

Gabriel Valente dos Santos

Caracterização molecular do genoma completo do vírus da
hepatite D e genotipagem de estirpes circulantes no Brasil



**Monografia apresentada ao Instituto
de Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como pré-requisito para a
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e
Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
MAIO/ 2022**

Trabalho realizado no Laboratório de Hepatites Virais, do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, sob a orientação do pesquisador Francisco Campello do Amaral Mello e coorientação de Giovana Paula Angelice

CIP - Catalogação na Publicação

SS237 Santos, Gabriel Valente dos
Caracterização molecular do genoma completo do vírus da hepatite D e genotipagem de estirpes circulantes no Brasil / Gabriel Valente dos Santos. -- Rio de Janeiro, 2022.
61 f.

Orientador: Francisco Campello do Amaral Mello.
Coorientador: Giovana Paula Angelice.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Vírus. 2. Hepatite D. 3. Genotipagem. 4. Vigilância epidemiológica. 5. Genoma completo. I. Mello, Francisco Campello do Amaral , orient. II. Angelice, Giovana Paula , coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Gabriel Valente dos Santos**

DRE: 117040101

BANCA EXAMINADORA: Profa. Dirlei Nico (Presidente)
Profa. Maria Teresa Villela Romanos
Profa. Tatiana Domitrovic

Título da Monografia: **“Caracterização molecular do genoma completo do
vírus da hepatite D e genotipagem de estirpes circulantes no Brasil”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/odi-guyt-xdw>

Data e hora de início: **8 de junho de 2022 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **9,8** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 08 de junho de 2022.

NOTA Banca Examinadora:

9,8 Profa. Dirlei Nico
9,8 Profa. Maria Teresa Villela Romanos
9,8 Profa. Tatiana Domitrovic

Presidente da banca :



Profa. Dirlei Nico



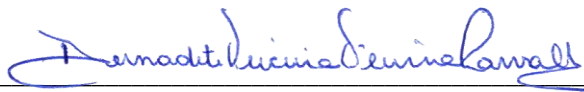
Aluno:

Gabriel Valente dos Santos

Orientador:

Dr. Francisco Campello do Amaral Mello / Coorientador: Giovana Paula Angelice

Coordenador
de TCC



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Maria Cristina e José Carlos, que sempre me apoiaram e incentivaram a cada momento da minha vida. Mãe, você é minha rocha, minha inspiração e minha melhor amiga. Obrigado por me transmitir tanta força e perseverança, principalmente pelos momentos difíceis que enfrentamos juntos. Agradeço ao meu pai, pelo imenso apoio aos meus estudos. Sempre te acompanhei de escola em escola onde você trabalhava, sempre lutando pelo meu direito à bolsa de estudos. Obrigado por me amarem, principalmente nos momentos em que não consegui fazê-lo por conta própria. Espero, um dia, ser capaz de retribuir o esforço de vocês durante esses 22 anos de vida.

Agradeço a toda minha família, que sempre se preocuparam com meu bem-estar e formação, sou muito grato ao apoio da minha irmã, Carolina, meus avós, meus tios e todos que foram importantes para mim durante minha vida. Aos que se foram, restam apenas lembranças boas, e espero ser motivo de orgulho para vocês.

Agradeço aos meus amigos do Colégio Marista São José, que desde a época do ensino fundamental estiveram comigo, aprendi muito com vocês e continuo aprendendo. Obrigado por me aceitarem, pelas risadas, pelas viagens, pelos abraços e pelos desabafos. Mesmo em momentos distantes, sei que cultivo uma amizade maravilhosa com vocês, e sei que posso contar com cada um para tudo.

Agradeço, também, aos meus professores do ensino fundamental e médio, que me incentivaram nos estudos e acreditaram em mim. Agradeço, especialmente, a minha professora de redação, Simone e ao meu professor de biologia, Celso, por abrirem meus olhos para a carreira científica, e por terem me inspirado com histórias de vida incríveis.

Sou imensamente grato pelo privilégio que tive de estudar na UFRJ, e por ter conhecido pessoas maravilhosas no percurso. Agradeço a todos os pesquisadores e professores que me ensinaram tanto e transmitiram seu amor pela ciência.

Agradeço a todos os integrantes do LAHEP, por me acolherem e por serem pessoas tão maravilhosas. Sou muito grato pela convivência ótima que tenho nesse grupo. Agradeço à aluna de mestrado Giovana, com quem aprendi tanto, que acompanhou meus primeiros passos no laboratório e foi essencial para que eu pudesse me inserir nesse projeto. Agradeço ao meu orientador, Francisco, por tantos ensinamentos, pela paciência e calma que você transmite aos seus alunos e por ser um exemplo a ser seguido. Agradeço ao Erik, pelo imenso conhecimento transmitido e

pelos conselhos que me ajudaram a me tornar uma pessoa melhor. Obrigado por acreditar em mim. É um imenso privilégio poder trilhar minha carreira científica ao lado de pessoas tão incríveis.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para minha evolução como pesquisador e como ser humano.

Agradeço às instituições de fomento à pesquisa, CNPq e FAPERJ, que possibilitaram a realização deste e tantos outros projetos no Brasil.

“Onde quer que haja mulheres e homens, há sempre o que fazer, há sempre o que ensinar, há sempre o que aprender.”

-Paulo Freire

RESUMO

Gabriel Valente dos Santos

Caracterização molecular do genoma completo do vírus da hepatite D e genotipagem de estirpes circulantes no Brasil

Orientador: Francisco Campello do Amaral Mello

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus da hepatite D (HDV) é um vírus defectivo dependente do vírus da hepatite B (HBV) para realizar seu ciclo replicativo. A infecção HBV-HDV pode ocorrer simultaneamente (coinfecção), ou quando um portador crônico do HBV é infectado posteriormente com o HDV (superinfecção). A superinfecção é a forma mais grave de hepatite viral crônica, devido a sua rápida progressão para cirrose e hepatocarcinoma e, conseqüentemente, ao alto risco de óbito. A divisão genotípica do HDV ainda não é um consenso entre os pesquisadores e novas propostas de classificação vêm surgindo à medida que novos dados genômicos são disponibilizados na literatura. Atualmente, o HDV é dividido em 8 genótipos, que possuem distintas distribuições geográficas ao redor do mundo. No Brasil prevalecem os genótipos 1 e 3, porém, estudos que abordam o genoma completo de variantes circulantes no Brasil são escassos, o que gera dificuldades na vigilância epidemiológica do HDV no país. Dessa forma, o presente estudo busca compreender a variabilidade genética viral e contribuir com novos dados de epidemiologia molecular do HDV no Brasil. Para isso, foram selecionadas 40 amostras de soro reagentes para o anticorpo anti-HDV, obtidas no Brasil entre 2013 e 2015. Dessas 40 amostras, 11 tiveram o RNA do HDV detectado e extraído para a amplificação por RT-PCR de dois fragmentos sobrepostos, a fim de cobrir o genoma viral completo. Os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger, seguido de análise filogenética. As análises filogenéticas indicaram a presença de 3 genótipos do HDV, sendo o HDV-3, considerado endêmico na região Norte do país, encontrado na maioria das amostras (9/11; 81,8%). As outras duas amostras foram classificadas nos genótipos 5 (1/11; 9,1%) e 8 (1/11; 9,1%), geralmente de circulação restrita ao continente africano. Tais genótipos, tendo sido raramente reportados no Brasil, demonstram a importância da contínua vigilância epidemiológica para o monitoramento das variantes virais e o alto potencial de disseminação do HDV pelo país.

Palavras-chave: vírus da hepatite D, vigilância epidemiológica, genoma completo, variabilidade genética.

ABSTRACT

Gabriel Valente dos Santos

Molecular characterization of the complete genome of hepatitis D virus and genotyping of circulating strains in Brazil

Orientador: Francisco Campello do Amaral Mello

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The hepatitis D virus (HDV) is a defective virus that depends on the hepatitis B virus (HBV) to carry out its replicative cycle. HBV-HDV infection can occur simultaneously (co-infection), or when a chronic carrier of HBV is later infected with HDV (superinfection). Superinfection is the most severe form of chronic viral hepatitis, due to its rapid progression to cirrhosis and hepatocarcinoma and, consequently, the high risk of death. The genotypic classification of HDV is still not a consensus among researchers and new classification proposals are emerging as new genomic data become available in the literature. Currently, HDV is divided into 8 genotypes, which have distinct geographic distribution around the world. In Brazil, genotypes 1 and 3 prevail, however, studies that address the complete genome of circulating variants in Brazil are scarce, which creates difficulties in the epidemiological surveillance of HDV in the country. Thus, the present study seeks to understand the viral genetic variability and contribute with new data on the molecular epidemiology of HDV in Brazil. For this, 40 serum samples collected in Brazil between 2013 and 2015 that tested positive for the presence of anti-HDV antibody were selected. HDV RNA was detected in 11 samples after RT-PCR amplification of two overlapping fragments, to cover the complete viral genome. The amplified products were submitted to nucleotide sequencing by the Sanger method, followed by phylogenetic analysis. Phylogenetic analyzes indicated the circulation of 3 HDV genotypes in Brazil, with HDV-3, considered endemic in the northern region of the country, found in most samples (9/11; 81.8%). The other two samples were classified into genotypes 5 (1/11; 9.1%) and 8 (1/11; 9.1%), usually restricted to the African continent. The detection of such genotypes, which were rarely reported in Brazil, demonstrate the importance of continuous epidemiological surveillance to monitor viral variants and the high potential for HDV dissemination throughout the country.

Keywords: hepatitis D virus, epidemiological surveillance, whole genome, genetic variability.

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

Gabriel Valente dos Santos

Caracterização molecular do genoma completo do vírus da hepatite D e genotipagem de estirpes circulantes no Brasil

Orientador: Francisco Campello do Amaral Mello

As hepatites virais são doenças de gravidade variável, que afetam o fígado e são causadas por diversos vírus. Geralmente, a infecção é silenciosa, não provocando sintomas. Em outros casos, sintomas como icterícia (pele e olhos amarelados), febre, náusea e dor abdominal podem ser apresentados. Um destes agentes causadores é o vírus da hepatite D, que causa a forma mais grave de hepatite, onde a infecção prolongada possui alto risco de levar a cirrose e ao câncer de fígado. A classificação genotípica desse vírus ainda não é um consenso entre os pesquisadores, e à medida que novas informações sobre o genoma desse vírus são disponibilizadas, sua classificação pode ser alterada. No Brasil, o genótipo de maior importância é o 3, que circula na região Norte do país. Estudos que avaliam o genoma completo do HDV são escassos, principalmente deste genótipo, o que gera dificuldades na vigilância epidemiológica desse vírus no Brasil. Dessa forma, este estudo busca compreender a variabilidade genética viral e contribuir com novos dados de epidemiologia molecular do HDV no Brasil. Para isso, foram obtidas 11 amostras do soro de pacientes infectados pelo HDV, destas, foi extraído o material genético do vírus. Esse material foi amplificado pelo método de PCR, para possibilitar o sequenciamento do genoma do vírus. Com as sequências do genoma completo obtidas, foram realizadas análises filogenéticas através de um software, que dividem estas sequências em grupos, de acordo com sua similaridade. Foi identificada a presença de 3 genótipos do HDV, sendo o HDV-3, considerado endêmico na região Norte do país, encontrado na maioria das amostras (9/11; 81,8%). As outras duas amostras foram classificadas nos genótipos 5 (1/11; 9,1%) e 8 (1/11; 9,1%), geralmente de circulação restrita ao continente africano. Tais genótipos, tendo sido raramente reportados no Brasil, demonstram a importância da contínua vigilância epidemiológica para o monitoramento das variantes virais e o alto potencial de disseminação do HDV pelo país.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Vírus da hepatite D	1
1.1.1. Histórico.....	1
1.1.2. Características gerais	2
1.1.3.Ciclo replicativo	3
1.1.4. Transmissão	5
1.1.5. Epidemiologia	5
1.1.6.História natural da infecção	7
1.1.7. Diagnóstico	7
1.1.8. Tratamento	8
1.1.9.Prevenção e controle	8
1.1.10.Variabilidade genética e classificação genotípica	9
1.2. Vírus da hepatite B.....	13
1.2.1. Histórico.....	13
1.2.2. Características gerais	14
1.2.3. Ciclo replicativo	15
1.2.4. Transmissão	17
1.2.5. Epidemiologia.....	17
1.2.6. Manifestações clínicas	19
1.2.7. Diagnóstico	20
1.2.8. Tratamento	20
1.2.9. Prevenção e controle	20
1.2.10. Variabilidade genética e classificação genotípica	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25

4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Obtenção das amostras	26
4.2. Extração do RNA viral	26
4.3. Amplificação do RNA viral	27
4.4. Eletroforese em gel de agarose	29
4.5. Purificação e sequenciamento do produto de PCR	29
4.6. Montagem das sequências, alinhamento múltiplo e filogenia	30
4.7. Clonagem	31
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	41
8. PERSPECTIVAS.....	42
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

	1
Figura 1. Microscopia eletrônica das partículas de HDV.....	3
Figura 2. Representação das proteínas do envelope do HBV utilizadas pelo HDV.....	3
Figura 3. RNA genômico, antigenômico e RNAm do HDV.....	4
Figura 4. Representação esquemática do ciclo replicativo do HDV.....	6
Figura 5. Prevalência de anti-HDV em indivíduos HBsAg positivos no mundo.....	
Figura 6. Casos de hepatite D notificados no Brasil entre os anos 2010 e 2019.....	6 10
Figura 7. Distribuição global dos genótipos de HDV.....	11
Figura 8. Distribuição global dos genótipos e subgenótipos do HDV.....	13
Figura 9. Microscopia eletrônica das partículas de HBV.....	15
Figura 10. Mapa genômico do vírus da Hepatite B.....	16
Figura 11. Representação esquemática do ciclo replicativo do HBV.....	18
Figura 12. Prevalência global da infecção pelo HBV.....	
Figura 13. Distribuição dos casos de HBV segundo ano de diagnóstico e região no Brasil.....	18 21
Figura 14. Distribuição geográfica dos genótipos do HBV no mundo	22
Figura 15. Distribuição dos genótipos do HBV no Brasil.....	
Figura 16. Representação esquemática da estratégia de amplificação do genoma completo de HDV por RT-PCR <i>semi-nested</i>	27
Figura 17. Árvore filogenética gerada pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo GTR+G+I para definição dos genótipos de HDV.....	33
Figura 18. Árvore filogenética gerada por inferência Bayesiana baseada no modelo GTR+G+I para definição dos subgenótipos de HDV-3.....	34
Figura 19. Árvore filogenética gerada por inferência bayesiana baseada no modelo GTR+G+I para definição dos subgenótipos de HDV-5.....	35
Figura 20. Árvore filogenética gerada por inferência bayesiana baseada no modelo GTR+G+I para definição dos subgenótipos de HDV-8.....	36
Figura 21. Árvore filogenética por máxima verossimilhança com sequências parciais (403 nt) do HDV-8.....	37

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados para a estratégia de amplificação do genoma completo do HDV.....	27
Quadro 2. concentrações e volumes do mix do primeiro round de PCR para HDV.....	28
Quadro 3. Concentrações e volumes dos reagentes para o mix do segundo round de PCR	28
Quadro 4. Oligonucleotídeos externos e internos utilizados para o sequenciamento dos fragmentos de HDV amplificados.....	30
Tabela 1. Dados sociodemográficos das amostras positivas para o RNA do HDV.....	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

anti-HDV - Anticorpo referente ao antígeno delta

CHC - Carcinoma hepatocelular

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

HBcAg - Antígeno da região do "core" do HBV

HBsAg - Antígeno de superfície do HBV

HBV - Vírus da Hepatite B

HCV - Vírus da Hepatite C

HDAg - antígeno delta

HDV - Vírus da Hepatite Delta

HDV-3 – Genótipo 3 do vírus da hepatite Delta

HDV-5 – Genótipo 5 do vírus da hepatite Delta

HDV-8 – Genótipo 8 do vírus da hepatite Delta

IFN – Interferon

L-HBsAg - Antígeno de superfície do HBV "large"

L-HDAg - Antígeno delta "large"

NCTP – Receptor taurocolato de sódio

ORF - Fase de leitura aberta

PCDT - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PGHS - Receptor proteoglicano de sulfato heparana

pgRNA -RNA pré-genômico

RNA - Ácido ribonucleico

RNAi - RNA de interferência

RNA_m - RNA mensageiro

RNP - Complexo ribonucleoproteico

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

RVS - Resposta virológica sustentada

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

S-HDAg - Antígeno dela "small"

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Vírus da hepatite D	1
1.1.1. Histórico.....	1
1.1.2. Características gerais	2
1.1.3.Ciclo replicativo	3
1.1.4. Transmissão	5
1.1.5. Epidemiologia	5
1.1.6.História natural da infecção	7
1.1.7. Diagnóstico	7
1.1.8. Tratamento	8
1.1.9.Prevenção e controle	8
1.1.10.Variabilidade genética e classificação genotípica	9
1.2. Vírus da hepatite B.....	13
1.2.1. Histórico.....	13
1.2.2. Características gerais	14
1.2.3. Ciclo replicativo	15
1.2.4. Transmissão	17
1.2.5. Epidemiologia.....	17
1.2.6. Manifestações clínicas	19
1.2.7. Diagnóstico	20
1.2.8. Tratamento	20
1.2.9. Prevenção e controle	20
1.2.10. Variabilidade genética e classificação genotípica	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25

4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Obtenção das amostras	26
4.2. Extração do RNA viral	26
4.3. Amplificação do RNA viral	27
4.4. Eletroforese em gel de agarose	29
4.5. Purificação e sequenciamento do produto de PCR	29
4.6. Montagem das sequências, alinhamento múltiplo e filogenia	30
4.7. Clonagem	31
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	41
8. PERSPECTIVAS.....	42
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1. Introdução

1.1. O vírus da Hepatite D

1.1.1.Histórico

O vírus da hepatite D(HDV) ou Delta foi descrito pela primeira vez em 1977 por Mario Rizzetto em Turim, na Itália. Primeiramente, o HDV foi identificado como um antígeno do vírus da hepatite B (HBV), através de análises de imunofluorescência em células de pacientes infectados com HBV (Rizzetto *et al*, 1977).

Posteriormente, estudos colaborativos entre cientistas italianos e estadunidenses identificaram que tal antígeno dependia da estabilidade da partícula do HBV para infectar o hepatócito (Bonino *et al*, 1984)

A partir destes estudos, foi identificado que o “antígeno Delta” não era um componente do HBV, mas sim um vírus diferente, considerado defeitivo, que utilizava o antígeno de superfície do HBV para realizar a infecção. Em 1984, Ferruccio Bonino realizou um estudo a fim de analisar as características desse antígeno, identificando pela primeira vez a partícula viral do então chamado antígeno delta, denominando-o vírus da hepatite delta (Figura 1).

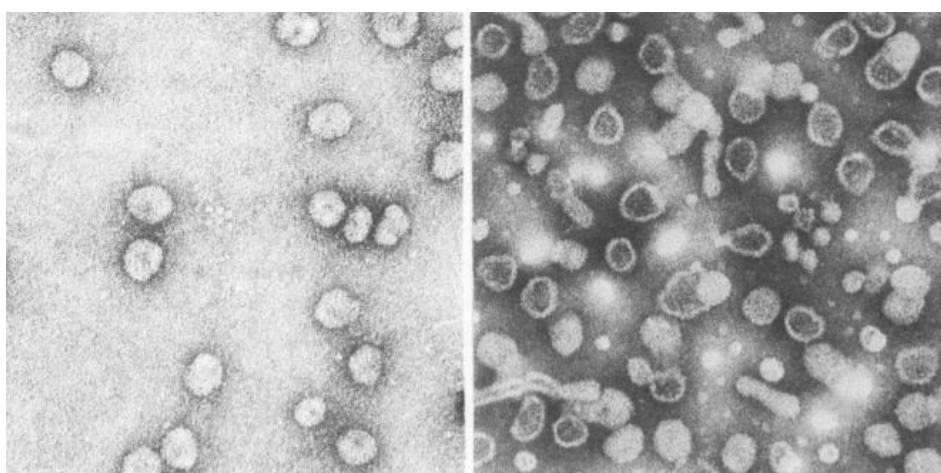


Figura 1. Microscopia eletrônica das partículas de HDV. A forma predominante das partículas é esférica, com aproximadamente 36 nm de diâmetro. À esquerda, são representadas partículas íntegras. À direita, as partículas foram visualizadas após 72h, onde pode ser observada a ruptura de parte delas. (Bonino *et al.*, 1984)

1.1.2. Características gerais

O HDV é classificado como único membro do gênero *Deltavirus*. O HDV é considerado defeutivo, pois não codifica todas as proteínas essenciais para seu ciclo de replicação, necessitando assim que haja uma infecção prévia por HBV para que possa ocorrer a infecção (Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM, 2011). Por este motivo, é considerado um vírus satélite.

A partícula viral do HDV é envelopada, apresentando formato esférico, com diâmetro aproximado de 36 nm (Kos A *et al*, 1986). O envelope é formado por fosfolipídios provenientes da célula hospedeira e composto pelos três antígenos de superfície do HBV (HBsAg): *small*, *middle* e *large* (Poisson Fet *al*, 1993) (Figura 2). Estudos *in vivo* demonstraram a presença das três proteínas do HBV na partícula de HDV, onde a eficiência da montagem da partícula de HDV e a secreção para a corrente sanguínea eram dependentes dos níveis de HBsAg, indicando que esses componentes são essenciais para o ciclo replicativo do HDV (Hourieux C *et al*, 1998).

O genoma do HDV é pequeno, sendo considerado o menor genoma de um vírus capaz de infectar uma célula humana. É composto por 1679-1697 nucleotídeos, sendo um RNA anti-senso circular de fita simples, complexado aos antígenos do HDV (HDAg) (Kos A *et al*, 1986). Uma característica singular do genoma do HDV é possuir uma grande quantidade de bases nitrogenadas Guanina e Citosina, o que induz o pareamento intramolecular de bases, levando a formação de estruturas no formato de bastões (Kos A *et al*, 1986; Giersch K *et al*, 2015 a). As características do genoma do HDV se assemelham com vírus de vegetais, o que pode explicar a origem deste vírus (Giersch K, *et al* 2015 b).

Além do genoma contido no vírion, o HDV apresenta dois RNAs adicionais em células hospedeiras, sendo um deles o seu antigenoma, no qual está a única ORF codificante das proteínas HDAg (Chen PJ *et al*, 1986), e o segundo RNA adicional que atua como RNA mensageiro com cerca de 800 nt com a mesma polaridade do antigenoma (Kos A *et al*, 1986) (Figura 3).

O HDV codifica duas proteínas antigênicas: uma menor, *small*-HDAg (S-HDAg), com 195 aminoácidos, e outra maior, *large*-HDAg (L-HDAg), com 214 aminoácidos. A proteína S-HDAg ativa a replicação do RNA genômico e medeia a transcrição do RNA mensageiro viral, enquanto a L-HDAg é uma proteína tardia que inibe a transcrição e replicação viral, interage com os antígenos de superfície do HBV

(com participação da S-HDAg) e acelera a formação de novos vírions (Goodrum e Pelchat, 2018)

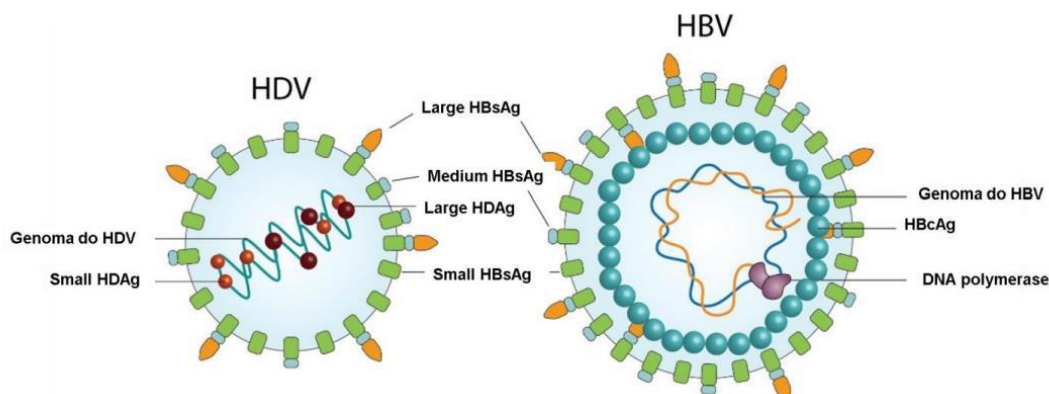


Figura 2: Representação das proteínas do envelope do HBV utilizadas pelo HDV (Adaptado de Giersch e Dandri, 2015).

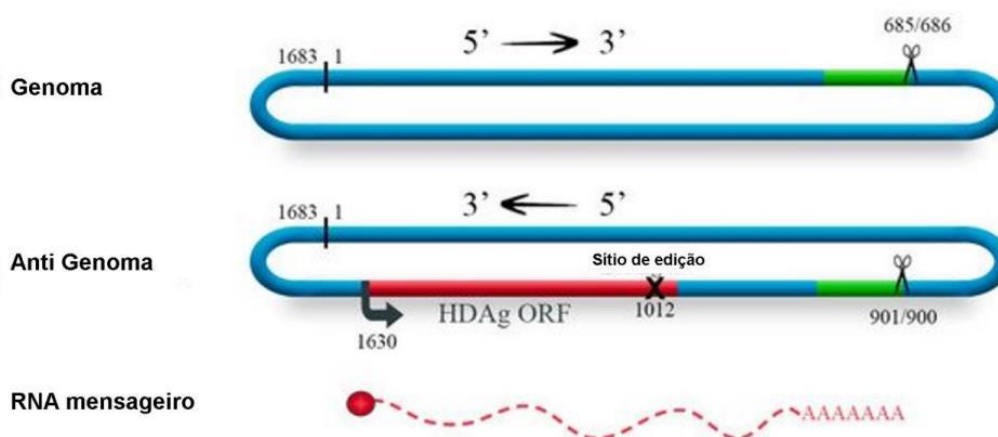


Figura 3: RNA genômico, antígenenômico e RNAm do HDV (adaptado de Goodrum e Pelchat, 2018). As ribozimas são representadas pelas partes verdes e a região de clivagem está sendo indicada pela tesoura. A ORF do HDAg está representada em vermelho e a seta na posição 1630 indica o início da transcrição. O “X” na ORF indica a região onde ocorre a edição do códon de parada presente no S-HDAg.

1.1.3. Ciclo replicativo

Devido à falta de um sistema modelo de cultura de células para a infecção por HDV, muitos detalhes do ciclo replicativo do HDV ainda não estão claros (Tseng CH, Lai MM, 2009). O modelo mais aceito se baseia no processo conhecido como “círculo rolante”, no qual uma fita circular de RNA é utilizada como modelo e transcrita por uma enzima RNA polimerase II dependente de RNA do hepatócito do hospedeiro.

Durante a formação dos novos filamentos de RNA, estes sofrem clivagem catalisada pelas ribozimas virais e as extremidades resultantes são ligadas pela enzima RNA ligase celular, adquirindo a forma circular (Botelho-Souza LF *et al*, 2017).

O vírion do HDV é formado pela ligação do seu genoma a proteínas HDAg, formando um complexo ribonucleoproteico (RNP). A bicamada lipídica contendo as proteínas S-HBsAg, M-HBsAg e L-HBsAg envolve o RNP, montando a partícula viral que será secretada e possibilitando sua entrada em outros hepatócitos (Taylor JM, 2015).

O vírion se liga ao hepatócito por meio de uma interação entre a proteína L-HBsAg e um receptor de membrana na célula hospedeira. A partir disso, o RNP é direcionado ao núcleo. A partir do RNA antígenômico (polaridade negativa), é formado o RNA genômico (polaridade positiva), que será transcrito em RNA mensageiro. Após a transcrição, o mRNA é exportado para o retículo endoplasmático, onde irá ocorrer a tradução das proteínas HDAg e formação de novas partículas virais. Por fim, essas partículas são exportadas do hepatócito através do complexo de Golgi para infectar novas células (Mentha *et al.* 2019)

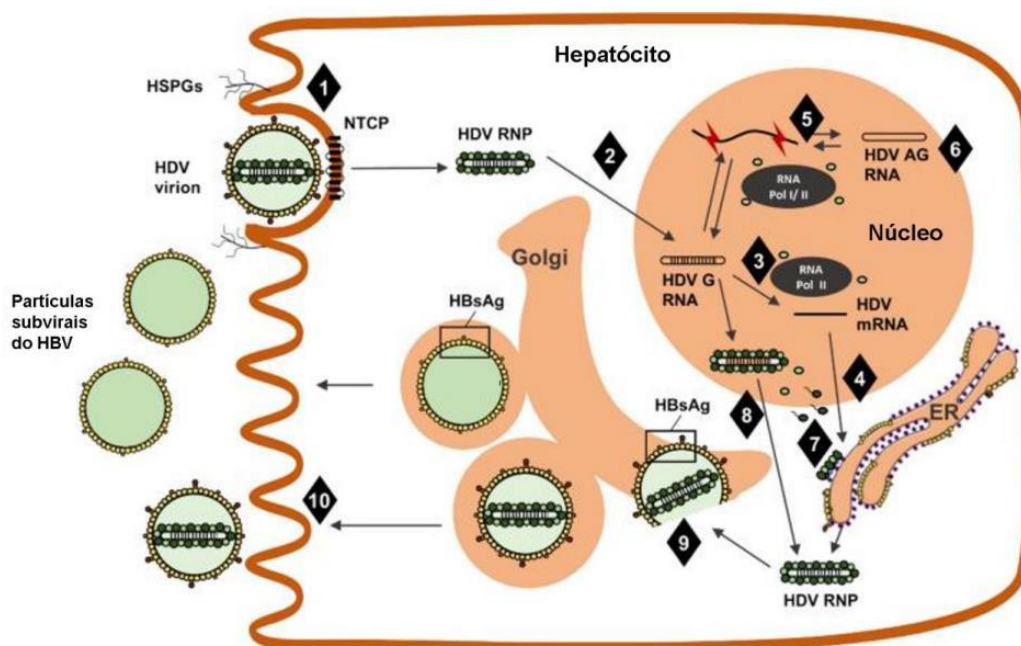


Figura 4. Representação esquemática do ciclo replicativo do HDV (Adaptado de Mentha *et al.* 2019).

1- Entrada do HDV no hepatócito. 2- Transporte da ribonucleoproteína do HDV (HDV RNP) para o núcleo e liberação do genoma viral (HDV G RNA). 3- Transcrição do genoma viral em RNA mensageiro (HDV mRNA). 4- Tradução do HDAg. Replicação do RNA viral mediada por polimerases da célula pelo mecanismo de rolling circle, com formação de intermediários de RNA multiméricos e antígenômicos. 6-

Edição do RNA antigenômico para formação da Large HDAg. 7- Farnesilação do L-HDAg, que leva a regulação da replicação e montagem viral. 8- Montagem da ribonucleoproteína no núcleo. 9- Montagem do virion (com as proteínas HBsAg por meio da interação destas com a L-HDAg farnesilado) e exportação.10- Secreção dos virions pelo Complexo de Golgi.

1.1.4. Transmissão

As formas de transmissão do HDV são as mesmas do HBV. A transmissão ocorre através do contato com sangue ou fluidos corporais de indivíduos contaminados (Blumberg BS, Alter HJ e Visnich SA, 2008). Possíveis formas de transmissão horizontal incluem o contato sexual sem o uso de preservativos, compartilhamento de agulhas e objetos perfurocortantes e transfusão de sangue (Davison F *et al*, 1987). A transmissão vertical pode ocorrer durante o parto.

A transmissão pode ocorrer através de fômites, devido a capacidade do HDV em se manter estável em superfícies (Indolfi G *et al*, 2019). Dessa forma, o compartilhamento de equipamentos de manicure, tatuagem e procedimentos dentários sem utilização de material estéril ou descartável pode ser uma via para contaminação pelo HDV.

1.1.5. Epidemiologia

Desde a sua descoberta em 1977, a infecção pelo HDV vem sendo negligenciada de forma geral. Nas últimas décadas, estimou-se uma prevalência de 15-20 milhões de indivíduos infectados pelo HDV, correspondendo a aproximadamente 5% dos portadores do HBV (Lempp FA, Ni Y, Urban S, 2016). Porém, essa proporção foi revista em diversos estudos subsequentes, onde foram identificadas prevalências de 62-72 milhões de pessoas (Stockdale AJ *et al*, 2017) e, mais recentemente, 74 milhões (Chen H, Shen D, Ji D, 2019). A prevalência do HDV em indivíduos positivos para o HBsAg que foram internados devido a complicações no fígado é de 16,4% (Stockdale AJ *et al*, 2020).

A distribuição mundial do HDV varia, possuindo maior prevalência na América do Sul (Brasil, Peru e Argentina), nos Estados Unidos, na África subsaariana e Ásia. (World Health Organization, 2017). Em um estudo focado na África subsaariana, foram identificados 7 milhões de infectados pelo HDV (Stockdale AJ *et al*, 2017).

Apesar do número expressivo, estima-se que a proporção de portadores do HDV é muito maior, pois a realização do teste diagnóstico para o HDV em pacientes infectados por HBV não é realizado comumente, o que leva a elevados índices de subnotificação.

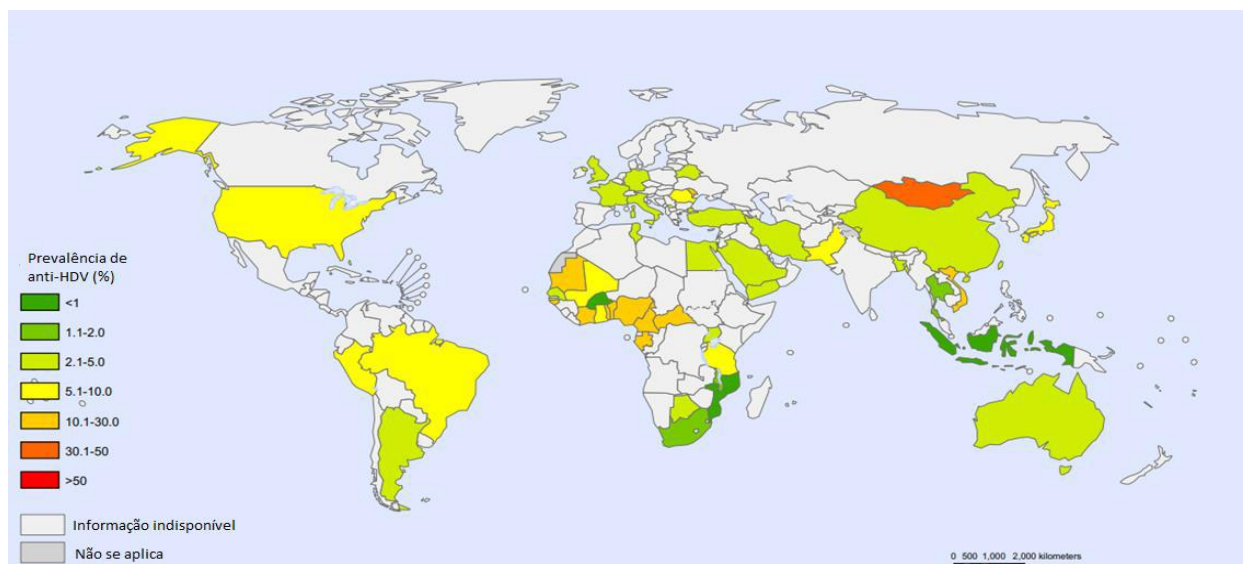


Figura 5. Prevalência de anti-HDV em indivíduos HBsAg positivos no mundo(Adaptado de Stockdale AJ, 2020)

No Brasil, de 1999 a 2020, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 689.933 casos confirmados de hepatites virais, dos quais 4.150 foram atribuídos ao HDV (Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, 2021). O HDV circula em maior quantidade na região Norte do país, onde 74,9% dos casos confirmados de HDV estão acumulados nessa região (Figura 6).

Historicamente, a maioria dos casos confirmados de HDV no Brasil ocorreu em homens (58,3%), sendo mais prevalente na população jovem, onde mais da metade dos casos ocorreram em indivíduos com idade entre 20 e 39 anos (Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, 2021).

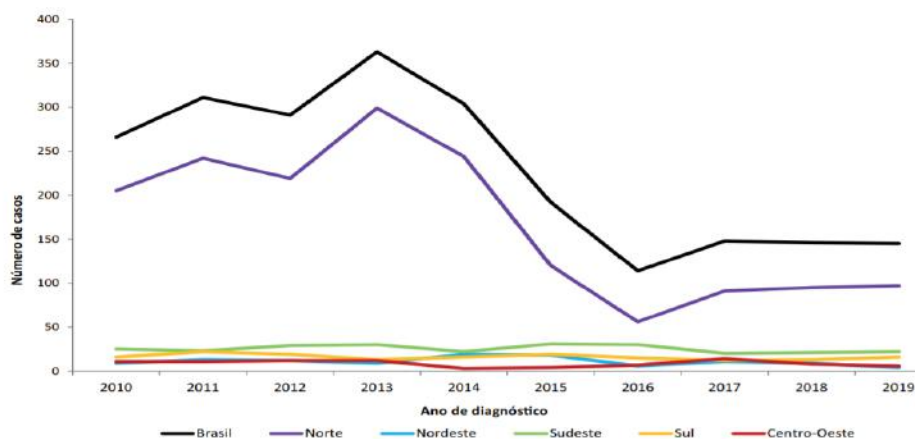


Figura 6. Casos de hepatite D notificados no Brasil entre os anos 2010 e 2019, segundo região de residência e ano de diagnóstico (Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, 2021).

1.1.6. História natural da infecção

A infecção pelo HDV é descrita como a forma mais grave das hepatites virais, onde a progressão para cirrose a partir de um quadro crônico ocorre em 15% dos pacientes em até 2 anos, aumentando para 80% de 5 a 10 anos (Koh C, Da BL, Glenn JS, 2019).

O quadro clínico da infecção pelo HDV pode ser agudo, quando um indivíduo susceptível (anti-HBs-negativo) entra em contato simultâneo com o HBV e o HDV levando a um quadro de coinfeção mais branda, indistinguível da monoinfecção pelo HBV. A coinfeção geralmente evolui para cura, sem sequelas ao organismo do indivíduo coinfectado (Smedile A *et al*, 1982).

O quadro mais grave ocorre quando indivíduos portadores do HBV crônico são posteriormente infectados pelo HDV, acarretando um quadro chamado de superinfecção, geralmente associado ao agravamento da doença. A superinfecção pelo HBV-HDV possui maior risco para desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) e consequente mortalidade quando comparada com a infecção somente pelo HBV (Kushner T *et al*, 2015).

1.1.7. Diagnóstico

No Brasil, segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções do Ministério da Saúde (PCDT), o padrão para diagnóstico sorológico do HDV é baseado na detecção de anticorpos anti-HDV IgG em pacientes com suspeita de exposição recente ao vírus (PCDT, 2016).

O teste diagnóstico deve ser realizado em pacientes portadores de hepatite B crônica e residentes em áreas endêmicas para o HDV. Em caso de anti-HDV IgG reagente, pode ser realizado o teste molecular confirmatório, através da detecção do RNA viral no paciente, o que caracteriza infecção ativa. Não há relatos de infecção oculta por HDV e, portanto, não é recomendado o exame de carga viral sem a detecção prévia do anticorpo.

Os testes de genotipagem são, geralmente, realizados com fins de pesquisa, porém essa informação pode ter relevância clínica, devido ao agravamento da doença em maior escala relacionado a determinados genótipos (Kay A *et al*, 2014).

1.1.8. Tratamento

O tratamento atual utilizado mundialmente para a infecção crônica pelo HDV é o interferon alfa (IFN), que apresenta uma baixa eficácia, com uma taxa de resposta virológica sustentada de 25-45% (Gilman C, Heller T, Koh C, 2019). Além disso, a recidiva do RNA do HDV após o tratamento pode ocorrer em até 50% dos pacientes tratados com IFN (Keskin O *et al*, 2015).

No Brasil, todo paciente portador do HDV é candidato ao tratamento com alfapeguinterferona 2a e/ou tenofovir ou entecavir, sendo o principal objetivo do tratamento o controle do dano hepático, uma vez que a resolução viral sustentada é rara (PCDT, 2019).

Outros tratamentos vêm sendo buscados nas últimas décadas, como os baseados na interrupção do ciclo do HBV. Uma dessas estratégias baseia-se no uso do Myrcludex B, um peptídeo sintético derivado da pre-S1 do HBV, que atua como um inibidor do receptor NTCP dos hepatócitos, essencial para entrada do vírus na célula (Gilman C, Heller T, Koh C, 2019).

1.1.9. Prevenção e controle

Devido a dependência do HBV para que o HDV possa causar um quadro infeccioso, as estratégias de prevenção e controle para o HDV são as mesmas do HBV. A vacina para hepatite B está disponível para aplicação em recém-nascidos em 3 doses, sendo a forma mais eficaz de prevenção das hepatites B e D (WHO, 2021).

Além disso, medidas profiláticas como a utilização de preservativos em relações sexuais e evitar o compartilhamento de materiais perfurocortantes como agulhas e instrumentos para manicure e tatuagem são efetivas para a prevenção e controle da doença.

1.1.10. Variabilidade genética e classificação genotípica

1.1.10.1 Distribuição dos genótipos no mundo e no Brasil

Inicialmente, o HDV foi classificado em 3 grandes clados (I, II e III) e subclados, porém essa classificação foi sofrendo modificações conforme novas sequências virais foram sendo descritas. A classificação atual enumera os genótipos do HDV de 1 a 8. Sequências do clado I passaram a representar o genótipo 1, os clados IIa e IIb tornaram-se os genótipos 2 e 4, respectivamente, e o clado III passou a ser designado genótipo 3. (Stockdale AJ *et al*, 2020). Os genótipos 5, 6, 7 e 8, descritos inicialmente no continente africano, foram os genótipos mais recentemente caracterizados, sendo o último, genótipo 8, descrito em 2006 (Le Gal F *et al*, 2006).

A base para classificação do HDV em genótipos se dá pela divergência intragenotípica de até 16% e intergenotípica de até 40%. Esta diversidade está associada à ineficácia da revisão da Pol II no RNA do HDV, bem como, à pressão do sistema imunológico em pacientes crônicos ao longo dos anos, podendo levar a edições nucleotídicas em diferentes locais do genoma (Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM, 2011).

O HDV-1, com distribuição mundial, circula na região europeia, no Oriente Médio, nas Américas e África (Rizzetto M, 2015) (Figura 7). Um estudo recente realizado nessas regiões com indivíduos infectados pela hepatite D, pelo Centro Francês de Referência para HDV, revelou que o HDV-1 era o agente de 76% dos casos, seguido pelos genótipos da África subsaariana (HDV-5, 6, 7 e 8) (Roulot D *et al*, 2020).

O HDV-2 circula na região asiática, predominantemente na China e Japão (Nguyen HM *et al* 2017, Roulot D *et al*, 2020). A China é considerada um grande reservatório para o vírus da hepatite B, onde a prevalência do HDV em pacientes cronicamente infectados pelo HBV é de aproximadamente 6,5% (Liao B *et al*, 2014).

O HDV-3 foi identificado somente no continente americano, ocorrendo predominantemente na América Central, incluindo a região da Bacia Amazônica (Gomes-Gouvêa MS *et al*, 2008; Melo Da Silva E *et al*, 2019). O HDV-4 é predominante no Japão, ocorrendo também com menor frequência em Taiwan (Rizzetto M, 2015). Os genótipos 5, 6, 7 e 8, até recentemente, eram relatados apenas no continente africano, contudo, nos últimos anos, o HDV-5 foi relatado no Reino Unido, França, Austrália, Brasil e Suíça. O HDV-6 foi relatado na França e no Reino Unido, HDV-7 também na França, e o HDV-8 no Brasil (Chen H *et al*, 2019).

No Brasil, o HDV possui alta circulação na região Amazônica, onde a porcentagem de portadores de HBsAg com anticorpos anti-HDV pode chegar a 32% (Paraná R *et al*, 2006). Nessa região, o genótipo mais prevalente é o 3 (Gomes-Gouvêa MS, 2008), que está restrito à região da América Central e do Sul, sendo o principal genótipo circulante no Brasil atualmente (Kay A *et al*, 2014), seguido do genótipo 1, que ocorre em todos os continentes.

Apesar da porção ocidental da região Norte do país ser a de maior prevalência para o vírus, estudos já identificaram a circulação do HDV-1 em outras regiões do país, como em Minas Gerais, onde foi relatada prevalência de 6,2% em 26 amostras de pacientes reagentes para o HBsAg (Scarponi CF, 2019).



Figura 7. Distribuição global dos genótipos do HDV (Adaptado de Chen et al, 2019). Cada cor representa um genótipo distinto, conforme descrito na legenda na parte inferior esquerda da figura, e o tamanho do círculo varia de acordo com o número de sequências analisadas, conforme descrito na legenda na parte inferior direita da figura.

1.1.10.2 Reclassificação dos genótipos

Recentemente, alguns estudos vêm sugerindo uma subdivisão dos genótipos do HDV, devido à alta divergência intragenotípica. Le Gal e colaboradores (2017) realizaram um estudo com sequências do genoma completo e parciais (HDAg) do HDV, onde a similaridade nucleotídica entre os mesmos genótipos foi definida em >85% no fragmento analisado ou >80% no genoma completo, enquanto uma similaridade maior que 90% no genoma completo redefiniria o grupo em subgenótipos (Le Gal F *et al*, 2017).

O genótipo 1 foi subdividido em 4 subgenótipos (a-d) onde o HDV-1a e o HDV-1b estão restritos à África e Madagascar e HDV-1c às ilhas da Oceania, enquanto o HDV-1d é encontrado no Oriente Médio, leste e oeste da Europa, Ásia e América do Norte. O HDV-2 foi subdividido em HDV-2a e HDV-2b, sendo encontrados, respectivamente, no Japão e Sibéria. O HDV-4a e HDV-4b circulam na porção oriental do continente asiático (Le Gal F *et al*, 2017) (figura 8). O HDV-3, HDV-5, HDV-6, HDV-7 e HDV-8 não apresentaram subdivisão neste trabalho.

Um outro trabalho publicado em 2019 por Miao e colaboradores, propôs a divisão dos genótipos 3 e 6 em três subgenótipos e os genótipos 1, 2, 4, 5, 7 e 8 foram agrupados em apenas dois subgenótipos (Miao Z, Pan Q. 2020). Neste trabalho, as análises feitas a partir de sequências do genoma completo do HDV indicaram o genótipo 3 apresentava menor similaridade nucleotídica comparado com os outros (62%), ao passo que a similaridade entre os outros variou de 69% a 79%. Já a similaridade nucleotídica para definir os subgenótipos variou de 81,5% a 91%.

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

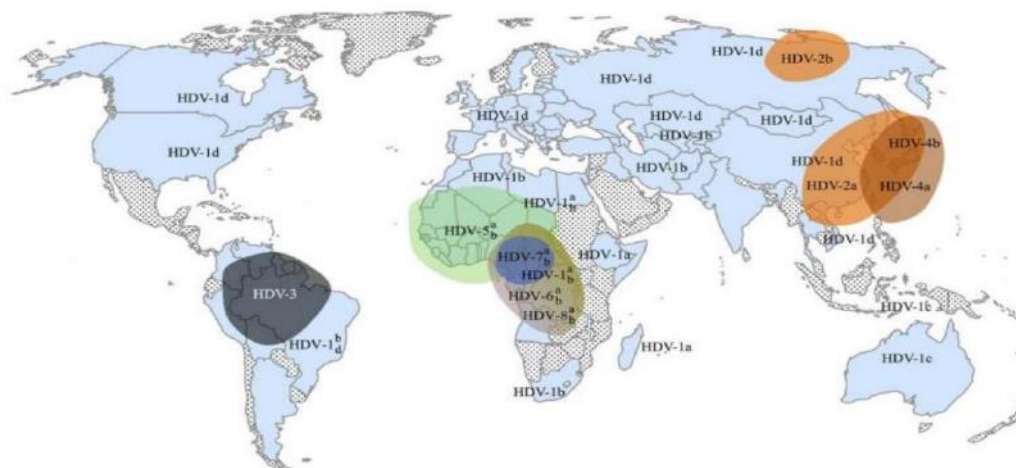


Figura 8. Distribuição global dos genótipos e subgenótipos do HDV (Le Gal *et al.* 2017). Os países onde ocorre o HDV-1 estão em azul claro. O HDV-1a e o HDV-1b estão restritos à África e Madagascar e o HDV-1c às ilhas da Oceania, enquanto o HDV-1d é encontrado no Oriente Médio, Europa Oriental e Ocidental,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

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

1.2.O vírus da hepatite B (HBV)

1.2.1 Histórico

O vírus da hepatite B (HBV) foi o primeiro vírus associado a um surto de hepatite no mundo. Em 1885, Lurman documentou uma epidemia de hepatite entre 191 marinheiros alemães na cidade de Bremen, após uma campanha de vacinação para varíola (Burns GS *et al.*, 2014).

Até então conhecida como hepatite sérica, diversos outros surtos foram documentados, onde o maior ocorreu nos Estados Unidos, em 1942, onde mais de 50.000 soldados foram hospitalizados, a maioria apresentando icterícia e febre

alta (Freeman G *et al*, 1946). Em ambos os casos, a origem dos surtos foi atribuída a distribuição de lotes da vacina para febre amarela contaminados.

Somente em 1964, na Austrália, que Blumberg identificou um antígeno em pacientes com leucemia que receberam transfusão de sangue recentemente, o denominando “antígeno Austrália”. Em 1965, a presença desse antígeno foi associada com a hepatite sérica, e o “antígeno Austrália”, posteriormente, foi identificado como o antígeno de superfície do HBV (HBsAg), o principal marcador sorológico para hepatite B ativa (Blumberg BS, Alter HJ e Visnich SA, 1965).

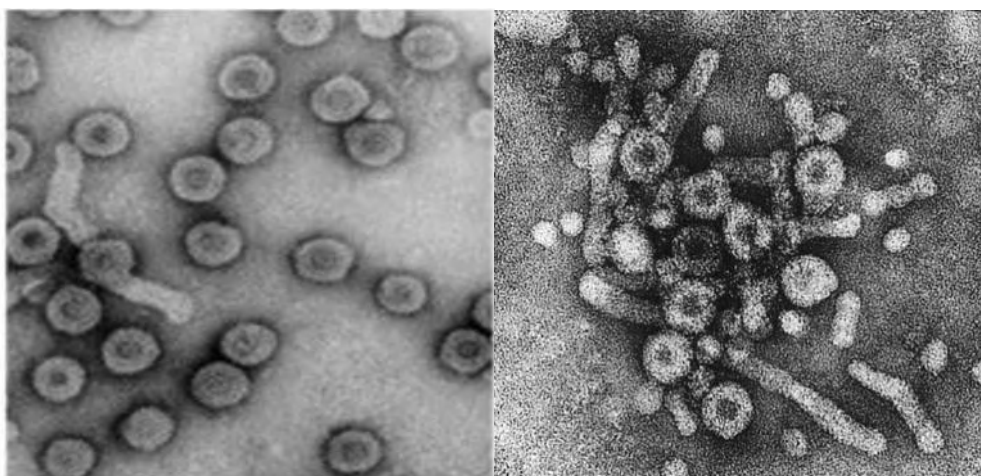


Figura 9. Microscopia eletrônica das partículas de HBV. (adaptado de: Gerlich, 2013; A J Zuckerman, 1999). A esquerda, são representadas as partículas infecciosas do HBV, de formato esférico com aproximadamente 42 nm de diâmetro. À direita, são visualizadas partículas não infecciosas, de formato tubular com 22 nm de largura

1.2.2 Características gerais

O HBV apresenta três partículas virais distintas, sendo duas incompletas e não infecciosas, formadas apenas pelas proteínas do HBsAg. A partícula infecciosa completa, também conhecida como partícula de Dane, apresenta, aproximadamente, 42 nm de diâmetro, possuindo um envelope composto por antígenos de superfície glicoproteicos, denominados *small* HBsAg, *middle* HBsAg e *large* HBsAg (S-HBsAg, M-HBsAg e L-HBsAg, respectivamente). O genoma do HBV encontra-se contido dentro de um nucleocapsídeo formado pelo antígeno do core (HBcAg) juntamente com a polimerase viral, a qual possui função de DNA polimerase-RNA dependente, com atividade de transcriptase reversa e RNase (H Karayiannis P *et al*, 2017).

O genoma viral é composto por uma molécula de DNA que apresenta formato circular parcialmente dupla-fita, possuindo aproximadamente 3200 pares de base. O genoma é composto por quatro regiões codificantes distintas, reguladas por quatro ORFs parcialmente sobrepostas (Seeger C *et al*, 2015). As regiões são denominadas de pre-S/S, pre-C/C, P e X.

A ORF pre-S/S é composta pelas regiões pre-S1, pre-S2 e S, sendo responsável pela síntese das três proteínas do HBsAg, que são formadas a partir de diferentes códons de iniciação desta ORF. Já a ORF pre-C/C é a responsável pela síntese das proteínas HBcAg, que é um antígeno estrutural integrante do nucleocapsídeo, e HBeAg, uma proteína viral secretável utilizada como um importante marcador de replicação viral ativa. A ORF P está associada à síntese da polimerase viral e, por fim, a ORF X é a responsável por codificar a proteína HBx, que apresenta uma alta homologia com as demais espécies do gênero Orthohepadnavírus, porém ausente nas linhagens que têm as aves como hospedeiro, sugerindo que esta ORF não esteja diretamente relacionada a replicação e, sim, segundo outros estudos, pode atuar como um regulador viral, além de outras associações como o desencadeamento do processo inflamatório e hepatocarcinogênese (Xu C *et al*, 2014).

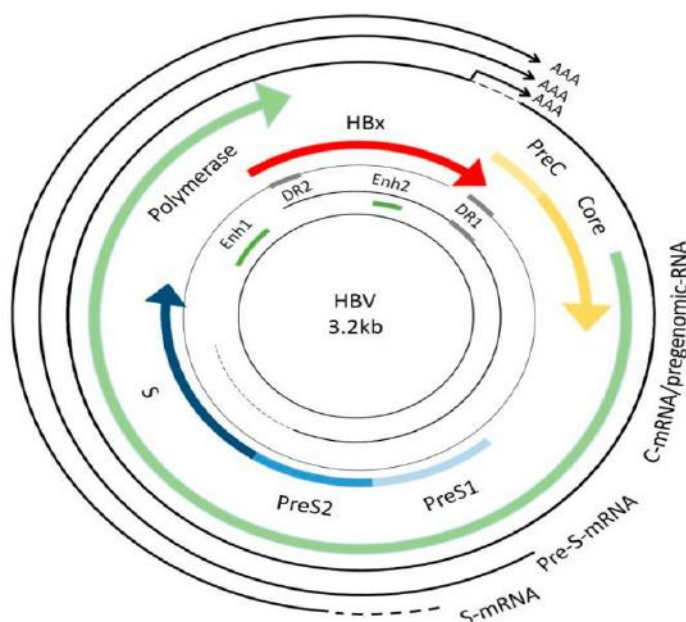


Figura 10. Mapa genômico do vírus da Hepatite B (Adaptado de Shuaichen Liu *et al*, 2016). O genoma do HBV é composto por um DNA de fita dupla (3,2 kb), que contém quatro ORFs sobrepostas que codificam o envelope viral (pré-S1/pré-S2/S) (seta azul), proteínas centrais (pré- C/C) (seta amarela), polimerase viral (seta verde) e proteína HBx (seta vermelha). O genoma contém quatro promotores, duas regiões potenciadoras (Enh1, Enh2) e duas repetições diretas (DR1, DR2).

1.2.3Ciclo replicativo

A primeira etapa da replicação do HBV é a entrada no hepatócito, pelo qual o HBV possui tropismo. O vírus utiliza dois receptores celulares para entrar na célula: o proteoglicano de sulfato heparan (PGHS), no qual é feita a ligação primária com baixa afinidade, e o taurocolato de sódio (NTCP), no qual será feita a ligação posterior com meio afinidade. O NTCP é uma proteína transmembranar responsável pelo transporte de ácidos biliares no fígado de espécies susceptíveis à hepatite B (Li K *et al*, 2015). Após a adsorção mediada pelos receptores PGHS e NTCP, o vírion migra para o citoplasma do hepatócito e perde seu envelope. Em seguida, o HBV tem seu nucleocapsídeo transportado até o núcleo celular, onde ocorre o seu desnudamento (Ganem D *et al*, 1996)

Uma vez no núcleo, o DNA viral é convertido em dupla fita circular covalentemente fechada (cccDNA), através da ação da DNA polimerase celular na fita positiva de DNA do HBV. Em seguida, a enzima RNA polimerase II do hospedeiro transcreve o cccDNA em filamentos de RNA pré-genômicos(pgRNA), que servirão de molde para a síntese do DNA viral, e subgenômicos que irão atuar como RNA mensageiro na tradução das proteínas do envelope (Bartlett *et al*, 2004).O pgRNA é então encapsidado com o auxílio da enzima viral e envolvido pelas proteínas do core, formando o nucleocapsídeo.

Internamente, inicia-se a transcrição reversa da fita positiva de RNA em uma fita negativa de DNA, sendo esta, posteriormente, utilizada como molde para a fita de DNA positiva, que não é sintetizada por completo. Este nucleocapsídeo é enviado ao retículo endoplasmático e ao complexo de Golgi, onde as proteínas do envelope são incorporadas formando o vírion que será secretado ou retornará ao núcleo celular para um novo ciclo de replicação(Tuttleman JS *et al*, 2004).

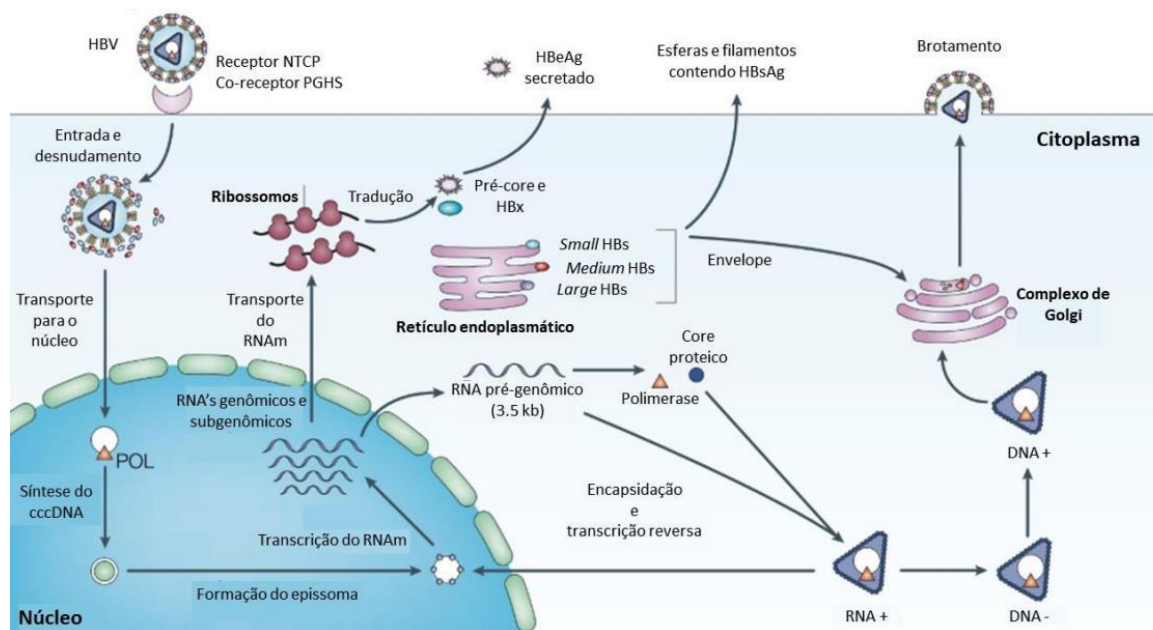


Figura 11. Representação esquemática do ciclo replicativo do HBV(adaptado de Bhattacharya e Thio, 2010). Após a entrada do vírus no citoplasma, o capsídeo é transportado para o núcleo. O DNA circular é convertido em cccDNA, que atua como molde para a transcrição de quatro RNAs (de 0,7 kb, 2.1 kb, 2.4 kb e 3.5 kb), que são exportados para o citoplasma e usados como RNAs mensageiros. O RNA pré-genômico também funciona como modelo da replicação. A nova partícula adquire o envelope durante a passagem pelo retículo endoplasmático e / ou complexo de Golgi e em seguida é secretada.

1.2.4 Transmissão

Assim como o HDV, o HBV é transmitido através do contato com fluidos corporais infectados, tendo como único hospedeiro natural o ser humano (Shapiro CN, 1993). O sangue é o veículo mais importante para a transmissão, mas outros fluidos corporais também foram implicados, incluindo sêmen e saliva. Atualmente, três modos de transmissão do HBV foram reconhecidos: transmissão perinatal (vertical), sexual e parenteral/percutânea (WHO, 2017).

O comportamento de risco da hepatite B incluem o sexo frequente com múltiplos parceiros, uso de drogas injetáveis, frequente exposição a sangue, principalmente por parte de profissionais de saúde, e a prática sexual com fins lucrativos. A população chave da hepatite B contempla homossexuais masculinos, presidiários, companheiros de pacientes com hepatite aguda, hemofílicos, indivíduos transplantados, doentes renais em programa de hemodiálise e familiares de portadores crônicos do HBV (Carrilho e Silva, 1995).

1.2.5 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência mundial do HBV é de aproximadamente 3,5% da população geral. Em 2019, foram identificados 296 milhões de portadores crônicos do vírus no mundo. Dados da OMS estimam que, em 2019, a hepatite B foi responsável por 820.000 mortes no mundo, em sua maioria pela evolução à cirrose ou hepatocarcinoma celular.

Em relação a distribuição do HBV pelo mundo, os continentes mais afetados são a África e Ásia, onde em alguns países a prevalência do vírus pode atingir índices acima de 8% na população. O HBV possui distribuição semelhante nas Américas (em torno de 2 a 4%), (Chweitzer A, Horn J, 2016) com destaque para região norte da América do Sul (Colômbia, Equador e Peru), onde são relatados índices mais elevados

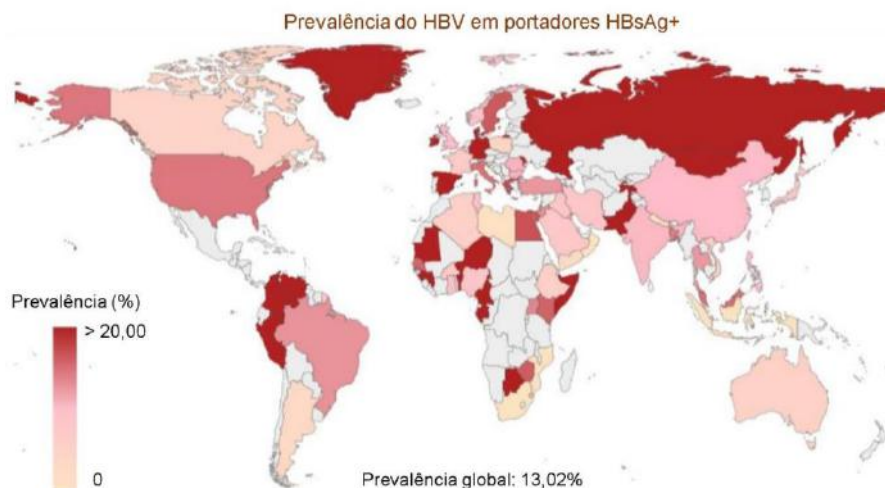


Figura 12. Prevalência global da infecção pelo HBV(adaptado de Miao, 2019).

No Brasil, entre o período de 1999 a 2020, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 689.933 casos confirmados de hepatites virais no Brasil. Destes, 254.389 (36,9%) são referentes aos casos de hepatite B (Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, 2016). A maior concentração de casos foi observada na faixa etária de 25-44 anos (49% dos casos).

De 2010 a 2020, verificou-se que as taxas de detecção das regiões Sul, Norte e Centro-Oeste foram superiores à taxa nacional (à exceção de 2018, quando a região Centro-Oeste apresentou taxa levemente inferior), enquanto as menores taxas foram observadas na região Nordeste (figura 13).

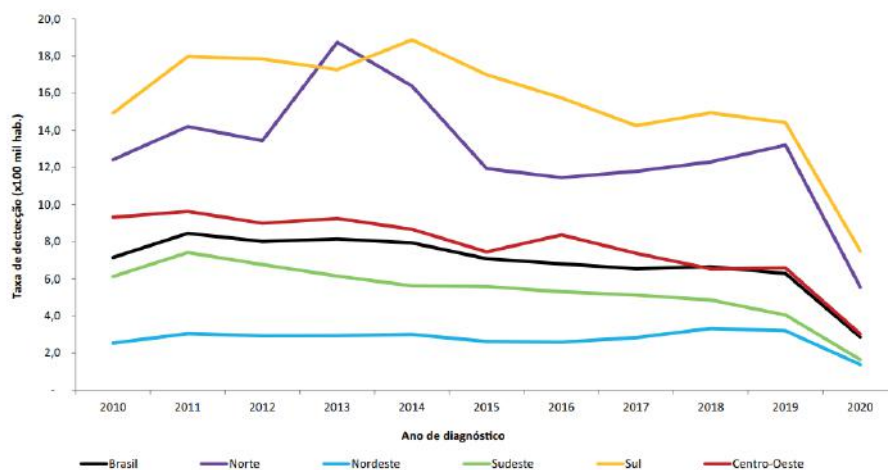


Figura 13. Distribuição dos casos de HBV segundo ano de diagnóstico e região no Brasil (fonte: Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, 2022)

1.2.6 História natural da infecção

Na maioria dos casos, adultos infectados pelo HBV progridem para resolução espontânea (90-95%), enquanto uma minoria evolui para infecção crônica pelo HBV. Em crianças, a maioria dos infectados se tornarão portadores crônicos, principalmente se a infecção ocorrer na primeira infância (Indolfi G *et al*, 2019).

Durante a infecção pela hepatite B aguda, os principais marcadores presentes são o anti-HBc IgM, HBsAg e HBeAg e o DNA do vírus. Ao longo do curso da infecção, IgM passa a diminuir, enquanto IgG aumenta, permanecendo detectável pelo resto da vida do indivíduo, sendo um importante marcador para infecção passada pelo HBV (Kao JH, 2008). A infecção crônica se estabelece a partir da detecção do antígeno HBsAg no soro do paciente após 6 meses de infecção, sem que haja soroconversão para anti-HBs. Nesses casos, há uma persistência do DNA viral no soro, podendo haver marcadores de replicação durante o período (Santos, Romanos e Wigg, 2015).

No caso de indivíduos infectados pelo HBV que não possuíram contato prévio com o vírus (infecção primária) ou em portadores crônicos que passem por uma reativação exacerbada do vírus, o quadro pode evoluir para hepatite fulminante (Ichai P *et al*, 2019). Nesses casos, há rápida progressão para quadros de cirrose e CHC, devido a destruição massiva do tecido do fígado, levando ao óbito em cerca de 80% dos casos (Thomas Mina *et al*, 2015).

O HBV é uma das principais causas de hepatite fulminante, sendo responsável por 5 a 18% de casos de hepatite fulminante na Europa, e 7% nos EUA. Na França, o HBV foi

a segunda causa mais comum de hepatite fulminante entre 1998 e 2010 (12,7%), após o paracetamol (22,2%). (Ichai P *et al*, 2015)

Em respeito aos sintomas, na infecção aguda, são comumente apresentadas anorexia, náusea, icterícia, colúria e acolia fecal e desconforto no quadrante superior direito. Pode haver um agravamento dos sintomas em pacientes coinfectados ou com doença hepática prévia (Hepatites Virais. Secretaria de Vigilância em Saúde). A infecção crônica acarreta a destruição progressiva do tecido hepático, podendo levar à cirrose e hepatocarcinoma com o passar das décadas. A resposta do sistema imune do hospedeiro frente à infecção é a principal responsável por esse dano hepático, uma vez que o HBV não é diretamente citopático (Lin CL *et al*, 2017).

1.2.7 Diagnóstico

No Brasil, o teste mais realizado para o diagnóstico do HBV é o sorológico, onde se busca o marcador HBsAg (antígeno de superfície – infecção ativa) em amostras de soro ou plasmado paciente. Caso o resultado seja positivo, testes confirmatórios podem ser realizados, buscando o anti-HBc total. No caso de a amostra ser positiva para HBsAg, mas negativa para anti-HBc, o teste molecular deve ser realizado para confirmar a possibilidade de infecção, buscando o DNA total do vírus (Manual Técnico para o diagnóstico das hepatites virais, Ministério da saúde).

1.2.8 Tratamento

O tratamento para o HBV, idealmente, busca a perda sustentada do HBsAg no soro do paciente, porém isso raramente ocorre. Por isso, o tratamento atua, na maioria dos casos, reduzindo os níveis da replicação viral e do dano hepático, evitando complicações mais graves (PCDT, 2019).

Segundo a EASL (European Association for the Study of the Liver), os tratamentos indicados para portadores crônicos do HBV são o IFN-alfa ou os análogos de nucleosídeos (NAs) como a Lamivudina, Adefovir, Entecavir, Telbivudina e Tenofovir (Journal of Hepatol. 2017). No Brasil, é indicado para o tratamento da hepatite B crônica o Entecavir ou Tenofovir, caso haja contraindicação ao primeiro (PCDT, 2019).

1.2.9 Prevenção e controle

A forma mais eficaz de prevenção do HBV é a vacinação, principalmente em recém-nascidos, que é administrada em 3 doses (Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação, Min. da Saúde). O anti-HBs é um marcador importante, que indica imunização para o HBV (Ferraz, 2007).

Além disso, evitar o compartilhamento de objetos perfurocortantes como agulhas e material para manicure/tatuagem e utilizar o preservativo em relações sexuais são maneiras eficazes de proteção contra o vírus (WHO, 2021).

1.2.10 Variabilidade genética e classificação genotípica do HBV

Apesar de ser um vírus de DNA, o HBV apresenta uma taxa de substituição nucleotídica alta, em comparação com outros vírus da mesma classe. Isso ocorre pela falta da atividade de revisão da polimerase viral durante a transcrição reversa no pgRNA (Van Damme E *et al*, 2019). Dessa forma, o HBV apresenta alta variabilidade genética, sendo classificado em 10 genótipos distintos (A-J), com divergência intragenotípica de aproximadamente 8% (Flor Helene Pujol *et al*, 2009). Ainda, os genótipos A, B, C, D, F e I apresentam subgenótipos. A distribuição geográfica dos genótipos do HBV é bem característica (Figura 14), sendo descrita de forma semelhante ao longo dos anos.

O genótipo A é cosmopolita, apresentando maior destaque na região africana. Os genótipos B e C são predominantes na Ásia. O genótipo D apresenta distribuição generalizada, com maior presença no Oriente Médio, região mediterrânea e Europa central, enquanto o genótipo E está restrito ao continente africano. O genótipo F está restrito a América do Sul, principalmente na Bacia Amazônica, enquanto o genótipo G, apesar de ter uma prevalência mundial baixa, é encontrado em todo globo. O genótipo H é comumente encontrado na América Central. O genótipo I foi relatado no Vietnã e Laos e o genótipo J foi identificado em uma ilha do Japão (Polaris Observatory Collaborators, 2018)

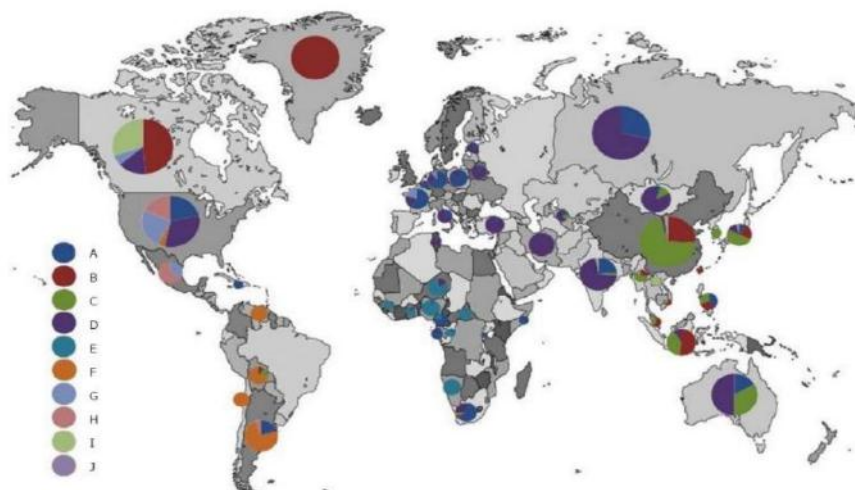


Figura 14. Distribuição geográfica dos genótipos do HBV no mundo (adaptado de Shi *et al.* 2014). Cada cor representa um genótipo.

No Brasil, o genótipo A apresenta maior prevalência, seguido do genótipo D e F, contudo, esta proporção varia de acordo com a região geográfica brasileira. Enquanto o genótipo A é majoritário nas regiões Norte e Nordeste, o genótipo D é o mais prevalente na região Sul. O genótipo F é o segundo genótipo mais frequente na região Norte, apresentando uma frequência baixa nas outras regiões. Além deste, outros genótipos são encontrados em menor proporção os genótipos E, G, C e B, sendo estes, com exceção do G, geralmente associados à imigrantes (Figura 15) (Lampe E, 2019).

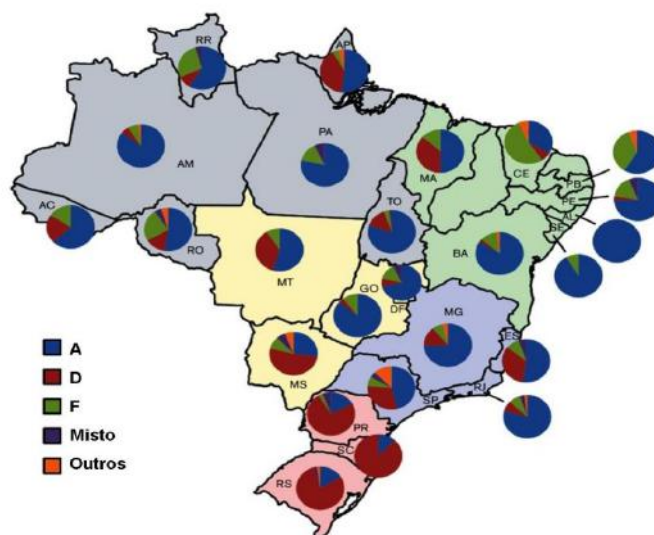


Figura 15. Distribuição dos genótipos do HBV no Brasil (Adaptado de Lampe *et al.*, 2019). O genótipo A (Azul) possui maior distribuição no país, possuindo prevalência geral de 58,7%, com maior distribuição nas regiões Norte e Nordeste. O genótipo D (Vermelho) se destaca na região Sul do país, com prevalência de 78,9%

2. Justificativa

A hepatite Delta é considerada a hepatite viral de maior morbidade, com abordagem clínica complexa (Hughes AS *et al*, 2011). A escassez de dados epidemiológicos sobre o vírus gera dificuldades para implementação de medidas de controle efetivas. Além disso, estima-se um elevado índice de subnotificação do HDV no Brasil, devido à falta de implementação de diagnóstico de rotina para o HDV em pacientes infectados pelo HBV (Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais 2018).

Estudos que avaliam o genoma completo de variantes circulantes no Brasil são escassos, o que gera dificuldades na vigilância epidemiológica da doença no país. Apesar da quantidade de dados genômicos do HDV terem aumentado exponencialmente nos últimos anos, ainda existe uma carência de genomas completos, especialmente de determinados genótipos. Segundo a base de dados Hepatitis Delta Virus Database (HDVdb) (Usman Z *et al*, 2020), que agrega dados de diferentes bancos de sequências internacionais, atualizando a entrada de sequências e distinguindo-as genotipicamente, estão disponíveis 513 sequências de genoma completo de HDV, sendo que a grande maioria, 62.6%, pertence ao genótipo 1. O banco de dados indica a presença de apenas 11 genomas completos do genótipo 3, variante mais divergente geneticamente dos demais genótipos e mais prevalente na região endêmica do norte do Brasil. A disponibilidade de dados de sequências deste genótipo, além de importante para a melhor caracterização molecular das estirpes virais circulantes no país, contribuirá com estudos de evolução e filodinâmica do HDV, uma vez que a divergência do HDV-3 frente aos demais genótipos levanta a hipótese de que esse genótipo possa ter uma origem diferente dos demais (Alvarado-Mora MV *et al*, 2011).

Ainda, determinar o perfil genotípico das hepatites B e D circulantes revela-se cada vez mais importante, ao passo que estudos demonstram que a interação de determinados genótipos desses vírus pode levar a uma progressão mais grave da doença. Em um estudo realizado com amostras de pacientes na Amazônia coinfectados pelo HBV/HDV, foi observado que mutações no genótipo 3 do HDV levavam a uma maior associação do vírus com o genótipo F do HBV, o que facilita a persistência e propagação do HDV na região (Kay A *et al*, 2014).

O presente estudo visa a caracterização do genoma completo de variantes do HDV no Brasil, que irá contribuir para a construção de um banco de dados epidemiológico molecular no país. Além disso, com a construção de árvores

filogenéticas, será possível analisar a diversidade genética do HDV e identificar os genótipos e subgenótipos circulantes em cada região do Brasil.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização molecular do genoma completo de estirpes do HDV circulantes no Brasil a partir de indivíduos com sorologia positiva para o anticorpo anti-HDV.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver uma estratégia de amplificação e sequenciamento do genoma completo do HDV;
- Determinar os genótipos e avaliar a variabilidade genética do HDV nas amostras brasileiras;

4. Materiais e métodos

4.1 Obtenção das amostras

As amostras utilizadas foram obtidas através de um trabalho prévio, onde foi realizada uma triagem em 1240 amostras de soro de pacientes positivos para o antígeno do envelope de HBV (HBsAg), coletadas em 24 dos 26 estados brasileiros entre 2013 e 2015 (Barros TM, 2020). Todo o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) sob o número 2.364.950, estando em conformidade com as diretrizes éticas da Declaração de Helsinque de 1975. O total de amostras foi submetido ao teste de ELISA pelo kit ETI-AB-DELTAK-2 (DiaSorin) para detecção do anticorpo anti-HDV e destas, 40 foram reagentes para o anti-HDV (prevalência de 3,2%). Dessas 40 amostras, somente 38 tiveram os ácidos nucleicos virais extraídos, pois as outras duas amostras apresentavam volume insuficiente para a realização dos testes. O RNA eluído foi submetido à amplificação parcial da região genômica que codifica o HDAg (403 pb) por RT-PCR. De 38 amostras, 13 foram positivas para o RNA viral, as quais foram utilizadas no presente estudo (Tabela 1).

4.2 Extração do RNA viral

As amostras positivas para o HDV foram submetidas ao processo de extração de ácidos nucleicos utilizando o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de extração de RNA. Esse processo se baseia na adsorção em sílica, seguida de lavagens seriadas e posterior eluição do material. O princípio do teste consiste na incubação de 200 microlitros da amostra de soro com um tampão de lise, contendo um sal caotrópico e proteinase K, a fim de lisar as partículas virais, expondo o material genético viral. Posteriormente, um tampão é adicionado à amostra e esta solução é aplicada em um microtubo contendo um filtro de sílica, no qual é adsorvido apenas o material genético por afinidade de cargas. Ocorrem então etapas de lavagem e centrifugação para a eliminação das substâncias contaminantes (sais, proteínas e contaminantes celulares) e, por fim, o material genético purificado é eluído com um tampão de baixa salinidade. O eluato obtido é mantido em freezer -80°C até o momento de uso.

4.3 Amplificação do RNA viral

Para a estratégia de amplificação do genoma completo do HDV foram utilizados 2 fragmentos sobrepostos complementares (figura 16), amplificados a partir de um primeiro round de RT-PCR seguido por um PCR *semi-nested*, cujos primers estão listados no quadro 1.

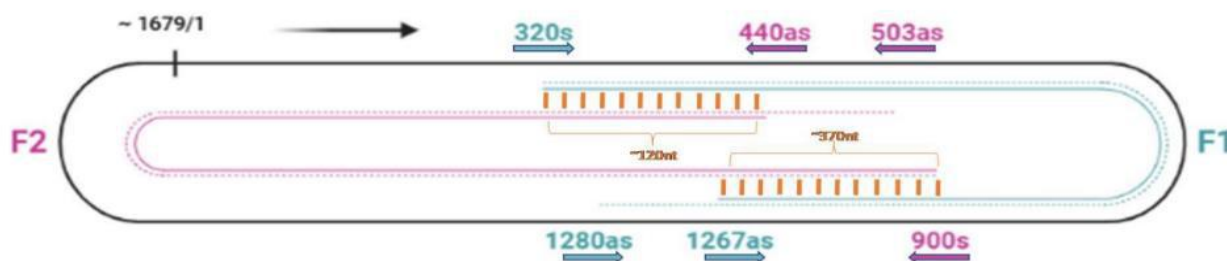


Figura 16. Representação esquemática da estratégia de amplificação do genoma completo de HDV por RT-PCR *semi-nested*. Em verde está representada a amplificação do primeiro fragmento com o PCR 1 (primers 320s/1280as; linha tracejada) e PCR 2 (primers 320s/1267as; linha sólida). O segundo fragmento sobreposto está representado em rosa com o PCR 1 (primers 900s/503as; linha tracejada) e PCR 2 (primers 900s/440as; linha sólida).

Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados para a estratégia de amplificação do genoma completo do HDV.

		Primer	Polaridade	Posição*	Sequência (5' – 3')
Fragmento 1	RT-PCR 1	320s	(+) Senso	304-325	CCAGAGGACCCCTTCAGCGAAC
		1280as	(-) Antisenso	1288-1265	TCATCCTCGAGTCTCTTGATGGTC
	PCR 2	320s	(+) Senso	304-325	CCAGAGGACCCCTTCAGCGAAC
		1267as	(-) Antisenso	1288-1265	GAAGGAAGGCCCTGGAGAACAAGA
Fragmento 2	RT-PCR 1	900s	(+) Senso	890-911	CATGCCGACCCGAAGAGGAAAG
		503as	(-) Antisenso	503-482	CCCCGGGATAAGCCTCACTCG
	PCR 2	900s	(+) Senso	890-911	CATGCCGACCCGAAGAGGAAAG
		440as	(-) Antisenso	446-427	AACAYCCTCCTGCTAGCCCC

*Posições no genoma completo do HDV referentes à sequência de número de acesso MN984436. Y representa uma degeneração no primer (C ou G).

Para o procedimento, o conjunto de reagentes “Superscript™ III One Step RT-PCR system” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) foi utilizado para a transcrição reversa e subsequente amplificação por PCR do cDNA viral. Em seguida, um segundo ciclo de PCR foi realizado (*semi-nested* PCR), a fim de obter uma melhor amplificação do RNA viral.

O mix do PCR foi preparado em uma estação asséptica e o manuseio dos reagentes foi feito sempre em contato com gelo. Os volumes utilizados para o preparo do mix para a primeira reação de RT-PCR com volume final de 25 μL estão descritos no quadro 2.

Um volume de 5 μL das amostras extraídas foi adicionado ao mix e colocado no termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), onde seguiu a seguinte ciclagem: um ciclo de 50 °C por 30 minutos; um ciclo de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de (94 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 90 segundos) e um ciclo de extensão final de 72 °C.

Um volume de 3 μL do produto amplificado foi adicionado ao mix do segundo ciclo de PCR (quadro 3) em uma reação com volume final de 50 μL e adicionado novamente ao termociclador sob a ciclagem: um ciclo de 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 90 segundos e um ciclo de extensão final de 72 °C por 5 minutos. O produto amplificado foi armazenado à -20 °C para a corrida eletroforética em gel de agarose.

Quadro 2: concentrações e volumes do mix do primeiro round de PCR para HDV (RT-PCR).

Componentes (Concentração de Estoque)	Concentração final (reação)	Volume de reação
Água destilada “DNase RNase free”	--	5,5 μL
2X Reaction Mix	2X	12,5 μL
Oligonucleotídeo senso	0,2 μM	0,5 μL
Oligonucleotídeo antisenso	0,2 μM	0,5 μL
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	40U/uL	0,5 μL
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	--	0,5 μL

Quadro 3: Concentrações e volumes dos reagentes para o mix do segundo round de PCR (*semi-nested* PCR).

Componentes (Concentração de Estoque)	Concentração final (reação)	Volume de reação
Água destilada DNase RNase free	--	38,3 μL
dNTPs 10 Mm	0,2 mM	1,0 μL
10X PCR Buffer, – Mg	1X	5,0 μL
50 mM MgCl ₂	1,5 mM	1,5 μL
Oligonucleotídeo senso	0,5 μM	0,5 μL
Oligonucleotídeo antisenso	0,5 μM	0,5 μL
Platinum™ Taq DNA Polymerase	--	0,2 μL

4.4 Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização do produto amplificado, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para a confecção do gel, 150g de agarose foram diluídos em 100 mL de tampão TAE 1x, onde foram aplicados 3 μ L de brometo de etídio. Após a solidificação do gel, uma mistura de 5 μ L do produto amplificado com 2 μ L azul de bromofenol a 2% foi aplicada em cada poço do gel. O padrão utilizado foi o 100 bp DNA ladder (Promega). A partir disso, foi realizada a eletroforese (~80 volts) por 1 hora e o gel foi visualizado em câmara com luz ultravioleta UVP Transilluminator (ClinX, Shanghai, China).

4.5 Purificação e sequenciamento do produto de PCR

A purificação do produto de PCR foi realizada para remover resíduos que poderiam interferir na leitura, trazendo maior qualidade para a etapa de sequenciamento. Para isso, foi utilizado o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega, Wiscosin, EUA), que se baseia na adesão do produto amplificado em colunas de sílica, que é purificado a partir de consecutivas lavagens com os tampões fornecidos.

As sequencias do genoma completo de HDV foram determinadas por sequenciamento direto utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Wiscosin, EUA) onde, além dos primers externos utilizados para a amplificação de cada um dos dois fragmentos, primers internos foram utilizados para garantir uma sobreposição do sequenciamento das fitas senso e antisenso, garantindo, assim, melhor confiabilidade na leitura de incorporação de bases e, conseqüentemente, na montagem da sequência nucleotídica consenso final (quadro 4). As reações do sequenciamento foram analisadas em um sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems).

Quadro 4. Oligonucleotídeos externos e internos utilizados para o sequenciamento dos fragmentos de HDV amplificados.

	Primer	Polaridade	Posição*	Sequência (5' – 3')
Fragmento 1	320s	(+) Senso	304-325	CCAGAGGACCCCTTCAGCGAAC
	688s	(+) Senso	685-703	TGGCCGGCATGGCCCCAGC
	900s	(+) Senso	898-904	CCAGAGGACCCCTTCAGCGAAC
	1267as	(-) Antisenso	1288-1265	GAAGGAAGGCCCTGGAGAACAAGA
	720as	(-) Antisenso	737-717	CTCGGATCGTTGCCCCAGCCGG
	503 as	(-) Antisenso	503-482	CCCCGGGATAAGCCTCACTCG
Fragmento 2	320s	(+) Senso	304-325	CCAGAGGACCCCTTCAGCGAAC
	900s	(+) Senso	890-911	CATGCCGACCCGAAGAGGAAAG
	440as	(-) Antisenso	446-427	AACAYCCTCCTGCTAGCCCC
	1480s	(+) Senso	1459-1482	TCATCCTCGAGTCTCTTGATGGTC
	1267as	(-) Antisenso	1288-1265	GAAGGAAGGCCCTGGAGAACAAGA
	308as	(-) Antisenso	326-303	TGTTTCGCYGAAGGGGTCTCTGGA

*Posições no genoma completo do HDV **referentes** à sequência de número de acesso MN984436.

4.6 Montagem das sequências, alinhamento múltiplo e filogenia

Para a realização da genotipagem, as sequências nucleotídicas obtidas (senso e reverso complementar) de cada amostra foram editadas e montadas no programa MEGA v.7.0 (Kumar S, Stecher G, 2016) para a obtenção do consenso. Um alinhamento múltiplo contendo as sequências geradas neste estudo, juntamente com outras 21 sequências representativa dos 8 genótipos e seus subgenótipos, de acordo com a classificação proposta por Miao et al., 2019, obtidas do GenBank, foi criado através do algoritmo ClustalW para a realização da análise filogenética.

A análise filogenética foi realizada no programa MEGA v.7.0 através do método baseado em caracteres por máxima verossimilhança com a aferição de confiabilidade da análise realizada através de um *bootstrap* com 1000 replicatas. As análises filogenéticas para refinamento da classificação das sequências em subgenótipos foram realizadas através de inferência Bayesiana utilizando o programa BEAST v1.10.0.

5. Resultados

Triagem das amostras e detecção do RNA do HDV

Após a extração de ácidos nucleicos e RT-PCR das 13 amostras positivas para o RNA do HDV, 11 foram amplificadas com sucesso, utilizando a estratégia de amplificação ilustrada na Figura 16. Os dados dos respectivos pacientes estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Dados sociodemográficos das amostras positivas para o RNA do HDV.

	Coinfecção HBV/HDV (n= 11)
Gênero	
Masculino	6
Feminino	5
Idade	
< 20	1
20-30	5
31-40	1
41-50	1
51-60	1
> 60	1
Regiões brasileiras	
Norte	8
Nordeste	-
Centro-Oeste	1
Sudeste	2
Sul	-

Genotipagem e variabilidade das sequências

Utilizando os 11 genomas completos de HDV amplificados, foi realizada a montagem de um alinhamento múltiplo de sequências. Foram obtidas 21 sequências representativas dos 8 genótipos de HDV através do GeneBank – National Center for Biotechnology Information (NCBI), que foram utilizadas como base para o alinhamento. A partir de uma análise filogenética por máxima verossimilhança, as 11 sequências completas de HDV foram classificadas nos genótipos 3 (9/11; 81,8%), 5 (1/11; 9,1%) e 8 (1/11; 9,1%) (Figura 17).

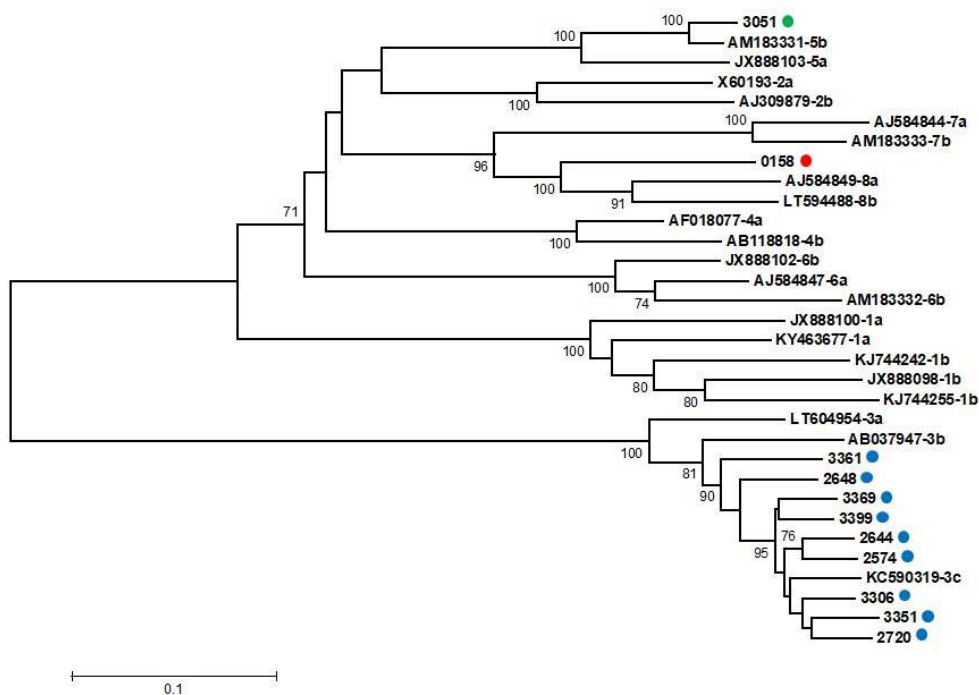


Figura 17– Árvore filogenética gerada pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo GTR+G+I para definição dos genótipos de HDV. As amostras determinadas no presente estudo caracterizadas como genótipo 3 estão representadas por círculos azuis, a amostra do genótipo 5 por um círculo verde e a amostra do genótipo 8 por um círculo vermelho. As sequências referência estão apresentadas pelo seu número de acesso no GenBank seguido pela classificação de genótipo segundo proposta de Miao *et al.* (2019). Os valores de bootstrap maiores que 70% para as 500 replicatas estão representados nos nós da árvore.

Das 9/11 amostras classificadas como HDV-3, sete (87,5 %) são provenientes da região Norte e uma (12,5%) da região Centro-Oeste(estado de Mato Grosso do Sul). e uma do Sudeste. As amostras HDV-5 (1/10; 10%) e HDV-8 (1/10; 10%) foram oriundas do estado de São Paulo, na região Sudeste.

Para cada um dos três genótipos encontrados (HDV-3, HDV-5 e HDV-8), foram construídos novos alinhamentos, a fim de obter uma classificação mais refinada das sequências em subgenótipos. Todas as sequências do genoma completo do HDV para cada genótipo disponíveis no GenBank foram utilizadas com base para o alinhamento.

Um trabalho brasileiro publicado em 2016 (Cicero *et al.*, 2016), reportou a caracterização de 46 sequências do genoma completo de amostras de HDV-3, porém, durante as buscas nos bancos de dados genéticos, foram encontradas somente 11 sequências do genoma completo deste genótipo. Para realizar as análises, após identificar uma alta similaridade entre as 46 sequências, foi utilizada a ferramenta CD-

HIT (Cluster Database at High Identity with Tolerance) para descartar sequências redundantes e, assim, permitir um processamento viável através de uma inferência Bayesiana. Com isso, o alinhamento final contou com 18 sequências além das 9 sequências HDV-3 aqui determinadas.

Para o alinhamento de HDV-5, foram utilizadas 18 sequências de genomas completos disponíveis, além da sequência da amostra 3051 caracterizada neste estudo. Para o alinhamento do HDV-8, a sequência 0158 foi comparada com 7 outras sequências completas de HDV-8 disponíveis nos bancos de dados. Os alinhamentos foram analisados filogeneticamente através de inferência Bayesiana

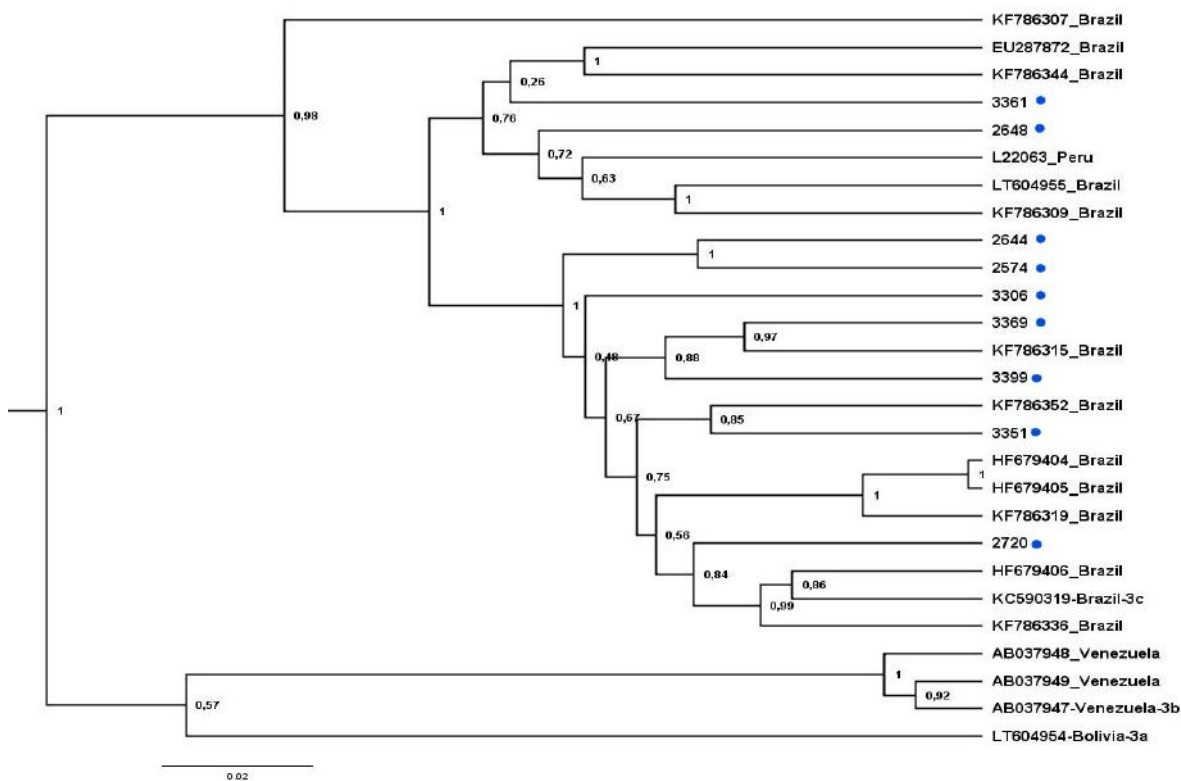


Figura 18 – Árvore filogenética gerada por inferência Bayesiana baseada no modelo GTR+G+I para definição dos subgenótipos de HDV-3. As nove amostras determinadas no presente estudo caracterizadas como genótipo 3 estão representadas por círculos azuis. As sequências referência estão apresentadas pelo seu número de acesso no GenBank seguido pelo nome de seu país de origem. Os valores de probabilidades posteriores estão representados nos nós da árvore.

Conforme visualizado na figura 18, todas as sequências brasileiras foram classificadas como pertencentes ao subgenótipo 3c, juntamente com uma sequência determinada no Peru. Sequências isoladas na Venezuela formaram um clado do subgenótipo 3b enquanto uma sequência isolada na Bolívia formou o subgenótipo 3a.

A respeito das relações intragenóticas do HDV-5, a amostra 3051 agrupou-se com as sequências do subgenótipo 5b (Figura 19). Todas as sequências completas disponíveis para análise foram coletadas em países localizados no noroeste da África, sendo que o isolado obtido da amostra 3051 apresentou uma maior similaridade com uma sequência de Guiné-Bissau. No geral, a similaridade nucleotídica entre a sequência 3051 e as demais sequências do subgenótipo 5b disponíveis variou entre 88,78% e 95,74%, enquanto a distância genética entre a sequência 3051 e os grupos de sequências dos subgenótipos 5a e 5b foi de $0,11 \pm 0,01$ e $0,07 \pm 0,01$, respectivamente.

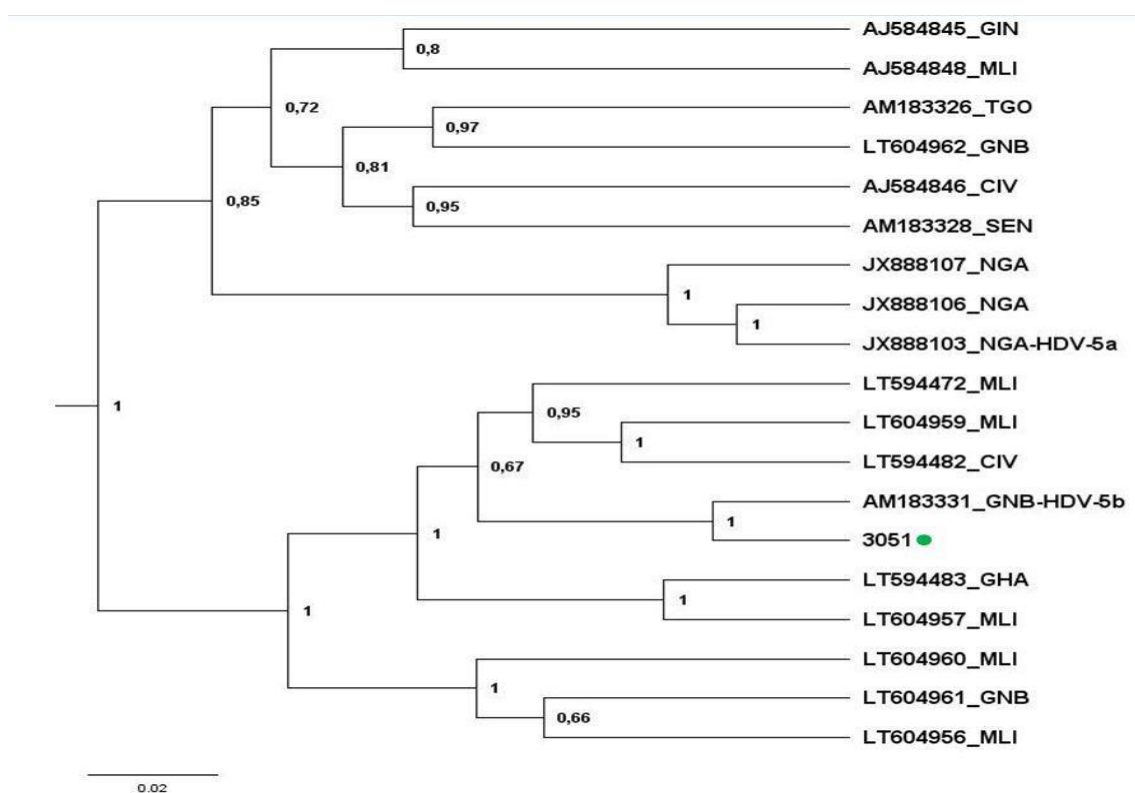


Figura 19 – Árvore filogenética gerada por inferência bayesiana baseada no modelo GTR+G+I para definição dos subgenótipos de HDV-5. A amostra determinada no presente estudo caracterizada como genótipo 5 está representada por círculo verde. As sequências referências estão apresentadas pelo seu número de acesso no GenBank seguido pela abreviação de seu país de origem de acordo com o código de três letras internacional de países definido na ISO3166-1. Os valores de probabilidades posteriores estão representados nos nós da árvore.

Em relação à sequência de HDV-8 caracterizada em nosso estudo, a inferência filogenética identificou, com alto grau de confiabilidade estatística (probabilidade posterior = 1), a formação de um clado monofilético exclusivo para a amostra em questão (Figura 20). A similaridade nucleotídica entre a sequência 0158 e as demais sequências do HDV-8 disponíveis variou entre 84,46% e 86,89%, enquanto a distância genética entre a sequência 0158 e os grupos de sequências dos subgenótipos 8a e 8b foi de $0,148 \pm 0,007$ e $0,158 \pm 0,009$, respectivamente.

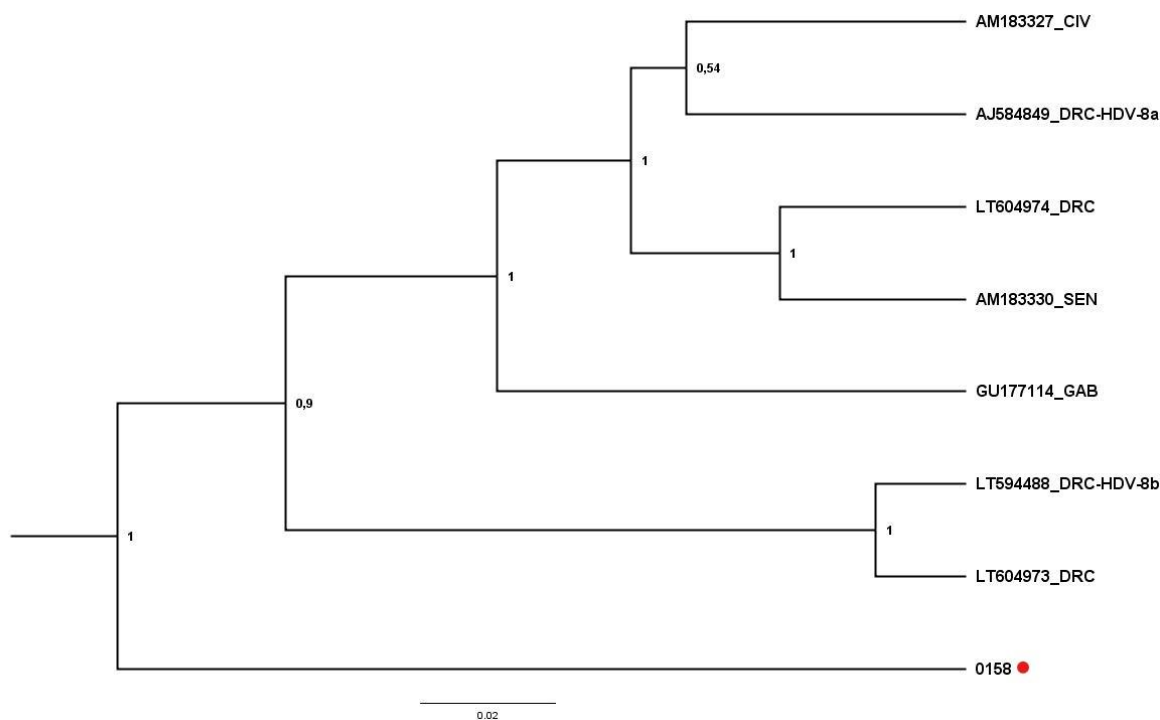


Figura 20 – Árvore filogenética gerada por inferência bayesiana baseada no modelo GTR+G+I para definição dos subgenótipos de HDV-8. A amostra determinada no presente estudo caracterizada como genótipo 8 está representada por círculo vermelho. As sequências referência estão apresentadas pelo seu número de acesso no GenBank seguido pela abreviação de seu país de origem de acordo com o código de três letras internacional de países definido na ISO3166-1. Os valores de probabilidades posteriores estão representados nos nós da árvore.

Como forma de possibilitar a análise da sequência de HDV-8 determinada neste estudo, juntamente com outras sequências deste mesmo genótipo reportadas em trabalhos anteriores realizados no estado do Maranhão, um alinhamento múltiplo contendo um fragmento parcial com 403 nucleotídeos da região genômica que codifica o HDAg foi analisado filogeneticamente por máxima verossimilhança (Figura 21).

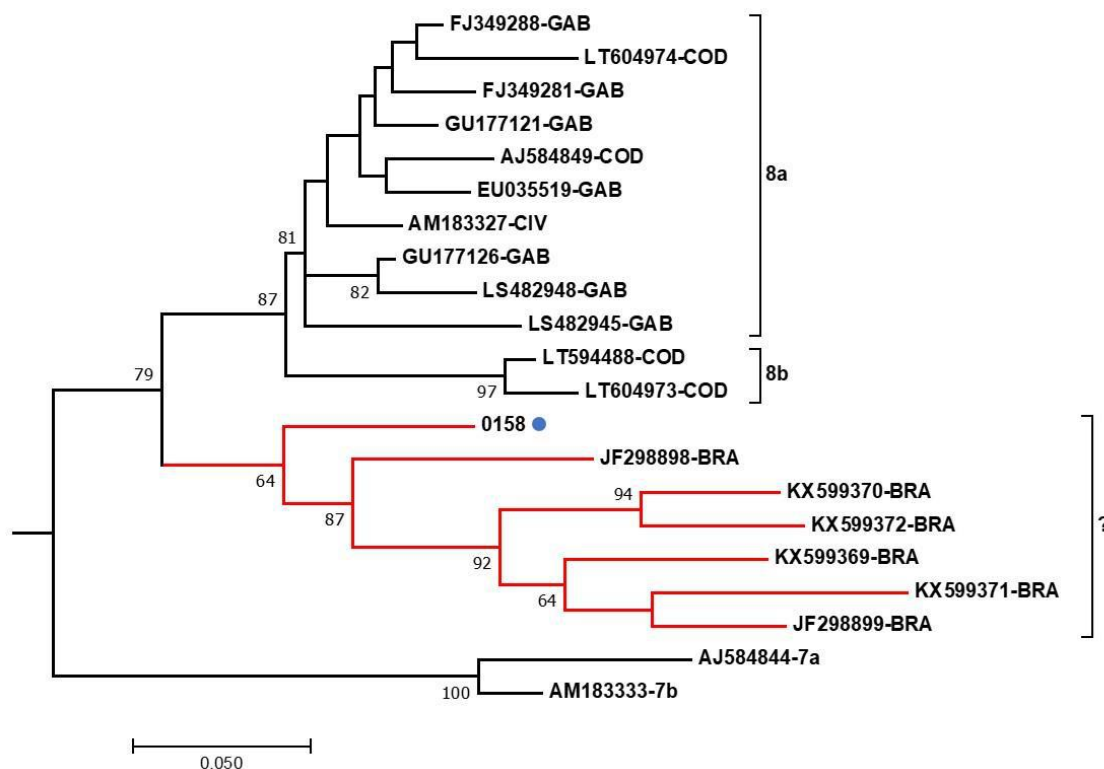


Figura 21– Árvore filogenética por máxima verossimilhança com sequências parciais (403 nt) do HDV-8. A amostra determinada no presente estudo está representada com um círculo azul. O ramo apresentado em vermelho mostra um terceiro clado distinto dos subgenótipos 8^a e 8b. As sequências referência estão apresentadas pelo seu número de acesso no GenBank seguido pela sigla do país de origem de acordo com o código de três letras internacional de países definido na ISO3166-1. Os valores de bootstrap maiores que 60% para as 1000 replicatas estão representados nos nós da árvore.

Conforme observado na árvore filogenética com sequências parciais, podemos confirmar a formação de um grupo monofilético a parte dos subgenótipos 8a e 8b contendo todas as sequências brasileiras até então disponibilizadas no GenBank. O cálculo de distância genética entre o clado brasileiro e os clados formados pelas sequências 8a e 8b indicou uma alta variabilidade de 15,5% enquanto a distância calculada entre o clado 8a e 8b foi de apenas 8,7%. As análises aqui realizadas sugerem fortemente que as sequências brasileiras do HDV-8 poderiam ser classificadas em um novo subgenótipo, que designaríamos 8c.

6. Discussão

Neste estudo, desenvolvemos uma nova estratégia de amplificação para o genoma completo do HDV (Figura 16), que foi aplicada na amplificação de 11 amostras de Delta provenientes de áreas endêmicas e não endêmicas do Brasil, o que possibilitou o sequenciamento dos 11 genomas completos. Protocolos disponíveis na literatura (Legal *et al.*, 2016; Yacoubi *et al.*, 2018) utilizam estratégias que demandam a amplificação de pelo menos 3 fragmentos sobrepostos para obtenção do genoma. Com a utilização de estratégias que demandem menos fragmentos para amplificação, evitamos a formação de quimeras no processo de sequenciamento, gerando maior confiabilidade no resultado.

No presente estudo, *primers* previamente publicados foram adaptados para a estratégia de amplificação de apenas dois fragmentos que, sobrepostos, contemplam toda a extensão genômica. Algumas sequências de *primers* foram ainda modificadas para uma melhor hibridização com o HDV-3, que é o mais divergente dentre todos os genótipos e o mais prevalente no Brasil (Alvarado-Mora *et al.*, 2011).

A análise filogenética do genoma completo do HDV indicou a presença dos genótipos 3 (9/11; 81,8%), 5 (1/11; 9,1%) e 8 (1/11; 9,1%). O HDV-1 não foi encontrado, ainda que esteja presente no mundo todo e seja o segundo mais prevalente na região da Bacia amazônica, atrás apenas do HDV-3 (Melo Da Silva *et al.*, 2019). O HDV-3 por sua vez, além de ser endêmico na região Norte, é o mais prevalente no Brasil e na América do Sul. Este foi o genótipo encontrado na maioria das amostras analisadas.

Das nove amostras caracterizadas como HDV-3, oito (88,9%) tiveram como origem a região Norte, endêmica para o HDV, enquanto uma veio do Mato Grosso do Sul. A região Centro-Oeste não é considerada endêmica no país, dessa forma, esse achado indica que possivelmente a amostra seja de um indivíduo que migrou da região Norte para o Centro-Oeste.

Apesar de anteriormente serem considerados genótipos endêmicos do continente africano, os outros genótipos encontrados, HDV-5 e HDV-8, já foram reportados no Brasil em estudos anteriores (Barros *et al.*, 2011; Melo da Silva *et al.*, 2019; Santos *et al.*,

2016). Nestes estudos, o HDV-5 havia sido somente relatado na região amazônica e o HDV-8 no Maranhão. Entretanto, em ambos os casos, houve informação insuficiente para definir se as amostras haviam sido encontradas em pacientes brasileiros ou estrangeiros.

Além do Brasil, o HDV-5 já foi encontrado na Suíça, no Reino Unido (Chen HY *et al.*, 2018) e mais recentemente na Austrália. O HDV-8 foi identificado em dois trabalhos com amostras brasileiras realizados no Maranhão (Barros LM *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2016), os quais associavam a detecção desse genótipo ao tráfico de escravos que ocorreu do século XVI até meados do século XIX. Em nosso estudo, há evidências de que a amostra do HDV-8 seja proveniente de um paciente africano ou afrodescendente, por conta de seu nome de origem africana. Porém, devido à escassez de dados sociodemográficos, não é possível confirmar essa hipótese.

A análise parcial do genoma do HDV da amostra 0158 juntamente com outras amostras brasileiras HDV-8 descritas anteriormente, demonstrou a formação de um clado monofilético à parte dos subgenótipos 8a e 8b. O cálculo de distância genética entre o clado brasileiro e os cladogramas formados pelas sequências 8a e 8b indicou uma alta variabilidade de 15,5% enquanto a distância calculada entre o clado 8a e 8b foi de apenas 8,7%. As análises aqui realizadas sugerem que as sequências brasileiras do HDV-8 poderiam ser classificadas em um novo subgenótipo, que designaríamos 8c. Uma posterior análise filogeográfica que nos permita identificar o momento de entrada deste genótipo tipicamente africano no Brasil, juntamente com a disponibilização de novos genomas completos de HDV-8 poderá confirmar a diferenciação deste novo subgenótipo.

Durante a pesquisa nos bancos de dados genéticos on-line, verificamos que estão disponíveis 513 sequências de genoma completo de HDV, sendo que a grande maioria, 62,6%, pertence ao HDV-1. Especificamente no banco de dados Genbank (NCBI, 1988), a busca ativa dos genomas completos dos genótipos 3, 5 e 8 evidenciou a presença de somente 36 sequências publicadas. Dessas, 11 referentes ao HDV-3, 18 ao HDV-5 e 7 ao HDV-8, de modo que nossos dados contribuirão significativamente para o conhecimento da diversidade genética do HDV. Essa escassez de genomas gera

dificuldades na vigilância epidemiológica da doença no país e em estudos de classificação viral.

Nesse contexto, há necessidade de esforços contínuos que avaliem as sequências das estirpes circulantes no Brasil. A obtenção desses genomas também contribuirá com a manutenção dos bancos de dados de sequência uma vez que, apesar da quantidade de dados genômicos do HDV ter aumentado nos últimos anos, ainda existe uma carência de genomas completos, sobretudo do HDV-8, encontrado neste trabalho. Obter os genomas completos é importante para a melhor caracterização molecular das estirpes virais circulantes no país e contribuirá com estudos de evolução e filodinâmica do HDV, principalmente do HDV-3, uma vez que sua divergência frente aos demais genótipos levanta a hipótese de que ele possa ter uma origem diferente (Alvarado-Mora *et al*, 2011).

Nossos dados preliminares já demonstram a importância da vigilância epidemiológica contínua, a qual permite monitorar e compreender o potencial de disseminação das variantes virais. Nesse contexto, as análises de sequências utilizando ferramentas de bioinformática se mostram de grande utilidade por permitir inferir rotas de entrada e migração do HDV pelo país.

7. Conclusões

- Das 1240 amostras positivas para o antígeno de envelope do HBV (HBsAg), 40 foram reativas para o anticorpo anti-HDV, e destas, 38 tiveram os ácidos nucleicos virais extraídos.
- Das 38 amostras extraídas, 13 foram positivas para o RNA viral, e destas, 11 foram amplificadas e tiveram seu genoma completo sequenciado.
- A partir do alinhamento e análise filogenética, foi identificado que a maioria das sequências pertencia ao genótipo 3 (9/11), seguidos dos genótipos 5 (1/11) e 8 (1/11).
- Foi identificada uma amostra de HDV-3 no estado do Mato Grosso, pertencente a uma região não endêmica para o vírus, assim como amostras de HDV-5 e HDV-8 no Sudeste, em São Paulo.
- A análise filogenética da amostra de HDV-8 (0158) e o cálculo de distância genética revelou uma alta variabilidade quando comparada às sequências dos subgenótipos 8a e 8b, o que indicaria a subdivisão de um novo subgenótipo, que seria denominado 8c.

8. Perspectivas

Em etapas futuras, uma análise filogeográfica das sequências HDV-3 será realizada, buscando identificar a origem ancestral deste genótipo endêmico da região Norte do país, sua diversificação e rotas de disseminação. Essa dúvida se na maior divergência intragenotípica de HDV-3, quando comparado aos outros genótipos, o que sugere uma origem diferente do genótipo com maior circulação no país. Enquanto HDV-3 possui similaridade nucleotídica de cerca de 62% com os outros genótipos, a similaridade entre os outros está em cerca de 80% (Miao *et al*, 2019)

Além disso, apesar de ser um fenômeno comumente identificado em outros genótipos do HDV, eventos de recombinação genômica ainda não foram descritos para o HDV-3. Sendo a maioria dos estudos com HDV-3 realizados apenas com a porção codificante do genoma, a perspectiva de análise de possíveis pontos de recombinação no genoma completo pode trazer importante conhecimento sobre a dinâmica deste processo neste genótipo.

Ainda, em etapas futuras, iremos finalizar o processo de clonagem do genoma completo do HDV, obtendo uma base para realização de testes quantitativos e qualitativos in-house.

9. Referências bibliográficas

- Alvarado-Mora, M. V. e Rebello Pinho, J. R. (2013). Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antiviral Therapy*. 18, 459-65.
- Blumberg, B. S., Alter, H. J. e Visnich, S. A. (1965). "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA*. 15, 541-6.
- Bonino F, Hoyer B, Shih JW, Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL. Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta-associated particle (1984) *Infect Immun*. 3, 1000-5
- Botelho-Souza LF, Vasconcelos MPA, Dos Santos AO, Salcedo JMV, Vieira DS. Hepatitis delta: virological and clinical aspects (2017) *Virology*. 1, 177
- Buddeberg F, Schimmer BB, Spahn DR. Transfusion-transmissible infections and transfusion-related immunomodulation (2008). *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 503-17
- Burns GS, Thompson AJ. Viral hepatitis B: clinical and epidemiological characteristics. (2014) *Cold Spring Harb Perspect Med*. 12, a024935
- Carrilho, J. F. e Silva, L. C. (1995). Epidemiologia. In: *Hepatites Agudas e Crônicas*. da Silva, LC eds. (São Paulo, Savier), pp. 73-95.
- Chen H, Shen D, Ji D. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut* (2019). 68, 512-521.
- Chen PJ, Kalpana G, Goldberg J, Mason W, Werner B, Gerin J, Taylor J. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus (1986). *Sci U S A*, 22, 8774-8
- Davison F, Alexander GJ, Trowbridge R, Fagan EA, Williams R. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers (1987). *J Hepatol*. 4, 37-44
- Delfino CM, Cerrudo CS, Biglione M, Oubiña JR, Ghiringhelli PD, Mathet VL (2018). A comprehensive bioinformatic analysis of hepatitis D virus full-length genomes. *J Viral Hepatitis* (7):860-869
- Giersch K, Allweiss L, Volz T, Helbig M, Bierwolf J, Lohse AW, Pollok JM, Petersen J, Dandri M, Lütgehetmann M. Hepatitis Delta co-infection in humanized mice leads to pronounced induction of innate immune responses in comparison to HBV mono-infection (2015 a). *J Hepatol*. 63(2), 346-53.
- Giersch, Katja, and Maura Dandri. Hepatitis B and Delta Virus: Advances on Studies about Interactions between the Two Viruses and the Infected Hepatocyte (2015 b). *Journal of clinical and translational hepatology*. 3, 220-9
- Gilman C, Heller T, Koh C. Chronic hepatitis delta: A state-of-the-art review and new therapies (2019). *World J Gastroenterol*. 32, 4580-4597
- Gomes-Gouvêa MS, Pereira Soares Mdo C, Guedes de Carvalho Mello IM, Brito EM, Pereira Moia L de J, Bensabath G, Nunes HM, Carrilho FJ, Pinho JR. Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin (2008). *Acta Trop*. 3, 149-55
- Goodrum G, Pelchat M. Insight into the Contribution and Disruption of Host Processes during HDV Replication (2018). *Viruses*. 1, 21
- Hourioux C, Sureau C, Poisson F, Brand D, Goudeau A, Roingeard P. Interaction between hepatitis delta virus-encoded proteins and hepatitis B virus envelope protein domains (1998). *Gen Virol*. 5, 1115-9
- Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus (2011). *Lancet*. 10, 73-85

Ichai P, Legeai C, Francoz C, Boudjema K, Boillot O, Ducerf C, Mathurin P, Pruvot FR, Suc B, Wolf P, Soubrane O, Le Treut YP, Cherqui D, Hannoun L, Pageaux GP, Gugenheim J, Letoublon C, Saric J, Di Martino V, Abergel A, Chiche L, Antonini TM, Jacquelinet C, Castaing D, Samuel D; French Liver Transplant Teams. Patients with acute liver failure listed for superurgent liver transplantation in France: reevaluation of the Clichy-Villejuif criteria (2015). *Liver Transpl.* 4, 512-23. doi: 10.1002/lt.24092. PMID: 25675946.

Ichai, P., & Samuel, D. Management of Fulminant Hepatitis B (2019). *Current infectious disease reports*, 21(7), 25.

Indolfi G, Easterbrook P, Dusheiko G, Siberry G, Chang MH, Thorne C, Bulterys M, Chan PL, El-Sayed MH, Giaquinto C, Jonas MM, Meyers T, Walsh N, Wirth S, Penazzato M. Hepatitis B virus infection in children and adolescents(2019). *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 4(6):466-476.

HepatitisB virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread (2017). *Hepatol Int.* 6, 500-508

Kay A, Melo da Silva E, Pedreira H, Negreiros S, Lobato C, Braga W, Muwonge R, Dény P, Reis M, Zoulim F, Trepo C, D'Oliveira A Jr, Salcedo JM, Schinoni MI, Parana R. HBV/HDV co-infection in the Western Brazilian Amazonia: an intriguing mutation among HDV genotype 3 carriers (2014). *J Viral Hepatology* (2014). 12, 921-4

Keskin O, Wedemeyer H, Tüzün A, Zachou K, Deda X, Dalekos GN, Heidrich B, Pehlivan S, Zeuzem S, Yalçın K, Gürel S, Tabak F, Idilman R, Bozkaya H, Manns M, Yurdaydin C (2015). Association Between Level of Hepatitis D Virus RNA at Week 24 of Pegylated Interferon Therapy and Outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 13(13):2342-49.e1-2.

Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, Winters MA, Subramanya G, Cooper SL, Pinto P, Wolff EF, Bishop R, Ai Thanda Han M, Cotler SJ, Kleiner DE, Keskin O, Idilman R, Yurdaydin C, Glenn JS, Heller T. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial (2015). *Lancet Infect Dis.* 10, 1167-1174

Koh C, Da BL, Glenn JS. HBV/HDV Coinfection: A Challenge for Therapeutics (2019). *Clin Liver Dis.* 3, 557-572.

Kos, A., Dijkema, R., Amberg, A. et al. The hepatitis delta (δ) virus possesses a circular RNA (1986). *Nature.* 7, 558–560

Kushner T, Serper M, Kaplan DE. Delta hepatitis within the Veterans Affairs medical system in the United States: Prevalence, risk factors, and outcomes (2015). *J Hepatol.* 3, 586-92

Liao B, Zhang F, Lin S, He H, Liu Y, Zhang J, Xu Y, Yi J, Chen Y, Liu H, Wang Z, Cai W (2014) Epidemiological, clinical and histological characteristics of HBV/HDV co-infection: a retrospective cross-sectional study in Guangdong, China. *PLoS One.* 22;9(12):e115888.

Le Gal F, Brichler S, Drugan T, Alloui C, Roulot D, Pawlotsky JM, Dény P, Gordien E. Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains (2017). *Hepatology.* 6, 1826-1841

Le Gal F, Gault E, Ripault MP, et al. Eighth major clade for hepatitis delta virus (2006). *Emerg Infect Dis.* 9, 1447-1450.

Lempp FA, Ni Y, Urban S. Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options (2016). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 580-9

Liao B, Zhang F, Lin S, He H, Liu Y, Zhang J, Xu Y, Yi J, Chen Y, Liu H, Wang Z, Cai W. Epidemiological, clinical and histological characteristics of HBV/HDV co-infection: a retrospective cross-sectional study in Guangdong, China (2014). *PLoS One.* (12):e115888.

- Liu S, Koh SS, Lee CG. Hepatitis B Virus X Protein and Hepatocarcinogenesis (2016). *Int J Mol Sci* ;17(6):940
- Melo Da Silva E, Kay A, Lobato C, Muwonge R, Zoulim F, Brites C, Parana R, Trego C. Non-F HBV/HDV-3 coinfection is associated with severe liver disease in Western Brazilian Amazon (2019). *J Med Virol.* 6, 1081-1086
- Mentha N, Clément S, Negro F, Alfaiate D. A review on hepatitis D: From virology to new therapies (2019). *J Adv Res.* 17, 3
- Miao Z, Pan Q. Revisiting the estimation of hepatitis D global prevalence (2020). *J Hepatol.* 5,1279-1280
- Mina T, Amini Bavil Olyae S, Tacke F, Maes P, Van Ranst M, Pourkarim MR. Genomic Diversity of Hepatitis B Virus Infection Associated With Fulminant Hepatitis B Development (2015). *Hepat Mon.* (6):e29477.
- Ministério da Saúde. (2017). Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite B e coinfeções. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais, v. 1, p. 120.
- Ministério da Saúde. (2018). Boletim Epidemiológico Hepatites Virais. [s.l: s.n.].
- Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants Chih-Lin Lin, MD, Director of Department of Gastroenterology (2016) Jia-Horng Kao, MD, PhD, National Chair Professor, Distinguished Professor
- Nguyen HM, Sy BT, Trung NT, Hoan NX, Wedemeyer H, Velavan TP, Bock CT. Prevalence and genotype distribution of hepatitis delta virus among chronic hepatitis B carriers in Central Vietnam (2017). *PLoS One.* (4):e0175304
- Paraná R, Kay A, Molinet F, Viana S, Silva LK, Salcedo JM, Tavares-Neto J, Lobato C, Rios-Leite M, Matteoni L, D'Oliveira A Jr, Tauil P, Trego C. HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: A preliminary report (2006). *Am J Trop Med Hyg.* 3, 475-9
- Poisson F, Roingeard P, Baillou A, Dubois F, Bonelli F, Calogero RA, Goudeau A. Characterization of RNA-binding domains of hepatitis delta antigen (1993). *J Gen Virol.* 10, 2473-8
- Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, Crivelli O, Trego C, Bonino F, Verme G. (1977) Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut.* 12, 997-1003.
- Rizzetto M. Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology (2015). *Cold Spring Harb Perspect Med.* 7, a021576.
- Roulot D, Briclher S, Layese R, BenAbdesselam Z, Zoulim F, Thibault V, Scholtes C, Roche B, Castelnaud C, Poynard T, Chazouillères O, Ganne N, Fontaine H, Gournay J, Guyader D, Le Gal F, Nahon P, Roudot-Thoraval F, Gordien E; Deltavir study group. Origin, HDV genotype and persistent viremia determine outcome and treatment response in patients with chronic hepatitis delta (2020). *J Hepatol.* 5, 1046-1062
- Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus (2015). *Immunity.* 42, 123-32
- SCARPONI, Cristiane FO. Molecular epidemiology of Hepatitis delta virus infection in Minas Gerais state from Brazil, an area outside the hyperendemic region of the Amazon Basin (2019). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.114, e190074.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico das hepatites virais (2021). Brasília, DF.

Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection (2015). *Virology*. 479-480:672-86

Shapiro CN. Epidemiology of hepatitis B (1993). *Pediatr Infect Dis J* 5, 433-7

Smedile A, Farci P, Verme G, Caredda F, Cargnel A, Caporaso N, Dentico P, Trepo C, Opolon P, Gimson A, Vergani D, Williams R, Rizzetto M. Influence of delta infection on severity of hepatitis B (1982). *Lancet*. 2(8305):945-7.

Stockdale AJ, Chaponda M, Beloukas A, Phillips RO, Matthews PC, Papadimitropoulos A, King S, Bonnett L, Geretti AM. Prevalence of hepatitis D virus infection in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* (2017). 10, 992-1003

Stockdale AJ, Kreuels B, Henrion MYR, Giorgi E, Kyomuhangi I, de Martel C, Hutin Y, Geretti AM. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis (2020). *J Hepatol*. 3, 523-532

Taylor JM. Hepatitis D Virus Replication (2015). *Cold Spring Harb Perspect*. 5, 11

Tseng CH, Lai MM. Hepatitis delta virus RNA replication (2009). *Viruses*. 3, 818-831

Tuttleman, J. S., Pourcel, C. e Summers, J. (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*. 47, 451-60.

WHO (World Health Organization). (2021). Hepatitis B. 204

WHO (World Health Organization). (2017). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.