISBN 1533-4406.
- _____. The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 26, n. 10, p. 1429-35, 2007. ISSN 0269-2813 (Print)0269-2813.
- _____. Hepatitis E Virus: Time to Change the Textbooks. **Dig Dis**, v. 34, n. 4, p. 308-16, 2016. ISSN 0257-2753.
- DAO THI, V. L. *et al.* Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Additive Effect When Combined With Ribavirin. **Gastroenterology**, v. 150, n. 1, p. 82-85, 2016. ISSN 0016-5085.

- DAWSON, G. J. *et al.* Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveller to Pakistan. **Lancet**, v. 340, n. 8816, p. 426-7, 1992. ISSN 0140-6736.
- DAZZI, F. *et al.* The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. **Blood Rev**, v. 20, n. 3, p. 161-171, 2006. ISSN 0268-960X.
- DE ALMEIDA RAMOS, D. *et al.* Production and characterization of a Brazilian candidate antigen for Hepatitis E Virus genotype 3 diagnosis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 363, n. 5, 2016. ISSN 0378-1097.
- DE CARVALHO, L. G. *et al.* Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 495, Oct 23 2013. ISSN 1471-2334.
- DE SOUZA, A. J. *et al.* HEV infection in swine from Eastern Brazilian Amazon: evidence of co-infection by different subtypes. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 35, n. 5, p. 477-85, 2012. ISSN 0147-9571.
- DEBING, Y. *et al.* A mutation in the hepatitis E virus RNA polymerase promotes its replication and associates with ribavirin treatment failure in organ transplant recipients. **Gastroenterology**, v. 147, n. 5, p. 1008-10 11, 2014. ISSN 0016-5085.
- _____. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. **J Hepatol**, Mar 8 2016. ISSN 0168-8278.
- DI PROFIO, F. *et al.* Detection and genetic characterization of hepatitis E virus (HEV) genotype 3 subtype c in wild boars in Italy. **Arch Virol**, 2016. ISSN 0304-8608.
- DOMANOVIC, D. *et al.* Hepatitis E and blood donation safety in selected European countries: a shift to screening? **Euro Surveill**, v. 22, n. 16, 2017.
- DOS SANTOS, D. R. *et al.* Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. **Vet Microbiol**, v. 149, n. 1-2, p. 236-41, 2011. ISSN 0378-1135.
- DRUMMOND, A. J. *et al.* Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Mol Biol Evol**, v. 29, n. 8, p. 1969-73, 2012. ISSN 0737-4038.
- ECHEVARRIA, J. M. *et al.* Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. **J Med Virol**, v. 85, n. 6, p. 1037-45, 2013. ISSN 0146-6615.
- EMERSON, S. U. *et al.* ORF3 Protein of Hepatitis E Virus Is Not Required for Replication, Virion Assembly, or Infection of Hepatoma Cells In Vitro. 2006.
- EMERSON, S. U.; PURCELL, R. H. Hepatitis E virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. In: (Ed.). **Fields virology**.: 5^a Ed., v.2, 2006. p.3047-58.
- FRANGE, P. *et al.* Hepatitis E virus in hematopoietic stem cell donors: Towards a systematic HEV screening of donors? **J. Infect.**, v. 71, n. 1, p. 141-4, 2015.
- FREITAS, N. R. D. *et al.* Hepatitis E seroprevalence and associated factors in rural settlers in Central Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 50, n. 5, p. 675-679, 2017. ISSN 0037-8682.

- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; V., P. K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. 1966.
- GARDINALI, N. R. *et al.* Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds. **Res Vet Sci**, v. 93, n. 3, p. 1515-9, 2012. ISSN 0034-5288.
- _____. Cynomolgus monkeys are successfully and persistently infected with hepatitis E virus genotype 3 (HEV-3) after long-term immunosuppressive therapy. **PLoS One**, v. 12, n. 3, 2017. ISSN 1932-6203.
- GENG, Y.; WANG, Y. Transmission of Hepatitis E Virus. **Adv Exp Med Biol**, v. 948, p. 89-112, 2016. ISSN 0065-2598.
- GENG, Y. *et al.* Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. **Hepat Mon**, v. 14, n. 1, 2014. ISSN 1735-143X.
- _____. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. **J Hepatol**, v. 64, n. 1, p. 37-43, 2016. ISSN 0168-8278.
- GEROLAMI, R.; MOAL, V.; COLSON, P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. In: (Ed.). **N Engl J Med**. United States, v.358, 2008. p.859-60. ISBN 1533-4406 (Electronic)0028-4793 (Linking).
- GRAFF, J. *et al.* A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. **J Virol**, v. 80, n. 12, p. 5919-5926, 2006. ISSN 0022-538X.
- HAAGSMA, E. B. *et al.* Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. **Liver Transpl**, v. 14, n. 4, p. 547-553, 2008. ISSN 1527-6465.
- HALAC, U. *et al.* Cirrhosis due to chronic hepatitis E infection in a child post-bone marrow transplant. **J. Pediatr.**, v. 160, n. 5, p. 871-874, 2012.
- HATIPOGLU, I. *et al.* Hepatitis B virus e antigen (HBeAg) may have a negative effect on dendritic cell generation. **Immunobiology**, v. 219, n. 12, p. 944-9, 2014. ISSN 0171-2985.
- HAUSTEIN, S. V. *et al.* Nonhuman primate infections after organ transplantation. **ilar j**, v. 49, n. 2, p. 209-219, 2008. ISSN 1084-2020.
- HELDT, F. H. *et al.* Hepatitis E Virus in Surface Water, Sediments, and Pork Products Marketed in Southern Brazil. **Food Environ Virol**, May 12 2016.
- HERING, T. *et al.* Past and current hepatitis E virus infection in renal transplant patients. **J Med Virol**, v. 86, n. 6, p. 948-953, 2014. ISSN 0146-6615.
- HIRANO, M. *et al.* Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). **Jpn J Infect Dis**, v. 56, n. 1, p. 8-11, 2003. ISSN 1344-6304.
- HOLLA, R. P. *et al.* Molecular virology of hepatitis E virus. **Semin Liver Dis**, v. 33, n. 1, p. 3-14, 2013. ISSN 0272-8087.

- HUANG, F. *et al.* Rhesus macaques persistently infected with hepatitis E shed virus into urine. **J Hepatol**, v. 64, n. 6, p. 1446-7, 2016. ISSN 0168-8278.
- HUANG, F. F. *et al.* Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 4, p. 1326-32, 2002. ISSN 0095-1137.
- IZOPET, J. *et al.* HEV and transfusion-recipient risk. **Transfus Clin Biol**, v. 24, n. 3, p. 176-181, 2017. ISSN 1246-7820.
- JABER, M. *et al.* Hepatitis E virus seroprevalence before hematopoietic SCT: a pediatric experience. **Bone Marrow Transplant.**, Bone Marrow Transplant, v. 49, n. 6, p. 857-8, 2014.
- JANSEN, J. *et al.* Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 1, p. 37-50, 2005. ISSN 1582-1838 (Print)1582-1838.
- JOTHIKUMAR, N. *et al.* A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. **J Virol Methods**, v. 131, n. 1, p. 65-71, Jan 2006. ISSN 0166-0934 (Print)0166-0934.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **In: Histologia Básica - 12ª Ed.** Guanabara Koogan, 2013. 238-250.
- KADRY, D. Y. *et al.* Association of Viral Infections with Risk of Human Lymphomas, Egypt. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 4, p. 1705-1712, 2016 2016. ISSN 1513-7368.
- KAMAR, N. *et al.* Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. **Gastroenterology**, v. 140, n. 5, p. 1481-9, 2011. ISSN 0016-5085.
- _____. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. **Am J Transplant**, v. 10, n. 5, p. 1321-4, 2010. ISSN 1600-6135.
- _____. Hepatitis E virus infection. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17086, 2017. ISSN 2056-676x.
- _____. Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. **Am J Transplant**, v. 8, n. 8, p. 1744-8, Aug 2008. ISSN 1600-6135.
- _____. Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 5, p. 30-3, 2010. ISSN 1058-4838.
- _____. Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis e virus infection. **Gastroenterology**, v. 139, n. 5, p. 1612-8, 2010. ISSN 0016-5085.
- _____. How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? **Am J Transplant**, v. 13, n. 7, p. 1935-6, 2013. ISSN 1600-6135.

_____. Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. **N Engl J Med**, 2008.

KANNEGIETER, N. M. *et al.* The Effect of Tacrolimus and Mycophenolic Acid on CD14+ Monocyte Activation and Function. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170806, 2017. ISSN 1932-6203.

_____. Conversion to Once-Daily Tacrolimus Results in Increased p38MAPK Phosphorylation in T Lymphocytes of Kidney Transplant Recipients. **Ther Drug Monit**, v. 38, n. 2, p. 280-4, 2016. ISSN 0163-4356.

KAWATANI, T. *et al.* Incidence of hepatitis virus infection and severe liver dysfunction in patients receiving chemotherapy for hematologic malignancies. **Eur J Haematol**, v. 67, n. 1, p. 45-50, 2001. ISSN 0902-4441 (Print)0902-4441.

KENNEY, S. P.; MENG, X. J. Identification and fine mapping of nuclear and nucleolar localization signals within the human ribosomal protein S17. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124396, 2015. ISSN 1932-6203.

KHUROO, M. S. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *The American Journal of Medicine*, 1980.

_____. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. **Virus Res**, v. 161, n. 1, p. 3-14, 2011. ISSN 0168-1702.

KHUROO, M. S.; KAMILI, S. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. **J Viral Hepat**, v. 16, n. 7, p. 519-23, 2009. ISSN 1352-0504.

KHUROO, M. S.; KAMILI, S.; JAMEEL, S. Vertical transmission of hepatitis E virus. **Lancet**, v. 345, n. 8956, p. 1025-6, 1995. ISSN 0140-6736.

KINUGASA, F. *et al.* Efficacy of oral treatment with tacrolimus in the renal transplant model in cynomolgus monkeys. **J Pharmacol Sci**, v. 108, n. 4, p. 529-34, Dec 2008. ISSN 1347-8613.

KOENECKE, C. *et al.* Hepatitis E virus infection in a hematopoietic stem cell donor. In: (Ed.). **Bone Marrow Transplant**. England, v.49, 2014. p.159-60. ISBN 1476-5365

KORKAYA, H. *et al.* The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. **J Biol Chem**, v. 276, n. 45, p. 42389-400, Nov 9 2001. ISSN 0021-9258.

KRAIN, L. J. *et al.* Fetal and neonatal health consequences of vertically transmitted hepatitis E virus infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 2, p. 365-70, 2014. ISSN 0002-9637.

KRAWCZYNSKI, K. Antigens and antibodies of hepatitis E virus infection in experimental primate models and man. *Viral hepatitis and liver disease*, 1991.

- KRAWCZYNSKI, K.; MENG, X. J.; RYBCZYNSKA, J. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. **Virus Res**, v. 161, n. 1, p. 78-83, 2011. ISSN 0168-1702.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, v. 33, n. 7, p. 1870-4, 2016. ISSN 0737-4038.
- LE COUTRE, P. *et al.* Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. **Gut**, v. 58, n. 5, p. 699-702, 2009. ISSN 0017-5749.
- LEE, G. H. *et al.* Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. **Gastroenterology**, v. 150, n. 2, p. 355-7, 2016. ISSN 0016-5085.
- LI, S. W. *et al.* The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239. **Hum Vaccin Immunother**, v. 11, n. 4, p. 908-14, 2015. ISSN 2164-5515.
- LI, T. C. *et al.* Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. **Vaccine**, v. 22, n. 3-4, p. 370-7, 2004. ISSN 0264-410X.
- _____. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection. **J Vet Med Sci**, v. 70, n. 12, p. 1359-62, 2008. ISSN 0916-7250.
- LIU, P. *et al.* Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 4, p. 559-65, 2013. ISSN 1080-6040.
- LO IACONO, M. *et al.* Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells as a Feeder Layer for the Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: a Review. **Stem Cell Rev**, v. 13, n. 1, p. 35-49, Feb 2017. ISSN 1550-8943.
- LOCATELLI, F.; STRAHM, B. How I treat myelodysplastic syndromes of childhood. **Blood**, Feb 8 2018. ISSN 0006-4971.
- LOPES DOS SANTOS, D. R. *et al.* First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. **J Clin Virol**, v. 47, n. 3, p. 276-9, 2010. ISSN 1386-6532.
- MA, R. *et al.* Hepatitis B virus infection and replication in human bone marrow mesenchymal stem cells. **Virol J**, v. 8, p. 486, 2011. ISSN 1743-422x.
- MATSUBAYASHI, K. *et al.* Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. **Transfusion**, v. 44, n. 6, p. 934-40, 2004. ISSN 0041-1132.
- MATTHEWS, K. A.; TONSHO, M.; MADSEN, J. C. New-Onset Diabetes Mellitus After Transplantation in a Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*). **Comp Med**, v. 65, n. 4, p. 352-6, 2015. ISSN 1532-0820.

- MAYER, P. Notiz über Hämatein und Häkalaun. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik. v. 20, n. 409, 1903.
- MENG, X. J. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 256-65, 2010. ISSN 0378-1135.
- _____. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. **Virus Res**, v. 161, n. 1, p. 23-30, 2011. ISSN 0168-1702.
- MENG, X. J. *et al.* A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 18, p. 9860-5, 1997. ISSN 0027-8424.
- METCALF, D. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. **Stem Cells**, v. 25, n. 10, p. 2390-5, 2007. ISSN 1066-5099.
- MIRAZO, S. *et al.* Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. **Hepat Med**, v. 6, p. 45-59, 2014. ISSN 1179-1535.
- MONNE, I. *et al.* Hepatitis E virus genotype 4 in a pig farm, Italy, 2013. **Epidemiol Infect**, v. 143, n. 3, p. 529-33, 2015. ISSN 0950-2688.
- MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 327, 2014-01-15 2014. ISSN 1476-4687/1476-4687.
- NAKAMURA, S. *et al.* Epidemiology of hepatitis E virus in indoor-captive cynomolgus monkey colony. **J Vet Med Sci**, v. 74, n. 3, p. 279-83, 2012. ISSN 0916-7250.
- NANDA, S. K. *et al.* Detection of the negative strand of hepatitis E virus RNA in the livers of experimentally infected rhesus monkeys: evidence for viral replication. **J Med Virol**, v. 42, n. 3, p. 237-40, Mar 1994. ISSN 0146-6615.
- NARDONE, R. *et al.* Rodent, large animal and non-human primate models of spinal cord injury. **Zoology (Jena)**, 2017. ISSN 0944-2006.
- OLLIER, L. *et al.* Chronic hepatitis after hepatitis E virus infection in a patient with non-Hodgkin lymphoma taking rituximab. In: (Ed.). **Ann Intern Med**. United States, v.150, 2009. p.430-1. ISBN 1539-3704.
- PANDOLFI, R. *et al.* In house ELISA based on recombinant ORF2 protein underline high prevalence of IgG anti-hepatitis E virus amongst blood donors in south Brazil. **PlosOne**, 2017.
- PARIKH, M. R. *et al.* A three-dimensional tissue culture model to study primary human bone marrow and its malignancies. **J Vis Exp**, n. 85, Mar 8 2014. ISSN 1940-087x.
- PARK, W. J. *et al.* Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen. **J Vet Sci**, v. 17, n. 1, p. 1-11, Mar 2016. ISSN 1229-845x.

PASSOS, A. M. *et al.* First report and molecular characterization of hepatitis E virus infection in renal transplant recipients in Brazil. **J Med Virol**, v. 85, n. 4, p. 615-9, 2013. ISSN 0146-6615.

PASSOS-CASTILHO, A. M. *et al.* Hepatitis E virus seroprevalence among schistosomiasis patients in Northeastern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 20, n. 3, p. 262-6, 2016. ISSN 1413-8670.

_____. High prevalence of hepatitis E virus antibodies in Sao Paulo, Southeastern Brazil: analysis of a group of blood donors representative of the general population. **Braz J Infect Dis**, v. 21, n. 5, p. 535-539, 2017. ISSN 1413-8670.

PAVIO, N.; MENG, X. J.; DOCEUL, V. Zoonotic origin of hepatitis E. **Curr Opin Virol**, v. 10, p. 34-41, 2015. ISSN 1879-6257.

PEREZ-GRACIA, M. T. *et al.* Current Knowledge on Hepatitis E. **J Clin Transl Hepatol**, v. 3, n. 2, p. 117-26, 2015. ISSN 2225-0719.

_____. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 5, p. 893-6, 2007. ISSN 0002-9637.

_____. Hepatitis E: latest developments in knowledge. **Future Microbiol**, 2016. ISSN 1746-0913.

PHAM, T. N.; MICHALAK, T. I. Occult persistence and lymphotropism of hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 18, p. 2789-93, 2008. ISSN 1007-9327

PISCHKE, S. *et al.* Blood-borne Hepatitis E Virus Transmission: A Relevant Risk for Immunosuppressed Patients. In: (Ed.). **Clin Infect Dis**. United States, v.63, 2016. p.569-70. ISBN 1537-6591.

PRASAD, G. S. *et al.* A Study of Hepatitis E in Pregnancy: Maternal and Fetal Outcome. **J Obstet Gynaecol India**, v. 66, n. Suppl 1, p. 18-23, Oct 2016. ISSN 0971-9202.

PSICHOGIOU, M. *et al.* Hepatitis E virus infection in individuals at high risk of transmission of non-A, non-B hepatitis and sexually transmitted diseases. **Scand J Infect Dis**, v. 28, n. 5, p. 443-5, 1996. ISSN 0036-5548.

PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. **J Hepatol**, v. 48, n. 3, p. 494-503, Mar 2008. ISSN 0168-8278.

PURDY, M. A. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. **J Gen Virol**, v. 98, n. 11, p. 2645-2646, 2017. ISSN 0022-1317.

RAMIÈRE, C. *et al.* Near full-length hepatitis E virus genome sequencing analysis in a chronically infected patient following ribavirin treatment failure. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 22, p. 124-125, 2015. ISSN 1352-0504.

RAUFF, B. *et al.* Hepatitis associated aplastic anemia: a review. **Virol J**, v. 8, p. 87, 2011. ISSN 1743-422x.

- RAY, R. *et al.* Hepatitis E virus genome in stools of hepatitis patients during large epidemic in north India. **Lancet**, v. 338, n. 8770, p. 783-4, 1991. ISSN 0140-6736.
- REYES, G. R. *et al.* Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. **Science**, v. 247, n. 4948, p. 1335-9, 1990.
- RIVERO-JUAREZ, A. *et al.* Hepatitis E Virus (HEV) Infection in Anti-HEV Immunoglobulin G-Carrying Patients After Successful Hepatitis C Virus Treatment: Reactivation or Reinfection? **Clin Infect Dis**, v. 64, n. 7, p. 964-966, 2017. ISSN 1058-4838.
- SAFADI, R. *et al.* Lack of known hepatitis virus in hepatitis-associated aplastic anemia and outcome after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 27, n. 2, p. 183-90, Jan 2001. ISSN 0268-3369.
- SANTOS, D. C. *et al.* Seroepidemiological markers of enterically transmitted viral hepatitis A and E in individuals living in a community located in the North Area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 637-40, 2002. ISSN 0074-0276.
- SARIN, H. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. **Vascular Cell**, 2010. ISSN 2045-824X.
- SARKARIA, S. M.; DECKER, M.; DING, L. Bone Marrow Micro-Environment in Normal and Deranged Hematopoiesis: Opportunities for Regenerative Medicine and Therapies. **Bioessays**, Jan 31 2018. ISSN 0265-9247.
- SAZZAD, H. M. S. *et al.* Risk Factors Associated with Blood Exposure for Sporadic Hepatitis E in Dhaka, Bangladesh. **Am J Trop Med Hyg**, 2017. ISSN 0002-9637.
- SCHLAUDER, G. G. *et al.* The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. **J Gen Virol**, v. 79, p. 447-56, 1998. ISSN 0022-1317.
- SCOTT, L. J. *et al.* Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. **Drugs**, v. 63, n. 12, p. 1247-97, 2003.
- SHAH, S. A. *et al.* Hepatitis E virus-associated aplastic anaemia: the first case of its kind. **J Clin Virol**, v. 54, n. 1, p. 96-7, 2012. ISSN 1386-6532.
- SHARMA, S. *et al.* Risk factors for vertical transmission of hepatitis E virus infection. **J Viral Hepat**, v. 24, n. 11, p. 1067-1075, 2017. ISSN 1352-0504.
- SILVA JUNIOR, F. C.; ODONGO, F. C. A.; DULLEY, F. L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. v. 31, p. 53-58, 2009.
- SILVA, S. M. *et al.* Prevalence of hepatitis E virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 338-41, 2012.
- SING, G. K. *et al.* Hepatitis B virus differentially suppresses myelopoiesis and displays tropism for immature hematopoietic cells. **J Virol**, v. 67, n. 6, p. 3454-60, 1993. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x.

- SMITH, D. B. *et al.* Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. In: (Ed.). **J Gen Virol**. England, v.96, 2014. p.1191-2. ISBN 1465-2099.
- SOTO, E. *et al.* Multispecies Epidemiologic Surveillance Study after an Outbreak of Yersiniosis at an African Green Monkey Research Facility. **Comp Med**, v. 65, n. 6, p. 526-31, 2015. ISSN 1532-0820.
- SOUSA, B. R. *et al.* Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. **Cytometry A**, v. 85, n. 1, p. 43-77, 2014. ISSN 1552-4922.
- SOUZA, C. F. D. *et al.* Mesenchymal stem cells: are they appropriate for cardiac regeneration? **Rev. Bras. Cardiol. Invasiva**, v. 18, n. 3, p. 344-353, 00/2010 2010.
- TAKAHASHI, M. *et al.* Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. **Virus Res**, v. 180, p. 59-69, 2014. ISSN 0168-1702.
- TAKAMI, A. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. **Int J Hematol**, Jan 27 2018. ISSN 0925-5710.
- TAM, A. W. *et al.* Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. **Virology**, v. 185, n. 1, p. 120-31, Nov 1991. ISSN 0042-6822.
- TAMPLIN, O. J. *et al.* Hematopoietic Stem Cell Arrival Triggers Dynamic Remodeling of the Perivascular Niche. **Cell**, v. 160, n. 1, p. 241-252, 2015/01/15/ 2015. ISSN 0092-8674.
- TEI, S. *et al.* Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. **Lancet**, v. 362, n. 9381, p. 371-3, 2003. ISSN 0140-6736.
- TESHALE, E. H.; HU, D. J.; HOLMBERG, S. D. The two faces of hepatitis E virus. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 3, p. 328-34, 2010. ISSN 1058-4838.
- THERVET, E. *et al.* Immunosuppressive treatments: mechanisms of action and clinical use. 2011-12-01 2011.
- TRINTA, K. S. *et al.* Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 25-9, 2001. ISSN 0074-0276.
- TSAREV, S. A. *et al.* Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 2, p. 559-63, Jan 15 1992. ISSN 0027-8424.
- _____. Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. **J Infect Dis**, v. 167, n. 6, p. 1302-6, 1993. ISSN 0022-1899.
- VARMA, S. P. *et al.* Hepatitis E virus replication involves alternating negative- and positive-sense RNA synthesis. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 3, p. 572-81, 2011. ISSN 0022-1317.
- VERSLUIS, J. *et al.* Hepatitis E virus: an underestimated opportunistic pathogen in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation., **Blood**, v. 122, n. 6, p. 1079-86, 2013.

VISWANATHAN, R.; SIDHU, A. S. Infectious hepatitis; clinical findings. **Indian J Med Res**, v. 45, n. Suppl., p. 49-58, Jan 1957. ISSN 0971-5916.

VITRAL, C. L. *et al.* Hepatitis A and E seroprevalence and associated risk factors: a community-based cross-sectional survey in rural Amazonia. **BMC Infect Dis**, v. 14, p. 458, 2014. ISSN 1471-2334.

WANG, J. *et al.* Salvaged allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for pediatric chemotherapy refractory acute leukemia. **Oncotarget**, v. 9, n. 3, p. 3143-3159, 2018. ISSN 1949-2553.

WEILER-NORMANN, C. *et al.* Acute hepatitis as a prequel to very severe aplastic anemia. **Z Gastroenterol**, v. 56, n. 1, p. 51-54, 2018. ISSN 0044-2771.

WHO. World Health Organization | Hepatitis E. - Updated in July 2017 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/> >.

WILLEMSE, S. B. *et al.* Hepatitis E virus infection and hepatic GvHD in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. **Bone Marrow Transplant**, 2016. ISSN 0268-3369.

WILLIAMS, T. P. *et al.* Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 9, p. 3040-6, 2001. ISSN 0095-1137.

WOO, P. C. *et al.* New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 12, p. 2219-2221, 2016. ISSN 1080-6040.

_____. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. **Emerg Infect Dis**, v. 20, n. 6, p. 1044-8, 2014. ISSN 1080-6040.

YAMAMOTO, H. *et al.* Hepatitis E virus outbreak in monkey facility, Japan. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 12, p. 2032-4, 2012. ISSN 1080-6040.

YANG, Z.; LOEW, T.; HAMMER, R. D. Association of long-term tacrolimus (FK506) therapy with abnormal megakaryocytosis, bone marrow fibrosis, and dyserythropoiesis. **Clin Case Rep**, v. 3, n. 7, p. 664-8, 2015. ISSN 2050-0904.

YARBOUGH, P. O. *et al.* Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. **J Virol**, v. 65, n. 11, p. 5790-7, 1991. ISSN 0022-538X.

YIN, X.; LI, X.; FENG, Z. Role of Envelopment in the HEV Life Cycle. **Viruses**, v. 8, n. 8, 2016. ISSN 1999-4915.

ZAAIJER, H. L.; KOK, M.; LELIE, P. N. Seroprevalence of hepatitis E in The Netherlands. **Ned Tijdschr Geneesk**, v. 136, n. 44, p. 2173-5, 1992. ISSN 0028-2162.

ZHOU, Y. *et al.* Characteristics and Functions of HEV Proteins. **Adv Exp Med Biol**, v. 948, p. 17-38, 2016. ISSN 0065-2598.

ZYLBERMAN, M. *et al.* Hepatitis E virus-associated aplastic anemia. Report of a case. **Medicina (B Aires)**, v. 75, n. 3, p. 175-7, 2015. ISSN 0025-7680 (Print)0025-7680.

9. APÊNDICES E/OU ANEXOS

9.1. Anexo

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-Fiocruz)



Ministerio da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-17/13

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

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

Macaca fascicularis
- 12 Machos.

Rio de Janeiro, 25 de março de 2013

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

9.2. Apêndice A

Sequências protótipos de HEV utilizadas para a construção da árvore filogenética

Número Genbank	Genótipo	Isolado	Origem	Referência
MG573667	3	AC10_serum	Brasil – RJ	Unpublished
JN190065	3	BRAsw-13	Brasil – PR	Gardinali <i>et al.</i> 2012
JN190066	3	BRAsw-107	Brasil – PR	Gardinali <i>et al.</i> 2012
JN190067	3	BRAsw-112	Brasil – PR	Gardinali <i>et al.</i> 2012
JN190068	3	BRAsw-114	Brasil – PR	Gardinali <i>et al.</i> 2012
JN190069	3	BRAsw-117	Brasil – PR	Gardinali <i>et al.</i> 2012
JN190070	3	BRAsw-123	Brasil – PR	Gardinali <i>et al.</i> 2012
JN983192	3c	Swine_027_feces	Brasil – PA	de Souza <i>et al.</i> 2012
JN983193	3c	Swine_027_liver	Brasil – PA	de Souza <i>et al.</i> 2012
JN983194	3f	Swine_035_serum	Brasil – PA	de Souza <i>et al.</i> 2012
JN983195	3f	Swine_037_feces	Brasil – PA	de Souza <i>et al.</i> 2012
JN983197	3f	Swine_034_feces	Brasil – PA	de Souza <i>et al.</i> 2012
JX123025	3	BRsw-A	Brasil – PR	Gardinali <i>et al.</i> 2012
JX123026	3	BRsw-B	Brasil – PR	Gardinali <i>et al.</i> 2012
JX173928	3	Brazilh2	Brasil – SP	Passos <i>et al.</i> 2013
JX173929	3	Brazilh3	Brasil – SP	Passos <i>et al.</i> 2013
KC549910	3	M2	Brasil – MT	Lana <i>et al.</i> 2014
KC549911	3	M4	Brasil – MT	Lana <i>et al.</i> 2014
KC549912	3	M5	Brasil – MT	Lana <i>et al.</i> 2014
KC549913	3	M9	Brasil – MT	Lana <i>et al.</i> 2014
KC549914	3	M3	Brasil – MT	Lana <i>et al.</i> 2014
KC549915	3	M6	Brasil – MT	Lana <i>et al.</i> 2014
KC549916	3	M1	Brasil – MT	Lana <i>et al.</i> 2014
KC549917	3	M8	Brasil – MT	Lana <i>et al.</i> 2014
KP966825	3b	49	Brasil – PR	Passos Castilho <i>et al.</i> 2017
KX578267	3	SW-IS7	Brasil – PR	Gardinali <i>et al.</i> 2017
KX578268	3	CY-LAE6	Brasil – RJ	Gardinali <i>et al.</i> 2017
KX578269	3	CY-LAB19	Brasil – RJ	Gardinali <i>et al.</i> 2017
KX578270	3	CY-LAC7	Brasil – RJ	Gardinali <i>et al.</i> 2017
KX757781	3	PR-4543	Brasil – RJ	Gardinali <i>et al.</i> 2017
JX645326	3	NL_Donor_08	Países Baixos	Slot <i>et al.</i> 2013

KU702729	3	DK_Donor4	Dinamarca	Unpublished
KR027824	3	567	França	Lhomme <i>et al.</i> 2015
KU892216	3	30_2	Noruega	Lange <i>et al.</i> 2017
HM623777	3	Sw11_4bAT	Austria	Unpublished
LC086324	3	HE-JA15-0878	Japão	Yamazaki <i>et al.</i> 2017
KC961259	3c	BeHu10	Bélgica	Thiry <i>et al.</i> 2014
KF719309	3	swHEV-19913	EUA	Gerber <i>et al.</i> 2014
KF751185	3	PeGe	Itália	Unpublished
JF730430	3	Fr-09AM21	França	Bouquet <i>et al.</i> 2011
JQ013791	3	W1-11	França	Izopet <i>et al.</i> 2012
JX645326	3	NL_Donor_08	Países baixos	Slot <i>et al.</i> 2013
AF185822	1	Abb-2B	Paquistão	Cuyck-Gandré <i>et al.</i> 2000
KX578717	2	Mex-14	México	Kaiser <i>et al.</i> 2016
KJ001832	4	GD7182	China	Liang <i>et al.</i> 2014
AB197674	4	JYI-ChiSai01C	China	Koike <i>et al.</i> 2005
AB602441	6	wbJOY_06	Japão	Takahashi <i>et al.</i> 2011

9.3. Apêndice B

Valores de densidade ótica (DO), *Cut Off* (CO) e relação DO/CO do marcador sorológico (IgG) da hepatite E

Animal (ID)	Data da coleta	IgG			
		DO	<i>Cut Off</i> (CO)	DO/CO	Média DO/CO
AC10	11/2013	0.018	0.493	0.036	0.036
	04/2015	0.060	0.747	0.080	0.077
		0.056	0.747	0.075	
	04/2016	1.816	0.747	2.431	2.511
		1.936	0.747	2.592	
	07/2017	2.107	0.423	4.981	4.981
	08/2017	1.658	0.747	2.219	2.217
		1.656	0.747	2.216	
	09/2017	1.498	0.747	2.005	1.952
		1.419	0.747	1.899	

Valores entre 0,9 e 1,0 = inconclusivo; > 1,0 = positivo e < 0,9 = negativo; ID: identificação; DO: densidade ótica; CO: *cut off*; IgG: imunoglobulina G