



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DE SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

BERNARD SALAME GEMAQUE

Deteccão sorológica e molecular da infecção por Hepacivirus em caninos e equídeos em municípios do Estado do Pará

Belém-PA

2014



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DE SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

BERNARD SALAME GEMAQUE

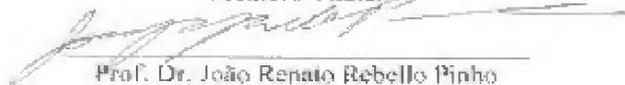
Detecção sorológica e molecular da infecção por Hepacivirus em caninos e equídeos em municípios do Estado do Pará

Data da aprovação: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira
Universidade Federal Rural da Amazônia -UFRA
Orientador e Presidente

Profa. Dra. Esther Castello Branco Mello Miranda
Universidade Federal do Pará – UFPA
Membro Titular


Prof. Dr. João Renato Rebelo Pinho
Universidade de São Paulo - USP
Membro Titular

Profa. Dra. Conceição de Maria Almeida Vieira
Universidade Federal Rural da Amazônia -UFRA
Membro Titular

Profa. Dra. Andréa Maria Góes Negrão
Universidade Federal Rural da Amazônia -UFRA
Membro Suplente

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia do Instituto de Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia, para obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção Animal na Amazônia. Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

Co-orientador: Msc. Alex Junior Souza de Souza.

Belém-PA

2014

Gemaque, Bernard Salame

Detecção sorológica e molecular da infecção por Hepacivirus em caninos e equídeos em municípios do Estado do Pará / Bernard Salame Gemaque. -Belém, 2014.

48 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2014.

1. Cavalos 2.Cães 3.Hepacivirus 4.Hepatite C - vírus 5. Amazônia I. Título.

CDD – 636.1089

Dedico este trabalho primeiramente a ti querido Pai do céu e a meus amados pais Miguel e Rosana pois vocês três sempre estiveram ao meu lado indicando o caminho que devia seguir e me dando o suporte e amor necessários a todo momento.

Com muita gratidão por terem me auxiliado com tanta atenção e me apresentado ao fantástico mundo das pesquisas com vírus dedico este trabalho ao professor Washington Pereira, Dr. Manoel Soares e ao grande amigo Alex Souza.

Hepacivirus em cavalos

“Os meus dias serão para trabalhar.
Se você estiver na Amazônia eu vou te encontrar.
As minhas noites serão para ler, pensar e entender.
Mais que o Kapoor eu vou te conhecer.

Pedi ao Senhor e Ele ouviu minha oração.
Das veias do cavalo direto para a detecção.
Trouxe as minhas mãos o que tanto eu queria
O Hepacivirus de cavalos está na Amazônia, eu sabia.”

Bernard Salame Gemaque

AGRADECIMENTOS

Meu Senhor e meu amado DEUS com alegria te agradeço porque eu nunca estive só. O teu doce Espírito me acompanhou em cada etapa desta pesquisa. Nos momentos tristes quando eu não havia encontrado Hepaciviru, Tú estavas lá para me confortar. E nos momentos sublimes de felicidade e empolgação inigualáveis deste trabalho, quando detectávamos novos Hepacivirus eu nunca duvidei que o responsável por tamanha alegria era você, poderoso Deus.

O Senhor entregou em nossas mãos as amostras dos animais portadores e trouxe luz a esta pesquisa. Nos abençoou com a honra de podermos ser a primeira equipe de pesquisa a relatar este vírus na América Latina, e a fazermos o terceiro registro de Hepacivirus em cavalos do mundo. Por isso a Ti seja a honra e toda a Glória para sempre. Eu te amo Jesus.

Agradeço ao meu amado pai Miguel Gemaque, que sempre esteve presente, apoiando em minha vocação, e acreditando nisso até mesmo quando tudo parecia impossível. Sempre me direcionando e orientando em meio as minhas dúvidas.

Agradeço minha amada mãe, Rosana Salame, que sempre me estimulou a buscar minhas realizações profissionais e nunca mediu esforços para me ver crescer como Médico Veterinário. Sempre me apoiando e dando suporte quando eu não sabia por onde prosseguir.

A meus amados avôs Francisco e Lourdes Gemaque, Richa e Minervina Salame que muito me ensinaram e aconselharam sempre me trazendo paz e segurança em todos os momentos.

Em especial agradeço ao meu querido orientador, amigo e mestre Prof. Washington Pereira, que me guiou com sua experiência, trazendo-me segurança e sempre muito disposto a ajudar quando precisei. Sempre se importando em facilitar o andamento desta pesquisa.

Professor Washington, você fez muito mais do que me preparar para dar aulas ou ser um pesquisador. Eu jamais me esquecerei de como a sua bondade e o seu exemplo me ensinaram e contribuíram para eu ser quem sou hoje como profissional. Obrigado meu querido professor, muito obrigado mesmo.

Ainda que eu tivesse em minhas mãos todas as folhas de papel do mundo, não seriam suficientes para poder escrever como sou grato a você Alex Souza. Graças a você estou parando de escrever como “escritor de matéria da revista Caras” e aprendendo a ser um verdadeiro pesquisador. Não me esquecerei de todas as vezes que com tanta paciência você me ensinou como dar cada passo nessa pesquisa com ética e profissionalismo, dentro e fora do laboratório.

Nos dias em que eu estava desanimando, você voltava a me animar, as vezes sem querer, simplesmente porque sua paixão pela pesquisa é altamente contagiosa e muito virulenta. Cada conversa científica durante os almoços, ou nossas ambiciosas teorias compartilhadas no Instituto Evandro Chagas sobre os Hepacivirus foram muito importantes para meu crescimento. Este mestrado em hipótese alguma teria sido o mesmo sem seu auxílio. Obrigado por tudo. Sou eternamente grato.

Graças a você Dr. Manoel eu pude conhecer este fantástico mundo dos vírus. Ter você como mentor foi uma experiência muito gratificante. Juntos compartilhamos de ideais sobre os Hepacivirus e sempre me senti muito enriquecido com nossas conversas. A sua presença neste projeto sempre me trouxe confiança de que estávamos no caminho certo. A sabedoria em suas palavras me trouxeram muita paz em vários momentos. Ser acompanhado por você neste período foi um grande presente de DEUS pra mim. Tem sido uma honra, uma enorme satisfação desfrutar de momentos onde posso aprender com você. Obrigado por acreditar neste projeto e permitir a realização dele. Muito obrigado por tudo.

Obrigado Professora Adriana por cada conselho e orientação sobre como preparar e ministrar aulas. Obrigado Dra. Olgaize e Dra. Heloiza por sempre comemorarem junto comigo cada novidade e descoberta deste projeto.

Dr. João e Michele, agradeço todo suporte e parceria sem a qual esta pesquisa não teria obtido o sucesso que teve. Andreza, Andrea, Max obrigado por me ensinarem e me acompanharem na realização das técnicas laboratoriais demais etapas desta pesquisa. Vocês, juntamente com o Alex me ensinaram a dar meus os primeiros passos na Sorologia e Biologia Molecular. Obrigado a toda equipe da Seção de Hepatologia do fantástico Instituto Evandro Chagas.

Fabício a sua participação nesta pesquisa deu a ela um importante caráter de originalidade. Seu empenho e esforço admiráveis para me ajudar a levar este trabalho a excelência estão gravados em minha memória. Por puro altruísmo você se doou e se sacrificou sem esperar nada em troca por este projeto. A você minha gratidão e admiração. Muito obrigado.

Muito obrigado ao meus amigos que durante estes dois anos compartilharam comigo, sempre me apoiando, dos momentos desafiadores desta frenética caça aos Hepacivirus. Dentre estes amigos destaco Antônio, Dionney, Leopoldo, Jessica, Elton, Uiara, Mayra, Suellen, Ana Cláudia, Roberta, Paulo, Jô, Marlene, Pedro e André.

Agradeço a meus queridos animais. Especialmente meus amigos caninos Toby sua esposa Pitchula e o amável filho deles Whisky. Como foi regozijante chegar em casa todos estes dias durante os dois anos desta pesquisa e ser tão bem recebido por você whisky, com saltos e latidos cheios de saudade. Certamente, estes três estarão sempre em meu coração.

Agradeço a todos os 30 cães e 300 cavalos que “deram seu sangue” para que esta pesquisa pudesse ser possível, se deixando ser contidos e levando uma agulhada sem reclamar.... pelo menos com palavras.

Aos membros da banca pela oportunidade de contar com a vossa experiência e conselhos.

GEMAQUE, B.S. **Detecção sorológica e molecular da infecção por Hepacivirus em caninos e equídeos em municípios do Estado do Pará.** Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2014.

RESUMO

O Vírus da Hepatite C é um flavivirus, do gênero Hepacivirus, responsável por infectar cerca de 3 % da população mundial, provocando doença crônica que pode evoluir para quadros de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Entretanto, pela grande dificuldade de realizar experimentos com o vírus, as pesquisas encontram uma série de limitações e restrições que retardam os avanços nessa área. Desde a descoberta de novos hepacivirus, em hospedeiros animais, diversos trabalhos têm sido realizados para identificar quem são estes hospedeiros e de que maneira seu estudo pode contribuir para o entendimento do comportamento e evolução dos flavivirus, além de tentar esclarecer a patogenicidade e virulência destes novos vírus nos animais infectados. O presente trabalho teve por objetivo detectar a presença de hepacivirus em cães e equídeos em regiões do Estado do Pará. Para detecção dos resultados foram testados soro de 30 caninos e 300 equídeos de 9 municípios paraenses, através das técnicas de ELISA indireto e NESTED RT-PCR. Do total de amostras, foi confirmada a presença do RNA viral em 25 cavalos, de seis localidades distintas. As demais análises de cães e equinos foram negativas. Estes resultados revelam a presença do vírus em cavalos da Amazônia, sendo esse o primeiro relato de detecção de hepacivirus animal na América Latina. As análises filogenéticas das sequências parciais do segmento NS3 do genoma viral identificadas sugerem considerável diversidade entre os isolados deste vírus, semelhante ao observado no vírus da hepatite C. Os resultados obtidos nesta pesquisa podem significar que se trata de um vírus enzoótico entre equinos na região nordeste do Estado do Pará.

Palavras-chave: Cavalos, Cães, Hepacivirus, Hepatite C – vírus, Amazônia.

Gemaque, B.S. **Serological and molecular detection of Hepacivirus infection in dogs and horses in municipalities cities of Pará State.** Masters Program in Animal Health and Production in Amazon, Amazon Rural Federal University, 2014.

ABSTRACT

The Hepatitis C virus is a flavivirus, Hepacivirus genus responsible for infecting about 3 % of world population, causing chronic disease that can progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. However, for the great difficulty of performing experiments with the virus, the research finds many limitations and restrictions that slow progress in this area. Since the discovery of new hepacivirus in animal hosts, a sequence of works has been performed to identify who are these hosts and how their study can contribute to the understanding of behavior and evolution of flaviviruses, besides trying to clarify the pathogenicity and virulence of these new viruses in infected animals. This study aims to detect the presence of hepacivirus in dogs and horses in Pará State. To results were tested serum of 30 dogs and 300 horses from 9 cities of Pará, through the indirect ELISA and NESTED-RT PCR techniques. Of the total samples, was confirmed the presence of viral RNA by PCR in 25 horses from six different locations. Other analysis of dogs and horses were negative. These results reveal the presence of the virus in horses of the Amazon, featuring this like the first report of detection of animal hepacivirus in Latin America. Phylogenetic analysis of the segment from NS3 identified sequences suggest considerable diversity among isolates of this virus, similar to that observed in hepatitis C virus. The results obtained in this study may mean that it is a virus enzootic in northeastern area from Pará State.

Keywords: Horses, Dogs, Hepacivirus, Hepatitis C – virus, Amazon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do genoma do Vírus da Hepatite C.....	16
Figura 2 – Índice em valores relativos da infecção por vírus da hepatite C nas populações de países da América do Sul e comparativo entre os estados brasileiros.	18
Figura 3 – (A) Mapa estrutural do genoma de canine Hepacivirus. (B) Análise de divergência de sequência dos Aminoácidos da poliproteína do CHV, genótipos do VHC e GBV-B.....	20
Figura 4 – Árvore filogenética das regiões conservadas do gene codificador da helicase de canine Hepacivirus alinhado com membros representativos dos gêneros Hepacivirus, Pegivirus (VGB vírus A, C, e D), Pestivirus, e Flavivirus.	20
Figura 5 – Comparativo dos dados genômicos e de patogênese de flavivirus do gênero Hepacivirus e seus respectivos hospedeiros.....	21
Figura 6 – Hibridização in situ do RNA do HCC em fígado canino. A) Fígado não infectado. (B e C) Fígado infectado.....	22
Figura 7 – Divergência das sequências de aminoácidos entre os genomas do NPHV	24

LISTA DE ABREVIACÕES

Canine hepacivirus.....	CHV
Hepacivirus canino.....	HCC
Vírus da Hepatite A	VHA
Vírus da Hepatite B	VHB
Vírus da Hepatite C	VHC
Vírus da Hepatite Delta	VHD
Vírus da Hepatite E	VHE
Vírus da Hepatite G	HGV-C
Vírus Torque Teno.....	TTV
Vírus da Diarréia Viral Bovina.....	BVDV
Sistema de Imunoprecipitação da Luciferase.....	LIPS
Non-Primate Hepacivirus.....	NPHV
Gama Glutamil Transferase.....	GGT
International Committee on Taxonomy of Viruses.....	ICTV
Hepacivirus em cavalos.....	HVC

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. ARTIGO CIENTÍFICO	29
5. CONCLUSÕES	41
6. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

Considera-se hepatite viral toda infecção do tecido hepático cuja etiologia está relacionada à presença de vírus que possuem tropismo primário por células deste órgão. Apesar de apresentarem alterações e sinais clínicos similares as hepatites virais formam um grupo de diversas doenças com particularidades, cada uma com etiologia, evolução e morfologia específicos além de, comportamento e genoma distintos e logo estão classificados em diferentes famílias de vírus (BENSABATH et al., 1986).

Atualmente, existem vacinas contra os vírus das hepatites A e B, porém esses vírus ainda constituem um grave problema de saúde pública no mundo, por seu difícil controle preventivo e tratamento. A principal dificuldade no desenvolvimento de vacinas para os vírus das hepatites C, Delta e E, é o fato de serem espécie-específicos, de tal forma que, por esta restrição a seus hospedeiros, seu manuseio em laboratório torna-se muito dificultoso (BENSABATH et al., 2013).

O Vírus da Hepatite C (VHC) pertence ao gênero Hepacivirus da família Flaviviridae. Desde 1988 quando o VHC foi de fato identificado e relatado pela primeira vez, e durante os anos posteriores, apesar das inúmeras descobertas acerca desse agente, sua origem permanecia completamente desconhecida (CHOO et al., 1989).

Estudos a respeito do VHC ganharam novas possibilidades desde que uma relevante sequência de descobertas teve início a partir de um trabalho publicado por Kapoor et al. (2011), quando identificaram, nos Estados Unidos da América (EUA), um novo vírus homólogo ao VHC, denominado Hepacivirus canino (HCC). A partir de então inúmeras, pesquisas têm sido realizadas ao redor do mundo em diversas espécies para identificar quais são estes hospedeiros e de que maneira seu estudo pode contribuir com avanços no entendimento do comportamento e evolução dos flavivirus, além de tentar esclarecer a patogenicidade e virulência destes novos vírus nos animais infectados.

Dentro deste contexto, o presente trabalho propõe avaliar a ocorrência da infecção por hepacivirus animais e a presença de anticorpos para estes vírus em caninos e equídeos em do Estado do Pará. Para a medicina veterinária, a possível participação do HCC na doença respiratória canina vem alertar os veterinários a respeito de uma nova etiologia de doenças do trato respiratório, da qual não se conhece ao certo a patogênese, epidemiologia, distribuição geográfica mundial e prevalência. Da mesma forma que o HVC pode representar novo diagnóstico diferencial para doenças do trato gastrointestinal em equinos. Os resultados

obtidos neste experimento, poderão melhor esclarecer a etiologia, epidemiologia e fisiopatologia de doenças respiratórias e de ordem gastrointestinal, dos pacientes caninos e equinos relacionadas a estes novos vírus. A partir do conhecimento e estudo destes vírus por parte da comunidade médico veterinária, os pacientes infectados pelo agente terão mais chance de serem diagnosticados corretamente possibilitando a formulação de um protocolo terapêutico direcionado e conseqüentemente uma maior probabilidade de sucesso no tratamento.

A pesquisa proposta através deste trabalho é pioneira na América do Sul. Investigou-se o HCC em cães, e o HVC em equinos do Estado do Pará, objetivando aprofundar e ampliar os conhecimentos sobre a distribuição geográfica do vírus, auxiliando assim o mapeamento epidemiológico da doença em escala mundial e regional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os agentes etiológicos que mais frequentemente estão relacionados a infecções hepáticas são o vírus da hepatite A (VHA), vírus da hepatite B (VHB), vírus da hepatite C, vírus da hepatite Delta (VHD) e vírus da hepatite E (VHE). Suas vias de transmissão já estão bem definidas, de tal modo que, o VHA e VHE são transmitidos por via entérica (fecal-oral) enquanto o VHB, VHC e VHD por via percutânea (sanguínea, sexual e vertical, ou seja, de mãe para filho) (BENSABATH et al., 2013).

Além destes cinco vírus existem outras cinco espécies relacionadas a ocorrência de hepatites entéricas e pós-transfusionais cuja etiologia não está relacionada aos vírus então conhecidos. Em virtude disso recebem a denominação de vírus não A-E. Destes, apenas dois estão caracterizados, o vírus da hepatite G (HGV-C) e o vírus Torque Teno (TTV). Porém não se pode afirmar ainda se de fato as infecções por estes agentes causam hepatite ou se eles apesar de terem sido identificados em pacientes hepatopatas não seriam a causa primária da doença (BENSABATH et al., 2013).

As manifestações clínicas variam em todas as hepatites, desde quadros assintomáticos, alguns com anemia e fraqueza, até formas fulminantes. Estudos ao longo dos anos esclareceram que pacientes infectados pelos vírus de transmissão entérica não desenvolvem infecção crônica e, portanto, não são acometidos pelas consequências da infecção persistente. Entretanto, os vírus de transmissão percutânea cronicam podendo evoluir para cirrose e até carcinoma hepatocelular (BENSABATH et al., 1987).

Com a criação e estabelecimento da biologia molecular como método de diagnóstico e pesquisa, no início dos anos 1980, foi possível obter avanços não somente acerca dos vírus então identificados (VHA e VHB), mas também auxiliou no advento da vacina contra o VHB e, principalmente, proporcionou a descoberta e caracterização do VHC (BENSABATH et al., 1986).

Atualmente, existem vacinas contra os vírus A e B, porém ainda assim as hepatites virais constituem um grave problema de saúde pública no mundo, por seu difícil controle prevenção e tratamento. A principal dificuldade no desenvolvimento de vacinas para os vírus das hepatites C, Delta e E, é o fato de serem espécie-específicos, de tal forma que, por esta restrição a seus hospedeiros, seu manuseio em laboratório torna-se muito dificultoso (BENSABATH et al., 2013).

A distribuição dos vírus hepatotrópicos na região amazônica ocorre da seguinte maneira: os vírus das hepatites A, B e C são prevalentes em todas as regiões, enquanto o Delta

foi identificado em algumas áreas da Amazônia ocidental e na Amazônia oriental só existe relato de sua presença em pacientes do Vale do Tapajós. Em relação ao VHE são necessários mais estudos para determinação segura da sua distribuição, sendo que , algumas pesquisas foram realizadas para sua identificação em áreas distintas e espalhadas da Amazônia e, em todas elas, o vírus foi detectado em menor ou maior escala (BENSABATH et al., 1986; STRAUSS et al., 1987).

A família Flaviviridae é composta taxonomicamente por quatro gêneros Flavivirus, Pestivirus, Hepacivirus e Pegivirus (STAPLETON et al., 2011). Os vírus que compõem esta família, morfológicamente, apresentam partículas esféricas envelopadas de 40 a 60 nm de diâmetro, além de possuírem estrutura genômica representada por RNA fita simples de polaridade positiva (ACKERMANN; BERTHEAUME, 1995).

A família Flaviviridae possui cerca de 70 vírus, onde dentre estes, aproximadamente 30 causam afecções clínicas ao homem, como os vírus da dengue, febre amarela, encefalite do Nilo, encefalite St. Louis, encefalite japonesa e o vírus da hepatite G (LIANG et al., 2000; BRASIL, 2001). Alguns vírus desta família acometem exclusivamente animais, provocando graves prejuízos econômicos relacionados à sanidade animal, como, por exemplo, o vírus da diarréia viral bovina (BVDV), da peste suína clássica, e doença da fronteira (que acomete cabras e ovelhas) e os pestivirus (BAKER, 1987; POTGIETER, 2004).

A divisão taxonômica do gênero Flavivirus indica que haja cerca de 50 espécies de vírus, formando dez grupos antigenicamente semelhantes. Uma característica comum aos vírus deste gênero é que todos são de complexa identificação a partir do padrão morfológico, e a heterogeneidade existente dentro do próprio gênero Flavivirus, supera as diferenças existentes entre os vírus pertencentes aos gêneros Pestivirus e Hepacivirus (FAUQUET et al., 2005; SCHATZMAYR; BARTH, 2005).

Apesar de possuírem genomas semelhantes, os vírus desta família variam em muitos aspectos entre si, como em suas características epidemiológicas e patogênese. Pode-se observar que alguns destes vírus utilizam tipos específicos de vetores para poder efetuar sua propagação e transmissão, enquanto que outros não utilizam este mecanismo, ou não possuem vetores conhecidos (FLORES, 2007).

Um exemplo dessas divergências é encontrado no gênero Flavivirus, que pode ser subdividido em três grupos distintos, de acordo com a forma de transmissão, sendo um grupo composto por vírus transmitidos por carrapatos (classificados como vetores biológicos) que causam as doenças de Gadget Gully, Kyasanur Forest, Langat, Louping III, febre hemorrágica

Omsk, Powassan, Royal Farm, Tick-borne encephalitis, Seabird tick-borne, Kadam, Meaban, Saumarez Reef e vírus Tyuleniy (FLORES, 2007).

Outro grupo de vírus dentro do gênero Flavivirus são os arbovírus transmitidos por mosquitos, como é o caso dos vírus causadores de Aroa, dengue, Kendougou, Cacicapore, encefalite japonesa, Koutango, encefalite Murray Valley, Nilo Ocidental, Yaounde, Kokobera, Ntaya, Bagaza, Ilhéus, Israel turkey, Tembuso, Zika, Banzi, Bouboui, Edhe Hill, Jugra, Saboya, Sepid, Uganda, Wesselbron e Vírus da Febre Amarela (FLORES, 2007).

Destaca-se neste grupo a dengue e a febre amarela, arbovirus de grande incidência nacional e regional, além de ambas dependerem do mesmo vetor específico, o mosquito *Aedes aegypti*, para serem transmitidas (FLORES, 2007). Apesar desta ampla participação vetorial, alguns flavivirus não precisam de vetores biológicos para completar seu ciclo, como por exemplo o vírus Entebbe dos morcegos, Yokose, Modoc, Apoi, Cowbone Ridga, Sal Vieja, San Perlita, Rio Bravo, Bukalasa dos morcegos, Carey Island, Dakar Bat, Montana Myotis, Phnom Pehn Bat (SANTOS, 2010).

Alguns vírus da família Flaviviridae podem ser transmitidos de forma mecânica, como é o caso do VHC, cuja transmissão pode ocorrer através de fômites como agulhas usadas durante terapias de acupuntura, materiais de centros estéticos e odontológicos não higienizados corretamente, assim como durante a colocação de piercings e tatuagens, transplante de órgão, via sexual e perinatal, ou por via parenteral através da não utilização de boas práticas de higiene hospitalar, como por exemplo, a reutilização em pacientes distintos da mesma seringa. Entretanto as principais vias são a hemoterapia através da transfusão de sangue contaminado e compartilhamento de seringas por usuários de drogas (SIMMONDS, 1994; WASLEY, 2000; BENSABATH et al., 2013).

O HCV pertence ao gênero Hepacivirus da família Flaviviridae. Desde 1988 quando foi relatado pela primeira vez, apesar das inúmeras descobertas acerca deste agente, sua origem permanece completamente desconhecida (CHOO et al., 1989). Assim como outros membros desta família, o VHC possui uma estrutura genômica composta por uma fita simples de RNA (FERREIRA; DA SILVEIRA, 2006).

É um vírus envelopado com um genoma que contem cerca de 9400 pb e codifica uma poliproteína com aproximadamente 3.000 aminoácidos. Além disso, é um agente filtrável, inativado por clorofórmio e tem cerca de 50 a 65 nm de diâmetro (SANTOS, 2002; YOU et al., 2004).

Por meio de processamento proteolítico esta poliproteína é capaz de gerar 10 proteínas virais maduras (Figura 1). Onde dividindo-a virtualmente em três partes tem-se no primeiro

terço a codificação para as proteínas estruturais virais e incluem o núcleo ou a proteína do cápside (C) e as glicoproteínas do envelope E1 e E2, P7 e proteínas não estruturais são codificadas pelo C-terminal dos outros dois terços da poliproteína, e suas funções consistem de várias formas em auxiliar a montagem do vírus e também na replicação do RNA (MORADPOUR; PENIN, 2013).

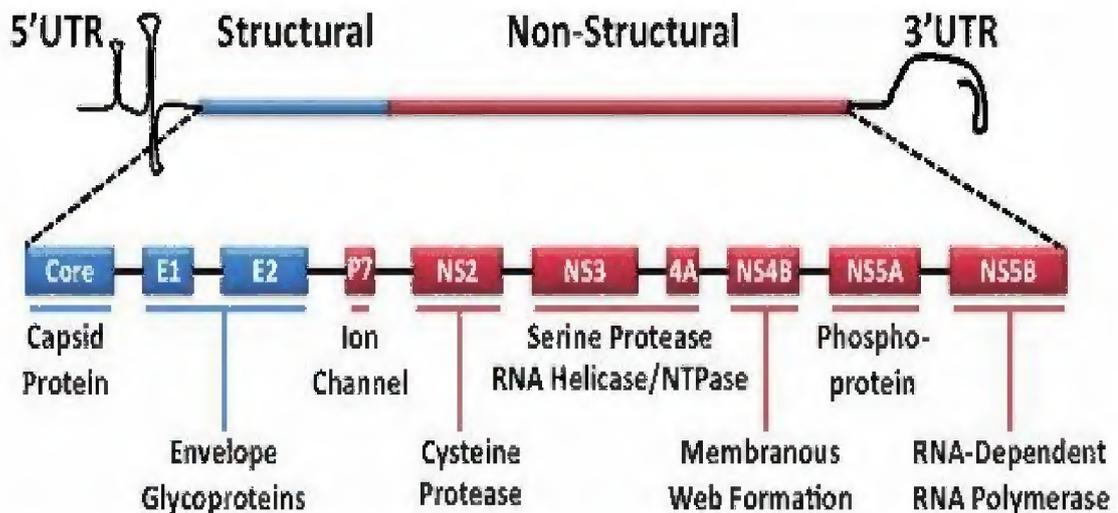


Figura 1 – Representação esquemática do genoma do Vírus da Hepatite C. Fonte: Poordad & Dieterich (2012).

Por ser um vírus de RNA o VHC, possui elevado índice de mutação genética espontânea. Isso explica a significativa variação na sequência de seu genoma, resultando na alta taxa de heterogeneidade. As mutações genômicas neste caso são resultantes de falhas na biossíntese do vírus, quando a enzima RNA polimerase realiza sua função de forma errônea durante a replicação viral (ROBERTSON et al., 1998; AVILA; FERREIRA, 2001). Este vírus possui considerável diversidade genética entre seus genomas, chegando a ter mais que 30% de divergência nucleotídica entre eles (SIMMONDS et al., 2005).

Uma de suas particularidades está relacionada justamente a sua alta capacidade mutacional, consiste em sua habilidade de permanência de infecção no hospedeiro, aumentando assim as possibilidades do desenvolvendo de hepatite crônica com viremia persistente (ALTER, 1995; DI BISCEGLIE; BACON, 1999).

O HCV é constituído por seis genótipos e cerca de 100 subtipos, dentre eles: 1a/1b/1c, 2a/2b/2c, 3a/3b/3c, 4a, 5a, 6a (ROBERTSON et al., 1998; NGUYEN; KEEFFE, 2005). Alguns estudos propõem que a amplitude de genótipos do vírus seria maior, de sete a onze, no

entanto, estes supostos novos genótipos encontram-se dentro das subclasses do tipo 6 (SIMMONDS et al., 1996; DE LAMBALLERIE et al., 1997).

No Brasil, os grupos de maior prevalência são 1, 2 e 3 (ALVARIZ, 2004) e a região norte é principalmente acometida por cepas do genótipo 1 (CAMPIOTTO, 2005). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014) estimam que a incidência mundial da infecção pelo HCV é de 2 a 3%, o que, numericamente, representa de 123 a 200 milhões pessoas infectadas ao redor do mundo. Para visualizar melhor a dimensão deste número basta comparar com a população do Pará, 7 milhões, e do Brasil, 200 milhões, segundo o censo populacional de 2012 do IBGE.

Dados do Brasil, baseados em estudos soropidemiológicos, apontam baixas prevalências, como por exemplo, entre grupos de indivíduos doadores sanguíneos, entretanto em algumas áreas da Amazônia brasileira esta prevalência chega a representar alguns dos índices mais relevantes do país, destacando-se os Estados do Acre (5,9%) e Pará (0,2 à 2%), assim o Brasil é classificado como um país de endemicidade intermediária (Figura 2), aproximadamente 1,6% dos brasileiros são portadores do VHC (SAWADA et al., 2011).

O vírus da hepatite C possui tropismo hepático (REIS et al., 2006) e são nos hepatócitos que este agente realiza sua replicação em maior escala, conseqüentemente, por essa razão o fígado é o órgão onde as lesões podem ser identificadas de forma mais intensa (CACOUB et al., 1999). Apesar deste tropismo hepático, pode ser encontrado em diversos tecidos, onde também é potencialmente infeccioso, porém com menor intensidade (REIS et al., 2006). Nesse sentido, já foram observadas alterações relacionadas ao VHC ao nível renal, endócrino, comprometimento dermatológico, articular, hematológico e muscular além de relatos de distúrbios do sistema imune associados à infecção (CACOUB et al., 1999).

Além disso, o VHC constitui o mais importante fator para desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular além de possuir confirmada relevância nos índices de hepatite aguda (ALTER, 2007). Todos os anos aproximadamente 350 mil pessoas vem à óbito em decorrência de complicações hepáticas decorrentes deste vírus, sendo considerado como principal determinante de doença hepática crônica ao redor do mundo e representa a maior causa de transplante de fígado em diversos países. Nos EUA, representa o agente de transmissão parenteral de maior prevalência de infecção hepática crônica (WHO et al., 2012).



Figura 2 - Índice em valores relativos da infecção por vírus da hepatite C nas populações de países da América do Sul e comparativo entre os estados brasileiros. Fonte: FMTHVD/Governo do Amazonas. Disponível em: <http://www.fmt.am.gov.br/imagens/mapabr.jp>

Os protocolos terapêuticos existentes para pacientes infectados pelo VHC, mesmo que possibilitem uma recuperação eficaz em determinados pacientes, demonstram-se ineficazes em outros casos, visto que estes protocolos ainda estão em evolução e precisam ser aprimorados (LIANG et al., 2000).

Por isso é de fundamental importância a profilaxia desta enfermidade, pois em se tratando de doença cujos protocolos terapêuticos ainda encontram-se em estudo e debates, a prevenção torna-se mais relevante do que normalmente seria, constituindo prioridade e desafio para a saúde pública junto as comunidades médica e científica.

A grande problemática no controle e profilaxia da disseminação do vírus da hepatite C encontra-se neste ponto, visto que além da necessidade de aperfeiçoamento do tratamento, não foi possível criar uma vacina verdadeiramente segura e eficaz para sua prevenção. Segundo alguns autores a formulação de uma vacina eficiente contra o VHC nem mesmo está em eminência de acontecer (CDC, 2002; FERREIRA et al., 2006).

A possibilidade do desenvolvimento de medidas mais eficazes de intervenção vem sendo adiada devido principalmente à ausência de um modelo animal adequado, visto que, naturalmente o VHC infecta apenas humanos e chimpanzés. Os fatores que influenciam neste número de hospedeiros limitado permanecem em grande parte desconhecidos. Além disso, existem muitos fatores adversos ao estudo do vírus em cultura de células, não obtendo-se

sucesso ou resultados confiáveis em grande parte destes estudos (SANDMANN; PLOSS, 2013).

Algumas pesquisas, no entanto, vinham sendo realizadas na tentativa de esclarecer as barreiras para o ciclo de vida deste hepacivírus nas espécies não-permissivas. Esperava-se que os resultados provenientes de tais experimentos pudessem de fato ajudar, no futuro, a construção ou adaptação de modelos experimentais animais para elucidar questões referentes à infecção por este agente, à imunidade do hospedeiro e à patogênese (SANDMANN; PLOSS, 2013). Mas de fato, a dificuldade principal para realização de experimentos com o VHC é que durante anos só se tinha conhecimento de um vírus parcialmente homólogo, o GBV-B, encontrado em primatas do Novo Mundo (KAPOOR et al., 2011).

Porém, os estudos a respeito do VHC ganharam novas possibilidades desde que uma relevante sequência de descobertas teve início a partir de um trabalho publicado por Kapoor et al. (2011), quando identificaram, nos EUA, um novo vírus homólogo ao VHC, denominado Hepacivírus canino (HCC), do termo em inglês canine Hepacivírus (CHV), notificado em dois surtos de doença respiratória em cães, e que a partir da coleta do conteúdo nasal, por suabe, e análise por Reação em Cadeia da Polimerase- PCR quantitativa revelou $>10^7$ cópias de RNA do HCC por suabe nasal da maioria dos onze animais infectados.

A caracterização molecular do genoma do HCC revelou que ele é composto por 9195 nucleotídeos e codifica uma poliproteína de 2942 aminoácidos além de uma curta 5' UTR (Região Não Traduzível). As proteínas não estruturais NS3 e NS5B do HCC possuem grande semelhança com essas mesmas regiões do VHC ($>55-65\%$). A proteína E2 do envelope de VHC, por exemplo, é uma das porções mais variáveis do seu genoma, mas tem similaridade de sequência significativa com o HCC (KAPOOR et al., 2011).

Durante anos o GBV-B foi considerado o vírus mais semelhante ao VHC, porém assim que o HCC foi identificado e analisado, concluiu-se tratar do vírus geneticamente mais homólogo ao VHC (Figura 3). De acordo com sugestões dos autores KAPOOR et al. (2011), em um modelo de árvore filogenética baseada na região NS3 (Figura 4), o Hepacivírus canino foi situado entre o VHC e o GBV-B, no entanto possui similaridade genética mais estreita com o vírus da hepatite C.

Apesar da estreita similaridade filogenética com o VHC, o HCC possui tropismo pelo trato respiratório de cães, mas também foi identificado em menor titulação ($<10^3$ cópias de RNA) no fígado de cinco cães com distúrbios gastrointestinais sem diagnóstico conclusivo, não ficando claro se é um vírus hepatotrópico ou se poderia ser considerado um novo agente etiológico de hepatite em caninos (KAPOOR et al., 2011).

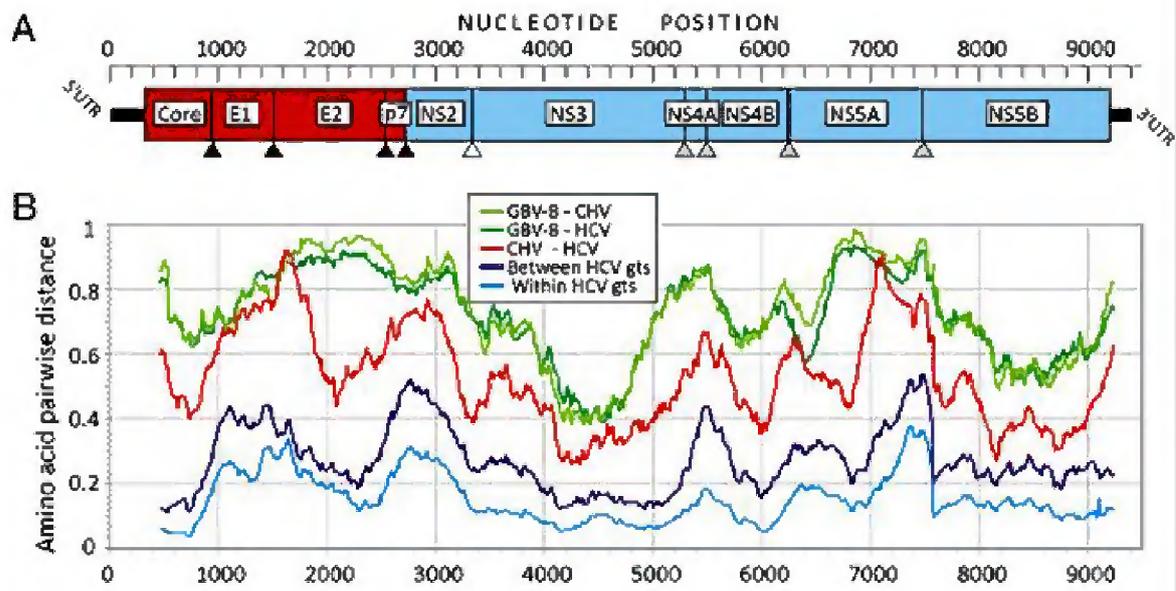


Figura 3 - (A) Mapa estrutural do genoma de canino Hepacivirus. (B) Divergência de sequência dos aminoácidos da poliproteína do CHV, genótipos do VHC e GBV-B. Fonte: adaptado de Kapoor et al. (2011).

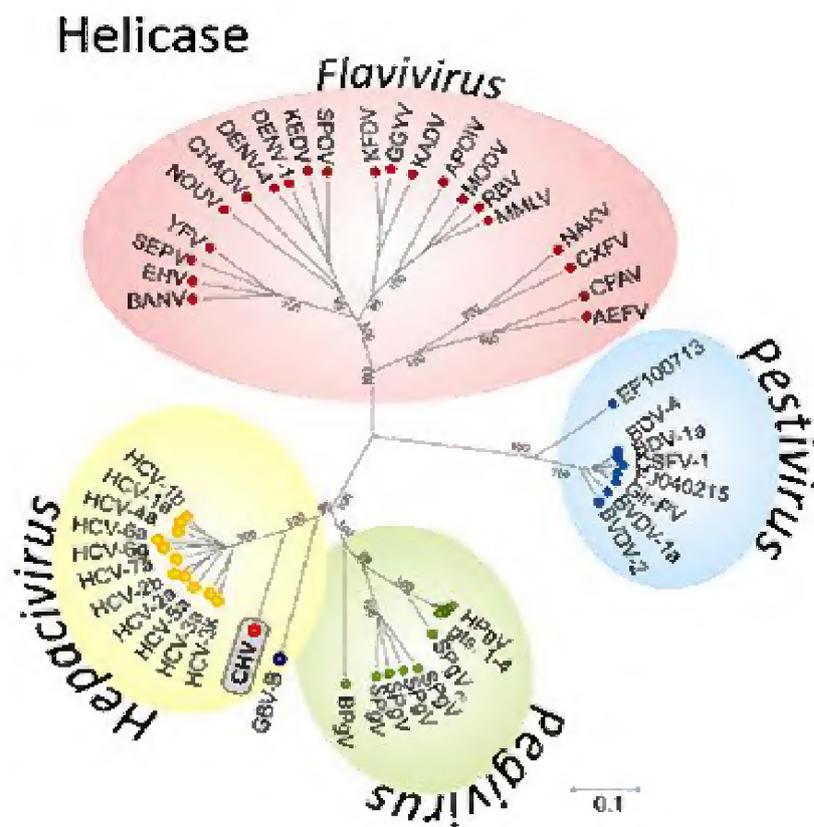


Figura 4 – Árvore filogenética das regiões conservadas do gene codificador da helicase de canino Hepacivirus alinhado com membros representativos dos gêneros Hepacivirus, Pegivirus (VBG vírus A, C, e D), Pestivirus, e Flavivirus. Fonte: adaptado de Kapoor et al. (2011).

Uma das características do HCC é que o vírus parece apresentar um padrão de tropismo tecidual relacionado ao trato respiratório, onde o agente foi encontrado em maiores concentrações (Figura 5). Visto que o genoma do vírus foi identificado somente entre animais com sinais clínicos de doença respiratória e ao mesmo tempo não tendo sido detectado em nenhum dos 60 cães saudáveis do grupo controle de Kapoor et al. (2011), isso pode representar que o HCC foi o responsável pela infecção e sintomas dos animais doentes, tendo desempenhado um papel na doença respiratória dos animais (BUKH, 2011).



	Vírus da hepatite C	GB vírus B (GBV-B)	Hepacivirus canino (HCC)
Variantes	Genótipos 1-7	Uma strain	?
Protótipo da poliproteína	3011 aminoácidos	3011 aminoácidos	2942 aminoácidos
Nº de proteínas previstas	10	10 (ou 11)	10
Propagação em cultura	JFH1 strain; células Huh7	Nenhuma	Nenhuma
Hospedeiro de detecção	Humanos	Micos	Cães
Hospedeiro natural	Humanos	?	?
Modelo animal	Chimpanzés	Micos / Sagüis	?
Órgão alvo principal	Fígado	Fígado	Trato respiratório
Patogênese	Hepatite viral	Hepatite viral	?
Curso do quadro	Agudo / Crônico	Agudo	?
Transmissão	Transmissão pelo Sangue	?	?

Figura 5 – Comparativo dos dados genômicos e de patogênese de flavivirus do gênero Hepacivirus e seus respectivos hospedeiros. Fonte: adaptado de Bukh (2011).

Pelo método Baiesiano de Monte Carlo via Cadeias de Markov, Kapoor et al. (2011) estimaram o tempo do mais recente ancestral comum entre o HCC e o VHC e concluíram que ele existiu entre cerca de 500 a 1000 anos atrás. As tentativas desta equipe em cultivar o HCC falharam.

Ainda não se pode afirmar que o HCC possui hepatotropismo, apesar de ter sido detectado em amostras do fígado em menor concentração e identificado pelo método de hibridização in situ (Figura 6), revelando infecção local e difusa no tecido hepático com a presença do RNA predominantemente no citoplasma dos hepatócitos. Será necessário investigar mais detalhadamente as possíveis formas de manifestações clínicas associadas ao vírus (KAPOOR et al., 2011).

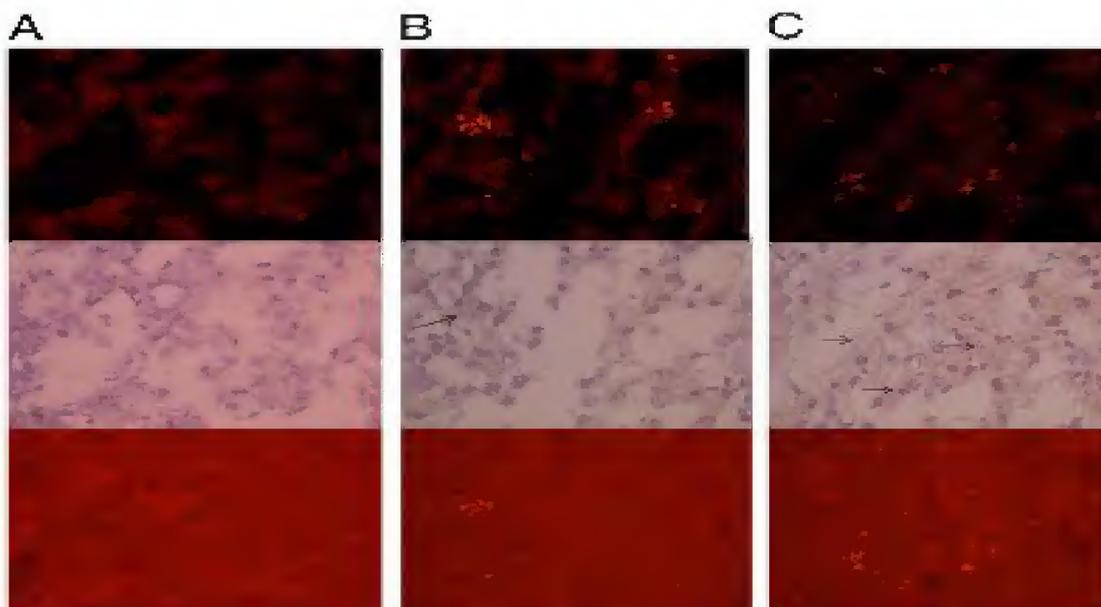


Figura 6 – Hibridização in situ do RNA do HCC em fígado canino. A) Fígado não infectado. (B e C) Fígado infectado. Fonte: Kappor et al. (2011, adaptado).

Posteriormente, Bexfield et al. (2013) investigaram indícios de correlação entre a presença do HCC e doença hepática em cães objetivando testar se o vírus é ou não responsável por provocar hepatite crônica nesta espécie. Realizando dois ensaios de Nested PCR para amostras de fígado de caninos, com primers para região NS3, procuraram identificar o RNA viral em 100 animais, todos do Reino Unido e com diagnóstico histológico de hepatite crônica de etiologia indeterminada. Além disso, utilizaram o método sorológico LIPS (Sistema de Imunoprecipitação da Luciferase) para amostras de soro dos mesmos cães, procurando detectar a presença de anticorpos anti-HCC (BEXFIELD et al., 2013).

Para aumentar a probabilidade de detectar o vírus, foram selecionados casos de pacientes caninos cujo exame histológico hepático revelava alterações sugestivas de que a etiologia poderia ser viral, como por exemplo, a presença de infiltrado inflamatório composto principalmente por linfócitos. Seus resultados sugerem a hipótese de que o HCC não promove doença hepática crônica em cães, uma vez que não detectaram indícios de infecção pelo vírus em nenhuma das 100 amostras analisadas nem por PCR nem pela sorologia (BEXFIELD et al., 2013). Um dado relevante é que todas as tentativas de identificar o VHC como agente causador de hepatite crônica e complicações hepáticas em cães foram negativas (BOOMKENS et al., 2005).

Levanta-se uma importante questão a partir da identificação e classificação do HCC. Esta descoberta, com base na semelhança genética, suscita a hipótese do VHC ser resultante de uma mutação ocorrida no genoma do vírus canino, em algum momento no passado (KAPOOR et al., 2011).

No intuito de identificar novos reservatórios para o recém descoberto Hepacivirus canino, Burbelo et al. (2012) desenvolveram uma nova técnica de diagnóstico de LIPS, altamente sensível e específica, baseada em antígenos recombinantes da região NS3 do HCC capaz de detectar anticorpos anti-hepacivirus em outras espécies de mamíferos. Assim, testaram amostras de soro de 80 cães, 14 coelhos, 81 veados, 84 vacas e 103 cavalos. Todas as amostras eram de animais do estado de New York e alguns dos equinos eram do mesmo estado enquanto outros eram da Nova Zelândia. Obtiveram resultados positivos somente entre as amostras de equinos. Houve uma única amostra de bovino que mostrou reatividade intermediária, tendo seu resultado final inconclusivo e, portanto, negativo.

Ainda, de acordo com resultados de Burbelo et al. (2012), no total das 103 amostras de soro de cavalos 36 foram imunoreativas (tanto animais dos EUA como da Nova Zelândia) e destes animais oito eram positivos para o genoma viral. A partir dos resultados obtidos por essa pesquisa foi relatado mais um vírus nunca antes detectado e em mais um novo hospedeiro, que agrupava muito próximo aos hepacivirus dos caninos e ao VHC (Figura 7). Os autores sugeriram a denominação de Hepacivirus de Não-Primatas (do inglês Non-Primate Hepacivirus, NPHV) para este novo hepacivirus identificado em equinos (BURBELO et al., 2012).

Pelo fato de 36 equinos (35% da população amostral total) serem soropositivos, Burbelo et al. (2012) sugeriram que o NPHV poderia fazer infecção persistente. A análise do genoma completo dos vírus revelou uma divergência das sequências nucleotídicas de 14% (variação de 6,4% a 17,2%), onde a maioria das diferenças ocorreu em sítios sinônimos. A avaliação dos resultados sugeriu uma infecção de cavalos por um hepacivirus mais intimamente relacionada com o HCC do que com o HCV em relação a proteína da helicase.

Lyons et al. (2012) pesquisando o genoma viral em plasma, amostras respiratórias e de órgãos de diversas espécies de mamíferos (gatos, cavalos, burros, roedores, cães e porcos) do Reino Unido, através de PCR (primers para região 5'UTR e NS3 do NPHV), obtiveram como resultado a identificação de três amostras de plasma de equinos positivos da Escócia, de um total de 142 cavalos, o que representa 2% dos cavalos positivos. De acordo com os autores, clinicamente os cavalos, não apresentavam indícios de hepatite ou doença sistêmica e as cargas virais, medidas por PCR em tempo real para NS3, variaram de 7×10^4 a 5×10^7 cópias de RNA/mL entre os três animais.

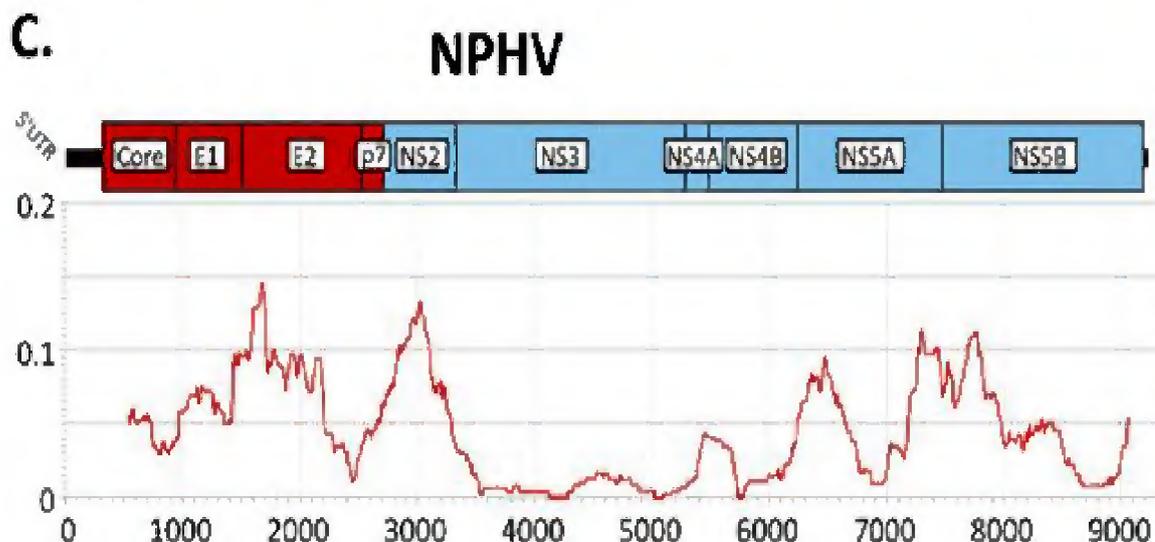


Figura 7 - Divergência das sequências de aminoácidos entre os genomas do NPHV. Fonte: Burbelo et al. (2012, adaptado).

Adicionalmente, os testes de função hepática não apresentaram qualquer indicativo de inflamação: Gama Glutamil Transferase (GGT) e Glutamato Desidrogenase estavam dentro dos parâmetros fisiológicos exceto por uma mínima e discreta elevação no nível da GGT em um dos cavalos. Também foi descartada a hipótese de insuficiência hepática: os níveis de ácidos biliares estavam dentro do padrão (LYONS et al., 2012).

Para obtenção de informações sobre a clínica dos animais infectados por NPHV, um dos cavalos positivos foi examinado durante o período de seis meses e foram coletadas novas amostras quatro e cinco meses após a primeira coleta. O cavalo permaneceu clinicamente estável e não demonstrou sinal clínico específico indicativo de doença sistêmica. Este cavalo competiu regularmente em eventos equestres e viajou extensivamente ao redor do mundo durante os dez anos anteriores a detecção de infecção com NPHV (LYONS et al., 2012).

Não houve relato de exposição a fatores de risco como procedimento cirúrgico, exposição a agulhas não esterilizadas ou história de doença. Durante o período de acompanhamento de cinco meses, o cavalo permaneceu com viremia, porém a carga viral foi progressivamente baixando, inicialmente 5×10^7 cópias RNA/mL, quatro meses depois 7×10^4 cópias RNA/mL, e no quinto mês 2×10^5 cópias RNA/mL. Foram coletadas amostras de plasma de seis cavalos que compartilhavam o mesmo estábulo com este cavalo confirmadamente infectado. Todos foram negativos para NPHV a partir de análises das regiões 5' - UTR e NS3 por PCR (LYONS et al., 2012).

Assim os resultados desse estudo concluíram que o NPHV pode fazer infecção crônica, porém são necessários mais estudos para definir se a infecção é assintomática ou que quadro clínico o equídeo pode desenvolver quando infectado (LYONS et al., 2012). A comparação das sequências de NPHV encontradas pelos autores e Burbelo et al. (2012) mostrou que todas são variantes ligeiramente distintas umas das outras, porém existem regiões que são bastante conservadas entre elas, como é o caso da NS3 (Figura 7).

Em apenas dois anos o gênero Hepacivirus teve inúmeras propostas de modificações taxonômicas sugeridas, decorrentes da identificação dessas novas variantes supracitadas, entretanto tais propostas de revisão de classificação do gênero ainda não foram aceitas pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

Além disso, alguns autores, nos trabalhos publicados, chamam de canine Hepacivirus para os hepacivirus de cães e Non-Primate Hepacivirus os hepacivirus encontrados em equinos, enquanto outros autores passaram a usar o termo Non-Primate Hepacivirus referindo-se tanto aos hepacivirus de cães como de equinos. Por tratar-se de recentes descobertas essas diferenças de nomenclatura são aceitas até o presente momento, podendo perdurar somente até que o ICTV determine a taxonomia definitiva desses vírus. Na presente pesquisa, por conveniência, seguiu-se a proposta de Burbelo et al. (2012) de manter a denominação de HCC para os hepacivirus encontrados em cães, entretanto, adotou-se Hepacivirus em cavalos (HVC) para os hepacivirus encontrados nesta espécie.

Recente pesquisa relatou a identificação de cavalos naturalmente infectados por um vírus cuja análise das características genômicas revelou tratar-se de um Flavivirus, que agrupou no gênero Pegivirus que causa viremia persistente (KAPOOR et al., 2013). Outro trabalho conseguiu associar a Doença de Thielier, que é um quadro de hepatite aguda equina até então de etiologia desconhecida, com a presença de novos pegivirus que fazem viremia persistente podendo ser transmitidos por via parenteral, semelhante ao VHC. As evidências relatadas no trabalho indicam que esses pegivirus sejam, de fato, os responsáveis pelas lesões hepáticas dos animais acometidos pela Doença de Thielier (CHANDRIANI et al., 2013).

Com o desenvolvimento de técnicas específicas e aprimoradas para a detecção e estudo de vírus semelhantes ao VHC em animais, novos isolados de hepacivirus foram detectados também em morcegos insetívoros das espécies *Hipposideros vittatus* e *Otomops martiensseni*, no Quênia. No mesmo estudo foram detectados pegivirus nunca antes relatados em morcegos (QUAN et al., 2013).

Do total de 1258 amostras coletadas de morcegos de diversos países ao redor do mundo (América Central, América do Norte, Ásia e África) 83 espécimes foram positivas

para estes dois vírus, totalizando cerca de 5% (0,6 % de hepacivirus e 4% pegivirus) de positividade para novos flavivirus (QUAN et al., 2013). As similaridades de sequências de aminoácidos, entre os isolados de hepacivirus e pegivirus detectados, variaram de 24% a 100%. A partir de análises da distribuição geográfica dos vírus detectados, sua biodiversidade e os estudos de filogenia molecular levou os autores a propor que estes mamíferos podem ser os principais e mais antigos reservatórios naturais de hepacivirus e por todos os morcegos apresentar aparente saúde, sugeriu que tais vírus não sejam patogênicos nesses hospedeiros.

Ademais, os autores acreditam que se estes mamíferos voadores estiveram de fato relacionados na transmissão dos hepacivirus e pegivirus para outras espécies, provavelmente as rotas de transmissão foram: consumo dos corpos dos morcegos, contaminação do alimento das demais espécies pela excreta dos morcegos, ou exposição ao sangue dos morcegos (QUAN et al., 2013).

Pouco tempo depois Lauck et al. (2013) publicaram trabalho de identificação de novos hepacivirus em primatas não-humanos do Velho Mundo da espécie *Colobus guereza*, de Uganda. Foram capturados nove animais de vida livre, residentes em um parque nacional que funciona como área de reserva animal. Deste total, três (33 %) estavam infectados com RNA viral que, filogeneticamente, agrupavam-se na família *Flaviviridae* e no gênero *Hepacivirus*.

Posteriormente foram relatados novos hepacivirus em roedores selvagens das espécies *Chaetodipus hispidus*, *Neotoma lepida*, *Peromyscus maniculatus* nos EUA, onde também foi identificado e relatado novo pegivirus na espécie *Neotoma albigula*. Neste trabalho com roedores, das amostras de plasma de pouco mais de 400 animais, os isolados de hepacivirus e pegivirus foram detectados em 18 amostras (KAPOOR, et al., 2013). Segundo os autores a maior importância da detecção de hepacivirus em roedores, está no fato de serem pequenos modelos animais, facilitando o manuseio e logística nos experimentos.

Outro estudo com 4770 amostras de soro e órgãos de 41 espécies de roedores também detectou RNA de hepacivirus em 27 animais da espécie *Myodes glareolus* da Europa e dez *Rhabdomys pumilio* da África do Sul. O teste sorológico revelou que 5,3% dos animais que apresentaram viremia também haviam soroconvertido. Em alguns roedores infectados, a análise histológica do tecido hepático revelou infiltrado inflamatório e fibrose de baixo grau, sugerindo que a infecção por hepacivirus, em animais, pode ter similaridade com as lesões hepáticas induzidas pelo VHC em humanos (DREXLER et al., 2013).

Os sítios de ligação ao micro RNA-122 na região 5' UTR, um dos determinantes para persistência e replicação do VHC nos hepatócitos humanos, também foi identificado nos HVC, de roedores e de primatas, entretanto estão ausentes nos vírus de caninos, sugerindo que

nestas espécies os hepacivirus possuem hepatotropismo, enquanto os de cães parecem ter evoluído e se adaptado de forma diferente, podendo apresentar tropismo por outros tecidos, outra evidência disto é que, até o momento, o vírus não foi encontrado em cães com hepatite crônica (KAPOOR et al., 2011; BURBELO et al., 2012; BEXFIELD et al., 2013; DREXLER et al., 2013; LAUCK et al., 2013).

As perspectivas de estudos envolvendo os novos hepacivirus ampliaram as formas de abordagens das dificuldades existentes que constituem verdadeiras barreiras, retardando o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a hepatite C (KAPOOR et al., 2011). A partir da descoberta destes hepacivirus, ocorreu o surgimento de uma nova alternativa estratégica nesta etapa, ou seja, os grupos de pesquisa do mundo todo que antes procuravam adaptar o VHC a um modelo animal para ser melhor estudado, agora já conhecem vírus homólogos que infectam naturalmente os cães, equinos, primatas não-humanos, roedores e morcegos.

Embasados na descoberta desses novos hepacivirus, as futuras pesquisas poderão apontar para a confirmação de outras novas espécies estarem envolvidas na evolução do VHC, podendo até mesmo levantar hipóteses da importância de espécies animais envolvidas na evolução e transmissão deste agente (KAPOOR et al., 2011). A partir de investigações detalhadas que visarão responder essas perguntas, e também com as possibilidades de cultivo dos novos vírus, se multiplicarão os conhecimentos acerca da evolução, transmissão, infecção e biomecanismos do agente causador da hepatite C.

Para as áreas médicas e da saúde humana, as descobertas relacionadas aos recém descobertos hepacivirus representam novas chances para uma evolução no tratamento e cura dos pacientes acometidos com o vírus da hepatite C. Além disso, os hepacivirus de canino e equinos filogeneticamente possui os determinantes genéticos mais similares ao VHC já encontrados. Assim, a partir do cultivo do HCC *in vitro* e até mesmo *in vivo* nos cães e de HVC em equinos, ou mesmo o cultivo de qualquer destes novos hepacivirus em seus respectivos hospedeiros, poderão servir como modelos experimentais, visando a criação de uma vacina eficaz contra o VHC, que poderá finalmente ser melhor trabalhada permitindo um grande passo na profilaxia da doença (KAPOOR et al., 2011).

Presume-se que estudos realizados com estes vírus poderão resultar em descobertas que levem a novas formas de tratamento para a doença humana. Sendo tão notáveis as semelhanças genômicas entre as espécies virais supracitadas, o entendimento do HCC, HVC e demais hepacivirus, associado a estudos sobre formas de combate a estes agentes resultarão em contribuições significativas para o tratamento da hepatite C (BUKH, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar sorológica e molecularmente a ocorrência de hepacivirus em cães e equídeos no Estado do Pará.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demonstrar a infecção pelo HCC e HVC através da soroprevalência de anticorpos anti-VHC.
- Detectar, por meio da técnica de Nested RT-PCR, a presença do RNA viral de hepacivirus em cães acometidos por doença respiratória e gastrointestinal e equídeos de municípios do Estado do Pará.
- Desenvolver sequenciamento e análise filogenética de sequências nucleotídicas parciais da região NS3 obtidas, analisando-as a partir da similaridade genética com outras sequências do hepacivirus e outros vírus relacionados, disponíveis no GenBank.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

“Detecção molecular de Hepacivirus em equinos da Amazônia Oriental, Brasil”

Bernard Salame Gemaque^{1,2}, Alex Junior Souza de Souza^{2,3}, Manoel do Carmo Pereira Soares², Andreza Pinheiro Malheiros², Andrea Lima da Silva², Max Moreira Alves², Michele Soares Gomes Gouvêa⁴, João Renato Rebello Pinho⁴, Heriberto Ferreira de Figueiredo¹, Djacy Barbosa Ribeiro¹, Jonan Souza da Silva¹, Leopoldo Augusto Moraes⁵, Ana Silvia Sardinha Ribeiro¹, Washington Luiz Assunção Pereira¹.

- 1- Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, PA, Brasil
- 2- Seção de Hepatologia, Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS), Belém, PA, Brasil
- 3- Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil
- 4- Instituto de Medicina Tropical, Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil
- 5- Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, PA, Brasil

Resumo: Investigamos a ocorrência de Hepacivirus entre amostras de soro de 330 cães e equídeos provenientes de municípios do Estado do Pará, Amazônia Oriental brasileira. Todas as amostras de cães apresentaram-se negativas para a infecção pelos Hepacivirus, entretanto detectamos uma elevada positividade (25/300) entre os equídeos testados por meio de Nested RT-PCR, com primers para região genômica NS3. Os resultados representam a primeira detecção da infecção por Hepacivirus em equídeos na América Latina e indicam uma ampla distribuição geográfica do vírus entre animais dessa espécie na região pesquisada, sugerindo ser enzoótico e, em cavalos, o vírus é muito similar filogeneticamente ao vírus da hepatite C humana, na região genômica NS3.

Palavras-chave: Vírus da Hepatite C, Hepacivirus, cavalo, Amazônia

INTRODUÇÃO

Atualmente estima-se que cerca de 150 milhões de pessoas, 3% da população mundial, encontram-se cronicamente infectadas pelo Vírus da Hepatite C (VHC), um dos principais responsáveis por indução de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular levando a óbito cerca de 350.000 indivíduos por ano. Todos os anos 3 a 4 milhões de pessoas são infectadas (1).

As pesquisas com este vírus sempre apresentaram inúmeras limitações pela dificuldade de cultivo *in vitro* do agente e limitação de modelos experimentais, exceto os chipanzés, que, somado com a alta diversidade genética do vírus, tem impossibilitado a criação de uma vacina (1,2,3). Entretanto, estas perspectivas foram modificadas após a descoberta nos Estados Unidos, em 2011 de um vírus homólogo ao VHC em cães com doenças respiratórias, naquela circunstância denominado como Hepacivirus canino (HCC) (2).

Posteriormente foram relatadas detecções de novos Hepacivirus entre morcegos insetívoros *Hipposideros vittatus* e *Otomops martiensseni*, no Quênia (4), em primatas não-humanos do Velho Mundo (*Colubus guereza*), em Uganda (5), roedores selvagens das espécies *Chaetodipus hispidus*, *Neotoma lepida*, *Peromyscus maniculatus* nos EUA (6), *Myodes glareolus* na Alemanha e Holanda e *Rhabdomys pumilio* na África do Sul (7) e entre em equinos (*Equus caballus*) da Alemanha (7), dos EUA, Nova Zelândia (8) e Escócia (9).

Hepacivirus nos cães foi identificado, em estudo prévio, em animais com sinais clínicos respiratórios e no citoplasma de hepatócitos de caninos com distúrbios gastrointestinais inespecíficos (2). Até o presente momento, a infecção em equinos parece não estar correlacionada a sinais clínicos específicos, apesar de ter sido associado a uma discreta elevação dos níveis da enzima hepática Gama Glutamil Transferase (GGT) em um cavalo infectado pelo vírus, entretanto, o hepatotropismo e a capacidade do vírus de induzir doença hepática nessa espécie permanecem pouco esclarecidos (9).

Em alguns roedores infectados, a análise histológica do tecido hepático revelou infiltrado inflamatório e fibrose de baixo grau, sugerindo que a infecção por Hepacivirus nestes animais pode ter similaridade com as lesões hepáticas induzidas pelo VHC em humanos (7).

Os sítios de ligação ao micro RNA-122 na região 5' UTR, um dos determinantes para persistência e replicação do VHC nos hepatócitos humanos, também foi identificado no HVC e Hepacivirus de roedores, entretanto estão ausentes nos Hepacivirus detectados em cães, sugerindo que os Hepacivirus de cavalos e roedores possuem hepatotropismo, enquanto os de

cães parecem ter evoluído e se adaptado de forma diferente, podendo apresentar tropismo por outros tecidos (2-7-8).

Outra evidência disto é que, até o momento, o vírus não foi encontrado em cães com hepatite crônica (10). Os vírus identificados em cães e equinos em relatos anteriores, apesar de apresentarem divergências, são filogeneticamente muito similares. Uma das amostras de equino da Nova Zelândia apresentou genoma quase idêntico aos Hepacivirus caninos (8).

Até o presente momento, por se tratarem de descobertas recentes, estes vírus não possuem nomenclatura oficial definida pelo International Committee of Taxonomy Viral (ICTV). Neste trabalho, convencionou-se chamar os vírus detectados em equinos de Hepacivirus em cavalos (HVC). O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de infecção por Hepacivirus em cães e equídeos criados em distintas cidades da Amazônia oriental brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue de 330 animais, 30 caninos e 300 equídeos, foram coletadas de Janeiro de 2011 a Novembro de 2013 em nove municípios e um distrito do Estado do Pará, na Amazônia Oriental brasileira. As coletas dos cães foram realizadas nas cidades de Belém (Latitude-01° 27' 21"S; Longitude-48° 30' 16"W), Ananindeua (01° 21' 56"S; 48° 22' 20"W), Benevides (01° 21' 41" S; 48° 14' 41" W) e Marituba (01° 21' 19"S; 48° 20' 31"W), (Figura 1). Foram obtidas em hospitais veterinários, e abrigos de animais. Foram incluídos na pesquisa cães de raças e faixa etária variadas (de 3 meses a 13 anos) de ambos os sexos (11 machos e 19 fêmeas), dos quais 25 apresentavam, no momento da coleta, sinais clínicos de alterações respiratórias e 5 com distúrbios gastrointestinais, todos eles de etiologia desconhecida, porém com sinais de ordem infecciosa.

As amostras de equídeos foram coletadas nos municípios de Belém, Ananindeua, Acará (01° 57' 39"S; 48° 11' 48"W), Chaves (00° 09' 36"S; 49° 59' 18"W), Santo Antônio do Tauá (01° 09' 07"S; 48° 07' 46"W), Dom Eliseu (04° 17' 06"S; 47° 30' 18"W), Peixe-Boi (01° 11' 31"S; 47° 18' 44"W) e ilha de Cotijuba (01°13'04"S; 48°32'44"W) que é distrito de Belém. Os equídeos eram de raças e faixa etárias variadas (de 1 a 18 anos), de ambos os sexos (161 machos, 123 fêmeas e 16 cujos dados referentes ao sexo não estavam disponíveis), dos quais 265 eram equinos (*Equus caballus*), 30 eram muares (*Equus mullus*) e 5 asininos (*Equus asinus*). Todos os animais eram residentes do Estado do Pará, situado na Amazônia Oriental brasileira e utilizados em atividade de tração (159 animais de carroceiros), outros 94 animais

de fazenda e auxiliavam no trabalho com gado, e outros 47 eram criados em haras e participam de competições.



Figura 1 - Localização geográfica dos municípios de coleta das amostras de equídeos e caninos no Estado do Pará. Amazônia brasileira. Os números são correspondentes aos municípios (1 - Chaves; 2 - Cotijuba; 3 - Belém; 4 - Ananindeua; 5 - Santo Antônio do Tauá; 6 - Marituba; 7 - Benevides; 8 - Peixe-Boi; 9 - Acará; 10 - Dom Eliseu).

Todos os equídeos deste experimento tiveram o sangue coletado pela veia jugular e os caninos pela veia radial utilizando tubos estéreis sem anticoagulante. Após centrifugação do sangue, alíquotas de soro foram separadas para sorologia e detecção molecular e permaneceram armazenadas em freezer -70°C até o processamento. Todos os procedimentos realizados para obtenção das amostras foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso Animal do Instituto Evandro Chagas (parecer nº 0023/2012 CEUA/IEC/CENP/SVS/MS).

Para detecção sorológica utilizou-se o kit comercial Anti-HCV MUREX (DIASORIN versão 4.0) para pesquisa de anticorpos anti-HCV (IgM e IgG), pela técnica de ELISA indireto. Os micropoços da placa deste Kit são revestidos com antígenos provenientes das regiões core, NS3, NS4 e NS5 do HCV.

Para detecção molecular do genoma do HCC e HVC, primeiramente o RNA viral foi extraído de um volume de 250 μ L de cada uma das 330 amostras de soro pelo método de fenol/clorofórmio/isotiocianato de guanidina, com a utilização do Trizol LS Reagent (Invitrogen™) e, posteriormente, o RNA foi convertido em cDNA, utilizando-se random primers. Foi realizada a transcrição reversa (RT) do RNA em cDNA, usando random primers. A incubação no termociclador para a R.T. ocorreu segundo o programa: 70°C para 10 minutos (min), 25°C durante 15 min, e 37°C durante 60 min e 95°C por 15 min; Hold de 10°C.

Os primers selecionados para reações de Nested RT-PCR foram obtidos de publicação prévia (6), com sequência-alvo na região NS3 do HCC (1° round= Chcv-0F1:5'-TCCACCTATGGTAAGTTCTTAGC-3'; Chcv-0R1:5'-ACCC TGTCATAAGGGCGTC-3'; 2° round= Chcv-0F2: 5'-CCTATGGTAAGTTCTTAGCT GAC-3'; Chcv-0R2: 5'-CCTGTCATAAGGGCGTCCGT-3').

Em virtude da similaridade filogenética entre os Hepacivirus detectados em cavalos e os detectados em cães, optou-se por utilizar os mesmos primers para pesquisa nas duas espécies (9). As reações de 1° round foram ajustadas para um volume final de 50 μ L, em que foram adicionados 5 μ L de 10X PCR Buffer, 1 μ L de DNTPs (10nM), 1,5 μ L de MgCl₂ (50nM), 1 μ L de cada primer (forward e reverse) (20 μ M), 0,2 μ L da Platinum Taq (Invitrogen) e 5 μ L do cDNA da amostra. Para as reações de 2° round seguiu-se o mesmo protocolo, porém com a mudança somente dos primers e com a adição de 5 μ L do produto de amplificação do primeiro round.

A primeira rodada de PCR (amplificação) foi realizada usando 5 μ L do cDNA obtido de cada amostras, pelo programa: 30 ciclos a 94°C para 18 s, 50°C durante 21 s, e 72°C durante 1,5 minutos, e um ciclo de 72°C por 5 min. Na segunda rodada, utilizou-se o mesmo programa da primeira. A detecção dos produtos de 2° round foi realizada no sistema automatizado QIAxcel (QIAGEN) e amostras que apresentaram bandas com tamanho aproximado de 380 pb foram consideradas como positivas.

Os produtos de 2° round foram sequenciados com auxílio do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), de acordo com as orientações do fabricante, em sequenciador nucleotídico automatizado 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequências consenso foram montadas a partir das sequências forward e reverse com auxílio do software Bioedit e, comparadas filogeneticamente, com a ferramenta BLAST/NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - National Center for Biotechnology Information - NCBI) para verificação do grau de similaridade nucleotídica com outras sequências de Hepacivirus disponíveis no banco de dados do GenBank/NCBI.

Posteriormente, utilizando-se o software MEGA (v5.1), as sequências consenso obtidas foram alinhadas com outras 43 sequências representativas de Hepacivirus humanos e animais, despositadas no Genbank/NCBI, e analisadas filogeneticamente pelo método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros, com base em sequência nucleotídica parcial da NS3 de 294 pb. Análise de Bootstrap foi aplicada para verificação do grau de confiabilidade das relações filogenéticas e valores acima de 70% foram considerados como significativos (1000 replicatas). Uma sequência de pegivirus equino (Genbank NC020902) foi utilizada como grupo externo. O cálculo de distância nucleotídica foi desenvolvido no software PAUP 4.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que nenhuma amostra de cão foi positiva tanto para detecção sorológica quanto para detecção do RNA viral, entretanto 25 (8,33%) das 300 amostras de equídeos foram positivas para Hepacivirus pela técnica de Nested RT-PCR (Tabela 1), sendo que nenhuma amostra positiva ou negativa para o RNA viral apresentou positividade na sorologia para anticorpos anti-HCV.

O resultado sorológico obtido neste trabalho, em que nenhuma amostra foi positiva, nem mesmo aquelas cujo genoma viral foi detectado por Nested RT-PCR, foi diferente do obtido em trabalho anterior (8), que ao utilizar um teste mais específico e sensível, identificaram 36 equinos sororreativos, dos quais, oito apresentavam viremia. É provável que no presente estudo os resultados tenham sido consequência do uso de ensaio imunoenzimático específico para o VHC, visto que não existem kits comerciais para detecção dos Hepacivirus em animais e/ou de seus anticorpos.

Animais utilizados com diferentes finalidades apresentaram-se infectados, respectivamente, 40% de carroceiros, 36% de competições e 24% de trabalho com gado, animais de duas raças puras (36% e 24%) e outros sem raça definida (40%) e tanto machos (13/25) quanto fêmeas (10/25) podem ser hospedeiros do vírus. Equinos de um a 10 anos apresentaram infecção. Os resultados demonstram portanto que a infecção pode afetar animais de várias idades. Em relato anterior os equinos positivos possuíam de 8 anos a 20 anos (9).

O fato de 36% dos equinos positivos (todos os espécimes provenientes da cidade de Acará) desta pesquisa serem assintomáticos no momento da coleta, sugere que, ao menos em parte, o ciclo do HVC ocorre de forma pouco patogênica, corroborando com trabalho anterior

em que um cavalo positivo, acompanhado por cerca de cinco meses, apresentou viremia persistente, porém, sem sinais clínicos que pudessem representar doença (9).

De modo semelhante, alguns autores sugerem que o HCC possa ser um vírus de baixa patogenicidade para o fígado de cães (10). Informações clínicas sobre o estado de saúde dos equinos das outras cidades incluídos nesta pesquisa são desconhecidas. Até o presente momento não foi possível associar a infecção por Hepacivirus em equinos com sinais clínicos em nenhum dos relatos publicados anteriormente (8-9).

Tabela 1 – Dados dos equinos positivos na pesquisa de Hepacivirus por Nested RT-PCR, no Estado do Pará, identificados pelo registro interno do Instituto Evandro Chagas e pelo código de acesso do GenBank de acordo com a procedência, raça, sexo, idade e segundo a atividade que desempenham. NI= Não Informado; SRD= Sem Raça Definida; M= macho; F= fêmea.

IDENTIFICAÇÃO	ACESSO GENBANK	PROCEDÊNCIA	RAÇA	SEXO	IDADE (ANOS)	ATIVIDADE
AS 8912	KJ469442	Acará	Q. de Milha	F	6	Haras/Competição
AS 8927	KJ469443	Acará	Q. de Milha	F	6	Haras/Competição
AS 8930	KJ469444	Acará	Q. de Milha	F	3	Haras/Competição
AS 8932	KJ469445	Acará	Q. de Milha	M	1	Haras/Competição
AS 8938	KJ469446	Acará	Q. de Milha	F	7	Haras/Competição
AS 8939	KJ469447	Acará	Q. de Milha	F	4	Haras/Competição
AS 8940	KJ469448	Acará	Q. de Milha	M	6	Haras/Competição
AS 8941	KJ469449	Acará	Q. de Milha	F	8	Haras/Competição
AS 8943	KJ469450	Acará	Q. de Milha	M	8	Haras/Competição
AS 8990	KJ469451	Cotijuba	S.R.D	M	10	Tração/Carroceiro
AS 9008	KJ469452	Cotijuba	S.R.D	M	08	Tração/Carroceiro
AS 9016	KJ469453	Cotijuba	S.R.D	M	2	Tração/Carroceiro
AS 9019	KJ469454	Cotijuba	S.R.D	M	6	Tração/Carroceiro
AS 9068	KJ469455	D. Eliseu	S.R.D	M	7	Tração/Carroceiro
AS 9069	KJ469456	D. Eliseu	S.R.D	F	NI	Tração/Carroceiro
AS 9186	KJ469457	Ananindeua	S.R.D	M	10	Tração/Carroceiro
AS 9201	KJ469458	Ananindeua	S.R.D	M	NI	Tração/Carroceiro
AS 9218	KJ469459	Ananindeua	S.R.D	M	NI	Tração/Carroceiro
AS 9264	KJ469460	Belém	S.R.D	F	7	Tração/Carroceiro
AS 9293	KJ469461	Chaves	Marajoara	NI	NI	Fazenda/Gado
AS 9298	KJ469462	Chaves	Marajoara	M	NI	Fazenda/Gado
AS 9308	KJ469463	Chaves	Marajoara	NI	NI	Fazenda/Gado
AS 9322	KJ469464	Chaves	Marajoara	F	NI	Fazenda/Gado
AS 9328	KJ469465	Chaves	Marajoara	F	NI	Fazenda/Gado
AS 9330	KJ469466	Chaves	Marajoara	M	NI	Fazenda/Gado

Durante as coletas em haras e fazendas foi observado que os equinos compartilhavam dos mesmos ambientes e mantinham contato físico frequentemente. Assim, não se pode descartar a hipótese de transmissão horizontal natural por via fecal-oral e/ou através de aerossóis entre os animais. Além disso, dentre as propriedades estudadas, é comum a prática de administração de medicamentos por vias parenterais nos equinos reutilizando-se a mesma agulha para vários animais sem prévia esterilização.

Portanto, como o VHC é transmitido principalmente pela via parenteral, é possível que esta via de transmissão também seja importante na disseminação dos outros Hepacivirus. Futuros estudos são necessários para confirmar as vias de transmissão naturais do HVC e para investigar correlações clínicas da infecção e/ou se durante o curso da infecção o vírus é hábil de desenvolver danos hepáticos significativos nos equinos infectados.

A identificação de Hepacivirus em cavalos estimulou a busca de novos vírus nesta espécie. Recentemente, dois novos flavivirus foram associados à doença hepática em equinos, ambos provocando viremia persistente: um pegivirus detectado em equinos com alterações de transaminases hepáticas (11) e um flavivirus associado à doença de Theiler, que é caracterizada pela ocorrência de hepatite aguda, pós-transfusional (12). Entretanto, enquanto estes flavivirus foram relacionados a alterações significativas, por outro lado há ausência de dados que confirmem alterações clínicas decorrentes de infecção pelo HVC (11,12). Foram também recém descobertos pegivirus em roedores e morcegos (4,6).

Todos os equinos que residiam em haras desta pesquisa, incluindo os nove animais positivos de Acará, participavam de competições locais e alguns em outros estados do Brasil. Durante estes torneios, é possível que estes animais entrassem em contato com os outros cavalos. A participação nestes eventos também foi relatada, em trabalho anterior, em um equino infectado por Hepacivirus (9), o que sugere que estas competições podem representar ocasiões que facilitam a transmissão pela grande concentração de animais. Entretanto, por desconhecer as vias de transmissão e não dispor de dados para concluir se os animais deste estudo se infectaram através destes eventos não se pode confirmar esta hipótese.

Os resultados apresentados no presente estudo ampliam os registros da ocorrência de Hepacivirus em animais de uma nova região geográfica, contribuindo para o entendimento da dispersão do vírus entre reservatórios.

Os isolados de Hepacivirus detectados em equinos no presente trabalho, a partir da inferência das relações filogenéticas, agruparam com outras sequências de Hepacivirus obtidas de cães e equinos ao redor do mundo (Figura 2). Adicionalmente, os isolados apresentaram variabilidade entre si, formando, em grande parte, grupos de acordo com a

origem geográfica, o que sugere que existe uma importante variabilidade entre as sequências nucleotídicas do vírus circulante entre equinos na Amazônia Oriental brasileira e que o vírus apresentar, inclusive, um caráter enzoótico nessa região.

As sequências relatadas no presente trabalho apresentaram maior relação filogenética com as sequências de Hepacivirus de cães e equinos previamente relatadas em trabalhos anteriores. Cálculos de divergência nucleotídica referentes às sequências detectadas nesta pesquisa, revelaram variações de distância de 0% a 19,9% entre elas.

Muitos destes novos isolados, agruparam entre si de acordo com a procedência geográfica, com exceção de duas sequências, das quais uma foi a KJ469449 que agrupou distante das sequências amazônicas e próxima dos Hepacivirus detectados em equinos dos EUA (7), apresentando similaridade de até 94% com uma sequência estadunidense. Esta amostra foi obtida de um cavalo da raça Quarto de Milha, raça originária dos EUA.

A outra sequência foi a KJ469466 que agrupou mais próximo aos Hepacivirus detectados na Alemanha (7), apresentando similaridade de até 95%. Esta amostra foi obtida de um cavalo da raça Marajoara. Esta raça teve sua origem a partir do cruzamento entre as raças europeias Árabe e Anglo-Árabe na ilha do Marajó, Estado do Pará, Brasil onde até os dias atuais é geneticamente conservada (13).

A importação dos primeiros cavalos para a ilha do Marajó há 300 anos atrás ocorreu com a chegada destes animais trazidos de Cabo Verde pelos colonizadores portugueses. Com o passar dos anos, a partir dos cruzamentos e isolamento geográfico a raça Marajoara foi desenvolvendo suas peculiaridades e adaptações a região Amazônica (13).

Estudos moleculares adicionais devem ser desenvolvidos para confirmar a autoctonicidade destes isolados neotropicais do HVC, uma vez que, o conhecimento das vias de infecção, bem como do número de sequências nucleotídicas do vírus nestes animais é limitado.

Nesse sentido, é difícil estimar se os HVC já estavam presentes nas Américas há um longo tempo, ou foram introduzidas no “Novo Mundo” juntamente com as linhagens de equinos que vieram com os colonizadores europeus. Neste sentido, os resultados poderão ser úteis para estudos filogenéticos futuros que possam explicar a evolução biológica e comportamento dos Hepacivirus, entre animais, das Américas.

As duas principais hipóteses sobre evolução dos cavalos fazem referência à origem de seus ancestrais na Ásia Central, ou na América Setentrional de onde emigraram para a Ásia, quando o Alasca ainda era ligado àquele continente pelo estreito de Bering (através da ponte de Bering formada nas Eras Glaciais) e de lá chegando a Europa e África (14).

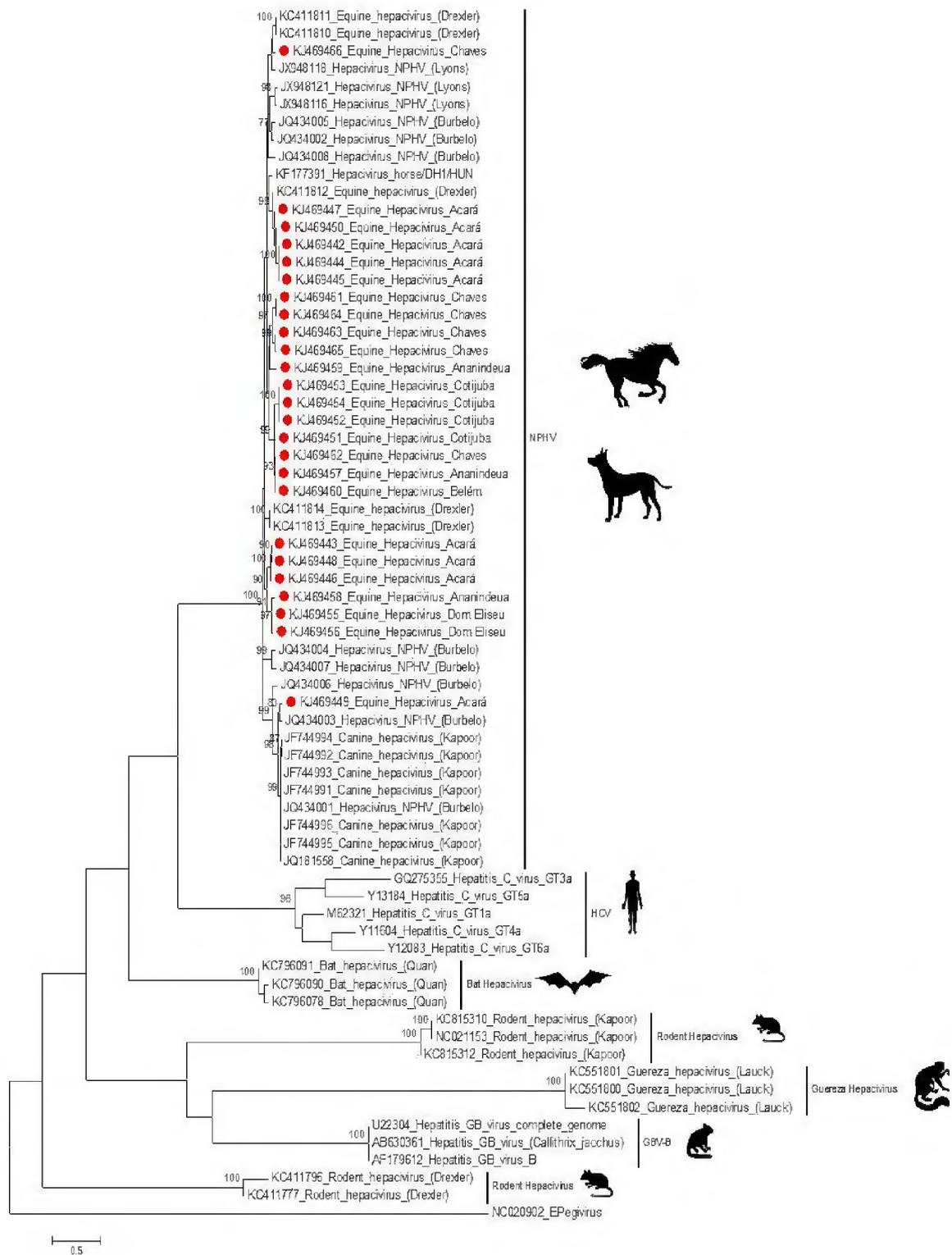


Figura 2 - Árvore filogenética por Máxima Verossimilhança de sequências nucleotídicas parciais da região NS3 (294 pb) do gênero Hepacivirus. As sequências recuperadas no Genbank encontram-se descritas pelo número de acesso, seguido das espécies em que foram isoladas. As 25 sequências obtidas de equinos no presente estudo estão destacadas (●) e identificadas pelo código de registro interno, seguido do município de procedência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) superiores a 70% encontram-se descritos nos nós. Uma sequência de pegivirus equino foi utilizada como grupo externo.

Evidências fósseis indicam que ancestrais do cavalo moderno habitaram o continente americano, entretanto desaparecendo no período Quaternário. A partir de 1494, alguns exemplares do cavalo doméstico foram introduzidos na América Central pelos colonizadores e cerca de 30 anos depois na América do Sul (15).

A co-evolução de strains dos Hepacivirus juntamente com o hospedeiro equino pode ter ocorrido próximo do período do descobrimento das Américas, pois estudos primários sugerem que os Hepacivirus encontrados em cães, que são extremamente semelhantes aos encontrados nos equinos, surgiram entre 500 e 1000 anos no passado (2).

Entretanto, as informações que se dispõem até o momento não permitem saber se o ancestral comum dos Hepacivirus em cavalos estava nas Américas e se foi neste continente após a introdução do cavalo doméstico que o vírus o infectou e após mutações e evolução tornou-se o atual HVC.

Outra possibilidade é que o vírus já existia na Europa e foi trazido ao Novo Mundo com os cavalos usados pelos colonizadores, permanecendo nesta espécie até os dias atuais. Pesquisas adicionais são necessárias para esclarecimentos referentes à evolução, epidemiologia e significados clínicos da infecção.

CONCLUSÕES

O Hepacivirus está presente em cavalos no Novo Mundo, e foi identificado na Amazônia Oriental brasileira, onde parece ter caráter enzoótico, com uma relevante dispersão geográfica no nordeste do Estado do Pará. Os antígenos core, NS3, NS4 e NS5 do VHC e os conjugados presentes no Kit comercial utilizado parecem não ser eficazes para detecção de anticorpos anti-HVC. Os isolados neotropicais de HVC detectados apresentam notável diversidade nucleotídica da região NS3 e agrupam filogeneticamente próximo aos HCC e HVC relatados anteriormente e disponíveis no GenBank.

AGRADECIMENTO

Este estudo foi realizado com o apoio financeiro do Instituto Evandro Chagas / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde. Obrigado a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (REUNI/CAPES) pelo incentivo e apoio financeiro. Agradecemos aos pesquisadores Elton Everton, Antonio Soares, Fabrício Resende,

André Chagas, Pedro Freitas e as equipes do Laboratório de Patologia Animal/UFRA e do Projeto Carroceiro/UFRA pela ajuda nas coletas e processamento de amostras.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO), Hepatitis C. Fact sheet N°164. 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
2. Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henriquez JA, Firth C, Hirschberg DL, Rice CM et al. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011. 108, 11608–11613.
3. Bukh J. Hepatitis C homolog in dogs with respiratory illness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. 108(31), 12563-12564.
4. Bexfield NH, Watson PJ, Heaney J, Heeney JL, & Tiley L. Canine hepacivirus is not associated with chronic liver disease in dogs. *Journal of Viral Hepatitis*, 2013, 21(3), 223-228.
5. Quan P-L, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, Anthony SJ, et al. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110:8194-8199.
6. Lauck M, Sibley SD, Lara J, Purdy MA, Khudyakov Y, Hyeroba D, et al. A novel hepacivirus with an unusually long and intrinsically disordered NS5A protein in a wild Old World primate. *Journal of virology*, 2013, 87:8971–8981.
7. Kapoor A, Simmonds P, Scheel TK, Hjelle B, Cullen JM, Burbelo PD, et al. Identification of Rodent Homologs of Hepatitis C Virus and Pegiviruses. *MBio*, 2013, 4(2).
8. Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Lukashev AN, Gmyl A, Coutard B, et al. Evidence for novel hepaciviruses in rodents. *PLoS pathogens*,
9. Burbelo PD, Dubovi EJ, Simmonds P, Medina JL, Henriquez JA, Mishra N, et al. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *Journal of virology*, 2012, 86(11), 6171-6178.
10. Lyons S, Kapoor A, Sharp C, Schneider BS, Wolfe ND, Culshaw G, et al. Nonprimate hepaciviruses in domestic horses, United Kingdom. *Emerging infectious diseases*, 2012, 18(12).
11. Degrandi TM, Marques JRF, Costa MRT, Vinade L, Gunski RJ and Garnerio ADV. Cytogenetic characterization of Brazil origin marajoara horses. *International Journal of Veterinary Medicine*, 2013, v 2013.
12. Goulart JA. O cavalo na formação do Brasil. Rio de Janeiro: Letras e Artes, 1964. 249p.

5. CONCLUSÕES

- O Hepacivirus em cavalos está presente no Novo Mundo, detectado na Amazônia Oriental, onde parece ter caráter enzoótico, com uma relevante dispersão geográfica regional no nordeste do estado do Pará.
- Os antígenos do core, NS3, NS4 e NS5 do VHC e os conjugados presentes no Kit comercial utilizado parecem não ser eficazes para detecção de anticorpos anti-HVC.
- Os HVC detectados em equinos neotropicais apresentam importante diversidade nucleotídica da região NS3 e agrupam filogeneticamente próximo aos HCC e HVC relatados anteriormente e disponíveis no GenBank.

6. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, H.; BERTHEAUME, L. **Atlas of virus diagrams**. Florida: CRC Press, 1995. p. 199.

ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p. 2436-2441, 2007.

ALTER, H. J. To C or not to C: these are the questions. **Blood**, v. 85, n. 7, p. 1681-1695, 1995.

ALVARIZ, F. G. Hepatite C Crônica: aspectos clínicos e evolutivos. **Moderna Hepatologia 2004**; Ano 30. Edição Especial, p. 20–32, 2004.

AVILA, S. L. M.; FERREIRA, A. W. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. Ed: Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001.

BAKER J. C. Bovine viral diarrhea virus: a review. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 190, p. 1449–1458, 1987.

BENSABATH G., SOARES M. C. P.; MAIA, M. M. S. Hepatites por vírus. In: **Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém: Fundação SESP, v. 1., 1986, p. 510-515.

BENSABATH, G.; CONDE, S. R. S. S., DIAS JUNIOR, L. B., DEMACHKI, S. Hepatites virais In LEÃO, R. N. Q; BICHARA, C. N. C.; FRAIHA NETO, H. **Medicina tropical e infectologia na Amazônia**. Belém: Ed. SAMAUMA, 2013, p. 675-677.

BENSABATH, G.; HADLER, S. C.; SOARES, M. C. P.; FIELDS, H. L.; MAYNARD, J. E. Epidemiologic and serologic studies of acute viral hepatitis in Brazil's Amazon Basin. **Relation**, v. 21, n. 1, p. 16-27, 1987.

BEXFIELD, N. H.; WATSON, P. J.; HEANEY, J.; HEENEY, J. L.; TILEY, L. Canine hepacivirus is not associated with chronic liver disease in dogs. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 21, n.3, p. 223-228, 2013.

BOOMKENS, S. Y.; SLUMP, E.; EGBERINK, H. F.; ROTHUIZEN, J.; PENNING, L. C. PCR Screening for candidate etiological agents of canine hepatitis. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 1–2, p. 49–55, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas** 3^a ed, Brasília, 2001. 84 p.

BUKH, J.; APGAR, C. L.; YANAGI, M. Toward a surrogate model for hepatitis C virus: An infectious molecular clone of the GB virus-B hepatitis agent. **Virology**, v. 262, p. 470-478, 1999.

BUKH, J. Hepatitis C homolog in dogs with respiratory illness. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 31, p. 12563-12564, 2011.

BURBELO, P. D. DUBOVI, E. J.; SIMMONDS, P.; MEDINA, J. L.; HENRIQUEZ, J. A.; MISHRA, N.; WAGNER, J.; TOKARZ, R.; CULLENT, J. M.; IADAROLA, M. J.; RICE, C. M.; LIPKIN, W. I.; KAPOOR, A. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. **Journal of Virology**, v. 86, n. 11, p. 6171-6178, 2012.

CACOUB P.; POYNARD, T. Y.; GHILLANI, P.; CHARLOTTE, F.; OLIVI, M.; PIETTE, J. C. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. **Arthritis & Rheumatology**, v. 42, p. 2204-12, 1999.

CAMPIOTTO, S., PINHO, J. R. R.; CARRILHO, F. J.; SILVA, L. C.; SOUTO, F. J. D.; SPINELLI, V. Geografic distribution of hepatitis C vírus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 41-49, 2005.

CDC. **Guidelines for Viral Hepatitis Surveillance and Case Management. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports**, p. 1-43, 2002.

CHANDRIANI, S.; SKEWES-COX P.; ZHONG W.; GANEM, D.E.; DIVERS, T.J.; VAN BLARICUM, A.J. Identification of a previously undescribed divergent virus from the Flaviviridae family in an outbreak of equine serum hepatitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110 n. 15, 2013.

CHOO Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D. W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-362, 1989.

DE LAMBALLERIE, X.; CHARREL, R. N.; ATTOUI, H.; DE MICCO, P. Classification of hepatitis C virus variants in six major types based on analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B genome regions and complete polyprotein sequences. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 45-51, 1997.

DI BISCEGLIE, A. M. D.; BACON, B. R. The unmet challenges of hepatitis C. **Scientific American**, v. 281, n. 4, p. 80-85, 1999.

DREXLER, J. F.; CORMAN, V. M.; MULLER, M. A.; LUKASHEV, A. N.; GMYL, A.; COUTARD, B.; ADAM, A.; RITZ, D.; LEIJTEN, L. M.; VAN RIEL, DEBBY; KALLIES, R.; KLOSE, S. M.; GLOZA-RAUSCH, F.; BINGER, T.; ANNAN, A.; ADU-SARKODIE, Y.; OPPONG, S.; BOURGAREL, M.; RUPP, D.; HOFFMAN, B.; SCHLEGEL, M.; KÜMMERER, B. M.; KRÜGER, D. H.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; SETIÉN, A. A.; COTTONTAIL, V. M.; HEMACHUDHA, T.; WACHARAPLUESADEE, S.; OSTERRIEDER, K.; BARTENSCHLAGER, K.; MATTHEE, S.; BEER, M.; KUIKEN, T.; REUSKEN, C.; LEROY, E. M.; ULRICH, R. G.; DROSTEN, C. Evidence for novel Hepaciviruses in rodents. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy: The eighth report of the international committee on taxonomy of viruses**. Elsevier/Academic Press; 2005; p. 1259.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Viral hepatitis prevention by immunization. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 3, p. 55-66, 2006.

FILHO, Nelson Aprobato. Fidelidade e traição entre cães e seres humanos - Libertação Animal. **Scientific American Brasil**, v. 56, 2013.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Ed. UFSM. Universidade Federal de Santa Maria, 2007. p. 568 – 570.

FMTHVD (Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado/ Governo do Estado do Amazonas). Disponível em: <http://www.fmt.am.gov.br/imagens/mapabr.jp>. Acessado em Setembro de 2013.

KAPOOR, A.; SIMMONDS, P.; GEROLD, G.; QAISAR, N.; JAIN, K.; HENRIQUEZ, J. A.; FIRTH, C.; HIRSCHBERG, D. L.; RICE, C. M.; SHIELDS S.; LIPKIN, W. I. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 28, p. 11608-11613, 2011.

KAPOOR, A.; SIMMONDS, P.; TROELS, K. H. S.; HJELLE, B.; CULLEN, J. M.; BURBELO, P. D.; CHAUHAN, L. V.; DUAISAMY, R.; LEON; M. S.; JAIN, K.; VANDERGRIFT, K. J.; CALISHER, C. H.; RICE, C. M.; LIPKIN, W. I. Identification of Rodent Homologs of Hepatitis C Virus and Pegiviruses. **mBio**, v. 4, n. 2, 2013.

LAUCK, M.; SIBLEY, S. D.; LARA, J.; PURDY, M. A.; KHUDYAKOV, Y.; HYEROBA, D.; A. TUMUKUNDE; G. WENY; W. M. SWITZER; C. A. CHAPMAN; A. L. HUGHES; T. C. FRIEDRICH; D. H. O'CONNOR ;GOLDBERG, T. L. A novel hepacivirus with an

unusually long and intrinsically disordered NS5A protein in a wild Old World primate. **Journal of virology**, 2013.

LIANG T. J.; REHERMANN, B.; SEEFF, L. B.; HOOFNAGLE, J. H. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, n. 4, p. 296-305, 2000.

LYONS, S; KAPOOR, A.; SHARP, C.; SCHNEIDER, B. S.; WOLFE, N. D.; GEOFF, C.; CORCORAN, B.; MCGORUM, B. C.; SIMMONDS, P. Nonprimate hepaciviruses in domestic horses, United Kingdom. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 12, p. 1976-1982, 2012.

MORADPOUR, D.; PENIN, F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. In: **Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy**. HEIDELBERG, S. B. 2013. p. 113-142.

NGUYEN, M. H.; KEEFFE, E. B. Chronic hepatitis C: genotypes 4 to 9. **Clinics in liver disease**, v. 9, n. 3, p. 411-426, 2005

POORDAD, F.; DIETERICH, D. Treating hepatitis C: current standard of care and emerging direct-acting antiviral agents. **Journal of viral hepatitis**, v. 19, n. 7, p. 449-464, 2012.

POTGIETER, L. N. D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock**. 2. ed. Cape Town: Oxford University, 2004, v. 2, p. 946-969.

QUAN, P. L.; FIRTH, C.; CONTE, J. M.; WILLIAMS, S. H.; ZAMBRANA-TORRELIO, C. M.; ANTHONY, S. J.; ELLISON, J. A.; GILBERT, A. T.; KUZMIN, I. V.; NIEZGODA, M.; OSINUBI, M. O. V.; RECUENCO, S.; MARKOTTER, W.; BREIMAN, R. F.; KALEMBA, L.; MALEKANI, J.; LINDBLADE, K. A.; ROSTAL, M. K.; OJEDA-FLORES, R.; SUZAN, G.; DAVIS, L. B.; BLAU, D. M.; OGUNKOYA, A. B.; CASTILLO, D. A. A.; MORAN, D.; NGAM, S.; AKAIBE, D.; AGWANDA, B.; BRIESE, T.; EPSTEIN J. H.; DASZAK, P.; RUPPRECHT, C. E.; HOLMES, E. C.; LIPKIN, W.I. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 8194-8199, 2013.

REIS, F.; OLIVEIRA, M.; ELOY, L.; RIOS, C.; CANGUÇU, S.; DANTAS, N.; PARANÁ, R. O vírus da hepatite C como causa de miocardiopatia dilatada idiopática: uma revisão de literatura. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 30, n. 1, p. 154-160, 2006.

ROBERTSON, B.; MYERS, G.; HOWARDS, C. Classification, nomenclature and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization.

International committee on virus taxonomy. **Archives of Virology**, v. 143, p.2493-2503, 1998.

SANDMANN, L.; PLOSS, A. Barriers of hepatitis C virus interspecies transmission. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 70-80, 2013.

SANTOS, A. C. A epidemia de dengue no município de Jaru (RO) e as medidas de enfrentamento do poder público: uma reflexão. **Ciência & Consciência**, v. 2, 2010.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução a Virologia Humana**. Ed: Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2 ed. 2002.p. 513-518

SAWADA, L.; PINHEIRO, A. C. C.; LOCKS, D.; PIMENTA, A. D. S. C.; REZENDE, P. R.; CRESPO, D. M.; CRESCENTE, J. A. B.; LEMOS, J. A. R.; OLIVEIRA, A. B. D. Distribution of hepatitis C virus genotypes among different exposure categories in the State of Pará, Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 8-12, 2011.

SCHATZMAYR, H. C.; BARTH, O. M. Características gerais dos vírus patogênicos para o homem. In: COURA, J.C. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. v. 2. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005; p. 1645- 1660.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELÉAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S.; HALFON, P.; INCHAUSPÉ, G.; KUIKEN, C.; MAERTENS, G.; MIZOKAMI, M.; MURPHY, D. G.; OKAMOTO, H.; PAWLITSKY, J. M.; PENIN, F.; SABLON, E.; SHIN-I, T.; STUYVER, L. J.; THIEL, H.-J.; VIAZOV, S.; WEINER, A. J.; WIDELL, A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 962-973, 2005.

SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALTER, H. J.; BONINO, F.; BRADLEY, D. W.; BRECHOT, C.; BROUWER, J. T.; CHAN, S.-W.; CHAYAMA, K.; CHEN, D. S.; CHOO, Q.-L.; COLOMBO, M.; CUYPERS, H. T. M.; DATE, T.; DUSHEIKO, G. M.; ESTEBAN, J. I.; FAY, O.; HADZIYANNIS, S. J.; HAN, J.; HATZAKIS, A.; HOLMES, E. C.; HOTTA, H.; HOUGHTON, M.; IRVINE, B.; KOHARA, M.; KOLBERG, J. A.; KUO, G.; LAU, J. Y. N.; LELIE, P. N.; MAERTENS, G.; MCOMISH, F.; MIYAMURA, T.; MIZOKAMI, M.; NOMOTO, A.; PRINCE, A. M.; REESINK, H. W.; RICE, C.; ROGGENDORF, M.; SCHALM, S. W.; SHIKATA, T.; SHIMOTOHNO, K.; STUYVER, L.; TRÉPO, C.; WEINER, A.; YAP, P. L.; URDEA, M. S. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C virus genomes. **Hepatology**, v. 19, p. 1321-1324, 1994.

SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; SAKULDAMRONGPANICH, T.; NUCHAPRAYOON, C.; TANPRASERT, S.; HOLMES, E. C.; SMITH, D. B. Evolutionary analysis of variants of

hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 3013-3024, 1996.

STAPLETON, J. T.; FOUNG, S.; MUERHOFF, A. S.; BUKH, J.; SIMMONDS, P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 2, p. 233-246, 2011.

STRAUSS, E.; GAYOTTO, L. C. C.; DA SILVA, L. C.; ALVES, V. A. F.; CARRILHO, F.; CHAMONE, D. A. F.; TREPO, C. Unexpected low prevalence of delta antibodies in the east Amazon region and São Paulo: evidence for regional differences in the epidemiology of delta hepatitis virus within Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v 81(n1), pag 73-74. 1987.

THURSTON, M. E. **The lost history of the canine race: Our 15,000-year love affair with dogs**. Kansas City, MO: Andrews and McMeel, 1996.

WASLEY, A.; ALTER, M. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Hepatitis C: State of the Art at the Millennium**, v. 20, n. 1, p.1-16, 2000.

WHO, Hepatitis C. Surveillance and Control. Fact sheet N 164: **World Health Organization, Switzerland**, 2012.

YOU, S.; STUMP, D. D.; BRANCH, A. D.; RICE, C. M. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. **Journal of virology** v. 78, p. 1352–1366, 2004.