

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**BÁRBARA VIEIRA DO LAGO**

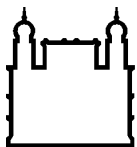
### **Os genótipos do vírus da hepatite B na África e no Brasil: Evolução, disseminação e associação com a rota de escravos**

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia celular e molecular

**Orientadora:** Dr. Selma de Andrade Gomes

**RIO DE JANEIRO**

2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**BÁRBARA VIEIRA DO LAGO**

Os genótipos do vírus da hepatite B na África e no Brasil: Evolução,  
disseminação e associação com a rota de escravos

**ORIENTADORA: Prof. Dr. Selma de Andrade Gomes**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Mariza Morgado- IOC

**Prof. Dr.** Ana Rita Coimbra Motta-Castro - UFMS

**Prof. Dr.** Elisabeth Lampe - IOC

**Prof. Dr.** Vanessa Salete de Paula – IOC

**Prof. Dr.** Natália Mota Araújo - IOC

Rio de Janeiro, 08 de Maio de 2014

*“ Era um sonho dantesco... o tombadilho  
Que das luzernas avermelha o brilho.  
Em sangue a se banhar.  
Tinir de ferros... estalar de açoite...  
Legiões de homens negros como a noite,  
Horrendos a dançar... (...)  
Senhor Deus dos desgraçados!  
Dizei-me vós, Senhor Deus!  
Se é loucura... se é verdade  
Tanto horror perante os céus?!  
Ó mar, por que não apagas  
Co'a esponja de tuas vagas  
De teu manto este borrão?...  
Astros! noites! tempestades!  
Rolai das imensidades!  
Varrei os mares, tufão (...)  
São os filhos do deserto,  
Onde a terra esposa a luz.  
Onde vive em campo aberto  
A tribo dos homens nus...  
São os guerreiros ousados  
Que com os tigres mosqueados  
Combatem na solidão.  
Ontem simples, fortes, bravos.  
Hoje míseros escravos,  
Sem luz, sem ar, sem razão. . .”*  
(O Navio Negreiro – Castro Alves)

*À minha família, meu  
centro, Suian, Maurício e Isabela;  
aos meus avós Inete, Cleto, Dadá  
e Lago, que tanto amo.*

*... e aos donos da minha  
existência, Reinaldo e Liz.*

*Sem vocês, tudo perderia a graça.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiro ao Grande Mestre do universo por mais uma existência de Amor e Instrução. Agradeço pela proteção em todas as batalhas, pela serenidade nas perdas e ganhos e pelas mãos nos meus ombros a cada passo. Com os anos, venho buscando minha graduação em bondade e misericórdia, e agradeço, humildemente, a oportunidade.

Agradeço aos meus pais Maurício e Suian pelos ensinamentos da bondade, da caridade e do respeito a todas as criaturas vivas. Por me explicarem desde muito cedo que não somos o centro, e sim, apenas mais uma parte, mas como tal temos importância imensurável na composição da vida e na harmonia das coisas. Agradeço à minha irmã Isabela por me ensinar a proteger e a dividir. Obrigada pelos anos, pelas horas, pelos segundos... Pelo sabor de uma jornada leve, porém profunda; pelas angústias e e alegrias compartilhadas. Agradeço a minha família pelos exemplos, bons e maus. Por me deixarem escolher qual deles seguir. Essas escolhas fizeram de mim quem sou, e quando me olho no espelho, vejo, cheia de orgulho, parte do reflexo de vocês.

Agradeço ao meu Ricky, pelo presente desses doze anos de companhia, pelo amor sem medida, pela verdade sem ressalvas.

Agradeço aos meus avós, Inete, Cleto, Dadá, Lago e Ilva, por serem minhas eternas fontes de sabedoria e inspiração. Obrigada pela adoção, pelos ensinamentos, pela intercessão constante e eterna, pelo diálogo, pela paciência. Vó Inete, obrigada pela roupa limpa, pela comida fresca, pela companhia e pela estabilidade emocional. Obrigada pelas renúncias e pela entrega desde pequenininha (não é a primeira vez que moramos juntas, né?). Tudo sempre foi mais leve e mais fácil com você por perto.

Agradeço também ao Reinaldo, meu companheiro de múltiplas jornadas. Obrigada pelo rumo, pela vontade, pela proteção. Por despertar o melhor em mim; Obrigada por tornar minha estrada mais simples, polindo com suas mãos cada pedra da nossa trilha. Obrigada pelas mãos entrelaçadas a cada salto mais largo, quando eu penso que minhas pernas são incapazes de chegar. E nessa hora, apesar de a nossa luz ser sua, obrigada por me agradecer como se fosse minha.

Obrigada, minha Liz, por me ninar enquanto você dorme. Por me trazer a paz quando só quer meu colo e quando eu canto pra você. Por me fazer voltar a acreditar em reinos mágicos de castelos e princesas. E quando o cansaço do mundo adulto parece imensurável, por fazer da minha vida, infância e perfeição.

Agradeço a tantas pessoas especiais: Magnes, Lara, Camila, Renato, Bruno; aos meus amigos da Rural e da UNIRIO. A meus tios, padrinhos Maira e Ronaldo, amigos, cunhados e primos; aos meus sogros Reinaldo e Sueli, ao meu lindo afilhado João Daniel, e a todos aqueles, que de alguma maneira, tocaram essa minha existência.

Agradeço muito especialmente à minha querida orientadora e mãe científica, Selma. Graças a seu trabalho e orientação, tive a oportunidade de me dedicar a um projeto pelo qual sou apaixonada. Agradeço pelo carinho, pelo acompanhamento, pela paciência, pela intimidade, pela liberdade e pela adoção. Agradeço também muito especialmente ao meu mestre adotivo Christian, por todo o trabalho, atenção e disponibilidade. Sem seu trabalho lado a lado, tudo teria sido muito mais difícil. Com certeza sua luz me imprestou o brilho com o qual eu termino essa jornada.

Agradeço aos meus queridos amigos do Laboratório de Virologia Molecular: Aos amigos antigos: À Monique por exercitarmos juntas o lado simples das coisas, pela confiança, companheirismo e amizade de nove anos.. À Carol, por toda a ajuda de toda a vida, pela paciência, por todas as barras resolvidas, pela prestatividade. Ao Chico pela cumplicidade, pela verdade, pelas risadas, pelos milagres..., ao Fino pelo bom humor e papos sérios, pelos bons exemplos, pela boa energia..., ao Léo pelas piadas, pelas bobagens, por todo o carinho e atenção, à Naty pela atenção, pelas caronas, pela amizade, pela troca.... À Flávia pelas orações, pela amizade, carinho, força e instrução espiritual. Ao Oscar por toda a calma nas horas certas, pela paciência, apoio, à Natalinha pela linda oportunidade, pelo carinho e suavidade. Agradeço também a todos os outros colegas de trabalho e novos amigos: Júnior, Márcia Terezinha, Sérgio, Pimenta, Marcelle ,Maryrose, Waldir, Vinícius, Agatha, Maria Clara, Jéssica, Georgia pelo carinho, ajuda e companhia. Foi um grande prazer e honra aprender com todos vocês.

Agradeço à minha revisora, Dra Mariza Morgado, por toda a revisão, ajuda e comentários valiosos. Agradeço pela sua atenção e elegância em me instruir, pela paciência e pela doação do seu tempo.

Agradeço aos demais membros da banca examinadora: As Dras Ana Rita Motta Castro, Elisabeth Lampe e Vanessa de Paula pela prestatividade, carinho, amizade e atenção durante todos esses anos. Por me ensinarem desde a iniciação científica com seus exemplos de competência, garra, doçura e dedicação.

Enfim, a todos aqueles que engrandecem a cada dia a minha caminhada e fazem cada passo fazer sentido.

## RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) representa um grave problema de saúde pública mundial, apesar da existência de uma vacina eficiente. Estima-se que cerca de 350 milhões de indivíduos no mundo estejam cronicamente infectados, dos quais a maior parte se encontra em países em desenvolvimento. A heterogeneidade das sequências dos isolados do HBV permite a sua classificação em oito genótipos, A a H, baseada na divergência do genoma completo de mais de 7,5%. A presente tese é composta principalmente de três manuscritos, sendo um trabalho publicado e dois outros em submissão, além de cinco trabalhos como colaboradora. Esses estudos se propuseram a investigar a evolução dos genótipos do HBV entre África e Brasil e associar a dispersão dos genótipos no Brasil com a rota de escravos. No primeiro trabalho, intitulado "*Analysis of Complete Nucleotide Sequences of Angolan Hepatitis B Virus Isolates Reveals the Existence of a Separate Lineage within Genotype E*", realizamos a caracterização filogenética viral dos isolados circulantes em Angola e sua associação com os perfis sorológicos e moleculares existentes naquela população. Através dessas análises, identificamos a separação das amostras angolanas como pertencentes a uma nova linhagem, composta por Angola, Namibia e Republica Democratica do Congo, provisoriamente denominada pela nossa equipe, *SWL (Southwest African Lineage)*. No segundo trabalho, intitulado "*HBV subgenotype A1: Relationships between Brazilian, African and Asian isolates*", fomos em busca das história evolutiva do HBV/A1, e suas rotas de dispersão entre África e Brasil durante o período do tráfico negreiro. Surpreendentemente, observamos que todas as amostras brasileiras estão geneticamente relacionadas às amostras da Ásia, ao invés da África. Esse fato sugere que o HBV/A1 possa ter sido introduzido no Brasil a partir dos portos de Moçambique, no sudeste africano, ou diretamente através da Índia por navegantes portugueses. Estudos futuros utilizando amostras de Moçambique serão necessários para confirmar essa hipótese. No terceiro trabalho, intitulado "*Comparison of levels of HBV (subgenotype A1) antigens synthesis after transfection of Huh7 cells by HBV cccDNA and 1.28 mer HBV DNA construct*", objetivamos comparar os níveis de replicação do HBV entre dois modelos previamente descritos. Uma vez que HBV não é um vírus cultivável, estratégias que possam auxiliar na compreensão dos seus mecanismos biológicos e replicativos são particularmente importantes. Esses estudos visam contribuir para um maior entendimento das características biológicas, variabilidade genética e outras particularidades envolvidas na infecção pelo HBV.

## ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the major global human health problems, despite the existence of an effective vaccine. It is estimated that around 350 million people worldwide are chronically infected; most of them is in developing countries. The sequence heterogeneity of HBV isolates has led to the classification of HBV into eight genotypes, A to H, based on full-length genomic divergence of more than 7.5%. This thesis is composed mainly of three manuscripts: One of them is already published and two others are in submission. Five other manuscripts are listed as complementary production. These studies have set out to understand the evolution of HBV genotypes between Africa and Brazil and associate its dispersion with slave routes. In the first study, entitled " Analysis of Complete Nucleotide Sequences of Hepatitis B Virus Isolates Angolan Reveals the Existence of a Separate Lineage Within Genotype E" , performed the phylogenetic characterization of viral isolates circulating in Angola and its association with serological and molecular profiles. Through these analyzes, we characterized a separated lineage composed by Angolan, Namibia and Democratic Republic of Congo, provisionally named by our team as SWL (Southwest African Lineage). In the second paper, entitled " Hepatitis B virus subgenotype A1: Relationships between Brazilian, African and Asian isolates " we aimed investigate the evolutionary history and migration patterns of HBV/A1 from Africa to Brazil during the slave trade. Surprisingly, was observed that all Brazilian samples are genetically related to Asian isolates, rather than the African ones. These finds suggest that Asia was the source of HBV/A1 infection in Brazil, probably through Mozambique in southeastern Africa, or directly through India by Portuguese sailors. Further studies with samples from Mozambique will be needed to validate this hypothesis. The third paper, entitled "Comparison of levels of HBV (subgenotype A1) antigens synthesis after transfection of Huh7 cells by HBV cccDNA and HBV DNA construct 1.28 mer", aimed to compare HBV/A1 replication levels between two previously described systems. Since the absence of appropriate cell culture systems supporting an efficient *in vitro* HBV infection, strategies that can assist in understanding their biological and replicative mechanisms are particularly important. These studies aim to clarify biological characteristics, genetic variability and peculiarities of HBV infection.

# ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	01
I.1. Histórico.....	01
I.2. Classificação do vírus da hepatite B (HBV) .....	03
I.3. Características biológicas e estruturais do HBV.....	04
I.3.1 Organização do genoma viral.....	06
I.3.1.1 ORF Pré-S/S.....	07
I.3.1.2 ORF Pré-C/C.....	08
I.3.1.3 ORF P.....	08
I.3.1.4 ORF X.....	09
I.4. Replicação do HBV.....	10
I.5. Epidemiologia da infecção pelo HBV.....	12
I.5.1 Prevalência da infecção pelo HBV no mundo.....	12
I.5.2 Prevalência da infecção pelo HBV no Brasil.....	14
I.5.3 Prevalência da infecção pelo HBV na África.....	15
I.6. Infecção pelo HBV: transmissão e marcadores sorológicos.....	16
I.6.1 Transmissão do HBV.....	16
I.6.2. Marcadores sorológicos da infecção pelo HBV.....	17
I.7 Tratamento da hepatite B.....	22
I.8. Variabilidade do HBV.....	24
I.8.1. Subtipos e genótipos do HBV.....	24
I.8.2. Distribuição geográfica dos genótipos.....	27
I.9. Panorama histórico.....	31
I.9.1 O escravo africano.....	31
I.9.2 O comércio transatlântico e a escravidão no Brasil.....	32
II. JUSTIFICATIVA .....	38
III. OBJETIVOS.....	41
III.1. Objetivo geral da tese.....	41
III.2.1 Objetivos gerais do artigo 1.....	41
III.2.2 Objetivos gerais do artigo 2.....	41
III.2.2 Objetivos gerais do artigo 3.....	41



IV. RESULTADOS.....	41
IV.1. Artigo 1.....	43
IV.2 Artigo 2.....	54
IV.3. Artigo3.....	64
V. DISCUSSÃO.....	86
VI. CONCLUSÕES.....	102
VII. PERSPECTIVAS.....	104
VIII. PRODUÇÃO COMPLEMENTAR.....	104
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
X.ANEXOS.....	120

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura do vírus da hepatite B (HBV). Modelo esquemático da partícula de Dane.	06
Figura 1.2. Partículas infecciosas e não infecciosas do HBV.....	06
Figura 1.3. Modelo esquemático do genoma do HBV.....	10
Figura 1.4. Modelo esquemático do ciclo replicativo do HBV.....	12
Figura 1.5. Prevalência mundial do HBsAg.....	13
Figura 1.6. Perfil sorológico da hepatite B.....	19
Figura 1.7. Fluxograma da infecção pelo HBV.....	21
Figura 1.8. Distribuição dos genótipos do HBV no Brasil.....	28
Figura 1.9. Distribuição dos genótipos do HBV no continente africano.....	29
Figura 1.10. Rotas utilizadas durante a expansão marítima portuguesa.....	33
Figura 1.11. Principais rotas do tráfico de escravos.....	35
Figura 10.12. Esquema utilizado na clonagem do genoma completo do HBV no vetor pUC19....	124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Características dos Genótipos do HBV.....	27
Tabela 10.2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR e/ou sequenciamento do genoma completo do HBV.....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS:

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

Anti-HBe - Anticorpo contra a proteína solúvel e

Anti-HBs - Anticorpo contra o antígeno de superfície viral

Anti-HBx - Anticorpo contra a proteína multifuncional X

DHBV- Vírus da hepatite B de patos

D.O./C.O.- Densidade ótica/ cut-off

GSHV - Vírus da hepatite B de esquilos

HAV - Vírus da hepatite A

HBV - Vírus da hepatite B

HBcAg - Proteína constituinte do *core* viral

HBeAg – Proteína solúvel e

HBsAg - Antígeno de superfície viral

HBxAg - Proteína multifuncional X

HCC - Carcinoma hepatocelular

HCV - Vírus da hepatite C

HDV - Vírus da hepatite Delta

HEV - Vírus da hepatite E

HGV - Vírus da hepatite G

HHBV - Vírus da hepatite B de garças

IC- Intervalo de confiança

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

Ipea - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada

STHBV - Vírus da hepatite B de cegonhas

TTV - Torque Teno vírus

TTMV - Torque Teno Mini virus

TTMDV - Torque Teno Midi vírus

WHS - Vírus da hepatite B de marmotas

WMHBV – Woolly Monkey Hepatitis B Virus

## I- INTRODUÇÃO

### I.1- HISTÓRICO

O termo hepatite refere-se a toda inflamação capaz de gerar dano nas células hepáticas, podendo variar de quadros assintomáticos, com simples alteração laboratorial, até doença hepática fulminante e fatal com distintos graus de morbi-mortalidade (WHO, 2004a; CDC, 2009).

Dentre as diversas causas de hepatite, as mais frequentes são as provocadas por infecções virais (vírus das hepatites A, B, C, D e E, febre amarela, citomegalovírus, entre outros). Como outras causas de distúrbio hepático podem ser citados uso de drogas (antiinflamatórios, anticonvulsivantes, sulfas, derivados imidazólicos, hormônios tireoidianos, anticoncepcionais), distúrbios metabólicos (doença de Wilson, hemossiderose, hemocromatose), hepatite transmissível, hepatite pós-choque e hepatite autoimune (Van-Damme e Vellinga, 1998, WHO, 2004a; CDC, 2009).

As hepatites virais referem-se ao dano hepático causado por um conjunto de vírus hepatotrópicos que apresentam, inicialmente, características clínicas semelhantes e são classificados, conforme a forma predominante de transmissão, em dois grupos: sanguíneos e entéricos (WHO, 2004a; WHO, 2004b; CDC, 2009).

As hepatites causadas pelos vírus A e E são de transmissão entérica e normalmente de resolução auto-limitada. Já as dos tipos B, C e D estão classificadas como hepatites de transmissão sanguínea e possuem potencial evolutivo para hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) (Van-Damme e Vellinga, 1998).

Relatos da icterícia, como doença epidêmica, podem ser encontrados tanto no Tamulde da Babilônia, como nas descrições de Hipócrates, médico e filósofo grego, datadas do século V a.C. (Sherlock, 1987).

O primeiro caso documentado de hepatite sérica aconteceu na Alemanha, em 1883, quando, aproximadamente 15% dos 1289 trabalhadores de um estaleiro em Bremen, após serem vacinados com um mesmo lote de vacina antivariólica estabilizada com linfa humana, desenvolveram icterícia

acompanhada por sintomas semelhantes aos da hepatite, num período variável de dois a oito meses após a vacinação (Gardner, 1950).

A primeira metade do século XX apresentou diversos surtos de hepatites com período de incubação longo (mais de 100 dias), que pareciam estar associados à utilização de seringas e agulhas não esterilizadas, às transfusões sanguíneas e à vacinação, reforçando a idéia da existência de uma hepatite de transmissão parenteral. Em 1942, durante a II Guerra Mundial, diversos casos de hepatite foram relatados quando mais de 28.000 soldados americanos desenvolveram hepatite ao receber vacina contra a febre amarela, estabilizada com soro humano (Krugman, 1989).

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

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

A descoberta do HBV veio através de uma via indireta. Em 1965, Blumberg e colaboradores, publicaram o que viria a ser uma das mais importantes revelações no campo das hepatites virais. Ao investigarem amostras de diferentes regiões mundiais com o objetivo de estudar características polimórficas hereditárias, verificaram no soro de um aborígine australiano, a presença de um antígeno que reagia de forma específica e com um anticorpo presente no soro de um paciente hemofílico norte-americano. Estudos revelaram que esse “antígeno Austrália” (Au) (atualmente designado antígeno de superfície do HBV ou HBsAg) era prevalente entre pacientes com leucemia, síndrome de Down e hepatite aguda. Ao mesmo tempo, um dos membros do laboratório de Blumberg sofreu de um quadro brando de hepatite

após ter contato com material contaminado, passando a apresentar positividade para o antígeno Au (Blumberg *et al*, 1967; Bayer *et al*, 1968). Por esta descoberta, Blumberg recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1976.

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

## I.2 - CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE B

O vírus da hepatite B (HBV) pertence à família *Hepadnaviridae* (ICTV, 2009), que engloba vírus de DNA que apresentam tropismo por células hepáticas e compartilham características morfológicas, estruturais e um mecanismo excepcional de replicação por meio de um intermediário de RNA, que é convertido em DNA pela transcriptase reversa viral. Pertence ao gênero *Orthohepadnavirus* (ICTV, 2009), no qual se inserem vírus que compartilham similaridades na seqüência de DNA e na organização genômica. Além de possuírem hospedeiros humanos (HBV), apresentam a capacidade de infectar outros mamíferos como esquilos (GSHV) (Marion *et al*, 1980), marmotas (WHV) (Summers *et al*, 1978) e primatas não-humanos (Vaudin *et al*, 1988; Hu *et al*, 2000; Robertson e Margolis, 2001). Em 1998, Lanford e colaboradores identificaram em um primata (*Lagothrix lagotricha*) um novo representante desse gênero, denominado de “WMHBV – Woolly Monkey Hepatitis B Virus” (Lanford, 1998).

Além do gênero responsável por causar infecção em mamíferos, um outro gênero pertencente à mesma família, *Avihepadnavirus*, tem como

hospedeiros aves, tais como: patos (DHBV) (Mason *et al*, 1980), garças (HHBV) (Sprengel *et al*, 1988) e cegonhas (STHBV) (Pult *et al.*, 2001).

### I.3 - CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E ESTRUTURAIS DO HBV

Na análise por microscopia eletrônica de preparações purificadas de soro de indivíduos infectados pelo HBV pode-se observar três formas distintas de partículas virais: a partícula completa infecciosa (conhecida como partícula de Dane) e as partículas incompletas não-infecciosas esféricas e filamentosas (Mosley *et al*, 1996).

A partícula viral completa infecciosa, com aproximadamente 42 nm, é esférica e possui uma densidade de flutuação de 1,22 g/cm<sup>3</sup> em gradiente de cloreto de cério. Possui ainda estrutura complexa, com envoltório externo lipoprotéico contendo glicoproteínas que constituem o seu antígeno de superfície. Esse antígeno é composto pelas proteínas S (“small”), M (“middle”) e L (“large”), distribuídas em quantidades distintas no envoltório viral (Tiollais *et al*, 1985).

O vírion apresenta um nucleocapsídeo com simetria icosaédrica formado pelo antígeno do *core* (HBcAg) que contém internamente o genoma do HBV e uma DNA polimerase, fundamental para a replicação viral (Figura 1). Conforme estimado no passado, estudos recentes utilizando técnicas como Real-time PCR e Cobas para quantificar o DNA do HBV, vêm demonstrando que o soro de indivíduos infectados possa apresentar concentrações superiores a 10<sup>8</sup> partículas virais por mL (Tiollais *et al*, 1985; Ganem *et al*, 1996; Morris *et al*, 2013; Cai *et al*, 2014).

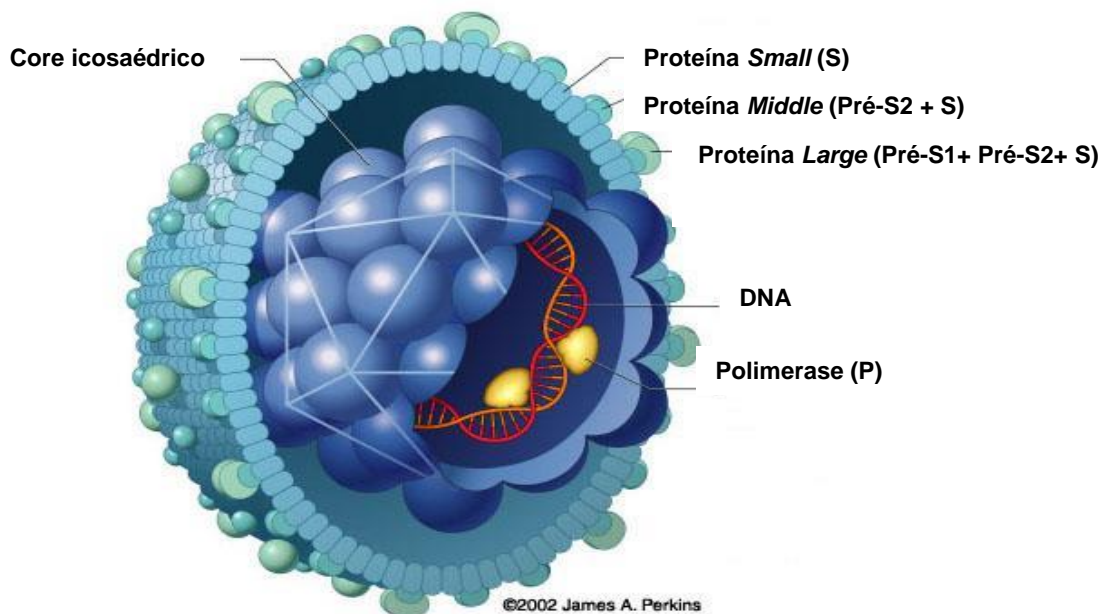


Figura 1.1: Estrutura do vírus da hepatite B (HBV). Modelo esquemático da partícula de Dane. Disponível em: <<http://www.rit.edu/~japfaa/infectious.html>>. Acesso em: 22 abril. 2014. (Figura adaptada)

Além das partículas virais completas e infecciosas, no soro dos pacientes infectados, podem ser encontradas as partículas não infecciosas esféricas e filamentosas, compostas exclusivamente pelo HBsAg e alguns lipídios oriundos da célula hospedeira (Figuras 1.2A e 1.2B). Essas partículas se apresentam em excesso, com concentrações superiores a  $10^{13}$  partículas por ml de soro. As partículas esféricas possuem cerca de 22 nm de diâmetro, enquanto as filamentosas possuem, aproximadamente, a mesma largura e comprimento variável com densidade de flutuação em cloreto de cério de aproximadamente  $1,18 \text{ g/cm}^3$  (Ganem, 1996, Gomes, 2003). Apesar de essas partículas não serem infecciosas, elas são imunogênicas e eficientes em neutralizar anticorpos anti-HBs.

Um dos grandes entraves para uma compreensão mais ampla dos mecanismos que envolvem a biologia do HBV se refere à sua incapacidade em infectar e desenvolver-se em linhagens celulares convencionais. Associado a isso, pesquisas laboratoriais envolvendo infecção experimental em animais são de difícil execução, uma vez que a gama de hospedeiros para o HBV é bastante restrita, abrangendo, apenas alguns primatas. Entretanto, apesar das dificuldades de cultivo e infecção experimental, certas linhagens celulares



derivadas de hepatoma, como a HepG2, HuH6 e HuH7 são capazes de produzir formas virais infectantes após transfecção de um clone viral estável (Gomes, 2003; Bruss, 2004).

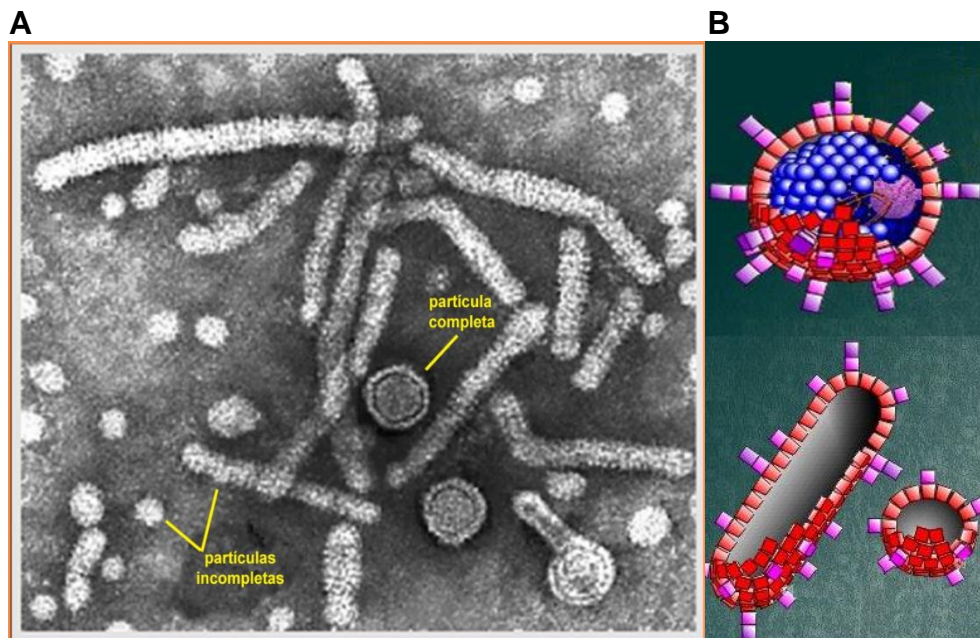


Figura 1.2: Partículas infecciosas e não infecciosas do HBV. A- Microscopia eletrônica. B- Representação esquemática.

(A) Disponível em: <<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html>> Acesso em 22 abril 2014

(B) Disponível em: <<http://www.carepublichealth.com/images/hepatitis-b1.jpg>> Acesso em 22 abril 2014

### 1.3.1 – Organização do genoma viral

O genoma do HBV é constituído por uma molécula de DNA circular, de fita parcialmente dupla (ambas as fitas não se encontram covalentemente fechadas), com aproximadamente 3.200 pares de base, constituindo um dos menores genomas dentre os vírus que infectam o homem. A fita mais longa é complementar aos RNAs virais e possui polaridade negativa. Na fita de polaridade positiva, a posição da extremidade 5' terminal é fixa, enquanto que a da extremidade 3' terminal é variável. Dessa forma, o comprimento da fita positiva varia de 50% a 90% do comprimento da fita complementar (Ganem,

1996). Próxima às extremidades 5' de ambas as fitas, há duas pequenas seqüências diretamente repetidas, de 11 nucleotídeos cada, "direct repeats" (DR1 e DR2). Essas seqüências são importantes para a inicialização da replicação do HBV (Seeger *et al*, 1986; Lien *et al*, 1987; Will *et al*, 1987).

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

O genoma apresenta quatro fases de leitura aberta (*open reading frames*, ORFs) parcialmente sobrepostas, não apresentando regiões não-codificantes. Todas as ORFs são codificadas pela fita longa e possuem pelo menos uma região de sobreposição a um outro gene. Em função desse eficiente sistema de sobreposição dos genes, HBV consegue codificar 50% mais proteínas do que seria esperado pelo reduzido tamanho de seu genoma (Figura 1.3). A síntese de quatro RNAs virais é regulada por quatro promotores, pré-S1, pré-S2, pré-C/C e X presentes nas ORFs e dois elementos potencializadores (*enhancers*) (EnhI e EnhII) (Ganem e Varmus, 1987).

#### 1.3.1.1 – **ORF Pré-S/S**

Composta pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S, a ORF pré-S/S é responsável pela síntese das três proteínas que compõe o HBsAg: as proteínas L, M e S. A proteína S (*small*), constituída por 226 aminoácidos, é codificada pela região S ; a proteína M, (*middle*), constituída por 281 aminoácidos, é codificada pelas regiões Pré-S2 e S, e a proteína L (*large*), com aproximadamente 400 aminoácidos, é codificada pelas regiões Pré-S1, Pré-S2 e S. Essas proteínas são formadas a partir de códons distintos de iniciação na mesma fase de leitura e são finalizadas pelo mesmo códon de terminação, presente no final da região S. Estas proteínas podem se apresentar nas formas glicosiladas e não-glicosilada e, em alguns casos, a proteína M pode apresentar uma dupla glicosilação (Seeger e Mason, 2000).

Os três tipos de proteínas não são encontrados de forma uniforme nos diferentes tipos de partículas virais; entretanto, o vírion apresenta quantidades quase equimolares das três proteínas (Heermann *et al*, 1984).

Como a proteína L possui os sítios de ligação do HBV aos receptores nos hepatócitos, é fácil compreender porque a partícula de Dane apresenta uma maior proporção de proteína L quando comparada às partículas não infecciosas. Além de promover uma ligação eficiente das partículas infecciosas aos hepatócitos, essa proporção aumentada da proteína L na partícula de Dane, em detrimento às partículas subvirais, garante sucesso na competição pelos sítios de ligação nas células hepáticas (Ganem, 1996).

#### **I.3.1.2 – ORF Pré-C/C**

A ORF é responsável pela síntese das proteínas HBcAg, proteína constituinte do *core* viral, e HBeAg, que funciona como um importante marcador sorológico de replicação viral. Ambos os códons de iniciação estão na mesma fase de leitura. (Nassal e Rieger, 1993; Nassal e Schaller, 1996).

O HBcAg é um antígeno estrutural, estabelecido a partir de um códon de iniciação localizado no início da região do *Core* viral (C), sintetizando um polipeptídeo composto de 185 aminoácidos. O nucleocapsídeo da partícula viral é composto por 180 monômeros do HBcAg, que espontaneamente se aglutinam formando uma estrutura icosaédrica denominada *core* ou cerne viral (Nassal e Schaller, 1996).

O HBeAg é sintetizado a partir de um códon único de iniciação situado na região Pré-C. O primeiro peptídeo precursor produzido é composto de 214 aminoácidos, contendo os 29 aminoácidos da região Pré-C e o restante constituinte do gene *core*. Essa sequência da região pré-core é responsável pela translocação do HBeAg para o retículo endoplasmático, onde o mesmo será processado pela clivagem nas duas extremidades, resultando em uma proteína final com 159 aminoácidos. Essa proteína é secretada nos estágios iniciais da infecção aguda e nas fases replicativas da infecção crônica, e atua como importante marcador sorológico de replicação viral (Nassal e Rieger, 1993).

#### **I.3.1.3 – ORF P**

A ORF P é responsável pela síntese da enzima DNA polimerase, primordial para a replicação do HBV. Constitui a ORF mais extensa, composta por 832 aminoácidos, cobrindo cerca de  $\frac{3}{4}$  do genoma total, sobrepondo-se a todos os demais genes. (Bartholomeusz *et al*, 1997).

A polimerase viral é composta por quatro domínios: (i) aminoterminal, que possui a função de primase e atua no início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa; (ii) região espaçadora, cuja função e importância ainda permanecem obscuras; (iii) domínio da transcriptase reversa, fundamental para a síntese do DNA a partir do RNA pré-genômico; (iv) domínio C-terminal, que apresenta atividade de RNase H. No domínio transcriptase reversa, está presente o motivo Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD). Esse motivo é essencial para a atividade de transcrição reversa e apresenta alta homologia entre todas as transcriptases reversas, constituindo a área mais comum de aparecimento de mutações de resistência a fármacos durante a terapia prolongada (Lai e Yuen, 2000).

#### 1.3.1.4 – **ORF X**

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

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

Essa proteína também tem sido relacionada à inflamação e imunomodulação. Em linhagens celulares de hepatoma humano, HBx induz a transcrição de citocinas inflamatórias, tais como TNF, IFN- $\alpha$  e IL-6 (Lara-Pezzi *et al*, 1998; Lee *et al*, 2010; Xiang *et al*, 2011).

Além disso, estudos vêm estabelecendo relações entre a expressão do HBx e a hepatocarcinogênese através da regulação da transcrição de genes



hepatócito, o vírion perde seu envelope, e o nucleocapsídeo é transportado até o núcleo celular, onde libera o genoma do HBV (Ganem, 1996). Os receptores celulares para o HBV ainda não foram identificados, bem como os eventos subsequentes de penetração e desnudamento do vírion ainda não são bem conhecidos (Locarnini, 2005).

Uma vez no núcleo, a fita positiva de DNA é completada pela enzima DNA polimerase celular, e as estruturas terminais de ambas as fitas são removidas, de modo ao genoma manter-se um círculo covalentemente fechado (cccDNA). A partir de então, pela ação da enzima RNA polimerase II celular, o cccDNA é transcrito em filamentos de RNA genômicos e subgenômicos, com distintas funções para a síntese viral. Os RNAs subgenômicos atuam como RNAs mensageiros, que serão transportados para o citoplasma, para a tradução das proteínas do envelope e HBx. Já os RNAs genômicos servem tanto como molde para a síntese do DNA viral (sendo denominados RNAs pré-genômicos, pgRNA), como de RNAs mensageiros, para a tradução das proteínas HBcAg, HBeAg e da polimerase viral (Ganem e Prince, 2004).

O pgRNA é um filamento ribonucléico cujo tamanho excede a uma unidade de genoma devido a uma redundância terminal de 130 nucleotídeos (3,5Kb), repetida em cada extremidade do genoma. A estrutura em *stem-loop* presente na extremidade 5', denominada sinal de encapsidação  $\epsilon$ , é fundamental no processo de empacotamento do pgRNA no capsídeo em formação. Após a ligação da DNA polimerase do HBV ao sinal de encapsidação  $\epsilon$ , esse complexo é envolvido por proteínas do core viral que se agrupam na construção icosaédrica dando origem ao nucleocapsídeo (Kidd-Ljunggren *et al*, 2002). Inicia-se então, a transcrição reversa da fita positiva de RNA em um filamento de DNA de polaridade negativa, sendo a fita de RNA concomitantemente degradada pela atividade de RNase H da polimerase viral. (Summers e Mason, 1982). A fita de DNA negativa recém sintetizada serve, então, de molde para a síntese da fita positiva. Essa fita, entretanto, não é completamente sintetizada. À medida que o genoma se circulariza e a fita positiva é estendida, o nucleocapsídeo é enviado para o retículo endoplasmático e para o complexo de Golgi (Figura 1.4), onde as proteínas do envelope (HBsAg) são incorporadas e os vírions secretados. O nucleocapsídeo pode, ainda, retornar ao núcleo para novamente liberar o DNA viral (que pode ser convertido

novamente em cccDNA) para a amplificação de novos genomas (Tuttleman *et al.*, 1986; Bruss, 2004).

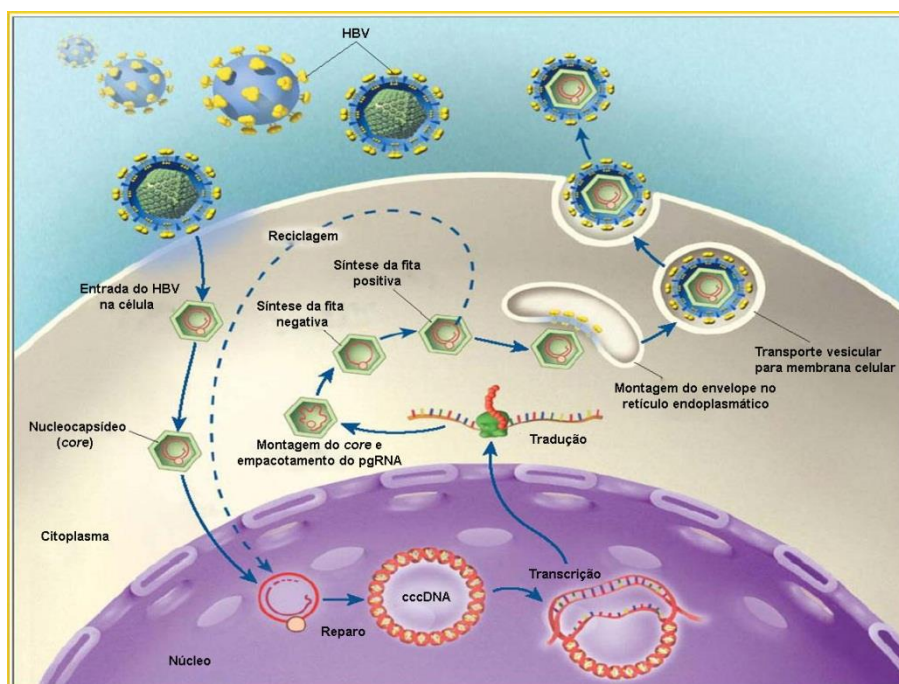


Figura 1.4: Modelo esquemático do ciclo replicativo do HBV (Fonte: Ganem e Prince, 2004 – figura adaptada para o português).

## I.5 – EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HBV

### I.5.1 – Prevalência da infecção pelo HBV no mundo

Apesar da existência de uma vacina eficiente, disponível desde os anos 80, a infecção causada pelo HBV consiste em um dos principais problemas de saúde pública mundial. Estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas no mundo tenham sido infectadas por esse vírus e que existam cerca de 240 milhões de portadores crônicos (WHO, 2013). Desse modo, a infecção aparece como uma das principais causas de doença hepática no mundo, com significância ainda maior devido aos altos índices de mortalidade e morbidade associados à doença. Entre os portadores crônicos, cerca de 65 milhões vivem em países africanos. Estima-se que ocorra, anualmente, 1 milhão de mortes relacionadas ao HBV, 250 mil só na África (Kiire, 1996; Kramvis & Kew, 2007a). No Brasil,

especula-se que o número de portadores crônicos esteja entre dois milhões de pessoas (Menendez *et al*, 1999; Lavanchy *et al*, 2005; Tonetto *et al*, 2009).

A infecção pelo HBV possui prevalência variável nas diversas regiões geográficas mundiais (Figura 1,5). São consideradas regiões de alta endemicidade (prevalência do HBsAg superior a 8%), áreas da África subsaariana, sudeste asiático e Amazônia. Aproximadamente 45% da população mundial vivem nessas áreas. Estima-se que grande parcela da população infectada tenha sido exposta ao HBV durante os primeiros anos da infância, sendo esta uma possível explicação para os elevados índices de infecção crônica (WHO, 2004; Candotti *et al*, 2007; Kamvis e Kew, 2007, WHO, 2013).

As zonas de endemicidade média ou intermediária, com prevalência para o HBsAg entre 2 e 8%, incluem o norte da África, Ásia central, leste europeu, Japão e algumas ilhas da América Central. Já nas zonas de baixa prevalência, com taxas para o HBsAg abaixo de 2%, estão presentes a Europa ocidental, a Austrália e a América do Norte (Wong *et al*, 1979 ; Sung,1990; Carey, 2009).

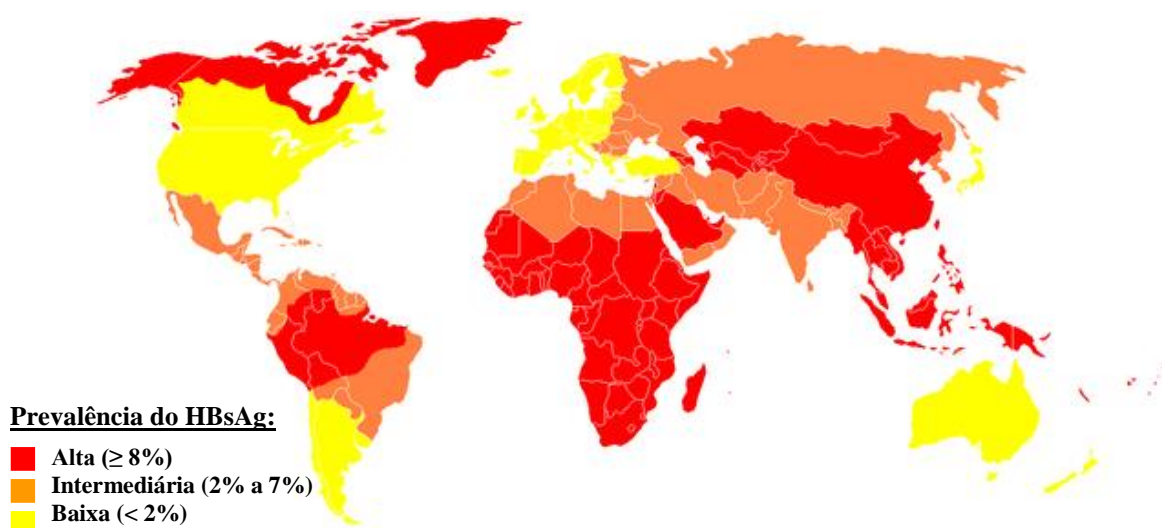


Figura 1.5: Prevalência mundial do HBsAg. Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Hepatite\\_B](http://pt.wikipedia.org/wiki/Hepatite_B). Acesso em 24 maio 2013 (Figura adaptada para o português).



### 1.5.2 – Prevalência da infecção pelo HBV no Brasil

No Brasil, até meados de 1980, pouco era conhecido sobre a prevalência do HBV. No entanto, com o acesso aos testes de diagnóstico e posteriormente o advento da biologia molecular em centros de pesquisa, pôde-se ter uma dimensão melhor na distribuição da infecção pelo país (Souto, 1999; Tonetto *et al.*, 2009).

O Brasil é atualmente classificado como uma área de baixa endemicidade para a infecção pelo HBV (Ministério da Saúde, 2012), entretanto, apesar de progressos na redução das taxas de novas infecções em função da vacinação, a erradicação do HBV ainda consiste em um desafio a ser superado.

Dados do Ministério da Saúde revelam que entre 1999 a 2011, o número total de casos confirmados no Brasil foi de 120.343, sendo a maior parte deles notificados nas regiões Sudeste (36,3%) e Sul (31,6%). Em 2010, observou-se que o número casos é maior no sexo feminino entre os 15 e os 29 anos de idade, e no sexo masculino em menores de 10 e após os 30 anos de idade. Entre 2000 e 2011, foram declarados 9.659 óbitos relacionados a hepatite B, a maioria dos quais nas regiões Sudeste (47,3%) e Sul (20,4%) (Ministério da Saúde, 2012).

No período de 1999 a 2011, na região Norte, foram notificados 15.571 casos de hepatite B, o que corresponde a 13,1% do total de casos no Brasil, a maioria deles no estado do Acre (27,7%), seguido por Rondônia (24,5%) e Amazonas (22,8%). Na região Sudeste, foram contabilizados 43.673 casos (36,3%), na região Sul 38.007 casos (31,6%), na região Centro-Oeste foram 11.895 casos de hepatite B (9,9%). enquanto na região Nordeste foram notificados 11.017 casos (9,2%) (Ministério da Saúde, 2012) (Figura 8).

Um estudo realizado em nove capitais da Região Nordeste demonstrou que a prevalência do HBsAg observada na população não-vacinada foi menor que 1% (Pereira *et al.*, 2009). Na região Centro-Oeste, um estudo realizado com 308 bombeiros de Campo Grande, MS, identificou a presença concomitante dos marcadores Anti-HBc/HBsAg em 6,5% dos indivíduos

(Contrera-Moreno *et al.*, 2012). Já um outro estudo, envolvendo 8840 doadores de sangue de janeiro a dezembro de 2010, também no Centro-Oeste do Brasil, identificou a prevalência de marcadores do HBV em 3.04% dos indivíduos. Ao compararem essa soroprevalência com a registrada no ano de 2001, foi demonstrada uma queda nos índices da infecção na região (Lindenberg *et al.*, 2013).

Diversos fatores podem ser responsáveis pela variação na prevalência de infecção pelo HBV. Dentre eles, podemos citar as diferenças demográficas relacionadas às características epidemiológicas da doença, sensibilidade das técnicas laboratoriais usadas, flutuações na viremia e desenvolvimento de mutações que interfiram com o reconhecimento viral por testes de diagnóstico (Brecht *et al.*, 2001).

### **1.5.3 – Prevalência da infecção pelo HBV na África**

Dados sobre a prevalência e o número de novas infecções pelo HBV em países africanos apresentam-se ainda deficientes em decorrência da subnotificação e dificuldades no acesso a tratamento, programas de saúde e sistemas de coleta de dados. Entretanto, de acordo com os trabalhos disponíveis, estima-se que, dos cerca de 240 milhões portadores crônicos existentes, 65 milhões vivam na África, com risco de morte de 25%. Na África subsaariana, a taxa de portadores do HBsAg varia de 9 a 20% (Kew *et al.*, 1992; WHO, 2004a; WHO, 2004b; Kramvis e Kew, 2007a).

Dentre os óbitos atribuídos a doenças hepáticas relacionadas ao HBV, especula-se que pelo menos um quarto delas, aproximadamente 250.000, ocorra em países africanos. Estima-se que o risco relativo de um africano negro, portador crônico do HBV, desenvolver carcinoma hepatocelular varie de 9 a 23 por 100.000 pessoas por ano (Kew, 1992; Mphahlele *et al.*, 2002; WHO, 2004b; Kramvis e Kew., 2007a).

A prevalência de portadores do HBsAg na África é bastante elevada (WHO, 2004b). De acordo com a prevalência do HBsAg, a infecção crônica pelo HBV em países africanos se distribui por três níveis. A infecção pelo HBV é hiperendêmica nos países da África subsaariana (>8%), com exceção do Quênia, Zâmbia, Costa do Marfim, Libéria, Serra Leoa e Senegal, que se

apresentam como áreas de endemicidade intermediária (2-8%). Os países do norte de África, como o Egito, Tunísia, Argélia e Marrocos são classificados como áreas de baixa endemicidade (<2%), embora possam ocorrer bolsões de alta endemicidade nessas regiões (Kramvis e Kew, 2007a).

## I.6 - INFECÇÃO PELO HBV: TRANSMISSÃO, PATOGENIA, ASPECTOS CLÍNICOS E MARCADORES SOROLÓGICOS

### I.6.1 – Transmissão do HBV

A transmissão do HBV ocorre, principalmente, pela exposição parenteral ao sangue/hemoderivados, pelo transplante de órgão/tecidos, pela via sexual e exposição perinatal (transmissão vertical) (WHO, 2004)

O HBV é encontrado principalmente no sangue de indivíduos infectados podendo, contudo, ser detectado em outros fluidos corporais, como na urina, saliva, fluido nasofaríngeo, sêmen e fluido menstrual (Davison *et al* , 1987; Gonçalves, 1997).

Como o HBV é bastante resistente às condições ambientais, a infecção por via parenteral pode ocorrer pelo uso de instrumentos odontológicos, seringas, agulhas, utensílios para *piercing*, acupuntura, tatuagem, alicates de unha, e outros objetos perfuro-cortantes que não tenham sido adequadamente esterilizados, bem como pelo compartilhamento de seringas e agulhas por usuários de drogas injetáveis (Souto, 1999; Chan e Lok, 1999).

A transmissão vertical (materno-infantil) é frequentemente documentada em populações que vivem em regiões de alta endemicidade. Essa transmissão ocorre em cerca de 90% das mães portadoras do HBeAg, principalmente em decorrência da exposição do recém-nascido ao sangue materno durante o parto. A infecção pode, contudo, acontecer após o nascimento, pelo contato estreito entre a criança e a mãe (Merican *et al*, 2000).

Especialmente em países em desenvolvimento verifica-se a transmissão horizontal, através de contato íntimo não sexual ou por de formas pouco conhecidas. Especula-se que tais mecanismos envolvam infecção percutânea por meio da saliva, traços de sangue, compartilhamento de objetos,

escarificação, rituais, instrumentos não esterelizados, dentre outros (Kiire, 1996).

Em áreas de baixa prevalência, a transmissão do vírus entre indivíduos adultos, ocorre principalmente pela via sexual. De acordo com Salvatori e colaboradores, a exposição sexual a um parceiro infectado ou a múltiplos parceiros contribui em cerca de 60% dos casos novos de hepatite B nos EUA (Salvatori *et al*, 1999). No Japão, entre os casos notificados de hepatite B no ano de 1999, cerca de 43% tiveram a transmissão realizada por via sexual (WHO, 2000).

Dentre os indivíduos com maior risco de contrair infecção pelo HBV estão os heterossexuais com múltiplos parceiros, usuários de drogas injetáveis, homossexuais masculinos, presidiários, parceiros sexuais de pacientes com hepatite aguda, profissionais do sexo, profissionais de saúde com exposição ocupacional ao sangue, hemofílicos, pacientes transplantados, doentes renais em programa de hemodiálise e familiares de portadores crônicos do HBV (Carrilho e Silva, 1995).

#### **1.6.2 – Marcadores sorológicos da infecção pelo HBV**

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

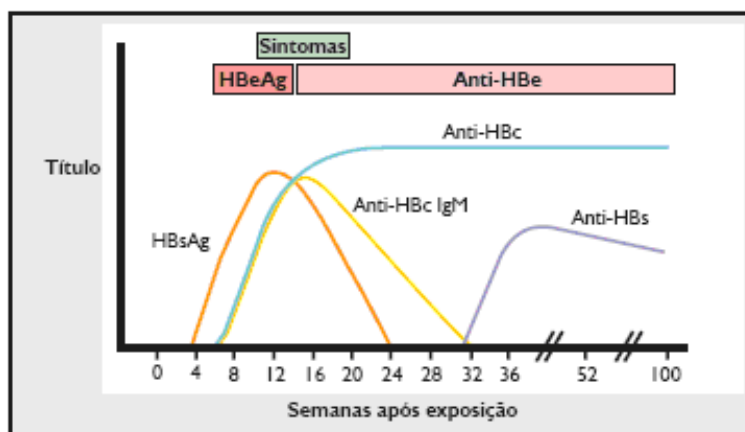
A hepatite B aguda caracteriza-se pela presença do antígeno HBs no soro do indivíduo infectado, dos anticorpos anti-HBc da classe IgM, e do antígeno HBe (marcador de replicação viral ativa), além da detecção do DNA do HBV (Sjogren, 1994).

Durante a fase de convalescença, os títulos de anti-HBc IgM decaem, ao passo que os títulos de anti-HBc IgG aumentam, normalmente permanecendo detectáveis por toda a vida. Nessa fase, o HBsAg e o HBeAg tendem a desaparecer, e surgem os anticorpos anti-HBe e anti-HBs. Esse último, um anticorpo protetor que neutraliza o vírus e, após infecção aguda, normalmente indica cura e imunidade contra uma nova infecção. Em indivíduos vacinados

contra o HBV, o anti-HBs aparece como marcador isolado, indicador de imunidade protetora (Sjogren *et al*, 1994).

A hepatite B crônica é definida pela persistência do HBsAg no soro por mais de 6 meses após a infecção aguda (Figuras 5A e 5B). Os marcadores de replicação viral e as manifestações clínicas evoluem de forma dependente da interação vírus-hospedeiro (Sjogren, 1994).

A-



B-

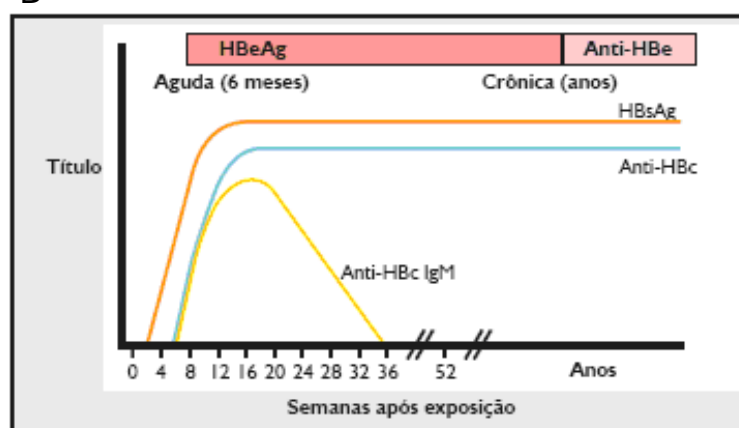


Figura 1.6: Perfil sorológico da hepatite B. A- Marcadores da infecção aguda. B- Marcadores da infecção crônica.

Disponível em <http://www.infekt.ch/index.php?catID=14&artID=644> (acesso em 22/04/2014) (Figura adaptada)

É comum a infecção culminar em destruição do tecido hepático com progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular. Muitas vezes a evolução para esses quadros ocorre após décadas da infecção (Sjogren, 1994).

O HBV não ocasiona efeito citopático diretamente. As lesões hepáticas são provocadas pelo sistema imune do hospedeiro que produz os dois tipos de resposta, humoral e celular, diante da infecção pelo vírus, causando as lesões hepáticas características da hepatite B (Coursaget *et al*, 1991). Os antígenos virais presentes na superfície dos hepatócitos infectados são reconhecidos pelos linfócito T citotóxicos, levando a destruição das células hepáticas por indução da apoptose (Lee, 1997; Chisari e Ferrari, 1995). Como consequência

do dano hepático repetido, verifica-se a tendência para instalação do quadro de cirrose. Esse quadro representa uma associação direta entre o grau de comprometimento dos hepatócitos e o tempo de infecção (Lee, 1997; revisto por Gomes, 2003).

A associação da doença a casos de carcinoma hepatocelular pode estar muitas vezes associado ao genótipo do vírus infectante e a características particulares do hospedeiro. A integração do DNA viral ao do hospedeiro parece ser o evento inicial, capaz de induzir alterações celulares e no genoma do HBV, desencadeando processos de mutagênese e carcinogênese (Zhou *et al*, 1988)

Os portadores crônicos constituem o principal reservatório do HBV, devido à persistência viral no organismo. Em função disso, apesar da triagem sanguínea em bancos de sangue, pacientes com a infecção crônica podem representar um sério risco de transmissão do vírus em transplantes ou transfusões sanguíneas (Coursaget *et al*, 1991; Elghouzzi *et al*, 1995; Flichman *et al.*, 2014; Moresco *et al.*, 2014).

Os principais fatores associados à progressão da hepatite crônica incluem a idade na qual o indivíduo foi infectado, que é inversamente proporcional ao risco de cronicidade (Figura 1.7), e o status imune, destacando-se a imunodepressão, como a que ocorre em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes renais crônicos em hemodiálise, pacientes renais crônicos pós-transplante e leucêmicos. A infecção dos recém-nascidos, apesar de geralmente assintomática, representa um risco de cerca de 90% de evolução para a forma crônica da infecção. Acredita-se que o estado de imaturidade do sistema imune nos recém-nascidos seja importante no desenvolvimento desse tipo de infecção (Strauss *et al*, 2003).

A forma crônica apresenta um quadro clínico variável, podendo, na maioria das vezes, permanecer assintomática, ou evoluir para quadros graves de cirrose e/ou carcinoma hepatocelular (Strauss *et al*, 2003).

# Hepatite B aguda

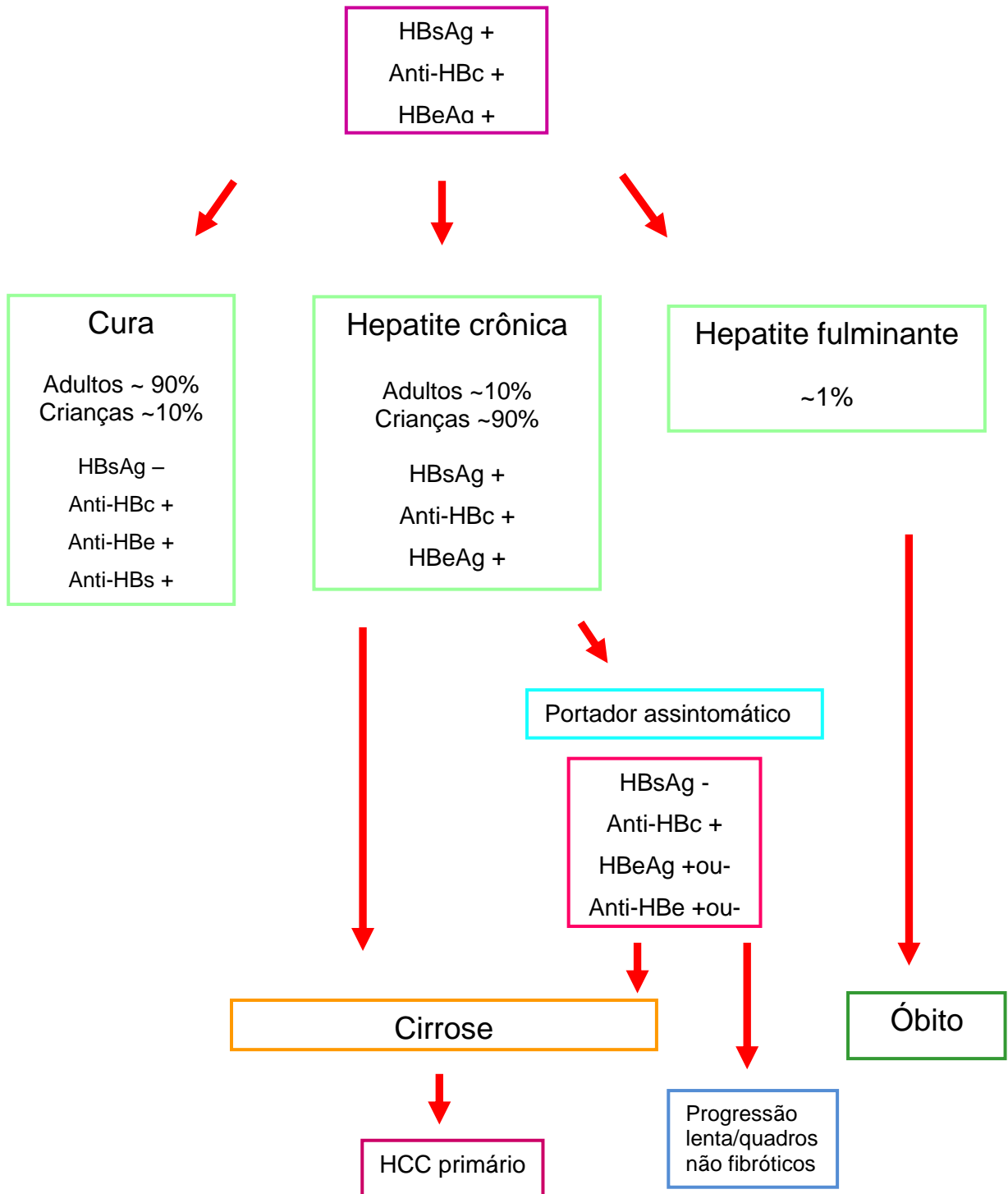


Figura 1.7: Fluxograma da infecção pelo HBV (Farrel, 1998). Adaptado.



## I.7 – TRATAMENTO DA HEPATITE B

A terapia contra o HBV tem como objetivo mais importante a prevenção da mortalidade e da morbidade hepática como o carcinoma hepatocelular e complicações cirróticas (Wong & Chan, 2013). O tratamento não é indicado para pacientes com infecção aguda, portanto, a terapêutica é somente direcionada para portadores da forma crônica da infecção.

Até poucos anos atrás, apenas duas drogas eram utilizadas para o tratamento de pacientes crônicos: o interferon-alpha (INF- $\alpha$ ), que possui atividade antiviral e imunomodulatória, cujo modo de ação consiste na inibição da replicação e síntese de proteínas virais, além de estimular a citólise dos hepatócitos infectados; e a lamivudina (3TC), um análogo de nucleosídeo que bloqueia diretamente a replicação viral (Liaw *et al*, 1999; Leung e Harrison, 1999; Abbas *et al*, 2010).

O IFN- $\alpha$  foi a primeira droga licenciada pelo FDA ("Food and Drug Administration") para o tratamento da hepatite B. O tratamento com IFN- $\alpha$  apresenta como vantagens uma curta duração, ausência de resistência antiviral, boa duração e qualidade de resposta nos pacientes respondedores. Como desvantagens, têm-se principalmente uma resposta não satisfatória em um elevado número de pacientes, além de graves efeitos colaterais, como: sintomas gripais, reações hematológicas, dermatológicas, endocrinológicas, oftalmológicas, neuropsiquiátricas e cardio-vasculares (Fattovich *et al*, 1996; Liaw *et al*, 2008). Está também disponível na forma peguilada, onde a união da droga a uma molécula de polietilenoglicol (PEG), retarda a metabolização da droga, fazendo com que o IFN permaneça mais tempo agindo antes de ser eliminado pelo organismo, reduzindo, conseqüentemente, o número de doses necessárias.

A lamivudina foi o primeiro análogo de nucleosídeo utilizado no tratamento da hepatite B, cuja ação é inibir a replicação viral através bloqueio da transcriptase reversa. A lamivudina é bastante eficiente, sendo responsável por reduzir em até 4 logs a carga viral no soro do paciente (Chien, 2010; De Clercq, 2013). Além disso, a lamivudina apresenta efeitos colaterais mínimos e custos baixos. No entanto, a emergência de amostras virais resistentes à

lamivudina constitui um importante obstáculo no tratamento de pacientes crônicos (Liaw *et al*, 1999). Essa resistência é observada em aproximadamente 38% a 58% dos casos após dois anos a três de tratamento e vai aumentando progressivamente ano após ano (Liaw *et al*, 1999; Leung e Harrison, 1999). As amostras do HBV resistentes a esse fármaco apresentam uma mutação no motivo *Tyr-Met-Asp-Asp* (YMDD), um motivo conservado da polimerase viral, região catalítica da atividade de transcriptase reversa (Mutimer, 2001).

Análises de mutagênese sítio-específica demonstraram que a substituição de metionina por valina ou isoleucina (rtM204V/I) seria suficiente para promover a resistência a lamivudina (Allen *et al*, 1998; Leung e Harrison, 1999). Outras substituições de aminoácidos na polimerase do HBV, rtL180M e rtV173L, foram encontradas em conjunção com a mutação no motivo YMDD e associadas a compensações replicatórias virais.

A prevalência dessa tripla mutação pode restaurar o fitness viral em aproximadamente 90%, enquanto isolados com a dupla mutação rtL180M + rtM204V possuem 40% da eficiência replicativa dos vírus selvagens. Devido à sobreposição de genes descrita para o HBV, as mutações rtV173L e rtM204V na polimerase viral resultam em duas substituições na proteína do envelope HBsAg (sE164D e sI195M). Essas substituições na proteína small S são conhecidas por reduzirem substancialmente a afinidade de ligação desta com anticorpos anti-HBs à níveis similares aos observados nos isolados com a mutação de escape vacinal sG145R (Sheldon e Soriano, 2008).

Entre os análogos de nucleosídeos/nucleotídeos, três outros fármacos são atualmente reconhecidos: entecavir (ETV), adefovir dipivoxil (ADV), e telbivudina (LdT), com mínima ou nenhuma resistência viral. Ainda, um medicamento denominado tenofovir disoproxil fumarato (TDF), que faz parte da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART), usada no tratamento da infecção pelo HIV, foi aprovado no tratamento do HBV a partir de 2008 (De Clercq, 2013).

A co-administração com adefovir dipivoxil ou tenofovir vem sendo indicada na terapia de resgate em pacientes portadores de linhagens resistentes à lamivudina (Lok *et al*, 2007, De Clercq, 2013).

## I.8 - VARIABILIDADE DO HBV

O HBV possui uma taxa de substituições relativamente alta, situada entre vírus de DNA e RNA que é responsável pela sua diversificação em pelo menos oito genótipos (com uma grande diversidade de subgenótipos) e nove subtipos. Se por um lado, o uso de uma enzima transcriptase reversa na replicação, com ausência da atividade de revisão de incorporação de nucleotídeos (proofreading), tende a manter elevados níveis de mutação no DNA viral; por outro lado, o fato de possuir um genoma totalmente codificante, contendo quatro fases de leitura parcialmente sobrepostas, reduz relativamente a ocorrência de mutações, uma vez que uma substituição, mesmo que silenciosa em uma fase de leitura poderia alterar o funcionamento da fase de leitura a ela sobreposta, inviabilizando a partícula viral (Chen e Oon, 1999; Kidd-Ljunggren et al., 2002).

Em um estudo anterior, Okamoto e colaboradores estimaram a taxa evolutiva do HBV entre 1,4 e 3,2 x 10<sup>-5</sup> substituições por sítio por ano (Okamoto et al., 1987), sendo superior às taxas descritas para vírus de DNA. Em 1989, Orito e colaboradores descreveram uma taxa de substituições de aproximadamente 5 x 10<sup>-5</sup> por sítio por ano, taxa esta que colocaria o HBV em uma posição intermediária entre os valores observados para os vírus DNA e os retrovírus (Orito et al., 1989).

### I.8.1 – Subtipos e genótipos do HBV

Os primeiros relatos de variabilidade no HBV foram descritos em 1971 por Le Bouvier (Le Bouvier, 1971), que identificou dois determinantes antigênicos mutuamente exclusivos, *d* e *y*, localizados no antígeno de superfície do HBV, compartilhando um epítipo conformacional comum, o determinante "a", (Levene e Blumberg, 1969). Dois determinantes adicionais, *w* e *r*, foram subsequentemente enunciados, em 1972, por Bancroft e colaboradores (Bancroft, *et al*, 1972). Foi, então, observado que cada amostra do HBV poderia ser classificada como pertencente a um dos subtipos determinados. Foram descritos, nove subtipos, classificados de acordo com

variações no antígeno de superfície viral: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *adw2*, *adw4*, *ayr*, *adrq+* e *adrq-* (Tabela 1) (Couroucé-Pauty *et al*, 1983).

Anticorpos contra o determinante “a” conferem imunidade a todos os subtipos do HBV. A subtipagem de amostras do HBV pode ser utilizada em estudos epidemiológicos e, em alguns casos, para verificar a possibilidade de infecção nosocomial (Kidd-Ljunggren *et al*, 2002).

Oito genótipos classificatórios foram descritos para o HBV e denominados de A a H, com base nas sequências nucleotídicas da região genômica Pré-S/S ou do genoma viral completo (Okamoto *et al*, 1988; Norder *et al*, 1992; 1994; Stuyver *et al*, 2000; Arauz-Ruiz *et al*, 2002). Os genótipos são distintos entre si pela estrutura e tamanho do genoma, com no mínimo 7,5% de divergência entre eles. Apesar da intensificação crescente do fluxo humano nas diversas regiões mundiais, os genótipos do HBV apresentam uma distribuição mundial característica, podendo funcionar como marcadores de população. (Norder *et al*, 1992; Norder *et al*, 1993; Kidd-Ljunggren *et al*, 2002). Dois novos genótipos, denominados como I (Olinger *et al*, 2008) e J (Tatematsu *et al*, 2009) foram recentemente propostos.

Em função de uma grande diversidade intragenotípica (mais de 4 e menos de 7,5%) vem sendo estabelecida uma divisão em subgenótipos, com exceção dos genótipos HBV/E e HBV/G (Norder *et al*, 1992; Bowyer *et al*, 1997; Devesa *et al*, 2004; Huy *et al*, 2004; Norder *et al*, 2004).

O genótipo A foi inicialmente dividido em dois subgrupos (atualmente, classificados como os subgenótipos HBV/A1 e HBV/A2), classificados de acordo com divergências entre as sequências da região pré-S2/S (Bowyer *et al*, 1997). Segundo Sugauchi e colaboradores, em um estudo realizado em 2003, amostras pertencentes ao subgrupo A1 teriam sido, anteriormente, identificadas em três países da África subsaariana: África do Sul, Zimbábue e Malavi, sugerindo que esse subgrupo teria se originado em populações africanas (Bowyer *et al*, 1997; Sugauch *et al*, 2003).

Estudos relacionados ao HBV/A2 o classificaram como um genótipo europeu. Foi sugerido que o HBV/A2 teria sido introduzido na Europa por comerciantes portugueses que viajaram pelo sul da África durante o século XV, e que a partir de então esse subgenótipo teria se diferenciado dos demais (Kramvis *et al*, 2002; Araújo *et al*, 2004; Hannoun *et al*, 2005).

Um terceiro subgenótipo, denominado HBV/A3, foi originalmente isolado nos Camarões (Kurbanov *et al*, 2005) e, posteriormente, identificado em isolados da Gâmbia (Hannoun *et al*, 2005) e Mali (Olinger *et al*, 2006). Os subgenótipos HBV/A4 e HBV/A5 foram identificados, respectivamente, em Mali e Nigéria (Hannoun *et al*, 2005, Olinger *et al*, 2006).

Os dois últimos subgenótipos descritos foram HBV/A6, identificado em pacientes belgas provenientes do Congo e Ruanda (Pourkarin *et al*, 2009), e HBV/A7, isolado em alguns indivíduos em Camarões (Hübschen *et al*, 2010).

Essa classificação acima descrita para o genótipo A, vem sendo documentada também para os genótipos HBV/B (B1-B9) (Sugauchi *et al*, 2004b; Kurbanov *et al*, 2010; Thedja *et al.*, 2011), HBV/C (C1-C12) (Huy *et al*, 2004; Kurbanov *et al*, 2010; Mulyanto *et al.*, 2011), HBV/D (D1-D9) (Norder *et al*, 2004; Kurbanov *et al*, 2010; Ghosh *et al*, 2013) e HBV/F (F1a, F1b, -F4) (Devesa *et al*, 2004).

**Tabela 1:** Características dos Genótipos do HBV (Fonte: Adaptado de Kay & Zoulim, 2007).

Genótipo	Subgenótipo	Subtipo	Distribuição Geográfica	Genoma (pb)
A	A1 (Aa)	<i>adw2, ayw1</i>	África, Ásia, Brasil	3221
	A2 (Ae)	<i>adw2, ayw1</i>	Norte da Europa e EUA	
B	B1 (Bj)	<i>Adw2</i>	Ásia (Japão)	3215
	B2 (Ba)	<i>adw2, adw3</i>	Ásia	
	B3	<i>adw2, ayw1</i>	Indonésia, China	
	B4	<i>ayw1, adw2</i>	Vietnam, Cambodia	
C	C1	<i>adrq+, ayr, adw2, ayw1</i>	Leste Asiático	3215
	C2	<i>adrq+, ayr</i>	Leste Asiático	
	C3	<i>adrq-, adrq+</i>	Ilhas do Pacífico	
D	D1	<i>ayw2, adw1, ayw1</i>	Europa, norte da África, Ásia	3182
	D2	<i>ayw3, ayw1</i>	Europa, Japão	
	D3	<i>ayw3, ayw2, ayw4</i>	Europa, Ásia, África do Sul, EUA	
	D4	<i>ayw2, ayw3</i>	Austrália, Japão, Nova Guiné	
E		<i>ayw4, ayw2</i>	África subsaariana	3212
F	Fia	<i>adw4, ayw4</i>	América Central (México, Nicarágua)	3215
	Fib	<i>adw4</i>	Argentina, Venezuela,	
	FII	<i>adw4</i>	Brasil, Venezuela, Nicarágua	
	FIII	<i>adw4</i>	Venezuela, Panamá, Colômbia	
	FIV	<i>adw4</i>	Argentina, Bolívia,	
G		<i>adw2</i>	EUA, Alemanha, França	3248
H		<i>adw4</i>	EUA, Nicarágua	3215

## 1.8.2 - Distribuição geográfica dos genótipos

O genótipo A (HBV/A) é o mais prevalente no norte da Europa, em algumas regiões da África subsaariana e nas Américas. Os genótipos B (HBV/B) e C (HBV/C) são característicos da população asiática (Okamoto *et al.*, 1988), onde se encontra a maioria dos portadores de HBV, sendo também identificados em diferentes localidades na Oceania. O genótipo D (HBV/D) é o mais amplamente difundido, apresentando uma prevalência mais acentuada dos países mediterrâneos. O genótipo E (HBV/E) é encontrado na África ocidental, enquanto o genótipo F (HBV/F) é endêmico das Américas Central e do Sul, especialmente em populações ameríndias. (Arauz-Ruiz *et al.*, 1997; Blitz *et al.*, 1998; Mbayed *et al.*, 1998; Moraes *et al.*, 1999). O genótipo G (HBV/G) foi encontrado nos Estados Unidos e na Europa (Stuyver *et al.*, 2000) e o genótipo H (HBV/H) foi identificado na Nicarágua, México e Califórnia (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002).

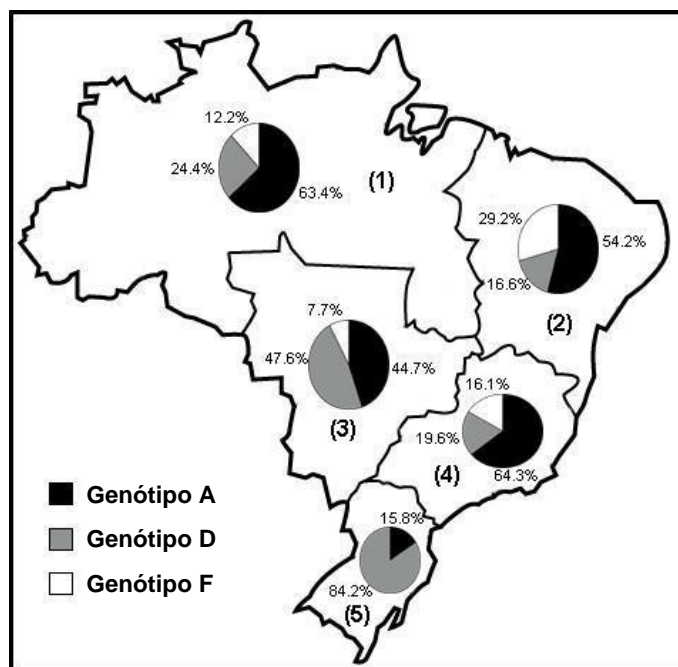
A proposição de um novo genótipo I foi realizada por um estudo envolvendo cepas do Vietnã (Tran *et al.*, 2008). Entretanto, de acordo com um estudo de 2008, a descrição desse novo genótipo e as conclusões sobre a recombinação intergenotípica observada não corresponderam aos atuais critérios para a definição de um novo genótipo (Kurbanov *et al.*, 2008). Um outro estudo realizado no Japão identificou um vírus com características genéticas que o posicionava filogeneticamente entre os isolados encontrados em humanos e os oriundos de primatas não-humanos (Tatematsu *et al.*, 2009). Tal isolado foi tentativamente classificado como um novo genótipo J. Apesar dessas duas proposições, características genéticas, epidemiológicas, virológicas e clínicas dos dois novos possíveis genótipos I e J ainda precisam ser melhor definidas (Kurbanov *et al.*, 2010).

Estudos recentes demonstraram que o padrão de distribuição geográfica dos genótipos do HBV vem mudando, especialmente em regiões do mundo onde ocorre um intenso fluxo migratório. Com isso, os eventos de recombinação entre os genótipos, que vêm sendo descritos ultimamente, tendem a aumentar, visto que diferentes genótipos passam a circular em uma

mesma região (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002; Kurbanov *et al.*, 2005; Olinger *et al.*, 2006; Kramvis *et al.*, 2008).

No Brasil, os genótipos mais comumente encontrados são A, D e F, o que reflete o alto grau de miscigenação da população brasileira.

Em um trabalho anterior, Mello e colaboradores analisaram amostras de soro positivas para o HBsAg de 303 doadores de sangue das cinco regiões geográficas do Brasil (Mello *et al.*, 2007). De acordo com este estudo, o genótipo A apresenta a maior prevalência no país (48,5%). Dentro desse grupo, o mais amplamente difundido é o subgenótipo A1 (figura 1.8), de origem africana (90.2%), com sua introdução relacionada ao período de tráfico negreiro da África para o Brasil (Araújo *et al.*, 2004; Tonetto *et al.*, 2009). A elevada prevalência dos genótipos A2 e D no sul e sudeste do Brasil, pode ser relacionada à entrada de imigrantes europeus, provenientes principalmente da Itália e Alemanha, ocorrida no início do século XX. Finalmente, o genótipo F, endógeno das populações ameríndias, seria originário da população indígena do Brasil (Mello *et al.*, 2007).



**Figura 1.8:** Distribuição dos Genótipos do HBV no Brasil (Fonte: Mello *et al.*, 2007-Figura adaptada para o português).

No continente africano, três principais genótipos vêm sendo identificados como mais prevalentes. O HBV/D é mais prevalente no norte africano. O HBV/A concentra-se no centro-sul e na costa oriental, enquanto o genótipo E, o menos divergente e pouco estudado, encontra-se difundido na costa ocidental subsaariana (Figura 9). Em países onde há a circulação de dois ou mais genótipos, são comuns os eventos de recombinação e coinfeção. Infecções mistas entre os genótipos A e E foram descritas em indivíduos HIV positivos de um estudo realizado em pacientes da Nigéria e Camarões (Olinger *et al.*, 2006); além de eventos de recombinação já foram documentados entre os genótipos A e D (Owiredu *et al.*, 2001) e A e E (Kurbanov *et al.*, 2005).

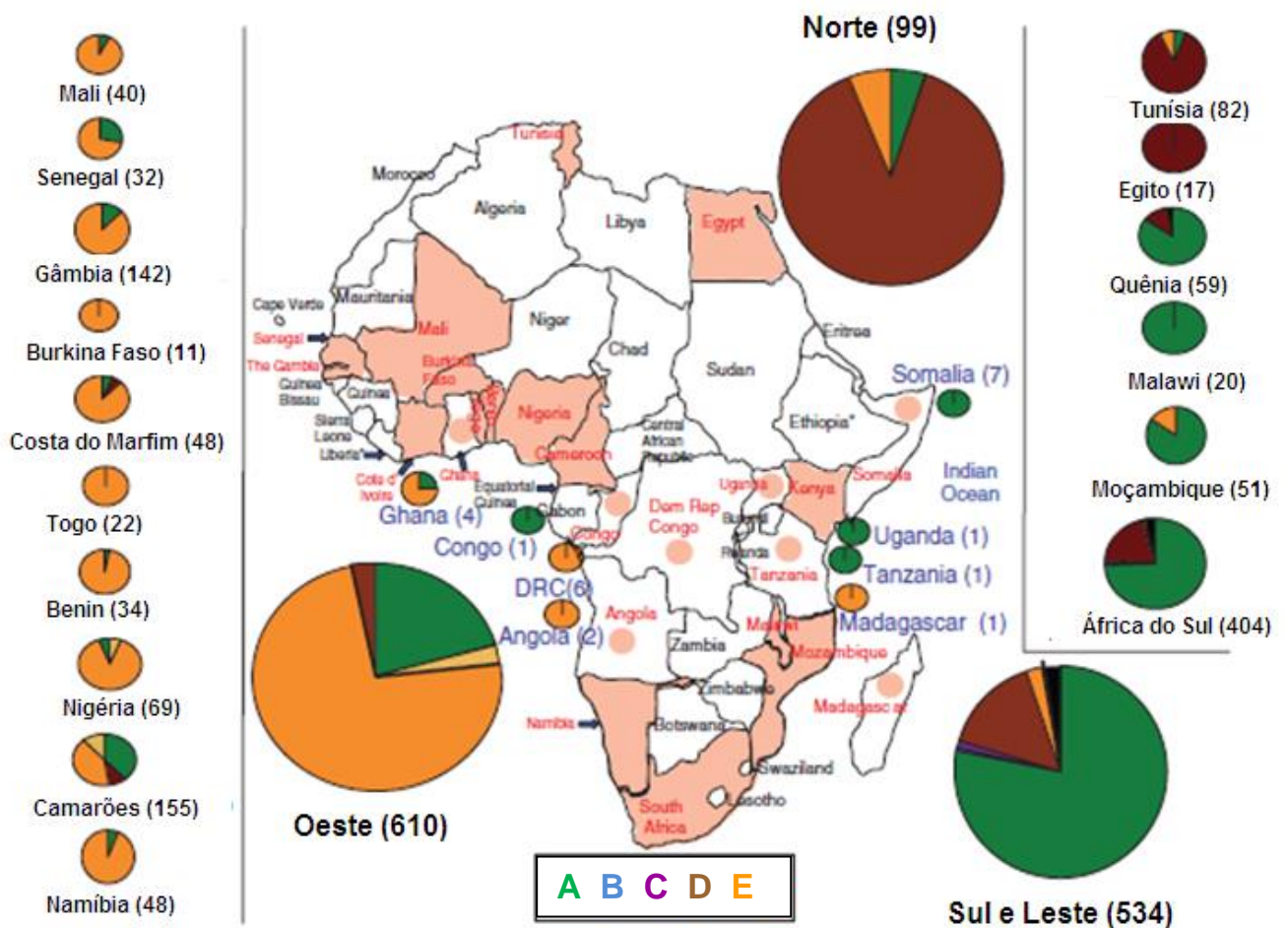


Figura 1.9: Distribuição dos genótipos do HBV no continente africano. Kramvis e Kew., 2007a, adaptado para o português.



Sequências depositadas em bancos de dados internacionais referentes aos genomas completos de isolados africanos demonstraram uma divergência intragenotípica para as sequências do genótipo E em torno de  $1,73 \pm 0,83$ . Essa baixa variabilidade genética associada ao genótipo E, quando comparada a isolados pertencentes aos demais genótipos, sugere que o mesmo tenha uma história evolutiva recente e tenha sido introduzido ou reintroduzido há cerca de 200 anos na população africana (Mulders *et al.*, 2004, Andernach *et al.*, 2009). Essa teoria é amparada pela quase ausência de isolados pertencentes a esse genótipo nas Américas entre os países que receberam mão-de-obra escrava africana. (Kramvis e Kew, 2007a; Kramvis e Kew, 2007b; Motta-Castro *et al.*, 2007; Sitnik *et al.*, 2007 Matos *et al.*, 2009).

À exceção de indivíduos africanos que relataram viagens para outros países, o único achado de isolados HBV/E nas Américas se refere a 9 amostras encontradas em indivíduos afro-descendentes da cidade de Quibdó, na Colômbia (Alvarado Mora *et al.*, 2010). De acordo com Alvarado e colaboradores, apesar de não haver relato de viagem para países africanos ou a entrada de visitantes dentre os membros da comunidade, não é possível afirmar se a presença dos isolados HBV/E nessa população é um evento recente ou se o mesmo foi introduzido durante o período escravocrata (Alvarado Mora *et al.*, 2010).

## I.9 – PANORAMA HISTÓRICO

### I.9.1- O escravo africano

V

“Ontem a Serra Leoa,  
A guerra, a caça ao leão,  
O sono dormido à toa  
Sob as tendas d'amplidão!  
Hoje... o porão negro, fundo,  
Infecto, apertado, imundo,  
Tendo a peste por jaguar...  
E o sono sempre cortado  
Pelo arranco de um finado,  
E o baque de um corpo ao mar...”  
*(O Navio Negreiro - Castro Alves)*

O processo de escravização dos povos africanos é fundamental para que se compreenda a atual situação de desigualdade no planeta. Repete em grandes proporções, histórias milenares de subjugação de populações fragilizadas por outras mais ricas e bem equipadas. Pressupõe a existência de formas de hierarquia amparadas na pobreza, mão-de-obra excedente que possa ser explorada em benefício de uma minoria, desconhecimento, desestruturação econômica, cultural e fragmentação etno-social.

Relatos bíblicos, já no Antigo Testamento, mencionam a existência de escravos e regulamentam aspectos da escravidão (Êxodo 20;17, Deuteronômio 5;14). Desde o início do século XIII, prisioneiros capturados nas guerras santas eram vendidos como escravos entre os próprios africanos, para uso doméstico e militar.

O emprego de mão de obra escrava africana nas Américas iniciou-se no século XV durante o período de expansão marítima europeia. Entretanto, esse comércio ocupava um papel secundário nas negociações entre África e Europa. Outros produtos como o ouro, marfim, pele de animais e especiarias eram os mais importantes produtos de exportação.

No entanto, à medida que aumentava a procura do mercado europeu pelos bens produzidos nas Américas, aumentava também a procura por escravos africanos para trabalhar na produção desses bens. O crescimento do comércio transatlântico foi responsável por profundas mudanças políticas e econômicas no continente africano. Em função disso, o tráfico de escravos secular para uso doméstico foi substituído pelo comércio em larga escala (Arruda, 1995; Klein, 2010)

Nesse aspecto, vale ressaltar que, apesar dos esforços europeus para satisfazer o desejo das elites africanas de armas e produtos ocidentais que eram trocados por cativos, seria impossível obter o suprimento desejável de mão-de-obra escrava se não houvesse a participação de redes complexas especializadas no interior do continente. Isso explica a grande diversidade de africanos traficados, tanto com relação às regiões de onde eram provenientes, quanto em relação à origem de sua condição de escravo: prisioneiros de guerras territoriais e religiosas, indivíduos condenados por crimes, penhorados por dívidas, vendidos por parentes em troca de bens e propriedades, camponeses raptados por traficantes, entre outros (Klein, 2010).

### **I.9.2- O comércio transatlântico e a escravidão no Brasil**

#### VI

*“Existe um povo que a bandeira empresta  
P’ra cobrir tanta infâmia e covardia!...  
E deixa-a transformar-se nessa festa  
Em manto impuro de bacante fria!...  
Meu Deus! meu Deus! mas que bandeira é esta,  
Que impudente na gávea tripudia?  
Silêncio!... Musa! chora, e chora tanto  
Que o pavilhão se lave no teu pranto...”*  
(O Navio Negreiro - Castro Alves)

Os primeiros portos de exportação de escravos para as Américas situaram-se na Costa do Ouro, Oeste africano. Conforme se desenvolvia a

expansão marítima portuguesa, novos portos foram ganhando importância, como nos atuais países do Congo e Angola, que se tornaram as principais fontes de fornecimento de escravos para o Brasil, os chamados “negros Bantus”. (Arruda, 1995).

Visando reduzir os custos de exportação de especiarias e seda que possuíam uma alta procura na Europa, e a fim de obter novas fontes de fornecimento de ouro, marfim e escravos, navegantes portugueses, financiados pela monarquia, se lançaram em diversas rotas marítimas comerciais (figuras 11 e 12) pelos três oceanos, estabelecendo relações comerciais com a Ásia, Brasil e continente africano (Koshiba, 2003; Klein, 2010).



Figura 1.10: Rotas utilizadas durante a expansão marítima portuguesa. Disponível em: <http://artigosdehistoria.blogspot.com.br/2012/02/imagens-referentes-expansao-maritima-e.html>. Acesso em: 27/02/2014

Diversos portos de embarque de escravos foram utilizados desde o início do regime escravocrata no Brasil, até sua abolição, no final do século XIX. Cada um desses portos recebia escravos provenientes de uma grande região que ia até centenas de quilômetros para o interior do continente.

Portanto, a origem étnica dos escravos recebidos no Brasil é muito variada, além de se ter alterado ao longo dos séculos de tráfico.

Além das diferenças na oferta de mão-de-obra em distintas regiões do continente africano, outra razão foi o momento histórico e local em que ocorreu cada ciclo econômico no Brasil (Arruda, 1995; Klein, 2010).

Desse modo simplificado, pode-se estabelecer a seguinte associação:

Séculos XVI e XVII: Portos do Senegal, Serra Leoa, Gana e Guiné, enviando escravos do extremo oeste africano (negros da Guiné) principalmente para Salvador e Recife, para trabalhar nas usinas de cana-de-açúcar.

Século XVIII: Portos de São Jorge da Mina, Uidá (Benim), Calabar (Nigéria), Luanda (Angola) e Cabinda, próximo à foz do rio Congo, para desembarcarem nos portos de Salvador e Rio de Janeiro, de onde a maior parte seria encaminhada para trabalhar na extração de ouro em Minas Gerais. Registros indicam que através dos portos do Congo e Angola foram traficadas cerca de 3,8 milhões de pessoas entre 1700 e 1810. Isso corresponde a 40% do total de escravos, fazendo do Congo e Angola, inquestionavelmente, os maiores fornecedores de mão-de-obra africana para o Brasil.

Século XIX: Portos de São Jorge da Mina, Cabinda, Congo e Angola, na primeira metade do século, e Zanzibar, Lourenço Marques, Quilamane e Inhambane (Moçambique), na segunda metade do século, enviando escravos que eram desembarcados principalmente no Rio de Janeiro, de onde a maior parte seguia para as plantações de café no vale do Paraíba do Sul, e de cana-de-açúcar do norte fluminense.

Após a Revolução Industrial, com o objetivo de criar novos mercados consumidores no Brasil para os produtos ingleses (o que só seria possível com a existência de trabalhadores assalariados), surge na Inglaterra uma forte pressão a favor dos movimentos abolicionistas. Amparado pelos ideais Iluministas europeus, e alinhado com o recém descrito liberalismo econômico, esse movimento teve sua consequência prática com o advento de Bill Aberdeen. Instituída em 1845, esta lei visava o combate ao tráfico de escravos no Atlântico Sul, atribuindo à marinha inglesa o direito de apreender quaisquer navios negreiros que se dirigissem ao Brasil. Essas medidas visavam efetivar o cumprimento de tratados internacionais vigentes desde a

década de 1810, que consideravam o tráfico de escravos ilegal e o colocavam na condição de pirataria.

Durante a década de 1840, a marinha britânica aprisionou centenas de embarcações que carregavam escravos africanos para o Brasil, conduzindo-os de volta ao continente africano. Entre 1845 e 1850, quando finalmente a Lei Eusébio de Queirós aboliu o tráfico negreiro no Brasil, mais de 300 embarcações brasileiras já haviam sido interceptadas pela marinha real britânica, muitas delas já em águas territoriais do país.

Diante da pressão exercida pela Inglaterra e frente à imensa demanda americana por escravos, a costa oriental africana, na atual região de Moçambique, passou a ser a nova fonte principal na aquisição dos escravos trazidos para o Brasil durante o século XIX (Arruda, 1995; Klein, 2010).



Figura 1.11: Principais rotas do tráfico de escravos. Disponível em: <http://fazendohistorianova.blogspot.com.br/2013/04/encontro-dos-europeus-com-povos-da.html>. Acesso em: 01/03/14

É difícil calcular precisamente quantos africanos foram trazidos para o Brasil ao longo de três séculos de tráfico. Muitos registros que poderiam tornar os dados mais precisos foram perdidos ou destruídos por traficantes e

fazendeiros nos momentos que cercaram a abolição da escravatura, evitando assim, a possibilidade de pagamento de indenizações. As estimativas indicam que entre cinco e dez milhões de pessoas desembarcaram nos portos brasileiros para serem vendidas como escravas.

Entre meados do século XVIII até primeiras décadas século XIX ocorreu o apogeu da escravidão no Brasil, momento histórico em que, impulsionado pela Europa em desenvolvimento, o Brasil cresceu economicamente tanto em função da extração aurífera quanto pela prosperidade das produções latifundiárias.

O século de apogeu do tráfico, no entanto, seria também o do início de seu fim. Impulsionados por inúmeros eventos históricos nas Américas e Europa (Revolução Francesa, em 1789, e a Revolução Haitiana de 1791), os ideais igualitários passavam a questionar a escravidão e ecoavam no Brasil através de poetas e intelectuais como Castro Alves, Luiz Gonzaga e Gonçalves Dias.

Apesar da escravidão no Brasil ter sido extinta em 13 de maio de 1888, a consolidação de uma nação etnicamente igualitária ainda encontra sérias barreiras econômicas e sociais. De acordo com um estudo realizado pelo Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea) em 2013, a população negra brasileira apresenta menor número de idosos, é mais pobre e está mais exposta à mortalidade por causas externas. De acordo com a pesquisa, os negros são 70% das vítimas de assassinato no Brasil. A possibilidade de um adolescente negro ser vítima de homicídio é 3,7 vezes maior em comparação com um branco (PRVL, 2010; Ipea, 2011; Ipea, 2013).

Assim, a herança deixada pela África vai além das características étnicas, hábitos culinários e religiosos da nossa população. Resquícios do passado escravocrata fazem com que ainda nos dias de hoje, os negros componham mais de 65% da população de baixa renda e ainda ocupem cargos mais baixos na sociedade. De acordo com o censo de 2010, existem hoje 97 milhões de brasileiros negros ou pardos versus 90 milhões de brasileiros brancos, demonstrando que apesar de um passado/presente de desigualdade e discriminação, os descendentes da África estão presentes na maior parte dos lares do Brasil (Ipea, 2011; 2013).

Além da enorme proporção de afro-descendentes na população brasileira em geral, estudos demonstram que existem comunidades

quilombolas em pelo menos 24 estados do Brasil: Amazonas, Alagoas, Amapá, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe e Tocantins. Dentre estes, estudos investigando a prevalência e variabilidade genética do HBV já foram realizados em quilombolas de duas regiões brasileiras: nordeste e centro oeste, demonstrando elevadas prevalências (12,5-42,4%) de infecção pelo HBV, além da presença quase que exclusiva do HBV/A1 (Motta-Castro *et al*, 2005, Motta-Castro *et al*, 2008, Matos *et al*, 2009, Alvarado-Mora *et al*, 2010).



## II. JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório, com comunidades isoladas de descendentes de escravos na região Centro-Oeste do país, identificaram a prevalência quase exclusiva de isolados do HBV pertencentes ao HBV/A1, sugerindo sua origem africana, com provável introdução no Brasil durante o período do tráfico negreiro (Motta-Castro *et al.*, 2005; Motta-Castro *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2009).

O presente estudo teve início com os acordos firmados entre o governo brasileiro e outros países de língua portuguesa que visavam incentivar a cooperação entre o Brasil e o continente africano. Em função disso, dois trabalhos de mestrado foram realizados visando (i) caracterizar sorologicamente a infecção pelo HBV em Luanda, Angola (Valente *et al.*, 2010) e (ii) caracterizar molecularmente os genomas completos de isolados de HBV de Angola (Lago, 2010). Como Angola foi um dos principais portos de exportação de escravos para o Brasil entre os séculos XV e XVIII, pretendíamos investigar a identidade genética entre os isolados de HBV/A1 brasileiros e angolanos e estabelecer seu momento de entrada no país. Entretanto, para a nossa surpresa, que foi posteriormente confirmada por estudos filogenéticos da época, verificamos a predominância, do HBV/E na costa ocidental africana, em lugar do HBV/A1, encontrado nas comunidades afro-descendentes brasileiras (Valente *et al.*, 2010).

Sendo o HBV/E o genótipo mais prevalente na costa ocidental africana (Odemuyiwa *et al.*, 2001; Mulders *et al.*, 2004; Kramvis e Kew, 2007; Hubschen *et al.*, 2009) e, entretanto, pouco estudado, investigações que forneçam dados sobre sua diversidade genética são particularmente importantes. Em contraste à sua elevada prevalência na África subsaariana, cobrindo uma região de cerca de 6000 km, indo do Senegal a Angola, sua baixa variabilidade genética e sua quase ausência em regiões das Américas que receberam um elevado contingente de escravos apontam para uma história evolutiva recente, após o período escravagista.

Por outro lado, partindo do princípio de que o HBV/A1 é um genótipo africano e que foi disseminado no Brasil durante o tráfico negreiro, é razoável

admitir que em pelo menos uma das localidades de onde os cativos vieram este genótipo era prevalente.

Diante disso, questões relevantes a se pensar são: Se as cepas do HBV/A1 trazidas para o Brasil durante o tráfico negreiro não eram predominantes na costa ocidental africana, quais outras regiões da África contribuíram para o fornecimento da população infectada? Quando a disseminação desse genótipo no Brasil teria ocorrido? A partir dessas perguntas é possível revisitar as bases históricas e correlacionar o período de entrada do HBV/A1 com a localidade de origem dessas populações.

Há uma grande escassez de estudos publicados que indiquem a incidência do HBV em Angola e dos genótipos que circulam nesta região. Os estudos publicados pela nossa equipe foram os primeiros a cerca da prevalência e variabilidade genética do HBV circulantes nesse país.

Assim, o presente estudo é, em parte, uma continuidade do trabalho desenvolvido durante o mestrado da proponente da tese, que realizou a caracterização molecular e genotípica dos isolados de HBV circulantes em Angola e investigou a variabilidade genética entre as subpopulações (Lago, 2010).

Estudos filogeográficos vêm sendo utilizados como uma ferramenta importante no conhecimento dos padrões de dispersão do HBV (Mello *et al.*, 2013; Andernach IE *et al.*, 2013; Ciccozzi *et al.*, 2014) e outros vírus como HIV (Bielejec *et al.*, 2014) e HCV (Golemba *et al.*, 2013), bem como no resgate histórico das rotas de migração populacionais.

O presente trabalho mostra-se relevante pelo aspecto interdisciplinar a que se propõe. Tendo em vista que os isolados do HBV apresentam diferenças etnogeográficas, patogênicas e terapêuticas (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002; Kramvis *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005), a investigação da sua variabilidade genética em populações ainda pouco estudadas contribuirá para o conhecimento de aspectos etiológicos, virológicos, clínicos e antropológicos. Os resultados das pesquisas do HBV poderão fornecer indícios de quais os países africanos mais contribuíram para a disseminação do HBV no Brasil iniciada no período escravocrata.

Além dos aspectos virológicos, este estudo pretende revisitar as bases históricas da contribuição dos grupos africanos para a formação da população

brasileira através do resgate de similaridades que refletem até os presentes dias, nossas origens étnicas, culturais e um passado de exploração em comum.

### III- OBJETIVOS

#### III.1- Objetivo geral da tese

Investigar a história evolutiva do HBV entre África e Brasil e sua associação com o período escravocrata.

#### III.2.1- Objetivos do Artigo 1

Caracterizar geneticamente os isolados do HBV/E de Luanda, Angola. Investigar a significância da detecção concomitante do antígeno HBsAg com o anticorpo anti-HBs, identificada em um segmento elevado da população circulante. Apesar da baixa variabilidade genética atribuída ao HBV/E, investigar a presença de assinaturas moleculares que possam diferenciar os isolados angolanos de isolados circulantes em outras regiões Africanas.

#### III.2.2- Objetivos do Artigo 2

Caracterizar geneticamente os isolados do HBV/A circulantes no Brasil. Investigar a identidade genética entre isolados brasileiros e de diferentes regiões africanas. Estudar a dispersão espacial do HBV/A1, bem como sua rota e momento de entrada no Brasil.

#### III.2.3- Objetivos gerais do Artigo 3

Comparar a carga viral e os níveis de expressão de diversas proteínas do HBV entre o método livre de vetor, descrito por Gunther (Gunther *et al.*, 1995) e uma construção contendo 1,28 do genoma do HBV, utilizando o vetor pCDNA4, utilizando o promotor endógeno do HBV, descrita por Bhoola e colaboradores (Bhoola *et al.*, 2012).

## IV- RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente tese serão apresentados sob a forma de artigos científicos e serão listados na ordem em que serão discutidos.

### IV.1- Artigo 1

#### **Analysis of Complete Nucleotide Sequences of Angolan Hepatitis B Virus Isolates Reveals the Existence of a Separate Lineage within Genotype E**

LAGO, B.V. MELLO, F.C.A., RIBAS F.S., VALENTE, F., SOARES, C.C., NIEL, C., A GOMES, S.A.

PLoS ONE. 2014 Mar 14;9(3):e92223. doi: 10.1371/journal.pone.0092223. eCollection 2014.

### IV.2- Artigo 2

#### **Hepatitis B virus subgenotype A1: Evolutionary relationships between Brazilian, Asian and Africa isolates**

LAGO, B.V. MELLO, F.C.A., KRAMVIS, A., NIEL, C., A GOMES, S.A.,

PLoS ONE., 2014 Aug 14;9(8):e105317. doi: 10.1371/journal.pone.0105317. eCollection 2014.

### IV.3- Artigo 3

#### **Comparison of levels of HBV (subgenotype A1) antigens synthesis after transfection of Huh7 cells by HBV cccDNA and 1.28 mer HBV DNA construct**

LAGO, B.V., DEROUBAIX, A. BHOOLA, N.H., GOMES, S.A., KRAMVIS, A  
(em revisão).

## Artigo 1:

### Breve contextualização e metas alcançadas

Sabemos que Angola foi o principal porto de exportação durante o tráfico negreiro, de onde foram enviados o maior número de escravos para o Brasil. No entanto, paradoxalmente, o HBV/E que lá circula atualmente não é encontrado em países do Novo Mundo que receberam mão-de-obra escrava africana. Esses achados indicam que não havia naquela época uma elevada circulação do HBV/E nas regiões africanas de onde os escravos foram retirados. A história evolutiva do HBV/E ainda é pouco conhecida. Apesar de hiperendêmico na África subsaariana, o genótipo E vem sendo descrito como um dos genótipos de menor variabilidade existente (1,75%, em comparação com 4% entre os isolados HBV/A Africanos) (Mulders *et al*, 2004; Kramvis e Kew, 2007a). Estudos filogenéticos sugerem que sua disseminação pela África ocidental tenha ocorrido há aproximadamente 200 anos. Essa baixa variabilidade e a quase ausência desse genótipo nas Américas, em países que receberam mão-de-obra escrava até meados do século XVIII, podem ratificar a hipótese de uma origem recente e de que sua disseminação pela África ocidental provavelmente teria ocorrido após o período do tráfico negreiro (Mulders *et al*, 2004; Sitnik *et al*, 2007).

### Metas alcançadas:

- Caracterização molecular das substituições existentes no genoma completo do HBV da população de Luanda, Angola e sua correlação com o perfil sorológico das amostras.
- Identificação de substituições características da população estudada, que possam ser consideradas assinaturas moleculares características dessa população.
- Caracterização filogenética dos isolados HBV/E de Angola através da comparação com outras sequências disponíveis no GenBank.

# Analysis of Complete Nucleotide Sequences of Angolan Hepatitis B Virus Isolates Reveals the Existence of a Separate Lineage within Genotype E

Barbara V. Lago<sup>1</sup>, Francisco C. Mello<sup>1</sup>, Flavia S. Ribas<sup>1</sup>, Fatima Valente<sup>2</sup>, Caroline C. Soares<sup>1</sup>, Christian Niel<sup>1</sup>, Selma A. Gomes<sup>1\*</sup>

**1** Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Eduardo dos Santos Foundation, Ministry of Health, Luanda, Angola

## Abstract

Hepatitis B virus genotype E (HBV/E) is highly prevalent in Western Africa. In this work, 30 HBV/E isolates from HBsAg positive Angolans (staff and visitors of a private hospital in Luanda) were genetically characterized: 16 of them were completely sequenced and the pre-S/S sequences of the remaining 14 were determined. A high proportion (12/30, 40%) of subjects tested positive for both HBsAg and anti-HBs markers. Deduced amino acid sequences revealed the existence of specific substitutions and deletions in the B- and T-cell epitopes of the surface antigen (pre-S1- and pre-S2 regions) of the virus isolates derived from 8/12 individuals with concurrent HBsAg/anti-HBs. Phylogenetic analysis performed with 231 HBV/E full-length sequences, including 16 from this study, showed that all isolates from Angola, Namibia and the Democratic Republic of Congo (n=28) clustered in a separate lineage, divergent from the HBV/E isolates from nine other African countries, namely Cameroon, Central African Republic, Côte d'Ivoire, Ghana, Guinea, Madagascar, Niger, Nigeria and Sudan, with a Bayesian posterior probability of 1. Five specific mutations, namely small S protein T57I, polymerase Q177H, G245W and M612L, and X protein V30L, were observed in 79–96% of the isolates of the separate lineage, compared to a frequency of 0–12% among the other HBV/E African isolates.

**Citation:** Lago BV, Mello FC, Ribas FS, Valente F, Soares CC, et al. (2014) Analysis of Complete Nucleotide Sequences of Angolan Hepatitis B Virus Isolates Reveals the Existence of a Separate Lineage within Genotype E. PLoS ONE 9(3): e92223. doi:10.1371/journal.pone.0092223

**Editor:** Isabelle A. Chemin, CRCL-INSERM, France

**Received:** November 21, 2013; **Accepted:** February 19, 2014; **Published:** March 14, 2014

**Copyright:** © 2014 Lago et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Sources of funding that have supported the work: Fiocruz, CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: selma@ioc.fiocruz.br

## Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infection still remains an important cause of morbidity and mortality worldwide, particularly in the Asian and African developing countries. Worldwide, about 350 million people are chronically infected and about 600,000 people die every year due to the consequences of acute or chronic HBV infection [1].

HBV has a DNA genome of about 3.2 kb, which contains four open reading frames, namely S (surface antigen), P (polymerase), C (core protein) and X (regulatory protein). Generally, the development of antibodies against hepatitis B surface antigen (HBsAg) leads to the viral clearance. However, the concurrent presence of HBsAg and anti-HBs has been reported occasionally [2–5]. Studies performed with HBV carriers testing positive for both serological markers have demonstrated that mutations in the pre-S [6,7] and S [8,9] regions of the genome may lead to changes in the immunogenicity of the viral particles, thus influencing the viral behavior and clinical course of the liver disease.

Africa is globally classified as a high HBV prevalence area, although hepatitis B endemicity may vary greatly from a region to another [10]. Based on HBsAg positivity, HBV is hyperendemic (>8%) in some sub-Saharan countries such as Nigeria, Namibia, Gabon and Cameroon. Other countries (Kenya, Zambia, Côte d'Ivoire, Liberia, Sierra Leone and Senegal) are considered areas

of intermediate endemicity (2–8%), while Egypt, Tunisia, Algeria and Morocco, located at the North of the continent, are low endemicity (<2%) regions. Prevalence of hepatitis B core antibody (anti-HBc), a serological marker for previous HBV exposure, is extremely high (>80%) in various African populations [10].

Human HBV isolates have been classified into at least eight genotypes, denoted A (HBV/A) to H (HBV/H), based on a sequence divergence >7.5% in the entire genome [11–14]. Genotypes A–D and F have been divided into subgenotypes based on an intergroup divergence of about 4% [15]. Genotypes A, D and E are the most frequently found in Africa and show a characteristic distribution, with subgenotype A1 being prevalent in Southern and Eastern coastal regions, HBV/E spread in West Africa and genotype D prevailing at the North of the continent [10,16].

The evolutionary history of HBV/E is still unclear. This genotype is largely spread in West Africa but shows a restricted genetic variability. Indeed, the mean divergence over the HBV/E whole genome does not exceed 1.75%, in comparison to 4% among HBV/A African isolates [17]. Despite the slave trade that lasted from the 16th to the 19th century, HBV/E has not been reported in the New World, except in people who maintained relations with Africa [18]. These findings support the hypothesis of a recent (<200 years) origin of HBV/E [17,19].

**Table 1.** Demographic, serological and occupational data and hepatitis B risk factors of the Angolan HBV/E carriers of this study.

Subject	Sex	Age (y)	Province of birth	Anti-HBs	Anti-HIV	Hospital position	Known hepatitis B risk factors
LDA067	F	29	Huambo	Pos	Neg	Yes (lab technician)	Surgery
LDA072	F	22	Luanda	Pos	Neg	No	–
LDA111	F	28	Cuanza Norte	Pos	Pos (untreated)	No	Blood transfusion
LDA154	M	20	Luanda	Neg	Neg	No	Tattoo
LDA173	M	37	Luanda	Neg	Pos (HAART)	No	–
LDA232	M	38	Cuanza Sul	Pos	Pos (untreated)	No	–
LDA264	M	34	Uíge	Neg	Neg	No	–
LDA265	M	44	Luanda	Pos	Pos (HAART)	No	Surgery
LDA274	F	36	Huíla	Neg	Neg	Yes (nurse)	–
LDA277	F	68	Uíge	Pos	Neg	No	Blood transfusion
LDA278	M	26	Uíge	Pos	Neg	No	–
LDA332	M	43	Malanje	Neg	Neg	No	–
LDA335	F	37	Luanda	Neg	Neg	No	–
LDA339	F	37	Luanda	Neg	Pos (HAART)	No	Surgery
LDA349	M	21	Luanda	Neg	Neg	No	–
LDA379	M	26	Luanda Norte	Neg	Neg	No	–
LDA386	M	20	Luanda	Neg	Neg	No	Multiple <sup>a</sup>
LDA399	F	23	Luanda	Neg	Neg	Yes (cleaner)	Tattoo
LDA405	M	21	Luanda	Neg	Neg	No	–
LDA408	F	21	Luanda	Neg	Neg	No	–
LDA417	F	26	Luanda	Neg	Neg	Yes (nurse)	–
LDA423	F	43	Luanda	Pos	Neg	No	–
LDA439	M	34	Huambo	Neg	ND	No	–
LDA445	F	23	Benguela	Neg	ND	No	–
LDA452	M	36	Bengo	Neg	ND	No	–
LDA470	M	28	Malanje	Pos	Neg	Yes (gardener)	Surgery
LDA481	M	43	Uíge	Pos	ND	Yes (porter)	Tattoo
LDA489	M	53	Bengo	Pos	Neg	Yes (nurse)	Multiple <sup>b</sup>
LDA494	M	39	Luanda	Pos	Neg	No	Tattoo
LDA504	F	39	Malanje	Neg	Neg	Yes (administrative)	–

<sup>a</sup>Multiple sexual partners, surgery, tattoo; <sup>b</sup> Surgery, blood transfusion; ND, not determined.  
doi:10.1371/journal.pone.0092223.t001



**Table 2.** Deletions in large and middle S proteins and association with anti-HBs status.

Sample	Deleted amino acids positions (length)	
	pre-S1 region	pre-S2 region
Concurrent HBsAg/anti-HBs		
LDA 232	64–81 (18 aa)	–
LDA 265	–	22 (1 aa)
LDA 423	–	19–22 (4 aa)
LDA 470	–	17–22 (6 aa)
LDA 489	–	17–22 (6 aa)
HBsAg without anti-HBs		
LDA 405	3–12 (10 aa)	–

doi:10.1371/journal.pone.0092223.t002

A previous study has shown that genotype E is predominant in Angola [20]. In this study, we investigated the genetic diversity of Angolan HBV/E isolates and demonstrate the existence of a separate cluster within genotype E formed by isolates from Angola, Namibia and the Democratic Republic of Congo.

## Results

### Mutations in the Surface Antigen, Polymerase and Precore-Core Genes

No nucleotide sequence could be determined for five of the 35 Angolan virus isolates previously characterized as HBV/E, due to insufficient amounts of PCR products. The other 30 were genetically characterized. Full-length genome and pre-S/S sequences were determined for 16 and 14 isolates, respectively. Table 1 shows demographic, serological and occupational data of the 30 HBV/E infected individuals, as well as their hepatitis B risk factors (when known) and anti-HIV status. Only three persons (LDA265, LDA423 and LDA470) were aware of their HBV carrier status. Twelve (40%) subjects had concurrent HBsAg and anti-HBs, while the remaining 18 (60%) tested HBsAg positive and anti-HBs negative. All but one HBV/E strain belonged to serotype *ayw4*, on the basis of the deduced amino acid composition. The exception was the isolate LDA332 which showed a proline residue at position 127 in the small S protein, compatible with serotypes *ayw1* and *ayw2*. Twenty-nine out of 30 isolates showed a start codon Met83 in the pre-S1 region (not shown), which is a characteristic of genotype E and may result in the translation of an elongated middle S protein.

Deletions varying from one to 18 amino acids in length were found (Table 2). Among the 12 isolates derived from individuals with concurrent HBsAg/anti-HBs, five (42%) showed a deletion in their genome (one in the pre-S1- and four in the pre-S2 region). Only one deletion (amino acids residues 3–12 in the pre-S1 region) was observed among the 18 HBV isolates derived from anti-HBs negative subjects. Based on previous mapping of immune epitopes and functional domains within the pre-S region [21,22], all five deletions present in isolates derived from individuals with concurrent HBsAg/anti-HBs disrupted T- and/or B-cell epitopes, whereas the unique deletion found in the group of subjects without anti-HBs antibodies did not.

Table 3 shows a comparison between deduced amino acids of the large S proteins of the 30 isolates from this study and the consensus sequence of 130 other HBV/E isolates available in the DNA databanks. The 31 amino acid residues shown on Table 3 are those for which a mutation was observed in at least two, but

not in all Angolan isolates. Strains derived from four subjects with concurrent HBsAg/anti-HBs (LDA265, LDA423, LDA481 and LDA494) showed an R34K substitution in the pre-S1 region. Furthermore, pre-S2 R16K and/or R18K mutations were observed in five HBV isolates derived from individuals with concurrent HBsAg/anti-HBs (LDA067, LDA232, LDA423, LDA470 and LDA494). At all, mutations disrupting T- or B-cell epitopes, including deletions in the pre-S2 region, substitution R34K in the pre-S1 region, and R to K substitutions at positions 16 and 18 in the pre-S2 region, were observed in 8/12 (67%) samples with concurrent HBsAg and anti-HBs but in none of the 18 samples without anti-HBs antibodies. Otherwise, the Q129H escape mutation in determinant 'a' was observed in two isolates (LDA265 and LDA339; Table 3).

Five individuals were coinfecting with HIV-1. At the time of blood collect, three of them (LDA265, LDA173 and LDA339) were under treatment with highly active antiretroviral therapy (HAART) while the two others did not know they were infected with HIV. All three HBV isolates derived from patients under HAART displayed drug resistance mutations. HBV isolate LDA265 showed the lamivudine resistance substitution rtL180M associated to the adefovir resistance mutation rtA181V (not shown). The two others, LDA173 and LDA339, displayed the lamivudine resistance triple mutation rtV173L, rtL180M, rtM204V/I which causes the concomitant amino acid substitutions E164D/G and I195M in the small S protein (Table 3).

The complete genomes of 16/30 HBV isolates (essentially those whose viral load was  $>10^4$  copies/ml) were successfully amplified by PCR, and their entire nucleotide sequences were determined. Table 4 shows the HBeAg/anti-HBe status, viral load and core promoter/precure mutations of the 16 isolates. The common variations A1762T-G1764A in the basal core promoter and G1896A and G1899A in the precure region were identified in three, four and two isolates, respectively. Among the samples without detectable anti-HBs antibodies, a perfect correlation occurred between precure/core promoter mutations and anti-HBe phenotype, since the three mutated strains (LDA274, LDA399 and LDA417) were precisely those infecting the HBeAg negative, anti-HBe positive subjects. However, such a correlation was not observed among the samples with concurrent HBsAg and anti-HBs, since only the isolate showing both precure and core promoter mutations (LDA423) was derived from an anti-HBe positive individual (Table 4). In the case of sample LDA072 showing a stop codon at nucleotide 1896, a possible explanation for HBeAg detection is that a minority subpopulation of wild-type

**Table 3.** Comparison of deduced amino acid sequences (specific positions) of Angolan HBV isolates and HBV/E consensus.

		Consensus amino acids and positions																																
		Pre-S1 region					Pre-S2 region					S region																						
Samples	34	38	56	66	76	84	85	90	5	11	16	17	18	19	22	39	3	10	13	14	20	21	45	83	129	164	189	193	203	204				
	R	R	K	F	W	L	K	D	S	A	R	V	R	G	F	A	S	G	L	V	F	L	A	F	Q	E	T	S	I	P	S			
Concurrent HBsAg and anti-HBs																																		
LDA067	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	K	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
LDA072	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.		
LDA111	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA232	.	.	-	.	T	.	A	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	P	.	S	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
LDA265	K	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.		
LDA277	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA278	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA423	K	.	.	.	.	.	T	.	.	.	K	A	K	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA470	.	.	.	.	S	.	N	.	.	K	-	-	-	.	.	E	R	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA481	K	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	Q	N	.	.	
LDA489	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	K	.	
LDA494	K	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	A	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	
HBsAg without anti-HBs																																		
LDA154	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LDA173	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	M	.	.	.	.	.	
LDA264	K	.	V	.	.	.	.	Y	T	.	.	.	.	.	S	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	
LDA274	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LDA332	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	D	L	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LDA335	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LDA339	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	D	.	L	M	.	.	.	.	.	
LDA379	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA349	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA386	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LDA399	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA405	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	
LDA408	.	K	Q	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	S	.	.	.	C	.	G	I	.	.	.	.	.		
LDA417	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA439	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA445	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LDA452	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	

**Table 3. Cont.**

Consensus amino acids and positions		S region																													
		Pre-S1 region					Pre-S2 region																								
Samples	34	38	56	66	76	84	85	90	5	11	16	17	18	19	22	39	3	10	13	14	20	21	45	83	129	164	189	193	195	203	204
LDA504	R	R	K	F	W	L	K	D	S	A	R	V	R	G	F	A	S	G	L	V	F	L	A	F	Q	E	T	S	I	P	S

Consensus sequence shown at the top of the table was deduced from the HBV/E full-length sequences available in GenBank. Only positions for which at least two, but not all, Angolan isolates showed differences with the consensus sequence, are shown.  
 -: deletion; \*: stop codon.  
 doi:10.1371/journal.pone.0092223.t003

viruses, undetectable by direct nucleotide sequencing, continues to produce HBeAg.

**Specific Mutations and Phylogenetic Analysis**

Alignment of the amino acid sequences of surface antigen, polymerase, core and X proteins of 213 HBV/E isolates from 12 African countries, including those from this study, revealed the existence of five specific mutations, namely Ile57 in the small S protein, His177, Trp245 and Leu612 in the DNA polymerase, and Leu30 in the X protein. These mutations appeared at high frequencies (79–96%) among the isolates from Angola, Namibia and DRC, but at low rates (0–12%) in those from nine other African countries (Cameroon, Central African Republic, Côte d’Ivoire, Ghana, Guinea, Madagascar, Niger, Nigeria and Sudan; Table 5). In all cases, those differences of frequencies were extremely statistically significant ( $P < 0.0001$ ).

Phylogenetic analysis was performed by using the maximum likelihood method with 231 complete HBV/E sequences available in GenBank (including the sequences from this work), a large majority of them from African isolates. Phylogenetic tree (Fig. 1A) showed that all the 28 isolates from Angola, Namibia and DRC clustered separately from all other HBV/E samples isolated in Africa. This cluster was thus called “Southwest African lineage”. Of 15 non African HBV/E isolates, seven (two Colombian, two Argentinian, one Japanese, one Belgian, and one Martinican) clustered in this group, but eight (five Belgian, two British and one Martinican) did not. Bayesian analysis was carried out to confirm the reliability of the Southwest African lineage. Fig. 1B shows that similar results were achieved. The existence of the Southwest African lineage was confirmed with a posterior probability = 1. The intralinear sequence divergence was 0.96%, while the divergence between the isolates belonging to the separate lineage and the others was 1.53%. Fig. 2 shows the localization of the 12 African countries for which at least one complete HBV/E sequence has been deposited in GenBank. Two well distinct geographic areas were observed. No isolate belonging to the separate lineage (represented in red ink) circulates in an African country other than Angola, Namibia or DRC. Inversely, no isolate clustering out of the Southwest African lineage (black ink) circulates in any of the three countries.

**Discussion**

In this study, 30 Angolan HBV/E isolates were genetically characterized. Deduced amino acid sequences showed the presence of a methionine residue at position 83 in the C-terminal end of the pre-S1 region of 29/30 (97%) isolates. As the number of sequenced HBV/E samples grows, it is becoming clear that Met83 constitutes a molecular signature of genotype E [23]. It would therefore be important to determine, in future studies, if the corresponding additional AUG codon acts as a start codon, leading to the translation of an elongated middle hepatitis B surface protein (MHBs) and/or if its translation may interfere with the translation of the regular MHBs coded for downstream [23].

Some previous studies have addressed the simultaneous presence of serum HBsAg and anti-HBs in chronic hepatitis B patients, with rates varying from 3–6% in South Korea [6,24] to 21% in Singapore [5], 24–32% in the United States [3,4] and 36% in The Netherlands [2]. In this study, the individuals showing concurrent HBsAg and anti-HBs represented 40% of all HBV carriers, with a 95% confidence interval of 30–51%. The reason why such a high proportion was observed in the Angolan population remains unclear. Deletions varying in length from 1 to 18 aminoacids were shown in the pre-S region of six isolates

**Table 4.** HBeAg/anti-HBe status, viral load and precore/core mutations of Angolan subjects (completely sequenced HBV isolates).

Samples	HBeAg/antiHBe status	Viral load (log copies/ml)	Mutations	
			Basal core promoter	Precore
<i>Concurrent HBsAg and anti-HBs</i>				
LDA072	Pos/Neg	6.37	–	G1896A
LDA265	Pos/Neg	6.24	A1762T/G1764A	–
LDA277	Pos/Neg	8.25	–	–
LDA278	Neg/Neg	5.33	–	–
LDA423	Neg/Pos	4.46	A1762T/G1764A	G1896A, G1899A
<i>HBsAg without anti-HBs</i>				
LDA154	Pos/Neg	9.50	–	–
LDA173	Pos/Neg	7.45	–	–
LDA274	Neg/Pos	4.49	–	G1896A, G1899A
LDA379	Pos/Neg	8.71	–	–
LDA386	Pos/Neg	8.90	–	–
LDA399	Neg/Pos	4.52	A1762/G1764A	–
LDA417	Neg/Pos	5.04	–	G1896A
LDA439	Pos/Neg	7.40	–	–
LDA445	Pos/Neg	5.11	–	–
LDA405	Neg/Neg	5.01	–	–
LDA504	Pos/Neg	4.30	–	–

doi:10.1371/journal.pone.0092223.t004

(Table 2). Deletions located between aa residues 19 and 22 in the pre-S2 region, detected in four strains, had already been described in HBV/E isolates from Benin, Cameroon, DRC, Mali, Nigeria and Togo [19]. Interestingly, all five deletions detected in samples with concurrent HBsAg and anti-HBs were found to disrupt viral epitopes recognized by T- or B-cells, whereas the sixth one, observed in an isolate infecting an anti-HBs negative individual, did not. The simultaneous detection of surface antigens and antibodies may be correlated to the disruption of epitopes in large S and middle S proteins, which could diminish or even completely abolish the recognition of the modified HBsAg by the antibodies of the infected subjects [21,22]. Here, substitutions (notably R34K in the pre-S1- and R16K and R18K in the pre-S2 region) were noted which were only present in samples with concurrent HBsAg and anti-HBs and may be responsible for this phenotype. Further studies are warranted to determine whether the high proportion (40%) of individuals with concurrent HBsAg/anti-HBs found

among Angolan subjects is related to their clinical status (asymptomatic carriers), to the fact that Angola is an area of hyperendemicity for HBV infection, or to any other reason.

Although described for the first time two decades ago [12], HBV genotype E has not been studied as extensively as other genotypes, due to its spreading be mainly restricted to Africa. While genotype A dominates in Eastern and South-Eastern Africa, HBV/E is the predominant genotype in the West African crescent that extends from Senegal to Namibia [20,25,26], as well as in CAR [27], DRC [19] and Madagascar [28]. Out of Africa, HBV/E isolates have been identified in Brazil [29,30], Argentina [31], Colombia [18], the Caribbean island of Martinique [32], Haiti [33], France [34,35], and Belgium [36]. All cases were related to the migration of African people to other continents. Additionally, three HBV/E isolates derived from native Belgian persons have also been described [37]. The fact that only few HBV/E isolates have been identified in the Americas is compatible with a relatively

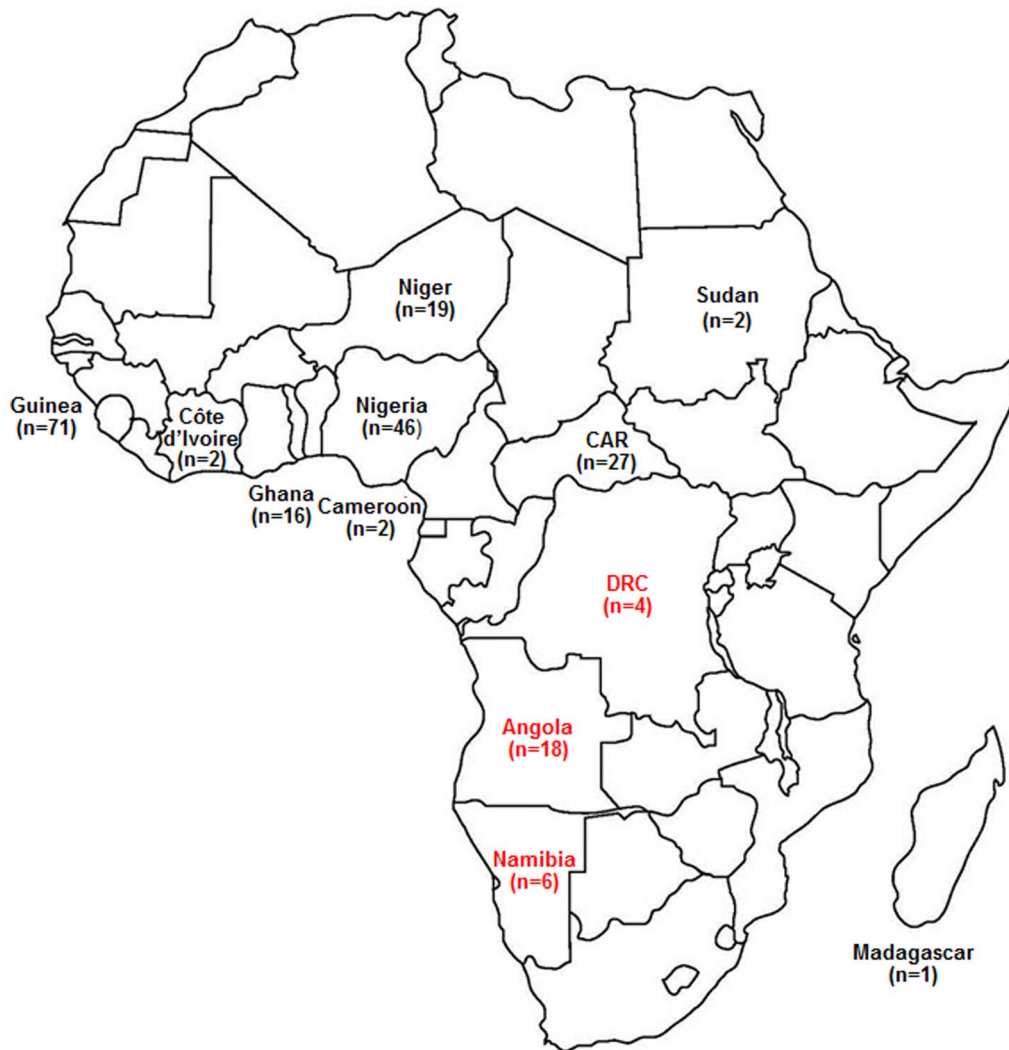
**Table 5.** Frequencies of atypical amino acids in HBV/E isolates from different African countries.

Amino acid/Position	Protein	Frequency in isolates from		P value
		Angola, Namibia and DRC <sup>a</sup>	Other African countries <sup>b</sup>	
Ile57	Small S	27/28 (96%)	12/185 (6%)	<0.0001
His177	Polymerase	22/28 (79%)	0/185 (0%)	<0.0001
Trp245	Polymerase	22/28 (79%)	13/185 (7%)	<0.0001
Leu612	Polymerase	24/28 (86%)	22/185 (12%)	<0.0001
Leu30	X	24/28 (86%)	1/185 (1%)	<0.0001

<sup>a</sup>Democratic Republic of Congo.<sup>b</sup>Cameroon, Central African Republic, Côte d'Ivoire, Ghana, Guinea, Madagascar, Niger, Nigeria and Sudan.

doi:10.1371/journal.pone.0092223.t005





**Figure 2. Distribution by country of the African HBV/E isolates completely sequenced.** Numbers in parentheses represent the number of full-length sequenced strains. Isolates that belong to the Southwest African lineage are in red while the others are in black. The two types of isolates were not found circulating together in any country. CAR = Central African Republic. DRC = Democratic Republic of Congo. doi:10.1371/journal.pone.0092223.g002

#### PCR Amplification and Calculation of the Viral Load

HBV DNA was extracted from 0.2 ml of serum sample using *High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Quantification of HBV DNA was performed by using TaqMan real-time PCR technology, as described previously [41]. The detection limit of the assay was 10 copies/reaction, corresponding to about 100 copies/ml of serum. The whole genomes of 16 HBV/E isolates were successfully amplified by using a previously described method [42]. The 19 remaining HBV/E samples had their pre-S/S region amplified by nested PCR as described in a previous report [20].

#### Nucleotide Sequencing

Nucleotide sequences of full-length HBV genomes were determined by direct sequencing using the *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) and a set of specific HBV primers [43]. Sequencing reactions were analyzed on an ABI 3730 automated sequencer (Applied Biosystems). The nucleotide sequences have been deposited in the GenBank

database (accession numbers HM195104, HM195106, HM195107, HM195109, HM195112, and KF849713 to KF849737).

#### Phylogenetic analysis

Multiple sequence alignment was performed by using Clustal X program [44] with 231 complete HBV/E sequences available in GenBank (see list and origin of the sequences in Table S1). Phylogenetic analysis was carried out (i) using the maximum likelihood method (bootstrap resampling test with 1,000 replicates) in MEGA version 5.1 software and (ii) by Bayesian Inference using the Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) statistical framework implemented in the BEAST v1.7.4 package [45] under the model of nucleotide substitution GTR+ $\Gamma$ +I which was selected as the best-fit model by the jModeltest program [46]. MCMC analysis was run for  $1 \times 10^8$  generations to achieve the convergence of parameters, which was assessed after 25% burn-in and calculation of Effective Sample Size (ESS) using TRACER v1.5

[47]. All parameters estimates showed ESS values >200 and their uncertainties were reflected in the 95% Highest Posterior Density intervals. The maximum clade credibility was visualized with FigTree v1.3.1 program [48] after the posterior tree distribution had been summarized using the TreeAnnotator v.1.7.4 program.

## Supporting Information

**Table S1 Nucleotide sequences used in this work.** List of the HBV genotype E complete nucleotide sequences (GenBank accession numbers), classified by country, used to construct the phylogenetic trees. The following criteria were used to include the sequences in the phylogenetic studies: non recombinant human

isolates from known country whose nucleotide sequences have been totally determined and did not show any insertion. (DOCX)

## Acknowledgments

The authors thank Gonzalo J.B. Bentecor for valuable comments and the DNA Sequencing Platform PDTIS/FIOCRUZ for performing nucleotide sequencing.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SAG. Performed the experiments: BVL FSR. Analyzed the data: BVL FCM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CCS FCM FV. Wrote the paper: BVL CN SAG.

## References

- World Health Organization website. Available: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscslyo20022/en/index1.html>. Accessed 2014 Feb 21.
- Heijink RA, van Hattum J, Schalm SW, Masurel N (1982) Co-occurrence of HBsAg and anti-HBs: two consecutive infections or a sign of advanced chronic liver disease? *J Med Virol* 10: 83–90.
- Shiels MT, Taswell HF, Czaja AJ, Nelson C, Swenke P (1987) Frequency and significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody in acute and chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 93: 675–680.
- Tsang TK, Blei AT, O'Reilly DJ, Decker R (1986) Clinical significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody positivity. *Dig Dis Sci* 31: 620–624.
- Wang YM, Ng WC, Kang JY, Yap I, Siet BL, et al. (1996) Serological profiles of hepatitis B carrier patients in Singapore with special reference to the frequency and significance of concurrent presence of HBsAg and anti-HBs. *Singapore Med J* 37: 150–152.
- Jang JS, Kim HS, Kim HJ, Shin WG, Kim KH, et al. (2009) Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 81: 1531–1538.
- Wang YM, Ng WC, Lo SK (1999) Detection of pre-S/S gene mutants in chronic hepatitis B carriers with concurrent hepatitis B surface antibody and hepatitis B surface antigen. *J Gastroenterol* 34: 600–606.
- Lada O, Benhamou Y, Poynard T, Thibault V (2006) Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of “a” determinant variants. *J Virol* 80: 2968–2975.
- Margeridon S, Lachaux A, Trepo C, Zoulim F, Kay A (2005) A quasi-monoclonal anti-HBs response can lead to immune escape of ‘wild-type’ hepatitis B virus. *J Gen Virol* 86: 1687–1693.
- Kramvis A, Kew MC (2007) Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatol Res* 37(s1): S9–S19.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO (2002) Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 83: 2059–2073.
- Norder H, Couroucé AM, Magnius LO (1994) Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198: 489–503.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, et al. (1988) Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69: 2575–2583.
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, et al. (2000) A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 81: 67–74.
- Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, et al. (2008) Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 80: 27–46.
- Olinger CM, Venard V, Njayou M, Oyefolu AO, Maïga I, et al. (2006) Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol* 87: 1163–1173.
- Andernach IE, Hübschen JM, Muller CP (2009) Hepatitis B virus: the genotype E puzzle. *Rev Med Virol* 19: 231–240.
- Alvarado Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Carrilho EJ, et al. (2010) Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. *J Gen Virol* 91: 501–508.
- Mulders MN, Venard V, Njayou M, Edoth AP, Bola Oyefolu AO, et al. (2004) Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis* 190: 400–408.
- Valente F, Lago BV, Castro CA, Almeida AJ, Gomes AS, et al. (2010) Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda, Angola. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 970–977.
- Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, et al. (2006) High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 130: 1153–1168.
- Zhang D, Dong P, Zhang K, Deng L, Bach C, et al. (2012) Whole genome HBV deletion profiles and the accumulation of preS deletion mutant during antiviral treatment. *BMC Microbiol* 12: 307.
- Kramvis A, Restorp K, Norder H, Botha JF, Magnius LO, et al. (2005) Full genome analysis of hepatitis B virus genotype E strains from South-Western Africa and Madagascar reveals low genetic variability. *J Med Virol* 77: 47–52.
- Lee BS, Cho YK, Jeong SH, Lee JH, Lee D (2013) Nationwide seroepidemiology of hepatitis B virus infection in South Korea in 2009 emphasizes the coexistence of HBsAg and anti-HBs. *J Med Virol* 85: 1327–1333.
- Fujiwara K, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Kato T, et al. (2005) Distribution of HBV genotypes among HBV carriers in Benin: phylogenetic analysis and virological characteristics of HBV genotype E. *World J Gastroenterol* 11: 6410–6415.
- Odemuyiwa SO, Mulders MN, Oyedele OI, Ola SO, Odaibo GN, et al. (2001) Phylogenetic analysis of new hepatitis B virus isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol* 65: 463–469.
- Bekondi C, Olinger CM, Boua N, Talarmin A, Muller CP, et al. (2007) Central African Republic is part of the West-African hepatitis B virus genotype E crescent. *J Clin Virol* 40: 31–37.
- Dupinay T, Restorp K, Leutscher P, Rousset D, Chemin I, et al. (2010) High prevalence of hepatitis B virus genotype E in Northern Madagascar indicates a West-African lineage. *J Med Virol* 82: 1515–1526.
- Motta-Castro AR, Martins RM, Araujo NM, Niel C, Facholi GB, et al. (2008) Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. *Arch Virol* 153: 2197–2205.
- Sitnik R, Sette H Jr, Santana RA, Menezes LC, Graça CH, et al. (2007) Hepatitis B virus genotype E detected in Brazil in an African patient who is a frequent traveler. *Braz J Med Biol Res* 40: 1689–1692.
- Mathet VL, Cuestas ML, Ruiz V, Minassian ML, Rivero C, et al. (2006) Detection of hepatitis B virus (HBV) genotype E carried—even in the presence of high titers of anti-HBs antibodies—by an Argentinean patient of African descent who had received vaccination against HBV. *J Clin Microbiol* 44: 3435–3439.
- Brichler S, Lagathu G, Chekaraou MA, Le Gal F, Edouard A, et al. (2013) African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J Gen Virol* 94: 2318–2329.
- Andernach IE, Nolte C, Pape JW, Muller CP (2009) Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerg Infect Dis* 15: 1222–1228.
- Ganne-Carrié N, Williams V, Kaddouri H, Trinchet JC, Dziri-Mendil S (2006) Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). *J Med Virol* 78: 335–340.
- Martel N, Gomes SA, Chemin I, Trépo C, Kay A (2013) Improved rolling circle amplification (RCA) of hepatitis B virus (HBV) relaxed-circular serum DNA (RC-DNA). *J Virol Methods* 193: 653–659.
- Pourkarim MR, Lemey P, Amini-Bavil-Olyae S, Houspie L, Verbeeck J, et al. (2011) Molecular characterization of hepatitis B virus strains circulating in Belgian patients co-infected with HIV and HBV: Overt and occult infection. *J Med Virol* 83: 1876–1884.
- Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Verbeeck J, Lemey P, Zeller M, et al. (2010) Molecular evolutionary analysis and mutational pattern of full-length genomes of hepatitis B virus isolated from Belgian patients with different clinical manifestations. *J Med Virol* 82: 379–389.
- Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanya D, et al. (2005) A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 86: 2047–2056.
- Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Lemey P, Maes P, Van Ranst M (2010) Are hepatitis B virus “subgenotypes” defined accurately? *J Clin Virol* 47: 356–360.

40. Hübschen JM, Andernach IE, Muller CP (2008) Hepatitis B virus genotype E variability in Africa. *J Clin Virol* 43: 376–380.
41. Bottecchia M, Ikuta N, Niel C, Araujo NM, O KM, et al. (2008) Lamivudine resistance and other mutations in the polymerase and surface antigen genes of hepatitis B virus associated with a fatal hepatic failure case. *J Gastroenterol Hepatol* 23: 67–72.
42. Günther S, Li BC, Miska S, Krüger DH, Meisel H, et al. (1995) A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 69: 5437–5444.
43. Bottecchia M, Souto FJ, O KM, Amendola M, Brandão CE, et al. (2008) Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. *BMC Microbiol* 8: 11.
44. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882.
45. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29: 1969–1973.
46. Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253–1256.
47. Rambaut A, Drummond AJ (2007) TRACER version 1.5. Available: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
48. Rambaut A (2009) FigTree v1.3.1: Tree Figure Drawing Tool. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.



## Artigo 2:

### Breve contextualização e metas alcançadas

Diante dos achados do primeiro estudo, partimos na busca da identidade genética do HBV/A1, principal genótipo circulante no Brasil, supostamente de origem Africana. Ao contrário do HBV/E, o HBV/A apresenta uma longa história evolutiva no continente africano, a partir de onde se diferenciou em sete subgenótipos e se disseminou para diversas regiões mundiais.(Hannoun *et al.*, 2005; Kramvis &Paraskevis, 2013). Dentre seus subgenótipos, o HBV/A1 teria sido intruduzido no Brasil durante os quase quatro séculos de tráfico de escravos. Desse modo, podemos concluir que o HBV/A1 estava presente em pelo menos uma das regiões africanas de onde vieram os cativos. É conhecido também que o HBV/A1 se divide em dois clados: Um clado nomeado “A1-Ásia” (Hannoun *et al.*, 2005; Makondo *et al.* , 2012; Gopalakrishnan *et al.* , 2013), composto por sequencias da Índia, outros países asiáticos e Somália, e o clado “A1-Africa”, composto por amostras das demais regiões africanas. Através do uso de ferramentas filogenéticas e filogeográficas, de que regiões do continente africano teriam vindo os isolados HBV/A1 para o Brasil? Seria possível vislumbrar as principais rotas do tráfico de escravos responsáveis pela disseminação do HBV/A1?

### Metas alcançadas

- Caracterização molecular e filogenética dos isolados do HBV/A de 8 estados brasileiros: Identificação de assinaturas moleculares características do HBV/A1 circulante na população brasileira.
- Comparação dos isolados brasileiros com outras sequências disponíveis no GenBank e investigação de similaridades genéticas entre isolados brasileiros e de outras regiões mundiais
- Investigação da origem, rotas de disseminação e tempo do ancestral comum mais recente (tmrca) do HBV/A1 entre África e Brasil

- Correlação dos achados científicos com as relações históricas entre África e Brasil que contribuíram para a composição étnica da população brasileira.



# Hepatitis B Virus Subgenotype A1: Evolutionary Relationships between Brazilian, African and Asian Isolates

Bárbara V. Lago<sup>1</sup>, Francisco C. Mello<sup>1</sup>, Anna Kramvis<sup>2</sup>, Christian Niel<sup>1</sup>, Selma A. Gomes<sup>1\*</sup>

**1** Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **2** Hepatitis Virus Diversity Research Programme, Department of Internal Medicine, School of Clinical Medicine, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa

## Abstract

Brazil is a country of low hepatitis B virus (HBV) endemicity in which the genotype A of HBV (HBV/A) is the most prevalent. The complete nucleotide sequences of 26 HBV/A isolates, originating from eight Brazilian states, were determined. All were *adw2*. Twenty-three belonged to subgenotype A1 and three to A2. By phylogenetic analysis, it was shown that all the 23 HBV/A1 isolates clustered together with isolates from Bangladesh, India, Japan, Nepal, the Philippines and United Arab Emirates, but not with those of Congo, Kenya, Malawi, Rwanda, South Africa, Tanzania, Uganda and Zimbabwe. Four amino acid residues in the polymerase (His138 in the terminal protein domain, Pro18 and His90 in the spacer, and Ser109 in the reverse transcriptase), and one (Phe17) in the precore region, predominated in Latin American and Asian HBV/A1 isolates, but were rarely encountered in African isolates, with the exception of those from Somalia. Specific variations of two adjacent amino acids in the C-terminal domain of the HBx protein, namely Ala146 and Pro147, were found in all the Brazilian, but rarely in the other HBV/A1 isolates. By Bayesian analysis, the existence of an 'Asian-American' clade within subgenotype A1 was supported by a posterior probability value of 0.996. The close relatedness of the Brazilian, Asian and Somalian isolates suggests that the HBV/A1 strains predominant in Brazil did not originate from the five million slaves who were imported from Central and Western Africa from 1551 to 1840, but rather from the 300–400,000 captives forcibly removed from southeast Africa at the middle of the 19<sup>th</sup> century.

**Citation:** Lago BV, Mello FC, Kramvis A, Niel C, Gomes SA (2014) Hepatitis B Virus Subgenotype A1: Evolutionary Relationships between Brazilian, African and Asian Isolates. PLoS ONE 9(8): e105317. doi:10.1371/journal.pone.0105317

**Editor:** Chiahoo Shih, Academia Sinica & National Defense Medical Center, Taiwan

**Received:** June 9, 2014; **Accepted:** July 23, 2014; **Published:** August 14, 2014

**Copyright:** © 2014 Lago et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. The nucleotide sequences reported in the manuscript have been deposited in the GenBank database (accession numbers KJ854685 to KJ854710).

**Funding:** The authors have no support or funding to report.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: selma@ioc.fiocruz.br

## Introduction

Worldwide, more than 240 million people are chronically infected with hepatitis B virus (HBV) [1]. HBV prevalence, measured by the presence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the serum, varies from <1% to >10% depending on the geographic region, with the highest prevalence in sub-Saharan Africa and southeast Asia. Based on a genomic sequence divergence >7.5% over the entire DNA genome, HBV isolates have been classified into eight genotypes (HBV/A to H) [2]. Additionally, two genotypes (I and J) have been proposed [3,4]. Genotypes A–D and F are further divided into subgenotypes that show a sequence divergence of about 4% between them [2]. HBV genotypes and subgenotypes have distinct geographic distribution and may be responsible for differences in the natural history and clinical outcome of the infection [5–8].

Originally, genotype A was classified into two subgenotypes A1 and A2 [9–11]. Five additional subgenotypes, namely A3 [12,13], A4 and A5 [14], A6 [15], and A7 [16] have been identified in African individuals. Recently, an alternative classification was proposed in which the subgenotypes A3, A4, A5 and A7 are classified into the quasi-subgenotype A3, and subgenotype A6

renamed A4 [17,18]. Subgenotypes A1, A4 and quasi-subgenotype A3 are found mainly in Africa, whereas A2 prevails outside Africa. It was earlier proposed that genotype A has an African origin, with subgenotype A1 prevailing in sub-Saharan Africa and the Indian subcontinent, and A2, predominant in Europe and North America, having spread more than 500 years ago from Africa to Asia and Europe, respectively [12]. The African origin of subgenotype A1 was recently shown by phylogeographic analysis [19].

Brazil is a country of low HBV endemicity, with an estimated HBsAg prevalence of 0.25–0.50% in the general population [20], although higher prevalence rates (1.6–3.3%) have been found in the Amazon Basin [21,22]. Countrywide, genotype A is the most common, followed by genotypes D and F [23]. Genotype A is predominant in the northern, northeast and southeast regions [24] which together, account for 79% of the country's population. Within genotype A, subgenotype A1 has been found at a frequency about ten times higher than A2 [24–27]. It has been suggested that the circulation of HBV genotypes A, D, and F reflects the ancestral descent of the Brazilian population [23]. The origin of the Brazilian population can be traced from three main sources, namely the Amerindians, who are mainly HBV/F carriers

[28,29], the European colonizers, responsible for the entry of genotypes A2 and D into Latin America [30,31], and the African slaves, who would have been carriers of HBV/A1 when they arrived in Brazil between the 16<sup>th</sup> and the 19<sup>th</sup> century. The proposal that subgenotype A1 was introduced into Brazil by the arrival of slaves [23,24] has been reinforced by the observations that (i) HBV/A1 is almost the exclusive subgenotype found in semi-isolated Afro-descendant communities [32–34], and (ii) Blacks and Mulattos (mixed descent) are more frequently infected with subgenotype A1 than caucasians, whereas the contrary is true for genotype D [30].

Geographically, subgenotype A1 is found in three ecoregions: Africotropic, Indo-Malay and Neotropic. When the complete genomes of HBV strains from Africa were compared to those outside Africa, with the exception of the Somalian strains, the majority of African sequences clustered separately from the Asian/American sequences, thus suggesting that subgenotype A1 was dispersed outside Africa by the slave and trade routes of the 15<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> centuries [19]. Brazil is the country that received more than five million of the 12 million slaves, forcibly removed from Africa, and was the last country to ban the Atlantic slave trade in the second half of the 19<sup>th</sup> century. The aim of this study was to use phylogenetic and phylogeographic analyses of complete sequences of HBV in order to shed light on the origins of subgenotype A1 in Brazil.

## Materials and Methods

### Ethics statement

The human blood samples from the present study were collected in several hepatitis reference centers located in different regions of Brazil. The study was approved by the Brazilian Ethics Committee for Medical Research (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP registration number 9604/2004). All the participants knew to be HBV chronic carriers and gave their written consent to participate to the study. Consent forms were recorded in the reference centers and kept separately from questionnaires. The names of the patients could not be linked to any study data collected.

### HBV samples

The 26 HBV isolates genetically characterized in this study were derived from blood donors (n = 13), patients with acute (n = 5) or chronic (n = 5) hepatitis B, and men who have sex with men (n = 3). The samples, which originated from eight Brazilian states, namely Amapá (n = 2), Amazonas (n = 3), Goiás (n = 1), Mato Grosso do Sul (n = 3), Pernambuco (n = 6), Rio de Janeiro (n = 6), Santa Catarina (n = 2) and São Paulo (n = 3), had been previously shown to belong to genotype A by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis [23,24].

### Viral DNA extraction and PCR amplification

HBV DNA was extracted from 200  $\mu$ l of serum sample using *High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The HBV whole genome was PCR amplified according to a previously published method using oligonucleotide primers P1 and P2 [35]. These primers have been designed at the 5' and 3' ends of the viral minus-strand DNA that exhibit a 9-nucleotide-long terminal redundancy.

### Nucleotide sequencing

After 0.8% agarose gel electrophoresis, PCR products were purified by using the *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Fitchburg, WI). Nucleotide sequences of full-length HBV genomes were determined by direct sequencing using the *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) and a set of eight sense and eight antisense specific primers distributed along the HBV genome [36]. Sequencing reactions were analyzed on an ABI 3730 automated sequencer (Applied Biosystems). The nucleotide sequences have been deposited in the GenBank database (accession numbers KJ854685 to KJ854710).

### Phylogenetic analysis

Multiple sequence alignment was performed by using Clustal X program with 151 HBV/A complete nucleotide sequences including the 26 sequences determined in this study, 111 HBV/A1 sequences available in the GenBank database originating from 20 countries (Argentina [n = 3], Bangladesh [n = 2], Colombia [n = 4], Congo [n = 1], France [n = 1], Haiti [n = 34], India [n = 7], Japan [n = 2], Kenya [n = 4], Malawi [n = 2], Martinique [n = 6], Nepal [n = 2], the Philippines [n = 7], Rwanda [n = 7], Somalia [n = 7], South Africa [n = 18], Tanzania [n = 1], Uganda [n = 1], United Arab Emirates [n = 1] and Zimbabwe [n = 1]), and 14 A2–A4 previously determined sequences which were used as an outgroup. The list of the GenBank accession numbers of the sequences, along with their subgenotypes and countries of origin, is shown in Table S1. Phylogenetic analysis was carried out using the maximum likelihood method (bootstrap resampling test with 1,000 replicates) in MEGA version 5.1 software.

### Bayesian Inference of migration events

In order to investigate the HBV/A1 migratory patterns and starting points of diversification, Bayesian phylogenetic analysis was conducted using Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulation implemented in BEAST v1.7.4 [37]. Differently from the other experiments, not all HBV/A1 isolates from Brazil (n = 23), Haiti (n = 34) and South Africa (n = 18) were included in the phylogeographic analysis. This was done to avoid over-representation of these countries, which might bias the ancestral location estimates. When two or more isolates from one of these countries shared >99% homology to each other, only one sequence was included in the analysis. The remaining HBV/A1 isolates (n = 101) were classified into eight geographic regions to establish the more plausible routes of dissemination: Antilles (Haiti, Martinique), Hispanic America (Argentina, Colombia), Brazil, Asia (Bangladesh, India, Japan, Nepal, the Philippines, United Arab Emirates), Europe (France), Somalia, South Africa, and other Sub-Saharan countries (Congo, Kenya, Malawi, Rwanda, Tanzania, Uganda, Zimbabwe). Bayesian trees were calibrated using six different, previously published evolutionary rates between  $2.2 \times 10^{-6}$  and  $7.7 \times 10^{-4}$  substitutions/site/year (s/s/y) [38–42]. The time of the most recent common ancestor (tMRCA) of internal nodes was estimated under an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock model. MCMC was run for  $60 \times 10^6$  generations using a general time reversible with gamma distributed rate heterogeneity and estimated proportion of invariable sites (GTR+G+I) substitution model (BEAST version 1.7.4), with a burn-in of 15%. The convergence of the Markov chain (estimated sum of squares >200) was assessed using Tracer version 1.5. The consensus tree was estimated by the TreeAnnotator programme v1.6.1. [37].

## Results and Discussion

### Geographic distribution of HBV subgenotypes A1 and A2 in Brazil

The complete genomes of 26 HBV/A isolates, originating from eight Brazilian states, were successfully amplified and sequenced. To our knowledge, these represented the first Brazilian HBV/A isolates to be fully sequenced. All isolates had a genome size of 3,221 nucleotides. Deduced amino acid sequences of the small S protein of all isolates showed Lys, Pro and Lys residues at positions 122, 127 and 160, respectively, corresponding to the *adw2* serological subtype. By phylogenetic analysis (see below), it was found that 23 isolates belonged to subgenotype A1 and three to subgenotype A2. In six states (Amapá, Amazonas, Goiás, Mato Grosso, Pernambuco and Rio de Janeiro), all the isolates under study belonged to subgenotype A1. The three A2 isolates were from the southern states, Santa Catarina (two samples) and São Paulo (one sample). São Paulo was the only state where both subgenotypes A1 and A2 were identified.

Based on PCR-RFLP and partial nucleotide sequencing, subgenotypes A1 and A2 have previously been identified in Brazil [24–27,30,43,44]. No HBV isolate belonging to quasi-subgenotype A3 and subgenotype A4 has been identified in Brazil. Figure 1 shows the geographic distribution of all the HBV/A isolates identified in Brazil to date, including the 26 characterized in this study. Data were available for 13 of the 26 Brazilian states. Although in all states, the frequency of subgenotype A1 was higher than that of A2, the ratio of A1:A2 was >14 in the northern states of Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Pernambuco and Rondônia, whereas it was <5 in the southern states of Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina and São Paulo (Fig. 1).

The proportion of European descendants, mainly Portuguese, Italian, Spanish, German and Polish, is higher in southern Brazil compared to other parts of the country, where Black and Mulatto people are generally in the majority. Considering the geographic distribution of the two subgenotypes (A1 in Africa and A2 in Europe), the prevalence of A2 in the southern Brazil correlated with the European origin of the population. On the other hand, almost all HBV isolates were shown to belong to subgenotype A1 in three Afro-descendant communities living in relative isolation since the slavery period in the states of Maranhão [32], Goiás [33] and Mato Grosso do Sul [34] (data in parentheses on Fig. 1).

### All HBV/A1 Brazilian isolates cluster in the ‘Asian-American’ clade

Two distinct clades have been recognized into subgenotype A1. One clade is mainly ‘African’ and includes isolates from southern, eastern and central Africa, while the other, comprising isolates from Asia and Somalia, has been called ‘Asian’ [45–47] or ‘Afro-Asian’ [48]. Recently, the term ‘Asian-American’ has also been used to design this latter clade, based on phylogenetic analyses that included HBV/A1 isolates from Caribbean islands and a restricted number of South American strains [19,31]. The ‘Asian-American’ clade would have originated in the nineteenth century when African slaves were exported from Mozambique to Central and South America, the islands of the Indian Ocean, and India. As Brazil has been the main importer of slaves for a long period of time and the last nation to outlaw the slave trade, it was essential to perform genetic distance and phylogenetic analyses with a sufficient number of Brazilian HBV/A1 isolates to validate or not this hypothesis.

Table 1 shows the intragroup and intergroup mean divergences between HBV/A1 isolates from different geographical regions. Even though the 23 Brazilian strains were sampled from

geographically distinct regions of the country, their mean intragroup divergence was relatively low, 1.14 (95% CI 0.94–1.34). The other intragroup divergences were included between 1.14 and 2.07, similar to previous observations [19,49]. The mean intergroup divergence between Brazilian and non-Brazilian isolates ranged from 1.40 to 2.28, with the lowest divergence from isolates from the Antilles and the highest with African isolates. Intergroup mean divergences between Brazilian and Asian (1.69) or Somalian (1.60) isolates were markedly lower than those observed between Brazilian strains and isolates from South Africa (2.24) or other sub-Saharan countries (2.28), although the upper confidence limits of the Brazilian-Asian (1.93) and Brazilian-Somalian (1.89) divergences were slightly higher than the lower confidence limit (1.87) of the Brazilian-sub-Saharan divergence (small overlap; see Table 1).

Figure 2 shows a phylogenetic tree obtained by using the maximum-likelihood method, based on the complete nucleotide sequences of HBV/A1 isolates available in GenBank, the sequences from this work, and 14 sequences of A2–A4 isolates which were used as an outgroup. Markedly, all HBV/A1 isolates from Brazil (n = 23) and the Asian countries (Bangladesh, n = 2; India, n = 7; Japan, n = 2; Nepal, n = 2; Philippines, n = 7; United Arab Emirates, n = 1) clustered together, which corroborated the hypothesis of the ‘Asian-American’ clade (represented in green on Fig. 2). All the Colombian (n = 4), French (n = 1) and Martinican (n = 6) isolates, as well as 2/3 Argentinian, 31/34 Haitian and 5/7 Somalian isolates, were also present in this clade. On the other hand, all the isolates from seven sub-Saharan countries, namely Congo (n = 1), Kenya (n = 4), Malawi (n = 2), Rwanda (n = 7), Tanzania (n = 1), Uganda (n = 1) and Zimbabwe (n = 1), as well as 16/18 South African isolates, clustered into the other, ‘African’ clade, represented in blue.

Three Brazilian isolates clustered together in a branch containing A2–A4 isolates from other countries (Fig. 2). An analysis (not shown) using the blast algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) demonstrated that the three Brazilian isolates showed >99% sequence homology with HBV/A2 isolates from Russia, Poland and Belgium, and 94.8–96.1% homology with three A4 (formerly A6) isolates described previously [15], allowing their unambiguous classification into subgenotype A2.

### Amino acid variability among HBV/A1 isolates from different geographic regions

The deduced amino acid sequences of the polymerase, precore, surface antigen and X protein (HBx) of the 134 HBV/A1 isolates used to construct the phylogenetic tree (Fig. 2) were compared. The frequency of determined amino acid residues varied according to the geographical origin of the isolates. Table 2 shows the 10 positions where the most notable variations of frequency were observed. Four amino acids in the polymerase (His138 in the terminal protein domain, Pro18 and His90 in the spacer, and Ser109 in the reverse transcriptase domain), and one (Phe17) in the precore region, were found to be largely predominant (71–100%) in Latin America (Antilles, Brazil and Hispanic America) and Asia, but rarely encountered in Africa, except in Somalia. Specific variations of two adjacent amino acids in the C-terminal domain of the HBx protein, namely Ala146 and Pro147, were found in all the Brazilian, but rarely in the other HBV/A1 isolates. However, these two residues are part of the consensus amino acid sequences of (sub)genotypes A2 and B–H [50].

The different HBV genotypes and subgenotypes display specific amino acids and genome lengths variations. In the last years, the role of specific amino acid variations in the different HBV proteins



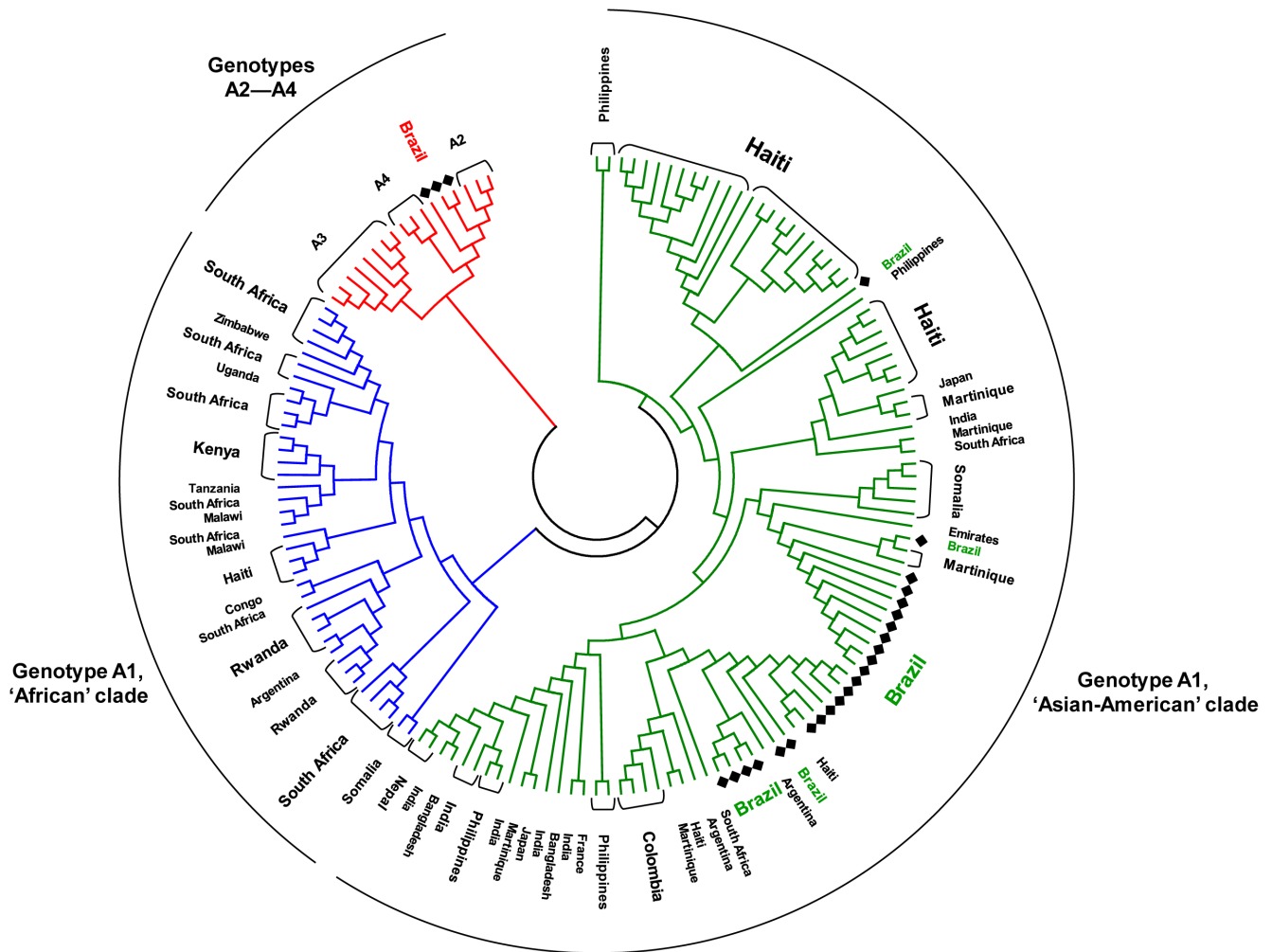
**Figure 1. Geographical distribution of HBV/A1 and A2 isolates in Brazil, including the 26 isolates characterized in this work.** Numbers indicate the ratios A1/A2. Numbers in parentheses refer to semi-isolated Afro-Brazilian communities which were established by the slave escapees during the 17<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> centuries. Data compiled from [24–27,30,43,44]. doi:10.1371/journal.pone.0105317.g001

**Table 1. Intragroup and intergroup mean divergences between HBV/A1 isolates from different geographic regions.**

Continent	Country/region (number of isolates)	(Intragroup divergence (95% CI)*)	Divergence with Brazilian isolates (95% CI)
Americas	Brazil (23)	1.14 (0.94–1.34)	-
	Antilles (40)	1.14 (0.96–1.32)	1.40 (1.16–1.64)
	Hispanic America (7)	1.91 (1.58–2.24)	1.91 (1.58–2.24)
Asia	Various (21)	1.71 (1.49–1.93)	1.69 (1.45–1.93)
Africa	Somalia (7)	1.36 (0.97–1.65)	1.60 (1.31–1.89)
	South Africa (18)	2.07 (1.80–2.34)	2.24 (1.89–2.59)
	Other sub-Saharan (17)	1.57 (1.33–1.81)	2.28 (1.87–2.69)
Europe	France (1)	-	1.71 (1.26–2.16)

\*CI, confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0105317.t001



**Figure 2. Phylogenetic analysis based on HBV complete nucleotide sequences.** The phylogenetic tree, performed by using the maximum likelihood method, incorporates 134 HBV/A1 isolates, including the 23 Brazilian isolates sequenced in this study. Subgenotype A1 strains separated into two clades, 'African' (blue) and 'Asian-American' (green). In addition, sequences of A2, quasi-subgenotype A3 and A4 samples were included as an outgroup (red), which allowed three Brazilian samples to be classified as subgenotype A2. The list of the GenBank accession numbers of the isolates with their subgenotypes and countries of origin is shown in Table S1. doi:10.1371/journal.pone.0105317.g002

has been extensively studied. These variations could affect virus antigenicity, HBeAg expression, replication rate, speed of disease progression, reliability of diagnostic methods and the success of antiviral therapy and immunization [51,52]. However, a review of the literature did not reveal a clinical significance or a shift of the replication rate for any of the 10 geographic region-specific mutations listed in Table 2.

### Phylogeographic analysis

Bayesian analysis was conducted to investigate the migratory patterns and starting points of diversification of HBV/A1. On the maximum clade credibility tree shown on Figure 3, HBV most probable dissemination routes are represented by different colours, corresponding to different parts of the world. It was confirmed that genotype A originated from Africa, as previously proposed [12]. Within subgenotype A1, the separation between the 'African' and 'Asian-American' clades was corroborated with a posterior probability value of 0.996. 'African' clade included all A1 isolates from sub-Saharan Africa (Congo, Kenya, Malawi, Rwanda, Tanzania, Uganda and Zimbabwe), all but one sequence from

South Africa, as well as a few isolates from Somalia and the Antilles (Haiti). All isolates from Asia (Bangladesh, India, Japan, Nepal, Philippines, United Arab Emirates), most of the isolates from Hispanic America, the Antilles and Somalia, as well as one sequence from South Africa, were located into the 'Asian-American' clade. Similarly to what was found by phylogenetic analysis (Fig. 2), all HBV/A1 Brazilian isolates clustered in the 'Asian-American' clade by Bayesian inference. The 'Asian-American' clade diverged from the 'African' clade moving toward Asia (pink colour on Fig. 3) and, from then, was divided into two subclades (I and II) with a posterior probability of 0.999. Subclade I acted as the source of infection for Asia, Brazil and the Hispanic America, with a single isolate going in the opposite direction, from Brazil to South Africa. Subclade II was composed of a monophyletic group formed by Somalian isolates plus a large group containing isolates from Asia (The Philippines), heading for the Antilles (Martinique and Haiti). One Brazilian isolate clustered together in the latter group, close to the Haitian isolates, with a posterior probability of 0.998.

**Table 2.** Frequencies of amino acid residues in the proteins of HBV/A1 isolates: Correlation with the geographic region.

Continent	Country/region	Polymerase										Precore			HBx	
		tp <sup>a</sup> 91	tp 138	spacer 18	spacer 90	rt <sup>b</sup> 109	rt 153	17	32	146	147					
America	Brazil	Ala (23/23)	His (23/23)	Pro (20/23)	His (22/23)	Ser (23/23)	Arg (13/23)	Phe (22/22)	Arg (15/22)	Ala (20/20)	Pro (21/21)					
	Antilles	Ser (30/39)	His (30/40)	Pro (33/38)	His (37/40)	Ser (37/40)	Trp (36/40)	Phe (35/40)	Arg (27/40)	Ser (36/38)	Ser (38/40)					
	Hispanic America	Ala (6/7)	His (5/7)	Pro (6/7)	His (6/7)	Ser (6/7)	Trp (5/7)	Phe (6/7)	Gly (6/7)	Ser (7/7)	Ser (7/7)					
Asia	Various <sup>c</sup>	Ala (14/21)	His (17/21)	Pro (19/21)	His (21/21)	Ser (21/21)	Trp (19/21)	Phe (19/21)	Arg (15/21)	Ser (17/20)	Ser (18/21)					
Africa	Somalia	Ile (4/7)	Gln (4/7)	Pro (5/7)	His (6/7)	Ser (6/7)	Trp (7/7)	Phe (6/7)	Gly (6/7)	Ser (6/7)	Ser (6/7)					
	South Africa	Ile (16/18)	Gln (16/18)	Ser (16/18)	Tyr (14/18)	Pro (14/18)	Trp (18/18)	Val (14/18)	Gly (15/18)	Ser (14/18)	Ser (12/18)					
Europe	Others <sup>d</sup>	Ile (17/17)	Gln (16/17)	Ser (17/17)	Tyr (17/17)	Pro (11/17)	Trp (17/17)	Val (16/17)	Gly (17/17)	Ser (12/16)	Ser (15/17)					
	France	Ile (1/1)	Gln (1/1)	Pro (1/1)	His (1/1)	Ser (1/1)	Trp (1/1)	Phe (1/1)	Arg (1/1)	Ser (1/1)	Ser (1/1)					

<sup>a</sup>tp, terminal protein domain;<sup>b</sup>rt, reverse transcriptase domain;<sup>c</sup>Bangladesh, India, Japan, Nepal, Philippines, United Arab Emirates;<sup>d</sup>Congo, Kenya, Malawi, Rwanda, Tanzania, Uganda, Zimbabwe.

doi:10.1371/journal.pone.0105317.t002

The tree represented on Figure 3 was constructed using the value of  $4.6 \times 10^{-5}$  s/s/y as the evolutionary rate [40]. Five additional trees were constructed by using previously published evolutionary rates [38,39,41,42] varying from  $2.2 \times 10^{-6}$  to  $7.7 \times 10^{-4}$ . All of them showed a very similar topology (not shown). The only notable difference was that Somalia substituted Asia as the origin of the 'Asian-American' branch in the tree constructed by using an evolutionary rate of  $1.4 \times 10^{-5}$  s/s/y [39]. Such a common ancestry of Somalian, Asian and Latin American HBV/A1 isolates might be explained by the Arab slave trade which was the practice of slavery in the Arab world, mainly in Western Asia, North Africa, Southeast Africa, the Horn of Africa and certain parts of Europe during the era of the Arab conquests [19].

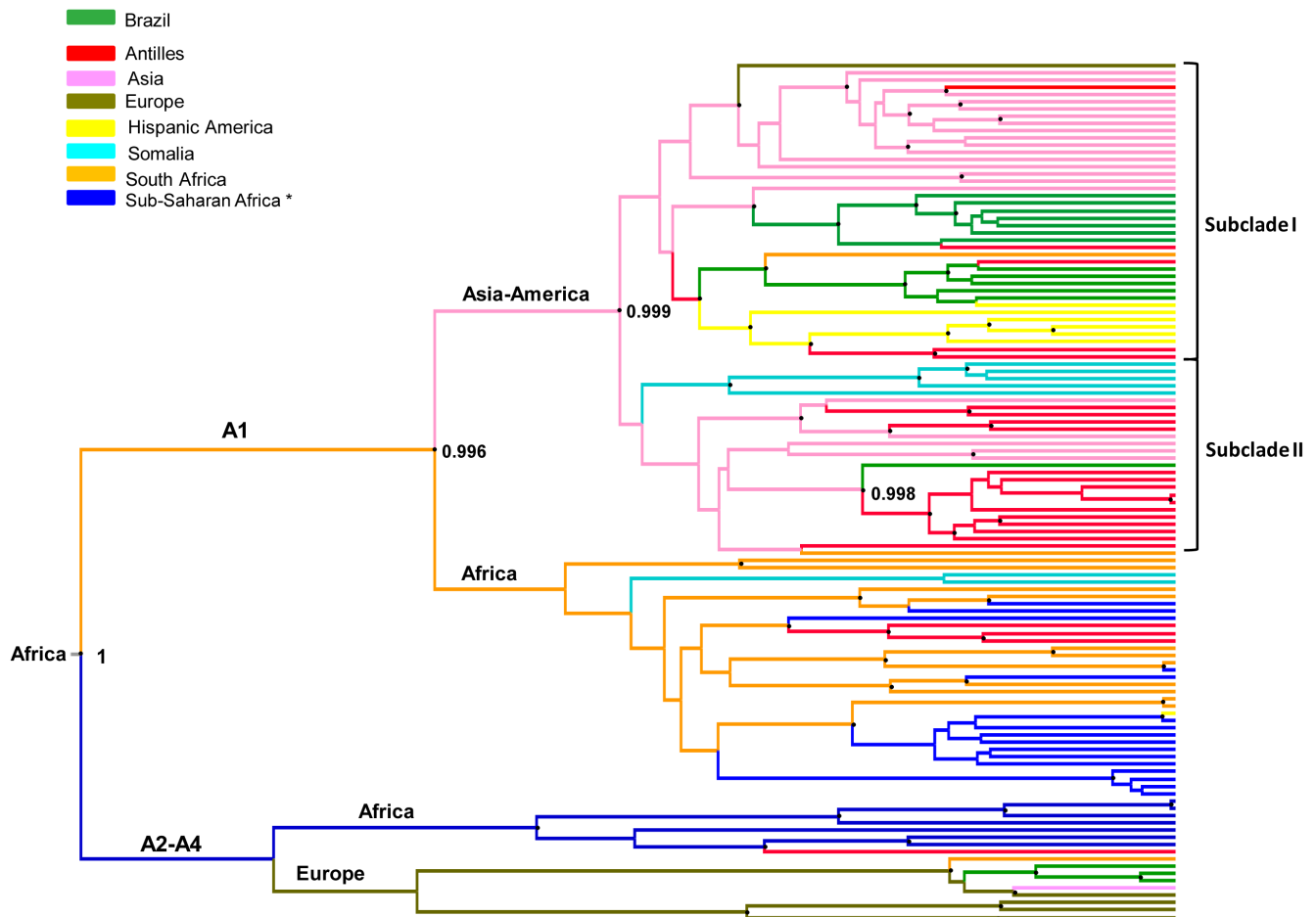
It is historically known that West Central Africa (Angola) and the Bight of Benin, in this order, were the major suppliers of slave labor to Brazil (4–5 million people; 16–19<sup>th</sup> century) [53]. However, an estimated number of 300–400,000 captives were brought from southeast Africa (Mozambique) between 1837 and 1856, circumventing the laws and treaties that prohibited the transatlantic slave trade [54]. A previous phylogeographic investigation of the Afro-descendant population of São Paulo, based on haplogroups of the Y chromosome and mitochondrial DNA, has reported that 87.6% of black Brazilians are descendants of people originated from central and western Africa, while 12.3% descended from southeast Africa [55]. Despite this low proportion, our findings using phylogeographic analysis of complete HBV genomes intimate that southeast Africa was the main source of HBV entry in Brazil, further corroborating the phylogeographic analysis done using only the S region and a limited number of Brazilian strains [19]. Studying the genetics of individuals infected with HBV/A1 could help in determining the origin of the human population infected by this genotype. Such a study, however, could have limitations due to (i) the time elapsed since the arrival in Brazil of slaves from the East African coast (160–180 years, 5–6 human generations) and (ii) the fact that the vast majority of these slaves were mixed immediately with the slaves from West Africa arrived before them, and mixed later with the general population.

Another possibility would be that HBV/A1 was brought from India to Brazil by Portuguese and Brazilian traders. However, this hypothesis does not explain the predominance of HBV/A1 in the Brazilian Black and Mulatto populations [30] and Afro-descendant communities [32–34].

It is noteworthy that genotype E, which is presently the predominant genotype in Angola [56,57], is rarely found in South America. The absence of the genotype E in Angola at the time of slavery and its relatively recent (last 150 years) dissemination in the Angolan population have thus been suggested [58,59]. By analogy, as all Brazilian A1 isolates belonged to the 'Asian-American', not 'African' clade, it is likely that HBV/A1 did not circulate, at least endemically, in western-central Africa, from where originated the great majority of the slaves between the 16<sup>th</sup> and the 19<sup>th</sup> century.

As Brazil is the country that received the largest number of slaves coming from different parts of Africa, it is striking that none of the 23 HBV/A1 isolates characterized in this work belonged to the 'African' clade. In Haiti, a country whose black population has very similar origins as Brazil, three out of 34 (9%) fully sequenced HBV/A1 isolates belonged to the 'African' clade (Fig. 2). The difference between the proportions of 'African' isolates in Brazil (0%) and Haiti (9%) was not statistically significant ( $p > 0.2$ ) and may be a result of sampling. In this case, it is possible that members of the 'African' clade do circulate in Brazil, at a relatively low rate, and sequencing of a large number of HBV isolates will reveal their presence.





**Figure 3. Bayesian maximum clade credibility tree of HBV/A full length nucleotide sequences.** A1 and A2-A4 represent HBV subgenotypes within genotype A. The numbers on the internal nodes represent posterior probabilities. All nodes marked with a dot showed posterior probability  $>0.95$ . The branch lengths are proportional to length of time. The names of the continents on the branches indicate the most plausible routes of dissemination. \*Sub-Saharan Africa refers to Congo, Kenya, Malawi, Rwanda, Tanzania, Uganda and Zimbabwe. doi:10.1371/journal.pone.0105317.g003

### HBV evolutionary rate

The evolutionary rate of HBV is presently unknown. As mentioned above, a number of studies have proposed evolutionary rates varying from  $2.2 \times 10^{-6}$  to  $7.7 \times 10^{-4}$  s/s/y, but no consensus has been reached. The tMRCAs for subgenotype A1 and the ‘Asian-American’ clade were calculated by using six different, previously proposed evolutionary rates [38–42]. It was deduced that values ranged between  $1 \times 10^{-5}$  and  $5 \times 10^{-5}$  s/s/y, which translated to tMRCAs of 500–800 and 400–700 years for HBV/A1 and ‘Asian-American clade, respectively, may correspond to the historical reality. In contrast, the extreme values of  $2.2 \times 10^{-6}$  and  $7.7 \times 10^{-4}$  s/s/y resulted in dating MRCAs at prehistoric times (Mesolithic) and in the 1970s–1980s, respectively (not shown).

In conclusion, the results reported here show that the Brazilian HBV/A1 isolates clustered together with Asian, rather than African isolates, confirming the existence of an ‘Asian-American’ clade within subgenotype A1, and provide insight into the spatial and temporal dynamics of HBV/A1. The close relatedness of the Brazilian, Asian and Somalian isolates suggests that the HBV/A1 strains predominant in Brazil did not originate from the five million slaves, who were imported from Central and Western Africa from 1551 to 1840, but rather from the 300–400,000

captives forcibly removed from southeast Africa at the middle of the 19<sup>th</sup> century.

### Supporting Information

**Table S1 Nucleotide sequences used in this work.** List of the 151 HBV complete nucleotide sequences (GenBank accession numbers), classified by country, used to construct the phylogenetic tree (Fig. 2). The following criteria were used to include the sequences in the phylogenetic studies: non recombinant human isolates from known country whose nucleotide sequences have been totally determined and did not show any insertion. (DOCX)

### Acknowledgments

The authors thank Dr Gonzalo Bello for help in the phylogeographic analysis and Drs Natalia M. Araujo, Ana R. Motta-Castro and Caroline C. Soares for valuable comments. BVL received a doctoral fellowship in the context of cooperation between the Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil, and the University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa. The DNA Sequencing Platform PDTIS/FIOCRUZ is acknowledged for performing nucleotide sequencing.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BVL FCM SAG. Performed the experiments: BVL. Analyzed the data: BVL FCM AK CN SAG. Contributed to the writing of the manuscript: AK CN.

## References

- WHO (2014) World Health Organization. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Accessed May 2014.
- Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, et al. (2008) Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 80: 27–46.
- Huy TT, Ngoc TT, Abe K (2008) New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol* 82: 5657–5663.
- Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, et al. (2009) A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol* 83: 10538–10547.
- Hadziyannis SJ (2011) Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African countries. *J Hepatol* 55: 183–191.
- Kramvis A, Kew MC (2005) Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat* 12: 456–464.
- Marciano S, Galdame OA, Gadano AC (2013) HBV genotype F: natural history and treatment. *Antivir Ther* 18: 485–488.
- Tanwar S, Dusheiko G (2012) Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis? *Curr Gastroenterol Rep* 14: 37–46.
- Bowyer SM, van Staden L, Kew MC, Sim JG (1997) A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. *J Gen Virol* 78: 1719–1729.
- Kramvis A, Weitzmann L, Owiredu WK, Kew MC (2002) Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol* 83: 835–839.
- Tanaka Y, Hasegawa I, Kato T, Orito E, Hirashima N, et al. (2004) A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology* 40: 747–755.
- Hannoun C, Söderström A, Norkrans G, Lindh M (2005) Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *J Gen Virol* 86: 2163–2167.
- Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanaya D, et al. (2005) A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 86: 2047–2056.
- Olinger CM, Venard V, Njayou M, Oyefolu AO, Maïga I, et al. (2006) Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol* 87: 1163–1173.
- Pourkarim MR, Lemey P, Amini-Bavil-Olyae S, Maes P, Van Ranst M (2010) Novel hepatitis B virus subgenotype A6 in African-Belgian patients. *J Clin Virol* 47: 93–96.
- Hübschen JM, Mbah PO, Forbi JC, Otegbayo JA, Olinger CM, et al. (2011) Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. *Clin Microbiol Infect* 17: 88–94.
- Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Lemey P, Maes P, Van Ranst M (2010) Are hepatitis B virus “subgenotypes” defined accurately? *J Clin Virol* 47: 356–360.
- Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Lemey P, Maes P, Van Ranst M (2011) HBV subgenotype misclassification expands quasisubgenotype A3. *Clin Microbiol Infect* 17: 947–949.
- Kramvis A, Paraskevis D (2013) Subgenotype A1 of HBV—tracing human migrations in and out of Africa. *Antivir Ther* 18: 513–521.
- Brazilian Ministry for Health (2010) Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Available at: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2010/50071/estudo\\_prevalencia\\_hepatites\\_pdf\\_26830.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2010/50071/estudo_prevalencia_hepatites_pdf_26830.pdf). Accessed May 2014.
- Arboleda M, Castilho MC, Fonseca JC, Albuquerque BC, Saboia RC, et al. (1995) Epidemiological aspects of hepatitis B and D virus infection in the northern region of Amazonas, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 481–483.
- Viana S, Paraná R, Moreira RC, Comprí AP, Macedo V (2005) High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 73: 808–814.
- Araujo NM, Mello FC, Yoshida CF, Niel C, Gomes SA (2004) High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of hepatitis B virus. *Arch Virol* 149: 1383–1395.
- Mello FC, Souto EJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, et al. (2007) Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 7: 103.
- Barros LM, Gomes-Gouvêa MS, Kramvis A, Mendes-Corrêa MC, dos Santos A, et al. (2014) High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. *Infect Genet Evol* 24: 68–75.
- Moura IF, Lopes EP, Alvarado-Mora MV, Pinho JR, Carrilho FJ (2013) Phylogenetic analysis and subgenotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. *Infect Genet Evol* 14: 195–199.
- Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Vieira DS, Pinho JR, et al. (2010) Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. *Virol J* 7: 315.
- Casey JL, Niro GA, Engle RE, Vega A, Gomez H, et al. (1996) Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis* 174: 920–926.
- Crispim MA, Fraiji NA, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MM, et al. (2014) Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infect Dis* 14: 94.
- Bertolini DA, Gomes-Gouvêa MS, Guedes de Carvalho-Mello IM, Saraceni CP, Simik R, et al. (2012) Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect Genet Evol* 12: 1295–1304.
- Brichler S, Lagathu G, Chekaraou MA, Le Gal F, Edouard A, et al. (2013) African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J Gen Virol* 94: 2318–2329.
- Alvarado-Mora MV, Botelho L, Gomes-Gouvêa MS, de Souza VF, Nascimento MC, et al. (2011) Detection of hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhão, Brazil. *Virol J* 8: 415.
- Matos MA, Reis NR, Kozłowski AG, Teles SA, Motta-Castro AR, et al. (2009) Epidemiological study of hepatitis A, B and C in the largest Afro-Brazilian isolated community. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 899–905.
- Motta-Castro AR, Martins RM, Araujo NM, Niel C, Facholi GB, et al. (2008) Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. *Arch Virol* 153: 2197–2205.
- Günther S, Li BC, Miska S, Krüger DH, Meisel H, et al. (1995) A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 69: 5437–5444.
- Bottecchia M, Souto EJ, do Ó KM, Amendola M, Brandão CE, et al. (2008) Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. *BMC Microbiol* 8: 11.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
- Hannoun C, Horal P, Lindh M (2000) Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. *J Gen Virol* 81: 75–83.
- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M (1987) Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* 57: 231–236.
- Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, et al. (1989) Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7059–7062.
- Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SY, Belshaw R, et al. (2013) Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology* 57: 908–916.
- Zhou Y, Homes EC (2007) Bayesian estimates of the evolutionary rate and age of hepatitis B virus. *J. Mol. Evol.* 65, 197–205.
- Freitas SZ, Soares CC, Tanaka TS, Lindenberg AS, Teles SA, et al. (2014) Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis B infection among HIV-infected patients in the State of Mato Grosso do Sul, Central Brazil. *Braz J Infect Dis.* doi:10.1016/j.bjid.2014.01.005.
- Souto EJ, Pirajá AC, da Silva GS, Bottecchia M, Gomes SA (2007) Lamivudina por tempo prolongado no tratamento da hepatite B crônica no Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 18–24.
- Gopalakrishnan D, Keyter M, Shenoy KT, Leena KB, Thayumanavan L, et al. (2013) Hepatitis B virus subgenotype A1 predominates in liver disease patients from Kerala, India. *World J Gastroenterol* 19: 9294–9306.
- Makondo E, Bell TG, Kramvis A (2012) Genotyping and molecular characterization of hepatitis B virus from human immunodeficiency virus-infected individuals in southern Africa. *PLoS One* 7: e46345.
- Ochwoto M, Chauhan R, Gopalakrishnan D, Chen CY, Ng'ang'a Z, et al. (2013) Genotyping and molecular characterization of hepatitis B virus in liver disease patients in Kenya. *Infect Genet Evol* 20: 103–110.
- Kwange SO, Budambula NL, Kiptoo MK, Okoth F, Ochwoto M, et al. (2013) Hepatitis B virus subgenotype A1, occurrence of subgenotype D4, and S gene mutations among voluntary blood donors in Kenya. *Virus Genes* 47: 448–455.
- Andermach IE, Nolte C, Pape JW, Muller CP (2009) Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerg Infect Dis* 15: 1222–1228.

50. Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Biswas A, Panigrahi R, et al. (2008) Analysis of hepatitis B virus X gene phylogeny, genetic variability and its impact on pathogenesis: implications in Eastern Indian HBV carriers. *Virology* 382: 190–198.
51. Kay A, Zoulim F (2007) Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 127: 164–176.
52. Lazarevic I (2014) Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances. *World J Gastroenterol.* 20: 7653–7664.
53. Eltis D, Richardson D (2010) Atlas of the transatlantic slave trade. New Haven and London: Yale University Press. 307 p.
54. Beachey RW (1976) The slave trade of eastern Africa. London: Rex Collings. 324 p.
55. Gonçalves VF, Carvalho CM, Bortolini MC, Bydlowski SP, Pena SD (2008) The phylogeography of African Brazilians. *Hum Hered* 65: 23–32.
56. Lago BV, Mello FC, Ribas FS, Valente F, Soares CC, et al. (2014) Analysis of complete nucleotide sequences of Angolan hepatitis B virus isolates reveals the existence of a separate lineage within genotype E. *PLoS One* 9: e92223.
57. Valente F, Lago BV, Castro CA, Almeida AJ, Gomes SA, et al. (2010) Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda, Angola. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 970–977.
58. Andernach IE, Hübschen JM, Muller CP (2009) Hepatitis B virus: the genotype E puzzle. *Rev Med Virol* 19: 231–240.
59. Andernach IE, Hunewald OE, Muller CP (2013) Bayesian inference of the evolution of HBV/E. *PLoS One* 8: e81690.

### Artigo 3:

#### Breve contextualização e metas alcançadas

O HBV/A tem sido descrito como um dos mais importantes genótipos do HBV, devido à sua dispersão na África e em países que mantiveram relações históricas com o continente africano, como Américas, Europa e subcontinente indiano. A falta de sistemas de cultura de células apropriados para a propagação viral do HBV tem sido uma grande limitação para compreender os seus mecanismos de replicação. As células imortais neoplásicas, como linhagens Huh7, vêm sendo utilizadas nesse propósito, uma vez que são mais fáceis de cultivar e possuem concentrações de enzimas estáveis quando comparadas com os hepatócitos.

A fim de proporcionar um modelo eficiente para reproduzir as condições *in vivo* da infecção pelo HBV, Günther et al. (1995) desenvolveram um método sem a utilização de vetor, que, através da amplificação e recircularização do genoma completo do HBV, permite a expressão de todos os genes. No entanto, a depender do genótipo e mutações existentes, nem todos os isolados de HBV apresentam a capacidade de replicar de forma competente e síntese de DNA de HBV intracelular é baixo (Villeneuve et al, 2003; Zhu et al, 2007, Cavallone, 2013)

Modelos utilizando vetores contendo mais de uma unidade de genoma do HBV foram desenvolvidos a fim de contornar uma consequente “quebra” dos genes do HBV devido à linearização do genoma viral, permitindo a expressão de todos os genes de HBV. Diante disso, nos propusemos a comparar os níveis de expressão de proteínas do HBV/A1 utilizando o método livre de vetor, descrito por Gunther e uma construção plasmidial contendo 1,28 do genoma do HBV, descrita por Bhoola e colaboradores (Bhoola, 2012).

#### Metas alcançadas:

- Construção do vetor de expressão contendo 1.28 unidades de genoma do HBV/A1 (1.28mer)

- Obtenção o genoma completo do HBV/A1 recircularizado em esquema vector-free para transfecção, conforme descrito por Gunther *et al.*, 1995
- Transfecção e comparação entre os níveis de expressão de proteínas entre os dois sistemas utilizados. Comparação das cargas virais no sobrenadante e extrato celular, da presença das proteínas Large-S (Pré-S1) e HBcAg intracelulares, além da expressão das proteínas HBsAg e HBeAg secretadas no sobrenadante celular.

Comparison of levels of HBV (subgenotype A1) antigens synthesis after transfection of Huh7 cells by HBV cccDNA and 1.28 mer HBV DNA construct

LAGO, B.V<sup>1</sup>., DEROUBAIX, A<sup>2</sup>. BHOOLA, N.H<sup>2</sup>., GOMES, S.A<sup>1</sup>., KRAMVIS, A<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Hepatitis Virus Diversity Research Programme, Department of Internal Medicine, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa

Subgenotype A1 of hepatitis B virus genotype A (HBV/A1) prevailing in Africa and in countries with migration history from Africa, including Brazil and India. HBV/A1 has unique molecular characteristics differentiating it from HBV/A2 prevailing in northern Europe and America. The objective of this study was to compare replication levels and HBsAg, HBcAg and HBeAg synthesis of HBV/A1 molecular clones following transfection with (i) purified HBV cccDNA after the Gunther vector-free method (Gunther, Li et al. 1995) and a 1.28 mer HBV DNA replication competent construct. Both HBV DNAs were under control of authentic endogenous HBV promoters and harbor HBV/A1 sequences representative of a consensus of this subgenotype. After transfection of Huh7 cells with both HBV DNAs constructs, the levels of replication and expression of HBsAg, HBcAg and HBeAg antigens were compared by different methods. Higher amounts of neo synthesized HBV DNA and of all HBV proteins were observed following transfection with the 1.28 mer compared with HBV cccDNA. These results demonstrate the importance of the development and comparison of alternative methodologies in order to optimize *in vitro* HBV replication that can mimic *in vivo* systems.

## Introduction

Hepatitis B virus (HBV), the prototype of the *Hepadnaviridae* family, causes human liver diseases, including acute and chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular

carcinoma (Brechot et al. 2000). Despite the existence of a vaccine for over thirty years and antiviral drugs therapies to control the infection, the World Health Organization estimates that there are 240 million chronic carriers worldwide (WHO, 2013)

HBV is one of the smallest DNA viruses infecting humans and possess approximately 3.2 kb in length. HBV DNA has four partially overlapping reading frames, pre-S/S, pre-C/C, P and X which allow the virus to produce 50% more proteins than would be predicted by the small genome size (Locarnini and Zoulim 2010). The four open reading frames of HBV are responsible for the synthesis of seven different products: The pre-C/C promoter controls transcription of several RNAs of about 3.5 kb. Among them, the called pgRNA is the template for the synthesis of the genomic DNA and the massager for synthesis of the core protein (HBcAg) and the DNA polymerase. Other 3.5 kb RNAs shaping the synthesis of HBeAg (Ganem and Varmus 1987).

The promoters, pre-S1 and pre-S2/S, controls the synthesis of surface proteins (HBsAg). The pre-S1 promoter controls the production of the large protein (L-HBsAg). The promoter pre-S2/S controls transcription of mRNAs promoting synthesis of the middle protein (M-HBsAg), while other mRNA originate the small protein (S-HBsAg). The promoter pre-S2/S is stronger than the pre-S1 promoter. This results in increased protein synthesis of M-HBsAg and S-HBsAg compared with production L-HBsAg protein (Heermann et al. 1984). The L-HBsAg possesses regulatory role for secretion of HBsAg thus its overexpression results in retention of HBsAg in the endoplasmic reticulum (Heermann et al. 1984; Pfaff et al. 1986; Dienes et al. 1990). X promoter controls transcription of a sole RNA which is translated into a protein with regulatory function (Wei et al. 2010).

At least eight HBV genotypes (A-H) are established, based on genomic nucleotide sequences of pre-S/S region or the complete viral genome (Okamoto et al. 1988; Norder et al. 1994; Stuyver et al. 2000; Arauz-Ruiz et al. 2002) Genotypes should

be distinguished from each other with at least 7.5% of divergence between them. Most of the genotypes have been subdivided into subgenotypes with at least 4.5% of divergence between them. HBV/A is an old HBV genotype (Paraskevis et al. 2013). and was initially divided into two subgroups (now named HBV/A1 and HBV/A2). It is believed that HBV/A1 had originated in African populations, is the oldest one and has several unique molecular characteristics that are important in clinical like a higher progression to cancer than HBV/A2 (Bowyer et al, 1997; Sugauch et al , 2003). HBV/A2 is related to European population (Kramvis et al, 2002; Araújo et al , 2004; Hannoun et al , 2005). Other HBV subgenotypes are HBV/A3, found in Cameroon (Kurbanov et al., 2005), Gambia (Hannoun et al, 2005) and Mali (Olinger et al., 2006) . The HBV/A4 and HBV/A5 were identified, respectively, in Mali and Nigeria (Hannoun et al, 2005 Olinger et al., 2006).

To date, there is no appropriate cell culture that allows an efficient HBV infection (Wang, et al. 1982). Only primary hepatocytes (Ren and Nassal 2001) and differentiated HepaRG cells, (Gripon, et al. 2002) can support the complete HBV life cycle, but working with primary hepatocytes or with HepaRG are difficult and their availability are limited.

Several different expression vectors were used to study HBV replication and protein synthesis usually under heterogeneous promoters. Plasmids that encode HBV sequences “more than one unit” of the genome may be used to study HBV production under natural promoters (Durantel et al. 2004; Jacquard et al. 2006; Warner and Locarnini 2008). The Gunther method (GM) using for transfection, PCR amplified full length HBV genoma from a cloned HBV full length template, is a very useful method to study HBV replication and protein synthesis (Gunther et al. 1995; Cavallone et al. 2013). However, it is know that intracellular HBV DNA synthesis is low by GM method (Cavallone et al., 2013, Durantel et al., 2004; Durantel et al., 2005). Recently, Cavallone and colleagues (2013) showed that previous recircularization by ligation and purification of



full length HBV DNA (cccDNA) improves the *in vitro* viral replication and viral replication competent HBsAg production when using GM. The objectives of this study was: (i) to construct a GM vector and a 1.28 mer vector both with endogenous HBV promoters, containing HBV sequences representative of a consensus of HBV/A1, (ii) to compare HBV DNA replication and HBV proteins expression levels generated by purified HBV cccDNA (GM) and by the 1.28 mer HBV DNA.

## 2. Materials and methods

### Construction of GM HBV expression plasmid

Two different HBV isolates previously characterized as belonging to HBV/A1 subgenotype were used for plasmid constructions. Briefly, HBV DNAs were extracted from 200 µL of serum of patients using *High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Generation of full length HBV DNA was obtained by PCR amplification of the serum extracted DNA with GM primers P1 (sense) nt 1821-1841, 5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTCATTTCTCTGCCTAATCA-3' and P2 (antisense) nt1825-1806, 5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTT CAAAAAGTTGCATGGTGCTGG-3' (Gunther et al., 1995). These primers allowed amplification of a full length HBV DNA PCR product containing Hind III, SstI and SapI restriction sites on both 5- and 3-ends of the primer region. Amplicons of HBV complete genome were cloned into the unique SstI restriction site of pUC 19. After clones selection, plasmids DNAs were purified using S.N.A.P. Midiprep kit (Invitrogen). Purified plasmid DNAs were then digested with restriction endonuclease SapI. SapI linearized full length HBV DNA was separated from the SapI digested plasmid DNA by agarose gel electrophoresis, purified with the commercial kit (Macherey-Nagel) and ligated with DNA T4 ligase. The ligation reaction containing different forms of HBV DNA was separated by agarose gel electrophoresis

and purified monomers of HBV cccDNA used for transfection, after quantification by spectrophotometer analysis

### **Obtainment of pCDNA 4/TO promoterless expression vector**

The pCDNA 4/TO mammalian expression vector (Invitrogen) was chosen for the construction of 1.28 mer HBV plasmid. This vector does not contain *NsiI* recognition site, but it contains one *PstI* site in its multiple cloning site (MCS), which forms a compatible end with *NsiI* enzyme. It contains also two *BglII* restriction sites, one in the MCS and one prior to its CMV promoter. In order to allow the expression of HBV to be driven by its own authentic promoter, the CMV and adenine-promoter box (TATA) box tetracycline operator promoter in the pCDNA 4/TO vector was removed by double digestion with *PstI* and *BglII*. (Fig 1)

### **Generation of 1.28 mer HBV clone**

Figure 1 shows the strategy used for the generation of 1.28 mer HBV over-length clone developed by Bhoola et al., 2012. Briefly, the full length HBV cccDNA obtained as described above by GM method, was further purified by salt/ethanol precipitation and used as templates for the generation of a linear full length HBV DNA with primers *NsiI* FL F, sense, nt 1055-1070, 5'-CCTGCA TTAATGCCTTTGTATGCATG-3' *NsiI* FL R, antisense, nt 1066-1088; 5'-GCC TGTTTCGCTTGTATACATGC-3') The *NsiI* full-length HBV PCR product was then digested with *NsiI* restriction enzyme and cloned into the *NsiI* site (*NsiI* at position 4436 of the vector) of dephosphorylated pGBKT7 DNA vector. After clone selection, plasmids DNA was purified in large scale, the *NsiI* full length HBV

DNA clone was digested with *Nsi*I generating *Nsi*I full length HBV DNA, which was used in the downstream generation of the 1.28 mer over-length HBV DNA clone.

The next step was the generation of a 0.9kb *Nsi*I-*Bgl*II HBV fragment by PCR using primers that resulted in the addition of *Nsi*I and *Bgl*II restriction recognition sites on both 5' and 3' ends of the PCR product, respectively, (primers: *Nsi*I Frag F, sense, nt 1064-1088, 5'-GGGGGGATGCATGTATAC AAGCGAAACAGGC-3'; *Bgl*II Frag R, antisense, nt 1993-2023). After amplification of HBV DNA with these pair of primers, PCR product was further digested by *Nsi*I and *Bgl*II resulting in the generation of the 0.9kb *Nsi*I-*Bgl*II HBV DNA fragment, to be used in the generation of the 1.28 mer over-length HBV DNA clone. The final step consisted in a triple ligation involving the three products generated: (i) *Nsi*I digested *Nsi*I full-length HBV DNA (3,2 kb), (ii) *Nsi*I+*Bgl*II digested HBV DNA fragment (0.9kb) and (iii) the dephosphorylated *Bgl*II+*Pst*I digested promoter less pCDNA 4/TO expression vector. After clone selection, plasmid DNAs in the correct orientation were used in transfection assays

### **Transfection efficiency control**

The green fluorescent protein (GFP) exhibits bright green fluorescence when exposed to ultraviolet light. Here eGFP plasmid expressing GFP gene was used as a reporter gene. Transfection efficiency was measured by determining the number of cells that had been successfully transfected with eGFP using a fluorescence microscope.

### **Nucleotide sequencing**

Nucleotide sequences of cloned HBV DNAs were determined using BigDye Terminator kit (Applied Biosystems, CA, USA). Sequencing reactions were analyzed on an ABI3730 automated sequencer (Applied Biosystems). Bioinformatics analysis of the sequences was performed using MEGA version 5.1 software.

## **Cell culture and transfection assays**

Transient transfection assays were performed using human hepatoma HuH7 cells maintained in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were plated at a density of  $5 \times 10^5$  cells per well of 12-well plates and transfected with 2  $\mu\text{g}$  of HBV expressing plasmids and GFP expressing plasmid using *TransIT-LT1* Transfection Reagent (Mirus Bio Corporation, Madison, Wisconsin, United States of America) according to the manufacturer's instructions. Two independent transfection assays and one transfection control with eGFP were performed using plasmid preparations of each construct. Culture supernatants were collected one, three and five days post transfection and clarified by centrifugation at 1,500g for 5 minutes.

## **Real time PCR**

Intracellular and extracellular HBV loads were determined by real time PCR. At days 1, 3 and 5 post transfection.

Genomic DNA was extracted from transfected Huh7 cells using the NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) following the manufacturer's protocol. The real time PCR assay was performed using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), in combination with a TaqMan MGB probe set (Applied Biosystems) following the manufacturer's protocol. The TaqMan MGB probe set consists of unlabelled PCR primers specific for HBV DNA (HBV DNA F, sense, nt 292-312; 5'-CGTGTGTCTTGGCCAAAATTTC G-3' and HBV DNA R, antisense, nt 358-379; 5'-CATCCAGCGATAACCAGGACAA-3') and a TaqMan MGB probe (nt 331-345; 5'-FAM TCACTCACCAACCTCC NFQ-3') that is complementary to the HBV target DNA, labeled with a 6-carboxylfluorescein reporter dye on its 5'-end and a non-fluorescent quencher -minor groove binder on its 3'-end. The standard curve was generated by serial dilution (1:10) of an HBV DNA-containing clone solution ranging from  $1 \times 10^4$  to  $1 \times 10^8$  copies/ml.

## **Detection of expressed HBV proteins**

### **ELISA**

Transfected medium were tested for the presence of HBsAg and HBcAg by a commercial immunoassay (BioMurex HBsAg colour,) after a serial dilution of 5 times in the medium. Mock-transfected HuH7 cells were used as negative control.

### **Indirect immunofluorescence**

Huh7 cells were seeded in 12-well plates and transfected at 60% of confluence. After five days post transfection, the cells were washed with PBS three times and fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 10 min. The fixing solution was removed and the cells were washed with 1 ml of PBS five times. Subsequently, the cells were permeabilized by the addition of 5 ml 0.5% (v/v) Triton X-100 for 10 minutes, washed and blocked by the addition of 3% BSA incubated at 4 °C until use.

The indirect immunofluorescence assay was performed using mouse monoclonal antibodies MA18/7 to detect the preS1 region of L-HBsAg and mouse monoclonal ID8 to detect HBcAg. The secondary antibody which consists of donkey anti-mouse (IgG) (H+L) antibody labeled with either AlexaFluor488 or AlexaFluor546.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Table I shows that some aminoacid differences were observed between the two cloned HBV/A1 used to prepare HBV/A1 GM and 1.28 mer clones. Two or three aminoacid substitutions were observed for each preS1, PreS2 and S region. X region and polymerase displayed 6 and 16 differences, respectively. PreC and C regions were identical between the two clones. All these substitutions were not previously described

as affecting replication, gene expression or detection of the corresponding proteins and seem natural variations among HBV/A1 subpopulations.

It has been previously suggested that sensitive assays as real time PCR may be used to increase the sensitivity in detecting viral replication after transfection assays, although such assay might be misleading by amplifying not only replicative intermediates but also the input DNA (Cavallone et al. 2013) Here, real time PCR was performed in order to detect and quantify the amount of HBV DNA in Huh7 cells transfected by both HBV cccDNA generated by GM and by 1.28 mer HBV over-length plasmid. Our results showed that the quantification by real time PCR, although may not be accurate due to a possible back ground of the input DNA, is useful in indicating the neo synthesis of HBV DNA, revealed by the increasing HBV load over transfection time with both DNAs (Fig 2). In order to enhance replication competence of HBV DNA generated by GM, purification and quantification of ligated HBV cccDNA has been done after cloning and prior to transfection to mimicking better the in vivo conditions (Cavallone et al. 2013). Despite enhancing replication competence by transfecting only monomers of HBV cccDNA, the HBV load obtained by this method was lower than that obtained with 1.28 mer over-length plasmid. As shown in Fig 2, the 1.28mer over-length construct presented higher HBV loads when compared to the HBV cccDNA, in both intra and extracellular. HBV DNA intracellular levels were higher than the extracellular levels with both DNAs. The HBV cccDNA, intracellular levels varied from  $2.48 \times 10^4$  to  $4,81 \times 10^7$  from day 1 to day 5 post transfection, respectively. The extracellular variation with the 1.28mer over-length construct was from  $3.12 \times 10^3$  to  $5.20 \times 10^4$ , respectively, No intracellular or extracellular HBV DNA were observed for non-transfected cells and cells transfected with eGFP plasmid (not shown).

Levels of extracellular HBsAg and HBeAg were detected in the supernatant of transfected cells by specific ELISAs at different times after transfection, up to five days post transfection (Figure 3). Both HBsAg and HBeAg showed increasing levels over time of transfection in the two different systems. HBsAg levels detected in medium of transfected cells may be associated with production of HBsAg empty particles or with Dane particles. Levels of HBsAg with HBV cccDNA construct ranged from 3.2 (value of D.O./C.O) on day one to 14.56 D.O./C.O. on day five, while HBsAg production with the 1.28 mer HBV DNA construct varies from 5.3 on day one to 20.38 (D.O./C.O) on day five post transfection. Although both forms of HBV DNA were able to produce detectable levels of HBsAg, these levels were on average 1.4 times higher with 1.28 mer HBV DNA construct than with HBV cccDNA. Similar results were observed with detection of HBeAg, that is considered in natural infection, an antigen associated with viral replication that is secreted in the cytoplasm of infected cells. In this case, levels of HBeAg detected with HBV cccDNA ranged from 1 (value of D.O./C.O) on day one to 6.25 D.O./C.O. on day five, while HBeAg production in 1.28 mer HBV DNA construct varies from 5.3 on day one to 7.24 (D.O./C.O) on day five post transfection, in this last case it seems that HBeAg production reached a plateau (7.48 D.O./C.O.) three days post transfection. These levels were on average 1.76 times higher with 1.28 mer HBV DNA construct than with HBV cccDNA.

The expression of L-HBsAg (under control of the 2.4 kb pre-S1 promoter) and HBcAg (preC/C promoter) were observed in the transfected cells at 24 to 72 h after transfection by immunofluorescence microscopy, with expression reaching a peak at 72 h. L-HBsAg was mainly observed in the cytoplasm, while HBcAg was detected in both the cytoplasm and nucleus, especially with 1.28 mer construct (Figure 3A and Figure 3B). It is known that L-HBsAg protein controls the release of subviral particles and accumulates inside the ER. It has been speculated that one function of the L protein in

virion morphogenesis might be to generate patches of retained HBV envelope proteins in the ER membrane by forming transmembrane aggregates with M and S proteins. These patches could then become sites for viral budding, since in these sites all three HBsAg proteins would be concentrated together. (Bruss and Ganem 1991). Here, using confocal microscopy for immunofluorescence, a mean of 1.5 fold higher detection of L-HBsAg with 1.28 over-length construct when compared to the HBV cccDNA was observed in three independent indirect Immunofluorescence assays. Not only the number of transfected cells is higher with 1.28 mer construct but also an higher intensity of immunofluorescence in the cytoplasm of these transfected cells compared to compare to the HBV cccDNA was observed, leaving us to suppose that there is a greater accumulation of L-HBsAg within the cells transfected with 1.28 over-length construct when compared to cccDNA.

In a previous works using transfection assays of HBV genes (Roingard et al. 1990) it was observed three types of HBcAg staining: (a) cells with nuclear HBcAg localization, (b) cells with cytoplasmic HBcAg and (c) cells with both nuclear and cytoplasmic HBcAg. It was shown that cell types b and c also expressed HBV DNA in their culture media; suggesting that cytoplasmic HBcAg may be more involved than nuclear HBcAg in HBV replication. In our study, these different localizations of HBcAg were observed with the 1.28 mer construct while only cytoplasmic HBcAg was observed with HBV cccDNA. Moreover, Huh-7 cells transfected with the 1.28 mer showed a mean of 3 fold higher detection of HBcAg, compared to the cccDNA (Figure 3B).

Recently, a study of the South African team that developed the strategy of 1.28 mer HBV vectors has been published (Bhoola et al., 2014). In their work, *in vitro* replication of HBVs A1, A2 and D3 constructed as 1.28 mer constructs have been compared. They found that HBV/ D3 replicated at a lower level than HBV/A, as measured by HBsAg and HBV DNA synthesis. Futhermore, some differences between



HBV/A1 and HBV/A2 have been observed, as higher levels of intracellular replicative intermediates and HBcAg, and lower extracellular expression of HBV/A1 when compared to HBV/A2. In this study conducted by Bhoola and colleagues (Bhoola et al., 2014) a number of reasons to explain a high efficiency of this vector is given: (i) the successive DNA purifications to prevent carry-over of enzymes. (ii) no exogenous promoter, ensuring that expression of HBV would be driven by its own endogenous promoters and enhancers. (iii) the use of cccDNA plasmid that is known to increase transfection efficiency in a process of endocytosis much more easily than its linearized counterpart (Chthrough et al., 1999; Von Groll et al., 2006) and provides greater stability, which prevents the plasmid DNA from being degraded by cytosolic nucleases (Sun and Nassal, 2006).

However, these reasons presented by Bhoola and colleagues (2014) may not explain why the 1.28 mer plasmid is more efficient in expressing HBV proteins than HBV cccDNA. Considering that here the same care was conducted prior to transfection with both cccDNAs, few other arguments could be found to explain the better performance of plasmid over HBV cccDNA. One possibility is that the uptake of the plasmid by the cell is more efficient than the uptake of HBV cccDNA and therefore a greater number of plasmid molecules enter into the cells. Construction of these DNAs fused to a fluorescent protein, may help to explain this by monitoring the various steps after transfection.

Although higher amounts of HBV DNA and of HBV proteins were observed following transfection with the 1.28 mer compared with HBV cccDNA, the first construction is more laborious than the second. Furthermore, the methods used here (real time PCR, ELISA and immunofluorescence) are sensitive to detect HBV DNA and HBV proteins after transfection of both forms of DNAs (1.28 mer HBV plasmid and HBV cccDNA). However, immunofluorescence (Fig. 4) are much more intense with the 1.28

mer HBV plasmid than with HBV cccDNA. An advantage of the plasmid is also antibiotic selection of stably transformed cells.

In conclusion, a new strategy generating 1.28 mer HBV DNA plasmid has been developed that enables the efficient expression of all HBV proteins in levels higher than transfection with purified HBV cccDNA, Both methods improves *in vitro* conditions and mimicking better the *in vivo* conditions.

## REFERENCES

- Araujo NM, Mello FC, Yoshida CF, Niel C, Gomes SA. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. Arch Virol. 2004 Jul;149(7):1383-95.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. J Gen Virol. 2002;83(Pt 8):2059-73.
- Bhoola NH and Kramvis A. The unfolded protein response (UPR) in cultured cell expressing either wild-type or mutant hepatitis b e antigen (HBeag) of the Hepatitis B virus (HBV), 2012. Tese publicada na Universidade de Witwaterstrand, Joanesburgo, África do Sul
- Bhoola NH<sup>1</sup>, Reumann K<sup>2</sup>, Kew MC<sup>3</sup>, Will H<sup>2</sup>, Kramvis A. Construction of replicat competent plasmids of hepatitis B virus subgenotypes A1, A2 and D3 with authentic endogenous promoters. J Virol Methods. 2014 Mar.
- Brechot, C., D. Gozuacik, et al. (2000). "Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC)." Semin Cancer Biol 10(3): 211-231.
- Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(3):1059-63.
- Cavallone D, Moriconi F, Colombatto P, Oliveri F, Bonino F, Brunetto MR. Optimization of in vitro HBV replication and HBsAg production in HuH7 cell line. J Virol Methods. 2013;189(1):110-7.
- Chthrough et al., 1999
- Dienes, H. P., W. H. Gerlich, et al. (1990). "Hepatic expression patterns of the large and middle hepatitis B virus surface proteins in viremic and nonviremic chronic hepatitis B." Gastroenterology 98(4): 1017-1023.

- Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Carrouee-Durantel S, Pichoud C, Villet S, et al. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol.* 2005;34 Suppl 1:S34-43.
- Durantel D, Carrouee-Durantel S, Werle-Lapostolle B, Brunelle MN, Pichoud C, Trepo C, et al. A new strategy for studying in vitro the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus. *Hepatology.* 2004;40(4):855-64.
- Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:651-93.
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15655-60.
- Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol.* 1995;69(9):5437-44
- Hannoun C, Söderström A, Norkrans G, Lindh M. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *J Gen Virol.* 2005 Aug;86(Pt 8):2163-7.
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol.* 1984;52(2):396-402.
- Hirsch RC, Lavine JE, Chang LJ, Varmus HE, Ganem D. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature.* 1990;344(6266):552-5.
- Jacquard AC, Brunelle MN, Pichoud C, Durantel D, Carrouee-Durantel S, Trepo C, et al. In vitro characterization of the anti-hepatitis B virus activity and cross-resistance profile of 2',3'-dideoxy-3'-fluoroguanosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):955-61.
- Kramvis A, Weitzmann L, Owiredu WK, Kew MC. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol.* 2002 Apr;83(Pt 4):835-9.
- Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanya D, Zekeng L, et al. (2010). "Molecular genetics of HBV infection." *Antivir Ther* 15 Suppl 3: 3-14.
- Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology.* 1994;198(2):489-503.

- Olinger CM<sup>1</sup>, Venard V, Njayou M, Oyefolu AO, Maïga I, Kemp AJ, Omilabu SA, Faou A, Muller CP. Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol.* 2006 May;87(Pt 5):1163-73.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1988;69 ( Pt 10):2575-83.
- Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SY, Belshaw R, Allain JP, et al. Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology.* 2013;57(3):908-16.
- Pfaff E, Klinkert MQ, Theilmann L, Schaller H. Characterization of large surface proteins of hepatitis B virus by antibodies to preS-S encoded amino acids. *Virology.* 1986;148(1):15-22.
- Ren S, Nassal M. Hepatitis B virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary tupaia hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication-defective adenovirus vectors. *J Virol.* 2001;75(3):1104-16.
- Roingeard P, Lu SL, Sureau C, Freschlin M, Arbeille B, Essex M, et al. Immunocytochemical and electron microscopic study of hepatitis B virus antigen and complete particle production in hepatitis B virus DNA transfected HepG2 cells. *Hepatology.* 1990;11(2):277-85.
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 1):67-74.
- Sugauchi F, Ohno T, Orito E, Sakugawa H, Ichida T, Komatsu M, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease.
- Sun D, Nassal M. Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. *J Hepatol.* 2006 Nov;45(5):636-45.
- Von Groll A, Levin Y, Barbosa MC, Ravazzolo AP. Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnol Prog.* 2006 Jul-Aug;22(4):1220-4

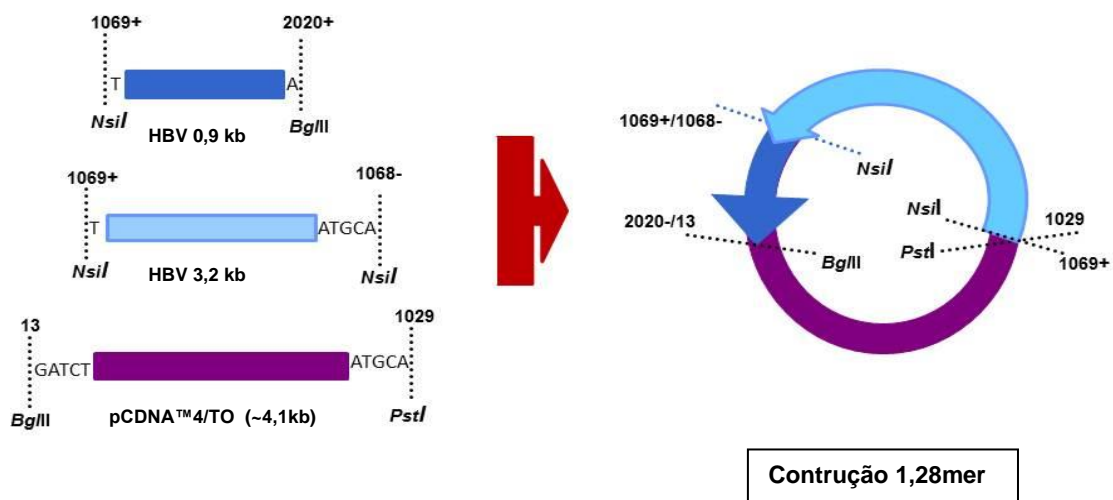
Wang Y, Schafer-Ridder M, Stratowa C, Wong TK, Hofschneider PH. Expression of hepatitis B surface antigen in unselected cell culture transfected with recircularized HBV DNA. EMBO J. 1982;1(10):1213-6.

Warner N, Locarnini S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172\* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. Hepatology. 2008;48(1):88-98.

Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. Pathol Biol (Paris). 2010;58(4):267-72.

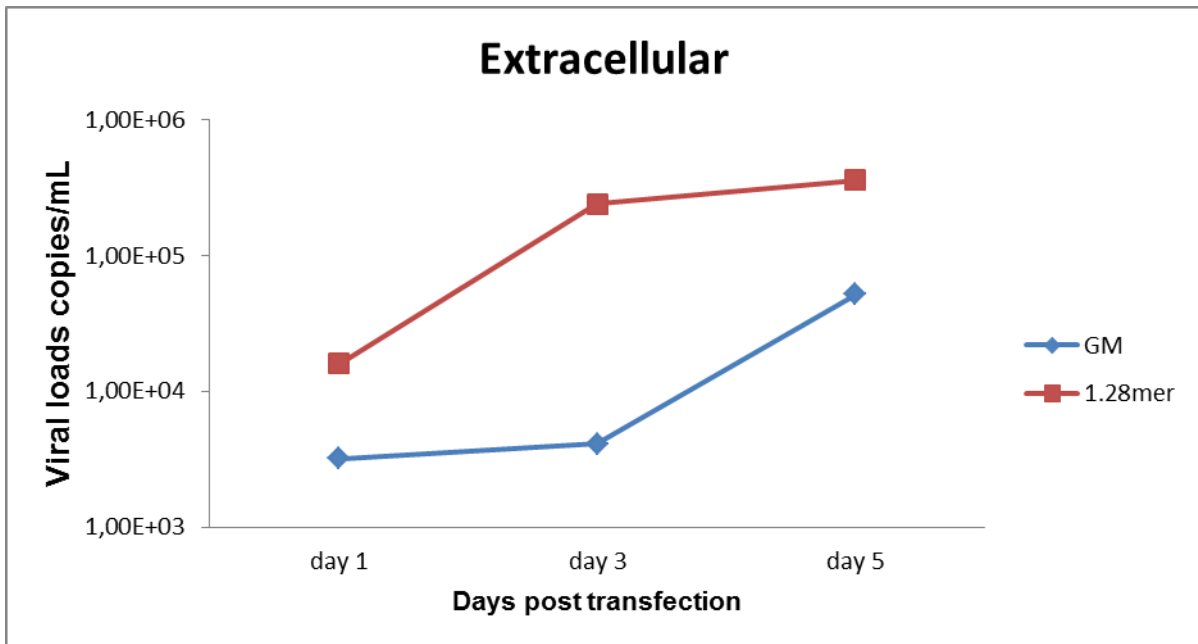
WHO, 2013) ([www.who.int/medicalcentre](http://www.who.int/medicalcentre))

**Figure 1:** Schematic representation of the strategy involved in the generation of 1.28mer over-length clone

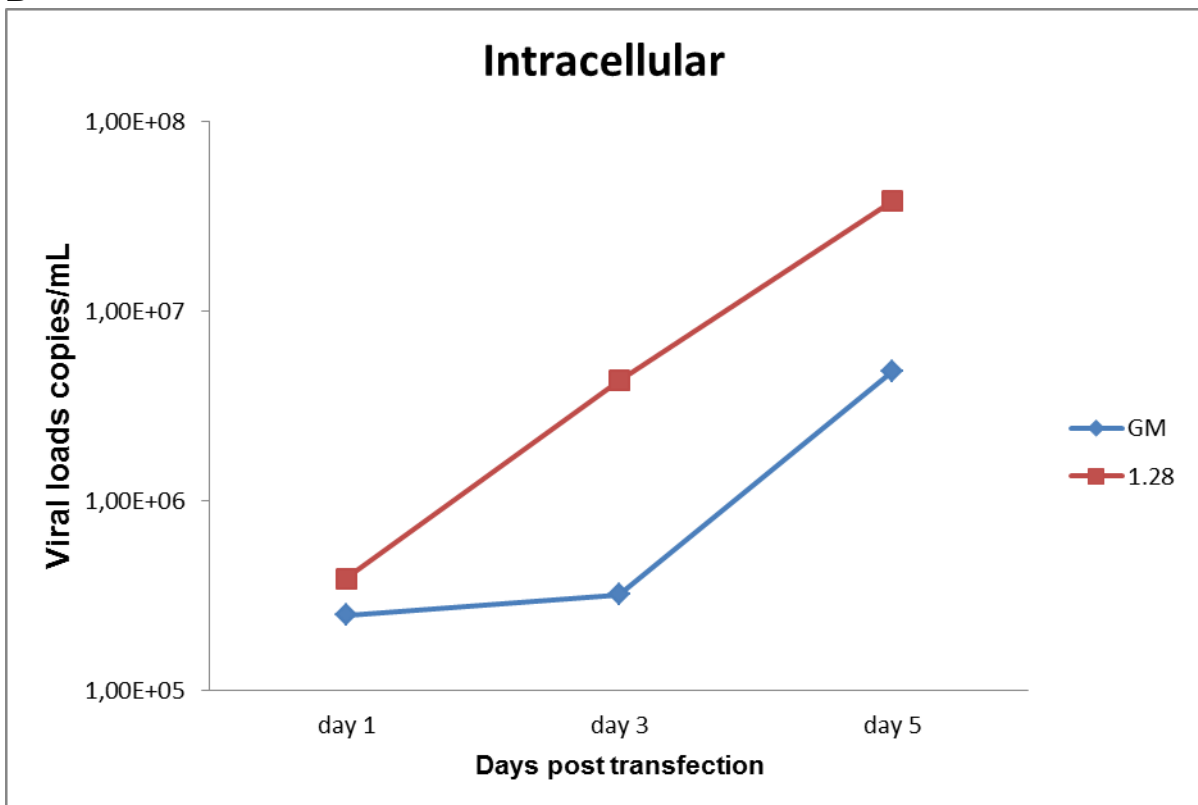


**Figure 2:** A- Real-time PCR Extracellular quantification. B- Real-time PCR Intracellular quantification

**A-**

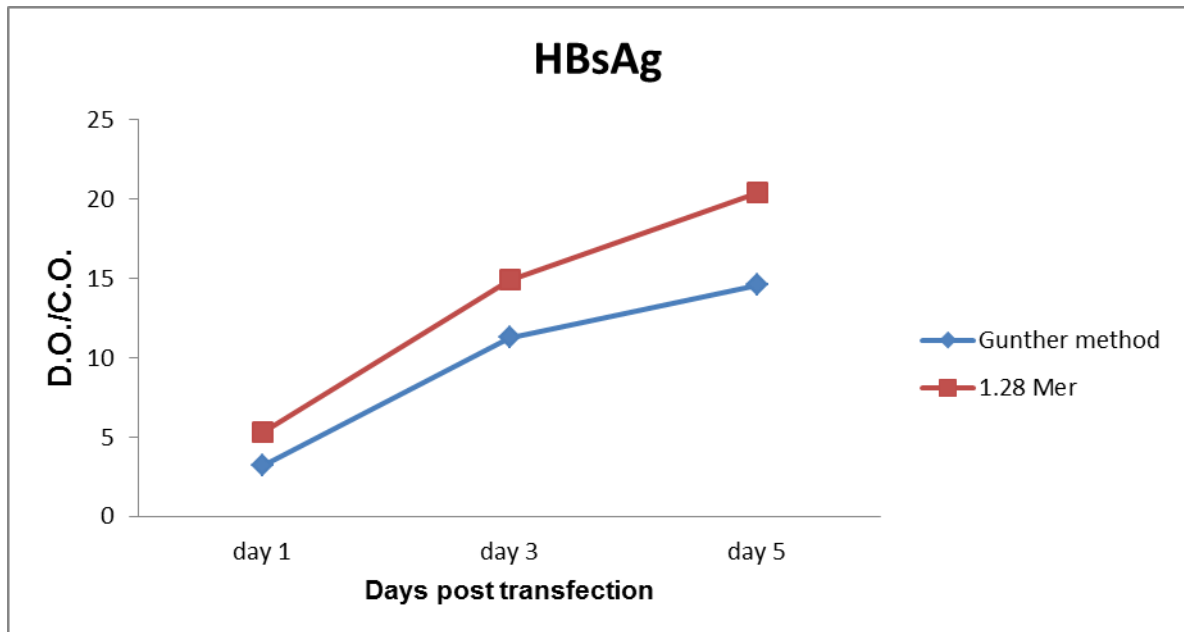


**B-**

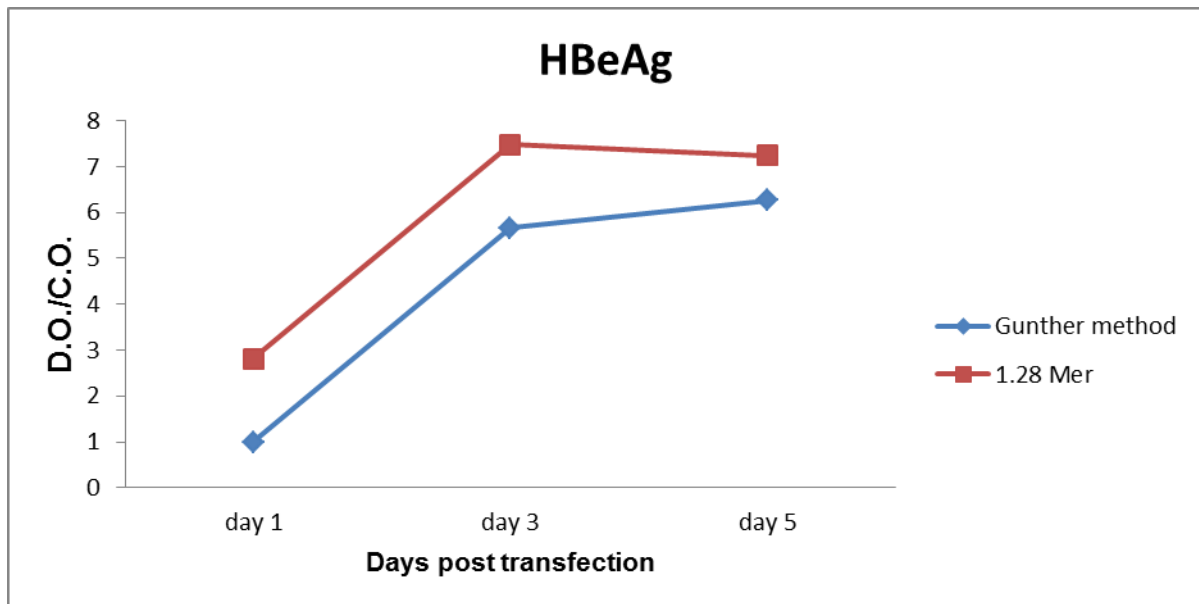


**Figure 3:** Levels of extracellular (Optical density: D.O./Cut-off: C.O.) HBsAg (A) and HBeAg (B) detected in the supernatant of transfected cells.

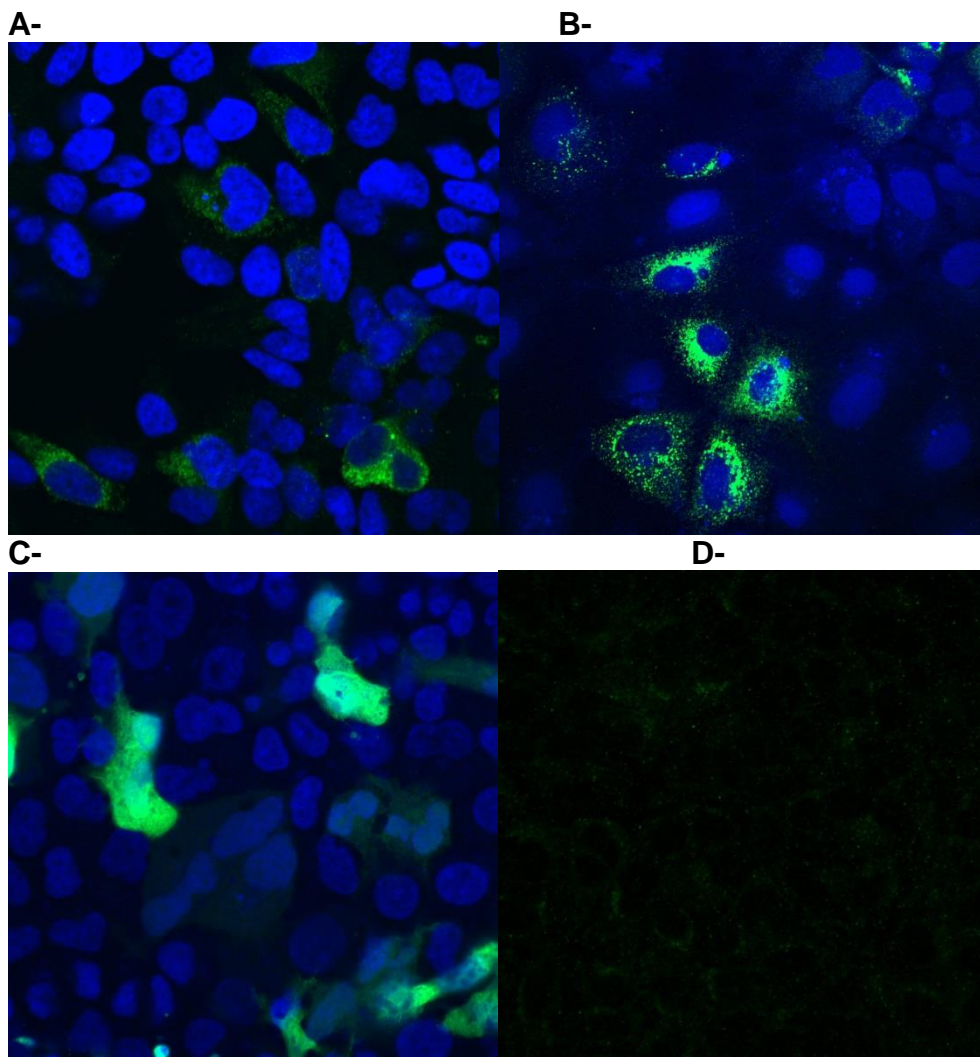
**A-**



**B-**

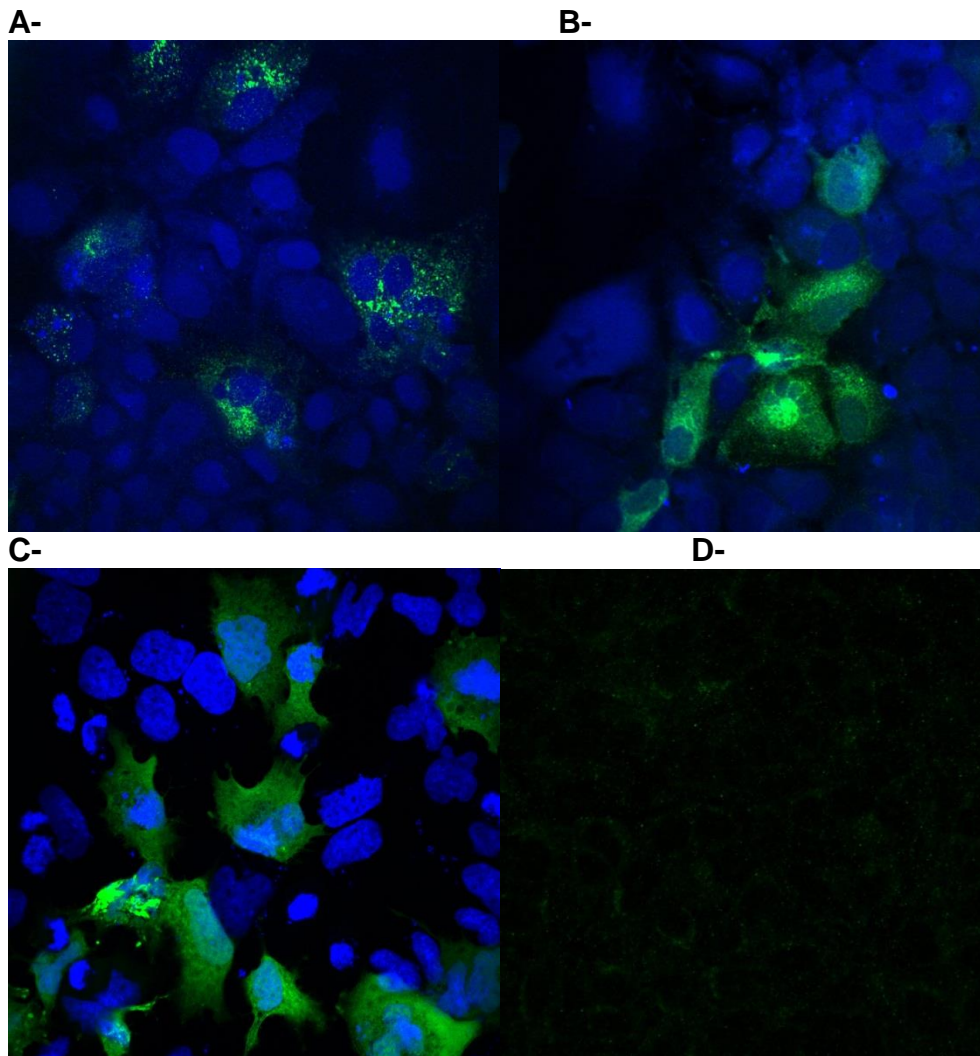


**Figure 4:** Indirect Immunofluorescence detecting intracellular Large-HBs protein. A-cccHBV system; B-1.28 construct; C-eGFP positive control; D-Negative control. Blue: nuclei stained with DAPI. Green: Large-HBs





**Figure 5:** Indirect Immunofluorescence detecting intracellular HBcAg protein. A-cccHBV system; B-1.28 construct; C-eGFP positive control; D-Negative control. Blue: nuclei stained with DAPI. Green: Large-HBs



## V- DISCUSSÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) representa um grave problema de saúde pública mundial, apesar da existência de uma vacina eficiente.

A presente tese é composta principalmente de três manuscritos, conforme previamente apresentado. Esses estudos se propuseram a compreender a evolução dos genótipos do HBV entre África e Brasil e associar a dispersão dos genótipos no Brasil com a rota de escravos. No primeiro trabalho, intitulado “*Analysis of Complete Nucleotide Sequences of Angolan Hepatitis B Virus Isolates Reveals the Existence of a Separate Lineage within Genotype E*”, realizamos a caracterização filogenética viral dos isolados circulantes em Angola sua associação com os perfis sorológicos e moleculares existentes naquela população.

De acordo com estudo recente, a história evolutiva do HBV/E dataria de 130 anos (Andernach *et al.*, 2013). Essa história evolutiva recente explicaria a baixa diversidade genética entre os isolados desse genótipo (divergência média de 1,75% ao longo do genoma completo) (Mulders *et al.*; 2004, Kramvis, *et al.*; 2005).

Apesar disso, ao comparar sequências de diferentes países do Oeste-Africano um estudo anterior apontou para uma divergência ainda menor entre isolados do HBV/E de países do Sul quando comparados a países ao Norte (Hubschen *et al.*, 2008). Nossos achados confirmaram essa hipótese classificando as amostras angolanas como pertencentes a uma nova linhagem, característica do sudoeste africano, provisoriamente denominada pela nossa equipe, SWL (*Southwest African Lineage*).

No segundo trabalho, intitulado “*HBV subgenotype A1: Relationships between Africa and Brasil*”, fomos em busca das história evolutiva do HBV/A1, genótipo mais prevalente no Brasil com suposta origem africana, para investigarmos as suas rotas de dispersão entre África e Brasil durante o período do tráfico negreiro.

Análises filogeográficas vêm sendo utilizadas como ferramentas importantes na investigação dos padrões de dispersão do HBV (Mello *et al.*, 2013; Andernach *et al.*, 2013; Ciccozzi *et al.*, 2014) e outros vírus (Bielejec *et*

al.,2014; Golemba *et al.*,2013). Ao aplicarmos essa ferramenta na análise geográfica e temporal das amostras brasileiras pudemos delinear as rotas de transmissão do HBV/A1 entre África e Brasil tendo como base os aspectos cronológicos históricos acerca do tráfico negreiro.

Surpreendentemente, observamos que todas as amostras brasileiras estão geneticamente relacionadas às amostras da Ásia e Somália, ao invés da África ocidental, levando-nos a crer que o HBV/A1 possa ter sido introduzido no Brasil a partir dos portos de Moçambique, no sudeste africano ou diretamente através da Índia por navegantes e mercadores portugueses e brasileiros que estabeleciam comércio com a Ásia. Um estudo utilizando amostras de Moçambique será necessário para investigar a similaridade genética entre as linhagens virais do sudeste da África e do Brasil.

No terceiro trabalho, intitulado “*Comparison of levels of HBV (subgenotype A1) antigens synthesis after transfection of Huh7 cells by HBV cccDNA and 1.28 mer HBV DNA construct*”, objetivamos comparar os níveis de replicação entre dois modelos que permitem a síntese *in vitro* das proteínas do HBV, utilizando isolados pertencentes ao HBV/A1. Nossos achados demonstraram que ambos os sistemas testados apresentam vantagens e desvantagens e esse balanço deve ser levado em conta em função do objetivo a que se pretende atingir. Mais detalhadamente, apesar da baixa síntese de proteínas e DNA descritos para os experimentos envolvendo o ccHBV, este sistema pode ser útil se pesarmos os custos e benefícios de se investir em uma construção vetorial laboriosa como o 1,28 mer. Por outro lado, em situações onde a síntese de produtos virais é inexistente ou não é suficiente para os objetivos pretendidos em um dado estudo, essa construção pode fornecer uma quantidade satisfatória de produtos virais, por fornecer mais altos níveis de DNA e proteínas.

Uma vez que HBV não é um vírus cultivável, estratégias que possam auxiliar na compreensão dos seus mecanismos biológicos e replicativos são particularmente importantes. Esses estudos visam contribuir para um maior entendimento das características biológicas e variabilidade genética do HBV, patógeno responsável por um dos mais importantes agravos à saúde mundial.

## V.1. DISCUSSÃO DETALHADA DOS ARTIGOS

### Artigo 1

A infecção pelo vírus da hepatite B configura-se como um grave problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. Estudos epidemiológicos realizados em diversas regiões mundiais evidenciaram uma ampla variação na endemicidade, estando esta relacionada, entre outros fatores, às condições sanitárias, sócio-econômicas e hábitos de vida de cada população (Karim *et al*, 1991).

Apesar da escassez de dados epidemiológicos e moleculares do HBV no continente africano, os estudos realizados demonstraram que os genótipos mais prevalentes são: A (subgenótipo A1, e em menor proporção, A3, A4, A5 e A7), D e E, sendo o genótipo E o menos estudado e mais prevalente na África ocidental (Norder *et al*, 1993; Kurbanov *et al*, 2005; Hannoun *et al*, 2005; Olinger *et al*, 2006; Kramvis e Kew, 2007a, Kramvis e Kew, 2007b).

No presente estudo, 30 isolados HBV/E oriundos de Angola foram caracterizados geneticamente. Dentre eles, 16 tiveram seus genomas completos analisados e os outros 14, a região pré-S/S completa.

A análise das sequências de aminoácidos desses 30 isolados revelou a existência de um resíduo de metionina na posição 83 (Met83) da extremidade C-terminal da região Pré-S1, que foi encontrado em 29/30 (97%) dos isolados. Uma vez que essa substituição está também presente em outras amostras, e à medida que o número de amostras de HBV/E sequenciadas cresce, torna-se mais claro que a substituição Met83 poderia ser classificada como uma assinatura molecular desse genótipo (Kramvis, *et al.*; 2005). Em função disso, para estudos futuros, seria importante determinar os reais efeitos dessa substituição na síntese viral; se o códon AUG correspondente a essa metionina atuaria como um códon de iniciação, levando à tradução de uma forma alongada da proteína M do envelope viral (MHBsAg), e se sua tradução poderia interferir na síntese do MHBsAg de tamanho normal que é codificado pelo códon AUG tradicional (Kramvis, *et al.*; 2005).

Estudos anteriores têm demonstrado a presença simultânea de HBsAg e anti-HBs no soro de alguns pacientes com hepatite B crônica, em taxas que variam de 3-6% na Coreia do Sul (Jang *et al.*; 2009, Lee *et al.*; 2013), 21% em Singapura (Wang *et al.*; 1996), 24-32% nos Estados Unidos (Shiels *et al.*; 1987, Tsang *et al.*; 1986) e 36% na Holanda (Heijntink *et al.*; 1982) . No presente estudo, os indivíduos que apresentaram a detecção simultânea dos HBsAg e anti-HBs representam 40% (30-51%; 95% IC) de todos os portadores do HBV. Apesar desse perfil já ter sido anteriormente documentado, a razão pela qual uma proporção tão elevada desses dois marcadores foi observada na população de Angola permanece obscura.

Deleções de 1 a 18 aminoácidos de comprimento foram encontradas na região Pré-S de seis isolados angolanos (Tabela 2). Quatro desses isolados apresentaram deleções localizadas entre os resíduos de aminoácidos 19 e 22 da região Pré-S2. Padrões semelhantes de deleção já haviam sido previamente descritos em isolados do HBV/E de Benin, Camarões, República Democrática do Congo, Mali, Nigéria e Togo (Mulders *et al.*; 2004).

De modo interessante, todas as deleções identificadas nas 5 amostras que possuem a presença simultânea dos marcadores HBsAg e anti-HBs, foram encontradas em regiões ricas em epítomos de reconhecimento por linfócitos B e T, conseqüentemente, interrompendo-os. Alternativamente, na sexta e última amostra, oriunda de um paciente com sorologia negativa para o anti-HBs (e que portanto, não apresentava a detecção simultânea dos dois marcadores), a deleção foi identificada numa região sem sítios de reconhecimento de linfócitos (Tabela 2).

A detecção simultânea dos antígenos e anticorpo do envelope viral foi identificada em amostras cujas deleções anularam sítios que seriam, normalmente, ricos em epítomos para ligação de células B e T. Esse perfil de detecção simultânea dos dois marcadores foi relacionado com a alteração de sítios de ligação de anticorpos presentes nas proteínas L e M do HBsAg. Essas alterações podem reduzir ou abolir o reconhecimento desse HBsAg modificado, resultando em falha na resposta imunológica (Chen *et al.*; 2006; Zhang *et al.*; 2012).

Foram identificadas substituições (R34K na Pré-S1 e R16K e R18K na Pré-S2) apenas em amostras com o perfil de detecção simultânea de HBsAg e

anti-HBs, podendo estar relacionadas a este fenótipo. Estudos mais direcionados serão necessários para determinar se a elevada proporção (40%) de indivíduos com esse perfil na população angolana pode estar relacionada com o seu estado clínico (portadores assintomáticos), ao fato de que Angola é uma área hiperendêmica para a infecção pelo HBV, ou a algum outro motivo.

Apesar de ter sido descrito há duas décadas (Norder *et al.*, 1994) o HBV/E não tem sido extensivamente estudado. Enquanto o HBV/A é mais prevalente no Sudeste e África Oriental, o HBV/E é o genótipo dominante no Oeste Africano, se estendendo por uma extensa área que vai do Senegal à Namíbia (Valente *et al.*, 2010; Fujiwara *et al.*, 2005; Odemuyiwa *et al.*, 2001), bem como na República Central Africana (CAR) (Bekondi *et al.*, 2007), DRC (Mulders *et al.*, 2004) e Madagascar (Dupinay *et al.*, 2010). Apesar de estar praticamente restrito ao continente africano, em países não-africanos, o HBV/E já foi identificado no Brasil (Motta-Castro *et al.*, 2008; Sitnik *et al.*, 2007), Argentina (Mathet *et al.*, 2005), Colômbia (Alvarado-Mora *et al.*, 2010), na ilha caribenha de Martinica (Brichler *et al.*, 2013), Haiti (Andernach *et al.*, 2009), França (Ganne-Carrie *et al.*, 2006, Martel *et al.*, 2013), e Bélgica (Pourkarim *et al.*, 2009), na maioria dos casos, estando relacionado a viajantes africanos.

O fato de que apenas poucos isolados HBV/E foram identificados nas Américas é compatível com a hipótese de sua introdução recente, que teria ocorrido após o período escravocrata nas Américas entre os séculos XVI e XIX (Mulders *et al.*, 2004, Odemuyiwa *et al.*, 2001).

De acordo com um estudo recente, a história evolutiva do HBV/E dataria de 130 anos, tendo este genótipo sido disseminado pelo continente africano entre 1880 e 1930 (Andernach *et al.*, 2013). A outra hipótese é de que HBV/E teria se mantido confinado a pequenas comunidades africanas por um longo período de tempo, e teria sido reintroduzido e disseminado na população geral nos últimos 200 anos (Kurbanov *et al.*, 2005). Essa (re)introdução recente também explicaria a baixa diversidade genética entre os isolados desse genótipo (divergência média de 1,75% ao longo do genoma completo) (Mulders *et al.*, 2004, Kramvis, *et al.*, 2005). Devido a essa baixa variabilidade, o HBV/E não foi classificado em subgenótipos, uma vez que esta subdivisão exige uma divergência média de 4% ao longo do genoma completo entre (Kramvis *et al.*, 2008; Pourkarim *et al.*, 2010).

Apesar dessa baixa diversidade genética descrita, ao comparar sequências de diferentes países do Oeste-Africano um estudo anterior apontou para uma divergência ainda menor entre isolados do HBV/E de países do Sul quando comparados a países ao Norte (Hubschen *et al.*, 2008).

Nas amostras de Angola caracterizadas no presente estudo, substituições em resíduos de aminoácidos característicos, nomeadamente Ile57 na proteína *small S*; His177, Trp245 e Leu612 na Polimerase, e Leu30 na proteína X, foi observada na grande maioria das cepas. De modo geral, a frequência desses aminoácidos foi muito maior entre os isolados de Angola e os países vizinhos do sudoeste africano Namíbia e República Democrática do Congo (79-96 %) do que nos países do noroeste: Camarões, CAR, Costa do Marfim, Gana, Guiné, Níger, Nigéria, e em Madagascar e no Sudão (0-12 %; Tabela 5). Além disso, árvores filogenéticas construídas por dois métodos independentes demonstraram a existência de uma linhagem distinta, denominada provisoriamente de linhagem do Sudoeste Africano (*Southwest African lineage* – SWL), separada dos demais isolados com valor de probabilidade posterior (pp) = 1 (fig. 1). O valor de distância genética intragrupo para a Linhagem do Sudoeste Africano foi de 0,96%, enquanto a distância intergrupo, quando comparada com os demais isolados HBV/E foi de 1,53%.

A distribuição geográfica dos isolados pertencentes a essa linhagem foi restrita a Angola, Namíbia e República Democrática do Congo, enquanto os isolados não pertencentes a essa linhagem estão disseminados por oito países da região equatorial Africana e em Madagascar. A co-circulação de isolados pertencentes e não pertencentes à nova linhagem proposta não foi verificada em nenhum país africano (Fig. 2). Com relação às amostras oriundas de países não africanos, os mesmos foram encontrados dentro e fora do grupo. Esse resultado não foi surpreendente, uma vez que os isolados encontrados fora da África foram descritas como sendo provenientes de viajantes africanos, emigrantes ou descendentes de africanos da primeira geração, que tanto podem ser originário dos países ao sul, membros componentes da nova linhagem, quanto das demais localidades. De acordo com Andernach e colaboradores, o HBV/E teria tido sua origem na Nigéria, a partir de onde teria se disseminado por toda a África centro-ocidental. De acordo com a taxa

evolutiva proposta nesse estudo, o contato com países ao sul, como Angola, teria ocorrido a partir de 1940 (Andernach *et al.*, 2013). Apesar da origem recente proposta para o HBV/E, parece pouco provável que a diferenciação da linhagem SWL observada pelo nosso estudo, tenha ocorrido em tão curto período de tempo.

Os resultados aqui apresentados vieram a corroborar observações anteriores que sugeriam uma menor diversidade genética em isolados do HBV circulantes nos países do Sudoeste Africano. Entretanto, a comprovação de que esses isolados formariam uma linhagem destacada dos demais só foi possível após a cuidadosa caracterização molecular e filogenética dos isolados de Angola, realizada no presente estudo. A descrição de uma linhagem distinta, com componentes filogenética e geograficamente relacionados entre si, representa o primeiro passo para uma subclassificação dos isolados do HBV/E, até então, inexistente.

## **Artigo 2**

O objetivo inicial do segundo trabalho foi estabelecer as rotas de disseminação do HBV/A1 entre África e Brasil, que ocorreu, provavelmente, durante o período do tráfico de escravos. Neste propósito, seqüências de 26 isolados pertencentes ao HBV/A de 8 estados brasileiros (Amapá, Amazonas, Goiás, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina) foram geneticamente caracterizadas e comparadas com 110 seqüências internacionais disponíveis no GenBank.

Até o momento, os isolados caracterizados no presente estudo foram os primeiros isolados HBV/A brasileiros a serem totalmente seqüenciados em seus 3221 pares de base. Todos foram classificados como pertencentes ao subtipo sorológico adw2. Através da análise filogenética, 23 isolados foram classificados como pertencentes ao subgenótipo A1 e três ao subgenótipo A2. Em seis estados brasileiros (Amapá, Amazonas, Goiás, Mato Grosso, Pernambuco e Rio de Janeiro) todos os isolados encontrados pertenciam ao subgenótipo A1. Os três isolados A2 existentes eram provenientes de dois estados localizados no Sul/Sudeste do Brasil: Santa Catarina (duas amostras)



e São Paulo (uma amostra). O estado de São Paulo foi o único em que foram identificados os dois subgenótipos A1 e A2.

Os subgenótipos A1 e A2 já foram previamente identificadas no Brasil com base em PCR-RFLP e seqüenciamento parcial (Bertolini *et al* , 2012; . Mello *et al*, 2007; Moura *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2010; Souto *et al.*, 2007). Dados disponíveis para 13 dos 26 estados brasileiros indicaram uma maior prevalência do HBV/A1 em relação ao HBV/A2 isolados. No entanto, a diferença foi notada entre os estados do Norte (Amapá, Amazonas, Pará, Pernambuco e Rondônia), onde a relação A1/A2 foi > 14, e os estados do sul e sudeste como Paraná, Rio de Janeiro , Santa Catarina e São Paulo, onde essa diferença foi < 5 . Neste sentido, vale ressaltar que a proporção de descendentes de europeus, principalmente portugueses, italianos, espanhóis, alemães e poloneses é maior no sul do Brasil do que em outras regiões. Considerando-se as origens dos dois subgenótipos (África para A1 e Europa para A2), é esperado que haja a presença em maior escala do HBV/A2 no sul do Brasil quando comparada às demais regiões brasileiras. Tais isolados encontrados no sul podem ser correlacionados com as características étnicas da população européia que migrou para o Brasil durante os séculos XVII, XIX e início do século XX.

Em três comunidades afro-descendentes que vivem em relativo isolamento, desde o período da escravidão, nos estados de Goiás, Maranhão e Mato Grosso do Sul, a maioria dos isolados HBV foram classificados como pertencentes ao genótipo A1 e nenhum HBV/A2 foi encontrado (Alvarado -Mora *et al* , 2011; Motta-Castro *et al*, 2008 ; Matos *et al*, 2009 ) .

Estudos recentes vêm demonstrando a existência de dois clados distintos contendo sequências pertencentes ao subgenótipo A1. Um deles é principalmente Africano e inclui isolados do sul, leste e centro da África, enquanto os outros , compreendendo isolados da Ásia e da Somália, tem sido chamado de "asiático" (Makondo *et al* , 2012; Gopalakrishnan *et al* , 2013; Ochwoto *et al.* , 2013) ou " afro-asiático " (Kwange *et al.*, 2013). O nome "asiático-americano" também foi usado para descrever este último clado com base na análise filogenética incluindo sequências HBV/A1 de ilhas do Caribe e um número limitado de cepas da América do Sul (Brichler *et al* , 2013; Kramvis & Paraskevis, 2013 ) . Esse clado teria se originado entre os séculos XVI e

XVII com a expansão marítima europeia através do Oceano Índico e teria se disseminado pela Ásia e Américas quando os escravos africanos foram exportados para a Índia e ilhas do Oceano Índico através do porto de Zanzibar e de Moçambique para as Américas Central e do Sul (Klein, 2010).

Como o Brasil foi o principal país importador de escravos e o último a abolir este comércio, tornou-se essencial realizar um estudo filogenético com um número suficiente de isolados brasileiros HBV/A1 para validar ou não esta hipótese.

As análises filogenéticas realizadas no presente estudo utilizando sequências do genoma completo confirmaram a existência desse clado "asiático-americano", onde se agrupam todos os isolados do Brasil, Colômbia, Martinica, Bangladesh, Índia, Japão, Nepal, Filipinas e Emirados Árabes Unidos, França, bem como 2/3 dos da Argentina, 31/34 dos isolados do Haiti e 5/7 dos da Somália. Por outro lado, todos os isolados de sete países africanos, nomeadamente Congo, Quênia, Malawi, Ruanda, Tanzânia, Uganda e Zimbábue, bem como 16/18 dos isolados do Sul Africano, foram agrupados no outro clado denominado "Africano". Três outros isolados brasileiros agrupam entre isolados HBV/A2 e A6 utilizados como grupos externos. Análises Blast demonstraram que as três amostras brasileiras apresentaram uma homologia de mais de 99% com isolados HBV/A2 da Rússia, Polónia e na Bélgica e de 94,8-96,1% com os três isolados A6 Belgas descritos anteriormente (Pourkarim et al., 2010b).

A topologia verificada na análise filogenética foi também confirmada pela análise filogeográfica. Dentre os isolados pertencentes ao HBV/A1, a separação em dois grandes clados foi identificada com valor de  $p.p.= 0,996$ . Conforme os resultados prévios da análise filogenética, o clado A1-África contém a maior parte dos genomas completos da África do Sul, todos os isolados do Congo, Malawi, Quênia, Ruanda, Tanzânia, Uganda, e Zimbábue, além de umas poucas seqüências da Somália e Haiti. No clado A1-Ásia-América, estão presentes todos os isolados da Índia, Nepal, Bangladesh, Emirados Árabes Unidos, Filipinas, Colômbia, Martinica, a maior parte dos isolados do Haiti e Somália, além de uma única seqüência da África do Sul. A distribuição dos isolados brasileiros dentro do clado Ásia-América, verificado nas análises filogenéticas, foi também confirmada pela Inferência Bayesiana.

As localidades e rotas de dispersão mais prováveis estão evidenciadas por diferentes cores, correspondentes à região geográfica dos isolados.

De acordo com o demonstrado pela árvore filogeográfica, a origem do HBV/A pode ser atribuída à África do Sul. Após a diferenciação do HBV/A1 nesses dois clados, o clado A1-África, se subdividiu em dois novos braços: O primeiro, um subclado monofilético, amparado por  $p.p.=0.998$  contendo apenas isolados da África do Sul, e o segundo se subdividindo em dois novos subclados, um deles chegando à Somália, e o outro, tendo a linhagem sul-africana como fonte de infecção nos demais países da África subsaariana e com alguns isolados chegando ao Haiti. Um isolado pertencente a este clado parece ter chegado recentemente à Argentina, seguindo um trajeto via África do Sul. Esses resultados corroboram parcialmente com os padrões de migração descritos por Kramvis & Paraskevis que analisaram a dispersão espacial do HBV/A1 a partir da região Pré-S/S.

O clado Ásia-América se diferenciou do clado africano indo em direção à Ásia, e a partir de então se dividiu em dois subclados. Um deles, como fonte de infecção para a Índia, outros países asiáticos, Brasil e Hispano-América, com um único isolado indo em direção oposta, a partir do Brasil para a África do Sul. O outro subclado, contendo um grupo monofilético formado por cepas da Somália, além de um subclado menor contendo isolados das Filipinas, seguindo em direção à Martinica e Haiti. Um isolado brasileiro se agrupou neste último subclado com  $p.p.=0,998$ , próximo aos isolados do Haiti.

Uma vez que não existe um consenso sobre a taxa evolutiva do HBV, cinco taxas de substituição previamente publicadas foram testadas. Em função dessas taxas variarem de  $7,72+E04$  a  $2,2+E06$  substituições/sítio/ano, com quatro outros valores intermediários dentro deste intervalo, os tempos do ancestral comum mais recente (tMRCAs) para os eventos analisados (origem do HBV/A1, origem do HBVA-não-A1, separação dos clados África e Ásia, dispersão pelo Brasil) obtidos utilizando cada uma das taxas propostas foram muito variáveis.

Desse modo, utilizamos as evidências históricas que correspondem à dispersão do HBV na África e sua disseminação no Brasil, para considerarmos como válidas para o nosso estudo, taxas evolutivas entre  $1 \times 10^{-5}$  e  $5 \times 10^{-5}$  s/s/y, levando a tMRCAs entre 500-800 e 400-700 anos para a origem do

HBV/A1 e do clado Ásia-América, respectivamente. Em contraste, as taxas evolutivas extremas,  $2.2 \times 10^{-6}$  e  $7.7 \times 10^{-4}$  s/s/y, resultam em datações que parecem longe da realidade ao compararmos com registros históricos, resultando em tMRCA datando do tempo pré-histórico (Mesolítico) e dos anos 1970s-1980s, respectivamente (Zhou & Holmes, 2007; Paraskevis et al., 2013).

Historicamente sabe-se que o oeste africano, mais precisamente, Congo e Angola, foram os principais fornecedores de mão de obra escrava para o Brasil. Entretanto, diante apogeu do tráfico negreiro, entre 1830 e 1850, e visando driblar a lei inglesa que proibia o tráfico de escravos no Atlântico, um grande número de cativos foram trazidos de Moçambique, o que resultou em uma considerável contribuição do Sudeste africano na composição da população negra brasileira. Um estudo que se propôs a investigar a filogeografia da população afro-descendente de São Paulo baseando-se nos haplogrupos do cromossomo Y e DNA mitocondrial, identificou que 87,6% dos negros brasileiros descendem do centro e oeste africanos, enquanto 12,3% descendem do sudeste da África (Gonçalves, 2007). Apesar de esse número parecer pequeno, nossos achados sugerem que a Ásia, possivelmente através dos entrepostos portugueses situados no sudeste africano, teria sido a fonte de entrada do HBV no Brasil. Diante desses achados, é razoável inferir que o HBV/A não circulava de forma endêmica nas populações africanas do oeste, de onde a maioria dos cativos era proveniente. Uma outra hipótese seria a introdução do HBV/A1 no Brasil diretamente através da Ásia (subcontinente indiano) através de mercadores portugueses e brasileiros envolvidos no comércio de uma série de produtos como seda e especiarias entre a Índia e o Brasil. Entretanto essa hipótese não explicaria a grande quantidade de pessoas infectadas pelo HBV/A1 nas comunidades afro-descendentes brasileiras. Assim, um outro estudo utilizando amostras de Moçambique será necessário para validar a hipótese do sudeste africano como possível fonte do HBV/A1 atualmente existente no Brasil.

Tendo sido o Brasil o país que recebeu o maior número de cativos oriundos de regiões africanas distintas, parece incomum que não haja, entre os isolados HBV/A1 brasileiros, nenhuma cepa geneticamente relacionada aos isolados do oeste africano (A1-África). Esse fato é especialmente intrigante ao observarmos a variabilidade genética dos isolados circulantes no Haiti, país

cuja população é essencialmente descendente de escravos negros trazidos da África no mesmo momento histórico. Apesar da maior parte dos isolados A1 haitianos se agruparem no clado Ásia-América, uma pequena proporção de isolados aparece no clado africano, tendo sido introduzidos no Haiti através dos países do oeste africano.

Historicamente sabe-se que mais de 70% dos escravos trazidos para o Brasil eram do sexo masculino; até o século XVIII esse número chegou a 85% em função dos trabalhos braçais nas lavouras de cana-de-açúcar e mineração no nordeste e Minas Gerais. As poucas escravas trazidas nesse período, eram utilizadas em afazeres domésticos e mantidas afastadas dos homens nas senzalas, uma vez que a gravidez representava uma queda no rendimento do trabalho da escrava e a perda do dinheiro investido. Nesse período mais severo do regime escravocrata, os abortos eram freqüentes. Eram comuns ainda as mortes durante o parto, além da baixíssima expectativa de vida para o bebê nascido de pais escravos.

Somado a esses fatores, evidências históricas e sociais demonstram que a união sexual entre brasileiros brancos e escravas negras eram relativamente comuns, ao passo que entre escravos negros e mulheres brancas eram raras. Desse modo, somado ao provável baixo índice de infecção pelo HBV no oeste africano durante o período do tráfico, o fato dos poucos escravos infectados que chegaram ao Brasil supostamente não conseguirem transmitir essa infecção por via sexual pode ser uma das explicações para a ausência de isolados HBV/A1 provenientes dos países do oeste africano.

Por outro lado, durante a era cafeeira que teve seu crescimento por volta do século XIX, as mulheres africanas (vindas em grande parte dos arredores de Moçambique) adquiriram importância no mercado como força de trabalho (Klein, 2010). Esse período coincidiu também com o início dos movimentos abolicionistas e um relativo afrouxamento das severas condições da escravidão. Se a união matrimonial entre escravos no passado era reprimida, esta passou a ser bem aceita, com o advento da família escrava funcionando como um fator favorável ao regime, uma vez que vinculava o cativo a terra e reduzia suas possibilidades de fuga. Nesse momento histórico, tanto a transmissão sexual quanto vertical do HBV puderam ser favorecidas. Assim, a chegada no Brasil de escravos provenientes do sudeste africano, supostamente

portadores do HBV/A1; a entrada maciça de mulheres escravas, aumentando a ocorrência de uniões sexuais; e uma relativa melhoria nas condições de vida dos cativos, devido a pressão exercida pelos movimentos abolicionistas, fizeram ampliar as chances de perpetuação da infecção pelo HBV.

### Artigo 3

O HBV/A tem sido descrito como um dos mais importantes genótipos do HBV, devido à sua elevada variabilidade genética e dispersão mundial na África e em regiões que mantiveram relações históricas com o continente africano, como Américas, Europa e subcontinente indiano. O HBV/A1 possui características clínicas e moleculares como seu perfil de soroconversão HBeAg/anti-HBe precoce e sua maior tendência à progressão para doença hepática quando comparado aos demais subgenótipos do HBV/A (Kramvis et al., 1998; Kew et al., 2005, Kimbi et al., 2004, Kramvis & Kew, 2007b).

Apesar do modelo proposto por Gunther suportar eficientemente a replicação pelo HBV *in vitro* (Gunther et al., 1995), fatores como a baixa síntese de DNA intracelular e a impossibilidade de que todos os isolados do HBV se tornem replicativamente competentes, consistem em algumas das principais limitações desse modelo. Com o objetivo de superar esses reveses, diversos modelos baseados em vetor contendo mais de uma unidade de genoma já foram descritos: 1,1 mer (Guidotti et al., 1995; Durantel et al., 2004), 1,2 mer (Guidotti et al., 1995; Fu and Cheng, 1998; Sugiyama et al., 2006), 1,3 mer (Guidotti et al., 1995; Tacke et al., 2004); 1,5 mer Gouskos et al., 2004; 2,0 (Parekh et al., 2003) e 3,0 mer (Tong et al., 1991).

Apesar da existência de todos esses modelos, o método proposto por Gunther ainda é o menos laborioso e mais comumente utilizado a fim de mimetizar a replicação e expressão das proteínas do HBV (Gunther et al., 1995). Dentre as diversas metodologias propostas, construções pequenas têm sido associadas à falta de hepato-especificidade (Guidotti et al., 1995), enquanto construções longas esbarram no inconveniente de múltiplas etapas de clonagem e amplificação, sem que haja estudos comparativos suficientes que justifiquem a sua utilização.

Um estudo recente comparou a eficiência replicativa entre o modelo proposto por Gunther, onde a recircularização do genoma do HBV é realizada intracelularmente, através das enzimas do hospedeiro, e o genoma do HBV recircularizado artificialmente, através do uso da enzima T4 ligase. Os resultados por eles obtidos indicaram que a etapa de ligação aumentava os níveis de replicação e expressão de proteínas (Cavallone et al., 2013).

Diante disso, nos propusemos a comparar os níveis de expressão de proteínas e DNA do HBV/A1 utilizando o método livre de vetor, descrito por Gunther (Gunther et al., 1995), incluindo a etapa de recircularização do DNA do HBV (cccHBV) (Cavallone et al., 2013) e uma construção plasmidial contendo 1,28 do genoma do HBV, descrita por Bhoola e colaboradores- esquema de construção detalhado nos anexos (Bhoola, 2010; Bhoola et al, 2014).

A quantificação do DNA do HBV por PCR em tempo real foi realizada a fim de comparar os níveis de DNA do HBV intra e extracelulares produzidos em células Huh7 transfectadas com os dois sistemas: a construção 1,28 mer e o cccHBV (Gunther et al., 1995; Bhoola, 2010; Cavallone et al., 2013). Devido à alta sensibilidade dessa técnica, mesmo o DNA produzido em baixas concentrações (uma das principais críticas à metodologia proposta por Gunther) poderia ser quantificado. No entanto, de acordo com Cavallone e colaboradores (Cavallone et al., 2013), a utilização dessa metodologia pode induzir a um erro, uma vez que pode ocorrer a amplificação não apenas de intermediários replicativos, mas também do DNA inicial fornecido uma vez que uma quantidade significativa do DNA dupla-fita permanece intacto mesmo depois da digestão pela enzima DNase I (Günther et al., 1995, Zoulin 2006, Cavallone et al., 2013). No presente estudo, ambos os sistemas apresentaram aumentos progressivos na carga viral, demonstrando a neo-síntese de DNA do HBV ao invés da simples detecção do DNA inicial fornecido.

Apesar do DNA do HBV ter sido quantificado nos dois modelos, a construção 1.28 mer apresentou carga viral superior em todos os dias de coleta. A quantificação dos níveis de HBV DNA extracelulares para o cccHBV variou entre  $3,2 \times 10^3$  no dia 1 a  $5,2 \times 10^4$  no dia 5, enquanto a construção 1,28 mer variou entre  $1,6 \times 10^4$  a  $3,6 \times 10^5$ . Com relação ao HBV DNA intracelular, o

mesmo variou entre  $2,5+E04$  a  $4,8+E07$  para o ccHBV e  $3,9+E05$  a  $3,8+E08$  para a construção 1,28 mer. Resultados similares com produção de elevados níveis de DNA do HBV neo-sintetizado, tanto no sobrenadante como no extracto celular foram obtidos por Dong e colaboradores para uma construção contendo 1,5 unidades de genoma do HBV (Dong *et al.*, 2009).

O presente estudo demonstrou ainda que os níveis de HBsAg e HBeAg foram superiores na construção contendo 1,28 unidades de genoma do que no ccHBV. Os altos níveis de HBsAg extracelular detectados no meio de células transfectadas pode ser associado com a produção de ambas as partículas, as partículas vazias compostas pelo HBsAg e partículas de Dane completas e infecciosas. Os níveis de HBsAg para o sistema livre de vetor variou de 3,2 (valor de DO/CO) no dia 1 para 14,56 DO/CO no dia 5, enquanto a produção HBsAg pela construção 1,28 unidade de genoma variou de 5,3 no dia 1 a 20,38 (DO/CO) no quinto dia pós transfecção. Embora ambos os sistemas tenham sido capazes de produzir níveis detectáveis de HBsAg, estes níveis foram, em média, 1,4 vezes maior na construção 1,28 mer do que no ccHBV.

Resultados semelhantes foram observados com relação ao HBeAg, onde o mesmo pode ser detectado mais cedo (24vs 72 horas) e em maiores quantidades na construção contendo 1,28 unidade de genoma. Os níveis de HBeAg detectados no sistema livre de vetor variou de 1,0 (valor de DO/CO) no dia 1 a 6,25 DO/CO dia 5, enquanto na construção 1,28 mer variou de 5,3 no dia 1 até 7,24 (DO/CO) no quinto dia após a transfecção. Neste último caso, parece que a produção HBeAg alcançou um platô (7,48 DO/CO) três dias após a transfecção. Esses níveis foram em média 1,76 vez superiores no 1,28 do que no sistema livre de vetor.

A expressão da proteína L-HBsAg (proteína *Large-S*, sob o controle do promotor do RNA de 2,4 kb da Pré-S1) e do HBcAg (proteína do Core, sob controle do promotor Pré-C/C) foram observadas nas células transfectadas 5 dias após a transfecção, por microscopia confocal de imunofluorescência. A proteína L-HBsAg foi detectada principalmente no citoplasma, enquanto que o HBcAg pode ser visualizado no citoplasma e no núcleo, especialmente na construção 1,28 mer. Sabe-se que a proteína *Large-S* controla a liberação de partículas sub-virais que se acumulam no interior do Retículo Endoplasmático



(RE). Foi demonstrado que os 19 aminoácidos N-terminais do polipéptido Large são responsáveis pela retenção intracelular de proteínas de HBsAg . Especula-se que uma das funções da proteína Large na morfogênese viral seja gerar aglomerados de proteínas do envelope do HBV que ficam retidas na membrana do RE, através da formação de agregados envolvendo as proteínas transmembranares Middle e Small . Esses aglomerados lipoprotéicos poderiam então se as fontes para o brotamento viral uma vez que nestes locais as três proteínas do envelope estariam mais concentradas (Bruss e Ganem, 1991).

Conforme pode ser visto pela imagem da microscopia, a detecção da Large-S foi em média 1,5 vezes mais elevada na construção 1,28 mer quando comparada com o cccHBV. Em três ensaios de imunofluorescência indireta independentes, não só o número de células transfectadas foi superior, como também a intensidade da fluorescência no citoplasma das células transfectadas com a construção 1,28 mer foi vai elevada, levando a crer que possa existir uma maior acumulação da proteína Large-S nas células transfectadas com o modelo 1,28 mer. Além disso a detecção do HBcAg, nas células transfectadas com a construção 1,28 mer se mostrou em média 3 vezes superior.

Em estudos anteriores (Roingeard et al, 1990) foram descritos três tipos de localização subcelular para o HBcAg : (a) células com localização nuclear do HBcAg, (b) células com HBcAg presente no citoplasma e (c) células com HBcAg tanto nuclear e citoplasmática. Foi demonstrado que nas culturas celulares com padrões de localização do HBcAg descritos em b e c também havia expressão do DNA do HBV nos seus meios de cultura, sugerindo que o HBcAg citoplasmático possa estar mais associado à replicação do HBV do que o HBcAg nuclear. Em nosso estudo, os diferentes padrões de localização celular do HBcAg foram observados nas células transfectadas com a construção 1,28 mer, enquanto apenas a localização citoplasmática foi observada no cccHBV.

Finalmente, novas estratégias tem sido desenvolvidas buscando a expressão eficiente de todas as proteínas do HBV em níveis mais elevados do que o obtido utilizando o cccHBV. Estes resultados demonstram a importância do desenvolvimento e comparação de metodologias alternativas, a fim de otimizar a replicação *in vitro* de HBV que possam reproduzir melhor os sistemas *in vivo*.

## VI- CONCLUSÕES

### Artigo 1

- Trinta isolados HBV/E oriundos de Angola foram caracterizados geneticamente. Dentre eles, 16 tiveram seus genomas completos analisados e os outros 14, a região pré-S/S completa.
- A análise das sequências de aminoácidos desses 30 isolados revelou a existência de um resíduo de metionina na posição 83 (Met83), encontrado em 29/30 (97%) dos isolados.
- Deleções de 1 a 18 aminoácidos de comprimento foram encontradas na região Pré-S de seis isolados, 5 deles possuem a presença simultânea dos marcadores HBsAg e anti-HBs, foram encontradas em regiões ricas em epítomos de reconhecimento por linfócitos B e T, conseqüentemente, interrompendo-os.
- Árvores filogenéticas construídas por dois métodos independentes demonstraram a existência de uma linhagem distinta, denominada provisoriamente de linhagem do Sudoeste Africano (*Southwest African lineage* – SWL), separada dos demais isolados com valor de probabilidade posterior (pp) = 1
- Foram identificadas substituições (R34K na Pré-S1 e R16K e R18K na Pré-S2) apenas em amostras com o perfil de detecção simultânea de HBsAg e anti-HBs, podendo estar relacionadas a este fenótipo.

### Artigo 2

- Vinte e seis isolados pertencentes ao HBV/A de 8 estados brasileiros (Amapá, Amazonas, Goiás, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina) foram geneticamente caracterizadas e comparadas com 110 sequências internacionais
- Diferenças na proporção A1/A2 no Brasil, baseadas em trabalhos publicados em 13 estados, foram notada entre os estados do Norte (Amapá, Amazonas, Pará, Pernambuco e Rondônia ), onde a relação

A1/A2 foi > 14 , e os estados do Sul do Paraná, Rio de Janeiro , Santa Catarina e São Paulo, onde era < 5 .

- As análises filogenéticas realizadas no presente estudo utilizando sequencias do genoma completo confirmaram a existência desse clado “asiático- americano” (pp=0,999), onde se agrupam todos os isolados do Brasil, Colômbia, Martinica, Bangladesh, Índia, Japão, Nepal , Filipinas e Emirados Árabes Unidos , França; e do clado " Africano "(pp=0.995), contendo isolados do Congo, Quênia, Malavi, Ruanda, Tanzânia, Uganda e Zimbabwe.
- Os achados presentes nesse estudo sugerem que o sudeste africano teria sido a fonte de entrada do HBV no Brasil

### **Artigo 3**

- Ensaios de imunofluorescência demonstraram maior secreção das proteína L-HBsAg e HBcAg na construção 1,28 mer em comparação com o sistema livre do vetor.
- Ambos os níveis intra e extracelulares de DNA do HBV foram mais elevados na construção 1,28 mer em comparação com o sistema livre do vetor.
- A construção 1.28 demonstrou ser mais eficiente do que o sistema livre de vetor na neo-síntese de DNA do HBV e expressão de proteínas, podendo ser uma ferramenta útil para a análise da replicação do HBV.

## VII- PERSPECTIVAS

Estudos têm investigado as possíveis razões para a elevada dispersão do genótipo E ao longo da costa oeste africana, localidade possivelmente dominada pelo HBV/A1 no período escravocrata.

Mecanismos de replicação ou de transmissão mais eficientes, levando a uma competição com conseqüente substituição do HBV/A1 por HBV/E vêm sendo sugeridos. Assim, uma comparação entre os níveis de replicação desses dois genótipos através da expressão de marcadores sorológicos, poderia demonstrar se essa substituição realmente ocorreu e se foi provocada por níveis de replicação mais elevados.

Desse modo, para trabalhos futuros, objetivamos comparar os níveis de replicação e de expressão de proteínas entre os HBV/E e HBV/A1, à exemplo da comparação realizada no artigo 3, para verificarmos a viabilidade dessa hipótese.

Pretendemos ainda, utilizando amostras de Moçambique, validar ou não a hipótese da origem do HBV/A1 circulante no Brasil ser oriundo do sudeste africano.

## VIII- PRODUÇÃO COMPLEMENTAR

1. **Serological and molecular evidence of hepadnavirus infection in swine.** Vieira YR, Vieira AA, Zanella JRC, Barquero G, **Lago BV**, Gomes SA, Silva MFM, Santos DRL, Pinto MA, de Paula VS. Ann Agric Environ Med. 2014. pISSN 1232-1966. eISSN 1898-2263. Aceito para publicação.

2. **Phylogeography and evolutionary history of hepatitis B virus genotype F in Brazil.** Mello FC, Araujo OC, **Lago BV**, Motta-Castro AR, Moraes MT, Gomes SA, Bello G, Araujo NM. Virol J. 2013 Jul 16;10:236. doi: 10.1186/1743-422X-10-236.PMID:23855930
  
3. **Detection of mixed populations of wild-type and YMDD hepatitis B variants by pyrosequencing in acutely and chronically infected patients.** Mello FC, **Lago BV**, Lewis-Ximenez LL, Fernandes CA, Gomes SA. BMC Microbiol. 2012 Jun 6;12(1):96. PMID: 22672436.
  
4. **Prevalence of hepatitis B virus infection among tuberculosis patients with or without HIV in Goiânia City, Brazil.** Aires RS, Matos MA, Lopes CL, Teles SA, Kozłowski AG, Silva AM, Filho JA, **Lago BV**, Mello FC, Martins RM. J Clin Virol. 2012 Aug;54(4):327-31. doi: 10.1016/j.jcv.2012.04.006. Epub 2012 May 18. PMID:22608842.
  
5. **Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda, Angola.** Valente F, **Lago BV**, Castro CA, Almeida AJ, Gomes SA, Soares CC. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010 Dec;105(8):970-7. PMID:21225192

## IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas Z, Jafri W, Hamid S. Management of Hepatitis B: Pakistan Society for the Study of Liver Diseases (PSSLD) Practice Guidelines. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2010; 20(3):198-01.
2. Abebe A, Nokes DJ, Dejene A, Enquesslassie F, Messele T, Cutts FT. Seroepidemiology of hepatitis B virus in Addis Ababa, Ethiopia: transmission patterns and vaccine control. *Epidemiol Infect.* 2003;131: 757– 70.
3. Allain JP, Candotti D, Soldan K, Sarkodie F, Phelps B, Giachetti C et al. The risk of hepatitis B virus infection by transfusion in Kumasi, Ghana. *Blood.* 2003; 101: 2419– 25.
4. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology.* 1998; 27:1670-77.
5. Alvarado-Mora MV<sup>1</sup>, Botelho L, Gomes-Gouvêa MS, de Souza VF, Nascimento MC, Pannuti CS, et al. Detection of Hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhão, Brazil. *Viol J.* 2011 Aug 25;8:415.
6. Alvarado Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. *J Gen Virol.* 2010; 91(Pt 2):501-08.
7. Andernach IE, Nolte C, Pape JW, Muller CP. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(8):1222-28.
8. Andernach IE, Hunewald OE, Muller CP. Bayesian inference of the evolution of HBV/E. *PLoS One.* 2013; 8(11): e81690.
9. Araujo NM, Mello FC, Yoshida CF, Niel C, Gomes SA. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. *Arch Virol.* 2004; 7:1383 – 95.
10. Arauz-Ruiz P, Norder H, Visoná KA, Magnius LO. Genotype F prevails in HBV infected patients of hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. *J Med Virol.* 1997; 51(4):305-12.
11. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* 2002; 83:2059– 73.
12. Arruda, JJ. Da Idade Média ao Renascimento do Mundo Moderno. *História Integrada.* Ed. Ática.1995; 2: 95-107.
13. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology.* 1983; 20(1):23-31.

14. Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, et al. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmyc protooncogene at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;176(3):985-92.
15. Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK, Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol*. 1972; 109(4):842-48.
16. Bartholomeusz A, Groenen LC, Locarnini SA. Clinical experience with famciclovir against hepatitis B virus. *Intervirology*. 1997; 40(5-6):337-42.
17. Bayer ME, Blumberg BS, Werner B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature*. 1968; 218(5146):1057-59.
18. Bekondi C, Olinger CM, Boua N, et al. Central African Republic is part of the West-African hepatitis B virus genotype E crescent. *J Clin Virol*. 2007; 40:31-37.
19. Blitz L, Pujol FH, Swenson PD, et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J of Clin Microbiol*. 1998; 36(3):648-51.
20. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, et al. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*. 1967; 66(5):924-31.
21. Bowyer SM, Van Staden L, Kew MC, et al. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. *J Gen Virol*. 1997; 78 (Pt 7):1719-29.
22. Buckwold VE, Xu Z, Chen M, et al. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol*. 1996; 70(9):5845-51.
23. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, et al. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely " occult"? *Hepatology*. 2001; 34: 194-03p.
24. Brichtler S, Lagathu G, Chekaraou MA, et al. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J Gen Virol* . 2013; 94: 2318–29.
25. Brunetto AL, Pearson AD, Gibson R, et al. The effect of pharmacological modification of gastric emptying and mouth-to-caecum transit time on the absorption of sugar probe marker molecules of intestinal permeability in normal man. *Eur J Clin Invest*. 1990; 20(3):279-84.
26. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res*. 2004;106(2):199-209.

27. Cai SH, Lv FF, Zhang YH, Jiang YG, Peng J Dynamic comparison between Daan real-time PCR and Cobas TaqMan for quantification of HBVDNA levels in patients with CHB. *BMC Infect Dis.* 2014 Feb 14;14:85.
28. Candotti D, Danso K, Allain JP. Maternofetal transmission of hepatitis B virus genotype E in Ghana, West Africa. *J Gen Virol.* 2007; 88:2686-95.
29. Carey WD. The prevalence and natural history of hepatitis B in the 21st century. *Cleve Clin J Med.* 2009; 76 Suppl 3:S2-5.
30. Carrilho JF e Silva LC. Epidemiologia. In: da Silva, LC. *Hepatites Agudas e Crônicas.* São Paulo: Savier. 1995; 73-95.
31. CDC. Hepatitis information for the public: Viral hepatitis. 2009 [Acesso em: 14/04/2010]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hepatitis>.
32. Chan HLY, Lok ASF. Hepatitis B in adults: A clinical perspective. *Hep B Clins in liver dis.* 1999; 3 (2) 291-08.
33. Chen BF, Liu CJ, Jow GM, et al. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterol.* 2003; 130: 1153–68.
34. Chien RN. On-treatment monitoring of chronic hepatitis B virus infection: An Asian–Pacific perspective. *J of Gastroenterol and Hepatol.* 2010; 25: 852-57.
35. Chisari FV e Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:29–60.
36. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Scien.* 1989; 244(4902):359-62.
37. Couroucé-Pauty AM, Plançon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang.* 1983; 44(4):197-11.
38. Coursaget P, LeCann P, Leboulleux D, et al. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in HBsAg negative Senegalense patients suffering from cirrhosis or primary liver cancer. *FEMS Microbiol Lett.* 1991; 67:35-39.
39. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus–like particles in serum of patients with Australian-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1970; 695-98.
40. Davison F, Alexander GJ, Trowbridge R, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication. *J of Hepatol.* 1987; 4(1):37-44.
41. De Clercq E. Antivirals: past, present and future. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(6):727-44.
42. Devesa M, Rodríguez C, León G, et al. Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. *J Med Virol.* 2004; 72(3):377-84.



43. Dupinay T, Restorp K, Leutscher P et al. High prevalence of hepatitis B virus genotype E in Northern Madagascar indicates a West-African lineage. *J Med Virol* . 2010; 82: 1515–26.
44. Elghouzzi MH, Couroucé AM, Magnius LO, et al. Transmission of hepatitis B virus by HBV-negative blood tranfusion. *Lancet*, 1995; 346:64.
45. Farrel GC. Chronic viral hepatitis. *Gastroenterol*.1998; 168:619-26.
46. Fattovich G, Giustina G, Favarato S, et al. A survey of adverse events in 11,241 patients with chronic viral hepatitis treated with alfa interferon. *J Hepatol*. 1996; 24(1):38-47.
47. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Scien*. 1973; 182(116):1026-28.
48. Flichman DM, Blejer JL, Livellara BI, Re VE, Bartoli S, et al. Prevalence and trends of markers of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human Immunodeficiency virus in Argentine blood donors.. *BMC Infect Dis*. 2014 Apr 23;14(1):218.
49. Fujiwara K, Tanaka Y, Orito E, et al. Distribution of HBV genotypes among HBV carriers in Benin: phylogenetic analysis and virological characteristics of HBV genotype E. *World J Gastroenterol*. 2005; 11:6410–15.
50. Ganne-Carrie´ N, Williams V, Kaddouri H et al Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). *J Med Virol*. 2006;78: 335–40.
51. Ganem D. Hepadnaviridae: The viruses and their replication. In *Virology Fields* BN, Knipe DM et al. Howley, 3<sup>rd</sup> edn. Philadelphia. Lipponcott-Raven, 1996; 2703-3737.
52. Ganem D e Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem*. 1987; 56:651-93.
53. Ganem D e Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. 2004; 350(11):1118-29.
54. Gardner HT. A note on the history of epidemic viral hepatitis in Germany. *Am J Med*. 1950; 8: 561-64.
55. Garmiri P, Loua A, Haba N, et al. Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, West Africa. *J Gen Virol*. 2009; 90(Pt 10):2442-51.
56. Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell*. 1980; 21 (3): 801-09.
57. Gomes SA. In *O vírus da Hepatite B*. Tratado de Hepatites virais. Editora Athenem. 2003; 119-25.
58. Gonçalves F L. Hepatite por vírus B. In: Focaccia R. *Tratado das Hepatites Virais*. São Paulo: Atheneu; 1997; 27-49.

59. Ghosh S, Banerjee P, Deny P et al. New HBV subgenotype D9, a novel D/C recombinant, identified in patients with chronic HBeAg-negative infection in Eastern India. *J Viral Hepat.* 2013; 20(3):209-18.
60. Günther S, Li B, Miska S, et al. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol.* 1995; 69(9):5437-44.
61. Hannoun C, Söderström A, Norkrans G, et al. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *J Gen Virol.* 2005; 86(Pt 8):2163-67.
62. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, et al. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J of Virol.* 1984; 52(2):396-02.
63. Heijntink RA, Van-Hattum J, Schalm SW et al. Co-occurrence of HBsAg and anti-HBs: two consecutive infections or a sign of advanced chronic liver disease? *J Med Virol.* 1982; 10: 83–90.
64. Hollinger FB. in: Fields BN, Knipe DM, et al. *Fields Virol.* Lippincot-Raven. 1996; 2(85): 2739-07.
65. Hu DY, Moon HB, Son JK, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J Hepatol.* 1999;31:123-32.
66. Hu X, Margolis HS, Purcell RH, et al. Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(4):1661-64.
67. Hubschen JM, Andernach IE, Muller CP. Hepatitis B virus genotype E variability in Africa. *J Clin Virol.* 2008; 43: 376–80.
68. Hübschen JM, Mbah PO, Forbi JC, et al. Detection of a new subgenotype of Hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 17(1):88-94.
69. Huy TT, Ushijima H, Quang VX, et al. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol.* 2004; 85(Pt 2):283-92p.
70. Iacomì F, Vincenti D, Vairo F, et al. Effect of HIV co-infection on mutation patterns of HBV in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *J Med Virol.* 2009; 81(7):1151-6p.
71. ICTV, 2009. Hepatitis B Virus. [Acesso em 14/04/2010]. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/index.asp?bhcp=1>
72. IPEA – Instituto de pesquisa econômica aplicada. Comunicados do Ipea nº 91: Dinâmica demográfica da população brasileira, 2011; 3-18.
73. IPEA – Instituto de pesquisa econômica aplicada. Boletim de políticas sociais 4 – Acompanhamento e análise, 2013; 19-21.

74. Jang JS, Kim HS, Kim HJ et al. Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol.* 2009; 81: 1531–38.
75. Abdool Karim SA, Thejpal R, Coovadia H. Household clustering and intra-household transmission patterns of hepatitis B virus infection in South Africa. *Interl J Epidemiol.* 1991; 20:495-03.
76. Kew MC. Chronic hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Africa. *S Afr J Scien.* 1992; 88: 524– 28.
77. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 6): 1267–80.
78. Kiire CF. The epidemiology and prophylaxis of hepatitis B in sub-Saharan Africa: a view from tropical and subtropical Africa. *Gut.*1996; 38:05-12.
79. Klein HS. *The Atlantic slave trade.* Cambrid. Second Edition 2010; 105-88.
80. Koshiha L, Frayze DMP. *A História do Brasil.* 1996
81. Kramvis A, Weitzmann L, Owiredu WK. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 4):835-39p.
82. Kramvis A e Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccin.* 2005; 23: 2409–23.
83. Kramvis A, Restorp K, Norder H, et al. Full genome analysis of hepatitis B virus genotype E strains from South-Western Africa and Madagascar reveals low genetic variability. *J Med Virol.* 2005; 77: 47–52.
84. Kramvis A e Kew MC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatol Research.* 2007a; 37: 09-19
85. Kramvis A e Kew MC. Molecular characterization of subgenotype A1 (subgroup Aa) of hepatitis B virus. *Hepatol Res.* 2007b; 37: 27-32.
86. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, et al. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol.* 2008; 80(1):27-46.
87. Krugman S. Hepatitis B: historical aspects. *Am J Infect Control.* 1989;17(3):165-67.
88. Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, et al. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol.* 2005; 86: 2047– 56.
89. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res.* 2010; 40(1):14-30.
90. Lago, BV e Gomes SA. Análises moleculares e filogenéticas de isolados do vírus da hepatite B em Luanda, Angola–Rio de Janeiro. *Dissertação (Mestrado em Biologia*

Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz; Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, 2010.

91. Lai CL e Yuen MF. Profound suppression of hepatitis B virus replication with lamivudine. *J Med Virol.* 2000; 61(3):367-73.
92. Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, et al. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(10):5757-61.
93. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol.* 2005; 34:S1-3.
94. Le Bouvier GL. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis.* 1971; 123(6):671-75.
95. Lee BS, Cho YK, Jeong SH et al. Nationwide seroepidemiology of hepatitis B virus infection in South Korea in 2009 emphasizes the coexistence of HBsAg and anti-HBs. *J Med Virol.* 2013; 85: 1327–33.
96. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med.* 1997; 337: 1733-45.
97. Levene C, Blumberg BS. Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. *Natur.* 1969; 221(5176):195-96.
98. Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, et al. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology.* 1999; 30(2):567-72.
99. Ling R e Harrison TJ. Functional analysis of mutations conferring lamivudine resistance on hepatitis B virus. *J of Gen Virol.* 1999; 80:601-06.
100. Lien JM, Petcu DJ, Aldrich CE, et al. Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J Virol.* 1987; 61 (12):3832-40.
101. Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis* 25 , 2005; Suppl 1: 9-19.
102. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology.* 2007; 46(1):254-65.
103. Lyra LG, Damasceno AP, Cotrim P, et al. Prevalence of antibody to hepatitis B virus in a urban population in the Northeast Brazil. *Rev do Instit de Med Trop de São Paulo.* 1986; 28(6):406-09.
104. MacCallum FO. Early studies of viral hepatitis. *Br. Med. Bull.* 1972; 22 (2):105-13.
105. Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, et al. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77(5):2941-45.
106. Martel N, Gomes SA, Chemin I, et al. Improved rolling circle amplification (RCA) of hepatitis B virus (HBV) relaxed-circular serum DNA (RC-DNA). *J Virol Methods.* 2013; 193: 653–59.

107. Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol.* 1980; 36(3):829-36.
108. Mathet VL, Cuestas ML, Ruiz V, et al. Detection of hepatitis B virus (HBV) genotype E carried—even in the presence of high titers of anti-HBs antibodies—by an Argentinean patient of African descent who had received vaccination against HBV. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 3435–39.
109. Matos MA, Reis NR, Kozlowski AG, et al. Epidemiological study of hepatitis A, B and C in the largest Afro-Brazilian isolated community. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009; 103(9):899-05.
110. Mbayed VA, López JL, Telenta PF, et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. *J of Clinl Microbiol.* 1998; 36(11):3362-65.
111. Menendez C, Sanchez-Tapias JM, Kahigwa E, et al. Prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis viruses B, C, and E in Southern Tanzania. *J Med Virol.* 1999; 58: 215– 20.
112. Merican I, Guan R, Amarapuka D, et al. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 15:1356–61.
113. Miyakawa Y e Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirol.* 2003; 46(6): 329–38.
114. Moraes MT, Niel C, Gomes SA. A polymerase chain reaction-based assay to identify genotype F of hepatitis B virus. *Braz J of Med Biol Res.* 1999; 32(1):45-49.
115. Moresco MN, Virgolino HD, de Moraes MP, da Motta-Passos I, Gomes-Gouvêa MS, de Assis LM, Aguiar KR, Lombardi SC, Malheiro A, Cavalheiro ND, Levi JE, Torres KLOccult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. *Vox Sang.* 2014 Feb 21.
116. Morris CJ, Hill M, de Medina M, Herman C, Cloherty GA, Martin P. Comparison of detection and quantification of HBV DNA in chronic HBeAg negative and positive patients by Abbott RealTime HBV and Roche Cobas TaqMan HBV assays. *J Virol Methods.* 2013 Nov;193(2):391-3.
117. Moryiama K. Enhanced core protein production by hepatitis B virus bearing a mutation in the precore region. *Arch Virol.* 1997;142(6):1263-71.
118. Mosley JW, Huang W, Stram DO, et al. Donor levels of serum alanine aminotransferase activity and antibody to hepatitis B core antigen associated with recipient hepatitis C and non-B, non-C outcomes. *Transfus.* 1996; 36(9):776-81.
119. Motavaf M, Safari S, Saffari Jourshari M, Alavian SM. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: the role of the virus x protein. *Acta Virol.* 2013;57(4):389-96.

120. Motta-Castro AR, Yoshida CF, Lemos ER, et al. Seroprevalence of Hepatitis B virus infection among an Afro-descendant community in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98(1):13-17.
121. Motta-Castro AR, Martins RM, Yoshida CF, et al. Hepatitis B virus infection in isolated Afro-Brazilian communities. *J Med Virol.* 2005; 77: 188– 93.
122. Motta-Castro AR, Martins RM, Araujo NM, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. *Arch Virol.* 2008;153(12):2197-205.
123. Mphahlele MJ, François G, Kew M, et al. Epidemiology and control of hepatitis B: Implications for eastern and southern Africa. *SA J Epidemiol Infect.* 2002; 17:12-17.
124. Mulders MN, Venard V, Njayou M, et al. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *Infect Dis.* 2004; 190(2):400-08.
125. Mulyanto, Depamede SN, Wahyono N et al. Analysis of the full-length genomes of novel hepatitis B virus subgenotypes C11 and C12 in Papua, Indonesia. *J Med Virol.* 2011; 83(1): 54-64.
126. Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol.* 2001; 36(10):651-60.
127. Mutimer D. Hepatitis B virus infection: resistance to antiviral agents. *J of Clin Virol.* 2001; 21(3):239-42.
128. Nassal M e Schaller H. Hepatitis B virus replication--an update. *J Viral Hepat.* 1996; 3(5):217-26.
129. Nassal M e Rieger A. An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys61 determines the structure of the secretory core gene product (e antigen) of hepatitis B virus. *J Virol.* 1993; 67(7):4307-15.
130. Ninomiya M, Takahashi M, Shimosegawa T, et al. Analysis of the entire genomes of fifteen torque teno midi virus variants classifiable into a third group of genus Anellovirus. *Arch Virol.* 2007; 152(11):1961-75.
131. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 241(1):92-97.
132. Norder H, Courcoce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology.* 1994; 198 (2): 498-03.
133. Norder H, Courcoce AM, Magnius LO, et al. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol.* 1993; 74: 1341-48.

134. Norder H, Hammas B, Lofdahl S, et al. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol.* 1992; 73 (Pt 5):1201-08.
135. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*. 1994;198: 489–03.
136. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004; 47:289-09.
137. Odemuyiwa SO, Mulders MN, Oyedele OI, et al. Phylogenetic analysis of new hepatitis B virus isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol.* 2001. Nov;65(3):463-69
138. Ogata N, Fujii K, Takigawa S, et al. Novel patterns of amino acid mutations in the hepatitis B virus polymerase in association with resistance to lamivudine therapy in Japanese patients with chronic hepatitis B. *J of Med Virol.* 1999; 59:270-76.
139. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1988; 69 (Pt 10):2575-83.
140. Olinger CM, Venard V, Njayou M, et al. Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol.* 2006 ; 87: 1163– 73.
141. Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(11):1777-80.
142. Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, et al. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Gen Mol Res.* 2008; 7(3)861-71p.
143. Owiredu WK, Kramvis A, Kew MC. Molecular analysis of hepatitis B virus genomes isolated from black African patients with fulminant hepatitis B. *J Med Virol.* 2001; 65(3):485-92.
144. Pas SD e Niesters HG. Detection of HBV DNA using real time analysis. *J Clin Virol.* 2002; 25(1):93-94.
145. Pereira LM, Martelli CM, Merchán-Hamann E, et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 ; 81(2):240-07.
146. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyaei S, Lemey P et al. Are hepatitis B virus “subgenotypes” defined accurately? *J Clin Virol.* 2010; 47: 356–60.

147. Pourkarim MR, Lemey P, Amini-Bavil-Olyaei S, et al. Novel hepatitis B virus subgenotype A6 in African-Belgian patients. *J Clin Virol*. 2009; 47(1):93-96.
148. Pourkarim MR, Lemey P, Amini-Bavil-Olyaei S et al. Molecular characterization of hepatitis B virus strains circulating in Belgian patients co-infected with HIV and HBV: Overt and occult infection. *J Med Virol* . 2011; 83: 1876–1884.
149. Prince AM. Relation of Australia and SH antigens. *Lancet*. 1968; 2(7565):462-63.
150. Pult I, Netter HJ, Bruns M, et al. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virol*. 2001; 289(1):114-28.
151. PRVL – Programa de redução da violência letal contra adolescentes e jovens 2010. [Acesso em 04/03/2014]. Disponível em: <<http://prvl.org.br/>>.
152. Rapicetta M, Stroffolini T, Ngatchu T, et al. Age- and sex-related study of HBV-DNA in HBsAg asymptomatic children from an endemic area (Cameroon). *Ann Trop Paediatr*. 1991.11: 325– 29.
153. Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*. 1977; 18(12):997-03.
154. Rizzetto M. Viral hepatitis in the third millennium. *Res of Virol*. 2002; 149: 251-56p.
155. Robertson BH e Margolis HS. Primate hepatitis B viruses – genetic diversity, geography and evolution. *Rev Med Virol*. 2001; 12(3): 133–41.
156. Salvatori L., Lavorino C., Giglio A. et al. Seroprevalence of anti-human parvovirus B19 antibodies in patients attending a centre for sexually transmitted diseases. *New Microbiol*. 1999; 22 (3): 181-86.
157. Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Scien*. 1986; 232 (4749): 477-84.
158. Seeger C & Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64(1):51-68.
159. Sheldon J, Soriano V. Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Apr;61(4):766-8. doi: 10.1093/jac/dkn014.
160. Sherlock S. The natural history of hepatitis B. *Postgrad med J*. 1987; 63(2): 7-11.
161. Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, et al. Characterization of seven genotypes (A to E, G and H) of hepatitis B virus recovered from Japanese patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Med Virol*. May. 2005; 76(1):24-32.
162. Shiels MT, Taswell HF, Czaja AJ et al. Frequency and significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody in acute and chronic hepatitis B. *Gastroenterol*. 1987; 93: 675–80.



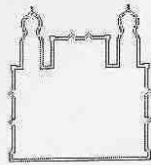
163. Shimazu T, Takada S, Ueno Y, et al. Post-transcriptional control of the level of mRNA by hepatitis B virus X gene in the transient expression system using human hepatic cells. *Gen Cells*. 1998; 3(7):477-84.
164. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med*. 1995; 1(6):564-69.
165. Sitnik R, Sette H Jr, Santana RA, et al. Hepatitis B virus genotype E detected in Brazil in an African patient who is a frequent traveler Brazilian. *J of Med and Biol Res*. 2007; 40: 1689-92.
166. Sjogren M. Serologic diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterol Clin North Amer*. 1994; 23:457-78.
167. Slagle BL, Lee TH, Medina D, et al. Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus S gene. *Mol carc*. 1996; 15(4): 261-69.
168. Souto FJD. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para o seu controle. *GED*. 1999;18 (4): 143-50.
169. Steele AD e Bos P Hepatitis B and C virus infection in adult volunteers in Angola. *S Afr Med J*. 1996; 86(6): 701-02.
170. Song BC, Cui XJ, Kim HU, et al. Sequential accumulation of the basal core promoter and the precore mutations in the progression of hepatitis B virus-related chronic liver disease. *Intervirol*. 2006; 49(5):266-73.
171. Spandau DF e Lee CH. Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol*. 1988; 62(2):427-34.
172. Sprengel R, Kaleta EF, Will H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol*. 1988; 62(10):3832-39.
173. Strand RT, Franque-Ranque M, Bergström S, et al. Infectious etiology of jaundice among pregnant women in Angola. *Scand J Infect Dis*. 2003; 35:401-03.
174. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J of Gen Virol*. 2000; 81(Pt 1):67-74.
175. Strauss RT, Franque-Ranque M, Bergström S, et al. Infectious etiology of jaundice among pregnant women in Angola. *Scand J Infect Dis*. 2003; 35:401-03.
176. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2000; 81(Pt 1): 67-74.
177. Sugauchi F, Orito E, Kato H, et al. Genotype, serotype, and phylogenetic characterization of the complete genome sequence of hepatitis B virus isolates from Malawian chronic carriers of the virus. *J of Med Virol*. 2003; 69(1):33-40.

178. Sugauchi F, Kumada H, Acharya AS, et al. Epidemiological and sequence difference between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *J Gen Virol.* 2004a; 85:811–20.
179. Sugauchi F, Kumada H, Sakugawa H, et al. Two subtypes of genotype B (Ba and Bj) of hepatitis B virus in Japan. *Clin Infect Dis.* 2004b ; 38(9): 1222-28.
180. Summers J, O'Connell A, Maupas P, et al. Hepatitis B virus DNA in primary hepatocellular carcinoma tissue. *J Med Virol.* 1978; 2(3):207-14.
181. Summers J & Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.* 1982; 29(2):403-15.
182. Sung JL, 1990. Hepatitis B virus eradication strategy for Asia. The Asian Regional Study Group. *Vaccin;* 8:95-98.
183. Tanaka Y, Hasegawa I, Kato T, et al. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatol.* 2004; 40: 747– 55.
184. Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov EI, et al. Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirol.* 2000 ;43(2):119-23.
185. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.* 2009; 83(20):10538-47.
186. Thedja MD, Muljono DH, Nurainy N et al. Ethnogeographical structure of hepatitis B virus genotype distribution in Indonesia and discovery of a new subgenotype, B9. *Arch Virol.* 2011; 156(5): 855-68.
187. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Natur.* 1985; 317(6037):489-95p.
188. Tonetto PA, Gonçalves NS, Fais VC et al. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. *BMC Infect Dis.* 2009; 9:149.
189. Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, et al. Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virol.* 2002; 293, 305-13.
190. Tran TT, Trinh TN e Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol .* 2008; 82(11): 5657-63.
191. Tsang TK, Blei AT, O'Reilly DJ et al. Clinical significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody positivity. *Dig Dis Sci.*1986; 31:620–24.
192. Tuttleman JS, Pourcel C e Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell.* 1986; 47(3): 451-60.

193. Valente F, Lago BV, Castro CA, et al. Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda, Angola. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105: 970–77.
194. VanDamme P e Vellinga A. Epidemiology of hepatitis B and C in Europe. *Acta Gastroenterol Belg*. 1998; 61 (2): 175-82.
195. Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, et al. The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol*. 1988; 69 (Pt 6):1383-89.
196. Wang YM, Ng WC, Kang JY et al. Serological profiles of hepatitis B carrier patients in Singapore with special reference to the frequency and significance of concurrent presence of HBsAg and anti-HBs. *Singap Med J* .1996; 37: 150–52.
197. WHO. 1953. Expert Committee on Hepatitis. First Report. World Health Organization Technical Report Series No. 62. pp 26. Geneve, WHO. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2(4): 756p.
198. WHO. 2000. Hepatitis B. World Health Organization; 204. [Acesso em 03/02/2014]. Disponível em: <http://who.int/inf-fs/en/fact204.html>.
199. WHO. 2004a Hepatitis B vaccines. *Weekly Epidemiological Records*.; 79:255-63.
200. WHO. 2004b. Position paper on Hepatitis B. Immunization, Vaccines and Biologicals.
201. Will H, Reiser W, Weimer T, et al. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol*. 1987; 61(3): 904-11.
202. Wong V & Chan H. Chronic hepatitis B: a treatment update. *Semin Liver Dis*. 2013; 33(2):122-9.
203. Wong DC, Purcell RH, Rosen L. Prevalence of antibody to hepatitis A and hepatitis B viruses in selected populations in the South Pacific American. *J of Epidemiol*. 1979; 110(3):227-36.
204. Xu C, Zhou W, Wang Y, Qiao L. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2014 Apr 10;345(2):216-22.
205. Zhang D, Dong P, Zhang K, et al. Whole genome HBV deletion profiles and the accumulation of preS deletion mutant during antiviral treatment. *BMC Microbiol*.2012; 12: 307
206. Zhou YZ, Slagle BL, Donehower LA, et al. Structural analysis of a hepatitis B virus genome integrated into chromosome 17p of a human hepatocellular carcinoma. *J Virol*. 1988; 62(11):4224-31.
207. Zhou DX, Taraboulos A, Ou JH, et al. Activation of class I major histocompatibility complex gene expression by hepatitis B virus. *J Virol*. 1990; 64(8):4025-28.

X.ANEXOS:

X.1.ANEXO 1:



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 11 de julho de 2007.

Carta: 040/07

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Selma De Andrade Gomes e  
- Dra. Elizabeth F. Rangel

Prezadas Senhoras,

Estamos encaminhando a carta do protocolo **362/07** intitulado “**Estudos epidemiológicos e moleculares do vírus da Hepatite B em Angola**” que está **APROVADO**.

Atenciosamente

## Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

**Título do Projeto:** ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES DO VÍRUS DA HEPATITE B EM ANGOLA

**Pesquisador Responsável:** SELMA DE ANDRADE GOMES

**Data da Versão**

**Cadastro:** 362/06

**Data do Parecer:** 25/06/2007

**Grupo e Área Temática:** I.8 Cooperação estrangeira

### Objetivos do Projeto

DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA DO ANTIGENO DE SUPERFÍCIE DO HBV (HBsAG) E DO GENÓTIPO EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PARA O HBV NA REPÚBLICA DE ANGOLA. COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS COM OS DADOS DO PROJETO "ESTUDOS MOLECULARES DO VÍRUS DA HEPATITE B" APROVADO PELA CONEP PELO PARECER 736/2004.

### Sumário do Projeto

Estudar o padrão da infecção pelo HBV na população angolana em amostragem de 1.000 amostras de soro colhidas em bancos de sangue daquele país.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Comentário
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

<b>Introdução</b>	Adequada
-------------------	----------

Comentários sobre a Introdução

<b>Objetivos</b>	Adequados
------------------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Comentário
Tamanho de amostra	Total 1.000 Local
Cálculo do tamanho da amostra	Não necessário (pesquisa quali)
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crterios de inclusão e exclusão	Comentário
Relação risco-benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - qualitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Comentário
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	
Data de início prevista	Adequado
Data de término prevista	Não especificado
	Comentário

ANEXO 1 (cont):

Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não
Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento	
Cronograma de seis anos com modificações a cada dois anos ?	
Referências Bibliográficas	Adequadas
Comentários sobre as Referências Bibliográficas	

Recomendação

**Aprovar**

Comentários Gerais sobre o Projeto

Após análise por este colegiado das respostas às pendências suscitadas no parecer de 28/05/2007, tendo por referência as normas e diretrizes da Resolução 196/96, foi decidido pela **APROVAÇÃO** do referido protocolo. Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais/anuais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.



**Marlehe Braz**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz

## X.2. ANEXO 2: METODOLOGIA UTILIZADA

### X.2.1. AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIRAL POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E CLONAGEM MOLECULAR.

O genoma completo do HBV extraído foi amplificado por PCR. Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do genoma completo do HBV foram P1, como oligonucleotídeo senso, e P2, como anti-senso (Tabela 1), gerando um produto de PCR com aproximadamente 3200 pares de bases (pb) de extensão correspondente à totalidade do genoma do HBV (Ghunter, *et al.* 1995).

Para a amplificação por PCR, foram utilizados 2  $\mu$ L do DNA extraído do soro em um volume final de 50  $\mu$ l em mix de acordo com instruções para a enzima *Elongase*. A reação de PCR foi realizada em um termociclador, nas seguintes condições: 1 minuto a 94°C, 10 ciclos de 94°C por 40 segundos, 52°C por 1 minuto e 30 segundos e 68°C por 3 minutos. Em seguida, foram realizados outros 10 ciclos nas seguintes condições: 94°C por 40 segundos, 52°C por 1 minuto e 30 segundos e 68°C por 5 minutos. Finalmente, seguiram-se mais 10 ciclos a 94°C por 40 segundos, 52°C por 1 minuto e 30 segundos e 68°C por 7 minutos.

Uma alíquota do produto da PCR obtida (10  $\mu$ L) foi, então, aplicada em gel de agarose a 0,8%, submetido à eletroforese em tampão TBE (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2,5 mM de EDTA; pH 7,5-7,8), corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e as bandas visualizadas sob luz ultra-violeta (UV).

Para a etapa de clonagem molecular, foi utilizada a metodologia descrita por Ghünter (1995):

Os produtos da PCR e o vetor pUC19 (Invitrogen) foram digeridos com a enzima *Sst*I (GAGCTC) respectivamente, no par de oligonucleotídeos P1-P2 utilizados na amplificação do genoma completo do HBV e no sítio de múltipla clonagem do vetor Puc19. Em seguida, o vetor foi tratado com a enzima CIAP (Fosfatase alcalina Invitrogen – 1000 unidades), visando minimizar os efeitos de uma possível recircularização do vetor.

A-

HindIII    SstI    SapI    HBV 5' 1821-1841 3'

**P1** CCGGA AAGCTT GAGCTCTTC TTTTCACCTCTGCCTAATCA

HBV 5' 1825-1806 3'

**P2** CCGGA AAGCTT GAGCTCTTC AAAAAGTTGCATGGTGCTGG

B-

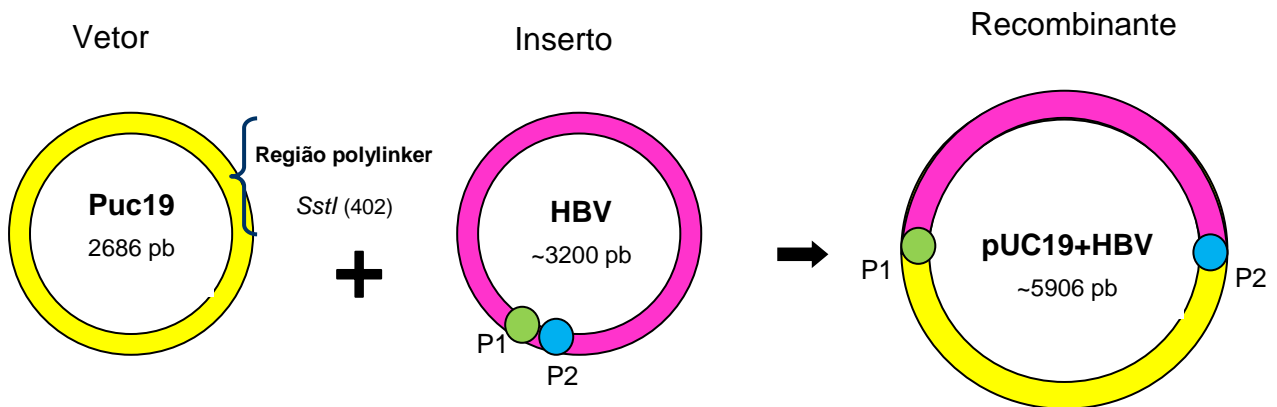


Figura 10.12: Esquema utilizado na clonagem do genoma completo do HBV no vetor pUC19.

A- Primers utilizados para a amplificação do genoma completo, contendo sítio de restrição para possíveis enzimas utilizadas para clonagem. A enzima utilizada foi a *SstI*. B- Vetor, inserto e esquema de plasmídeo recombinante.

O vetor pUC19 digerido e o inserto (genoma completo do HBV digerido) foram ligados pela enzima T4 DNA ligase (4 unidades), a 15°C por 16 horas.

Em seguida, o conjunto inserto-vetor (5906 pares de base) foi transformado em *E. coli* quimicamente competente, extraído em grande e mega escala (maxi-preparação plasmidial, utilizando kits comerciais), purificados e transfectados em linhagem celular Huh7.



**Tabela 10.2** – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR e/ou sequenciamento do genoma completo do HBV

Oligonucleotídeo	Posição no genoma*	Sequência
<b>PS1</b> (senso)	nt 2826 – 2845	5'-CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3'
<b>PS2</b> (anti-senso)	nt 143 – 124	5'-GGT CCC CAG TCC TCG AGA AG-3'
<b>PS4</b> (senso)	nt 3194 – 3218	5'- ACA CTC ATC CTC AGG CCA TGC AGT G -3'
<b>PS8</b> (anti-senso)	nt 82 – 63	5' - TTC CTG AAC TGG AGC CAC CA -3'
<b>P01</b> (senso)	nt 2470 – 2488	5'- GGA CTC ATA AGG TGG GGA A-3'
<b>P1</b> (senso)	nt 1821 – 1841	5'- CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA-3'
<b>P2</b> (anti-senso)	nt 1825 – 1806	5'- CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G -3'
<b>P3</b> (anti-senso)	nt 1019 – 1000	5'- AAA GCC CAA AAG ACC CAC AA-3'
<b>S2</b> (anti-senso)	nt 841 – 819	5'-GGG TTT AAA TGT ATA CCC AAA GA-3'
<b>S1</b> (senso)	nt 124-143	5'- CTT CTC GAG GAC TGG GGA CC-3'
<b>S4</b> (senso)	nt 416 – 436	5'- TGC TGC TAT GCC TCA TCT TCT-3'
<b>S18</b> (senso)	nt 743 – 765	5'- GGATGATGTGGTATTGGGGGCCA-3'
<b>X1</b> (senso)	nt 1363 – 1382	5' - ACC TCC TTT CCA TGG CTG CT – 3'
<b>X3</b> (anti-senso)	nt 1382 – 1363	5' - AGC AGC CAT GGA AAG GA <sub>g</sub> GT – 3'
<b>C3</b> (anti-senso)	nt 2056 – 2075	5' - TTG CCT GAG TGC AGT ATG GT – 3'
<b>C5</b> (senso)	nt 2299 – 2319	5' – AGA CCA CCA AAT GCC CCT ATC – 3'

### X.2.2. CONSTRUÇÃO CONTENDO 1,28 UNIDADES DO GENOMA DO HBV

A construção molecular contendo 1,28 unidades de genoma do HBV foi obtida conforme descrito por Bhoola e colaboradores (Bhoola *et al.*, 2014).

Resumidamente, o genoma completo do HBV foi clonado através do método de Gunther, conforme anteriormente descrito (Gunther *et al.*, 1995).

Em seguida, uma alíquota (~70ng) do genoma completo do HBV DNA foi amplificado utilizando oligonucleotídeos que resultaram na adição de sítios de restrição para a enzima *Nsi* nas extremidades 5' - 3' dos produtos de PCR (*Nsi* FL F, sentido, nt 1055-1070 , 5' -CCT GCA TTA ATG CCT TTG TAT GCA TG- 3' *Nsi* FL R, antisenso , nt 1066 -1088 ; 5' -CCG TGT TTC TGT GCT ATA CAT CG - 3 '). Esse produto de PCR foi então digerido com a enzima de restrição *Nsi*.

Em seguida, foi gerado um outro produto de de PCR contendo um fragmento da região da polimerase+região X do HBV, com ~0,9 kb. Os oligonucleotídeos utilizados continham sítios de restrição para as enzimas *Nsi*, a 5' e e sítios de *Bgl*II, a 3' (*Nsi* Frag F, sentido, nt 1064-1088 5'-GGG GGG ATG CAT TAC AAG GTA CGA AAC AGG C-3 '; *Bgl*II Frag R, anti-senso, nt 1993-2023).Esses frangentos fora, então, digeridos, resultando na síntese do fragmento de 0,9 kb *Bgl*II-*Nsi* de HBV DNA, para ser usado na construção contendo 1,28 unidades de genoma.

O vetor pCDNA™4/TO foi escolhido para a construção como o vetor de expressão em células eucarióticas. Apesar deste vetor não conter sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Nsi*, ele contém sítio para a enzima *Pst*I no seu sítio de clonagem múltipla (MCS). Essa enzima é compatível com a *Nsi* ; a restrição utilizando a enzima *Pst*I forma uma ligação irreversível ao ser unida com um fragmento clivado pela enzima *Nsi*.

Esse vetor também contém dois sítios de restrição para a enzima *Bgl*II, um no seu MCS e outro anterior ao seu promotor CMV. A digestão do vetor pCDNA™4/TO com a enzima *Bgl*II foi realizada a fim de remover o promotor CMV presente neste vetor e permitir que a expressão do HBV seja dirigida pelo seu promotor autêntico.

O passo final para a obtenção da construção contendo 1,28 unidades do genoma completo do HBV consistiu numa ligação tripla que envolve os três produtos gerados: (i) Produtos de PCR contendo o genoma completo do HBV (3,2 kb), digerido com a enzima *Nsi* (ii) Fragmento de PCR do HBV (0,9 kb) digerido com as enzimas *Nsi* + *Bgl*II (iii) vetor pCDNA™4/TO digerido, sem o promotor CMV, digerido com as enzimas *Bgl*II+ *Pst*I.