



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E PERFIL DE
CITOCINAS EM PACIENTES COM HEPATITE DELTA**

PRISCILA SARMENTO DE SOUZA

MANAUS - AMAZONAS

2018

PRISCILA SARMENTO DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E PERFIL DE
CITOCINAS EM PACIENTES COM HEPATITE DELTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração "*Imunologia Básica e Aplicada*".

Orientadora: Prof^a-Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Coorientador: Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda

MANAUS – AMAZONAS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729c Souza Filho, Priscila Sarmento de
Caracterização da resposta imune e perfil de citocinas em
pacientes com hepatite delta : resposta / Priscila Sarmento de
Souza Filho . 2018
88 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie
Coorientador: Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Hepatite B. 2. Hepatite Delta. 3. Resposta Imune. 4. Citocinas.
I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

PRISCILA SARMENTO DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E PERFIL DE
CITOCINAS EM PACIENTES COM HEPATITE DELTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração "*Imunologia Básica e Aplicada*".

Orientadora: Prof^a-Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Coorientador: Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda

APROVADA EM: 05/07/2018

BANCA EXAMINADORA

**Prof^a. Dr^a. Adriana Malheiro Alle Marie, Presidente
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)**

**Dr. José Eduardo Levi, membro externo
Universidade de São Paulo (USP)**

**Profa. Dr^a. Cintia Mara Costa de Oliveira
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)**

À todos, família, amigos,
professores. Por todo apoio,
companheirismo e incentivo,
durante esta caminhada.

Dedico

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a **DEUS**, por nunca me desamparar, e por me dá forças frente a todos os obstáculos, e dificuldades, pois é Nele que deposito minha fé e esperança. Agradeço pela oportunidade de poder chegar até este momento da minha vida, pois o que venho conquistando tem sido através da vontade e bondade do Senhor, que tem me guiado, me direcionando, e fortalecendo nos momentos em que me senti fraca.

Meus agradecimentos a minha família, por sempre me apoiar e incentivar, e nunca se privar em me ajudar nas minhas necessidades, e sempre me dando conselhos a nunca desistir de conquistar meus sonhos.

À minha querida mãe **Nazildes dos Santos Sarmiento**, pelo seu amor e carinho, onde é nela que deposito todo as minhas conquistas, sempre foi meu alicerce de vida, e que vem torcendo por mais essa etapa que estou conquistando. Agradeço a Deus por ter me concedido esta mulher como mãe e incentivadora. Te amarei eternamente, minha rainha.

Ao meu querido pai **Valdir Oliveira Sarmiento**, que sempre me apoiou em tudo, principalmente nos meus estudos, me incentivou a sempre correr atrás dos meus objetivos, e nunca olhar para trás, ou quaisquer dificuldades que já tenha passado, "como ele diz" a maioria das vezes as dificuldades são para nos fortalecer, naquilo que desejamos obter conquistar. Te amarei eternamente, meu rei.

Ao meu amado esposo **Jhimmy Cena de Souza**, que sempre esteve ao meu lado durante esta etapa me apoiando e ajudando, pelo seu amor que foi e tem sido primordial na minha vida. Te amo paixão.

Aos meus queridos irmãos **Marcelo Sarmiento e Núbia Nairan**, por todo o apoio e incentivo.

À minha querida sobrinha **Bruna Nairan**, que sempre me apoiou e que me ver como exemplo, para sua caminhada. Te amo pequena.

À minha orientadora, **Dra. Adriana Malheiro Alle Marie**, pelo exemplo de mulher guerreira, mãe, e claro pesquisadora, por sempre nos apoiar, pela orientação e por ter me acolhido com todo amor em seu grupo de pesquisa.

Ao meu Coorientador **Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda**, por ajudar no desenvolvimento deste projeto.

À todos os amigos da **DEP-Hemoam- NAEP** pelo carinho, rizadas, amizade e pelos momentos de companheirismo que sempre prevaleceu.

A todos os meus amigos da vida e os que fiz durante esta caminhada, em especial a aos meus amigos Grenda, Pedro, Diana, aqueles a quem posso contar a qualquer momento.

Aos meus amigos do **Mestrado em Imunologia 2016/1**, pois foram com quem passei boa parte desta etapa em minha vida, por se tornarem amigos mais chegados que irmãos.

A Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV) por ceder o espaço, para a captação dos pacientes.

Agradeço a **Dra. Marilu Barbieri Victoria, e ao Dr. Flamir da Silva Victoria**, pela ajuda e dedicação no desenvolvimento desde trabalho.

À **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)** por ceder os espaços e equipamentos necessários para a execução do projeto.

Ao meu amado grupo de pesquisa "**Hepatites Virais**", sob a supervisão da Msc. **Andréa Monteiro Tarragô**, a qual sou muito grata, pela seus conselhos e apoio que não foram poucos em todos os momentos. Gostaria de agradecer a essa mulher que foi primordial nesta conquista, não só pelos ensinamentos como pesquisadora, mais como exemplo de mulher batalhadora, guerreira, que nunca desiste de um objetivo, e nos incentiva a sempre correr atrás, e fazer nosso melhor. Muito obrigada por tudo maizona, obrigada pelos ensinamentos que me proporcionou durante o desenvolvimento deste trabalho, e ao longo desses seis anos, e aos componentes deste grupo: **Grenda Leite, Pedro Vieira, Diana Mota, Keyla Souza, Juliana Santos, Fernanda Cantão, Fabiane Bianca**, por muitos momentos bons juntos que tivemos e até nos viradões pela madrugada no laboratório.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA)**, seus **Docentes** pelos valorosos ensinamentos e por todo o empenho e dedicação no desenvolvimento deste programa.

À **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** pela oportunidade de cursar o mestrado em Imunologia Básica e Aplicada.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq)** pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho, meu muito obrigado.

*"Dizem que a vida é para quem sabe viver,
mas ninguém nasce pronto. A vida é para
quem é corajoso o suficiente para se arriscar
e humilde o bastante para aprender."*

Clarice Lispector

RESUMO

Introdução: O vírus da Hepatite D (HDV) é uma partícula viral incompleta cuja infectividade depende do vírus da hepatite B (HBV). A superinfecção ou coinfeção HBV/HDV eleva o risco de hepatite fulminante e propicia o desenvolvimento da fibrose hepática. No Brasil, o Estado do Amazonas tem sido considerado uma área endêmica para hepatite B e Delta. Nesta região, a infecção pelo HDV é frequentemente associada com formas mais grave da doença hepática. **Objetivo:** Este estudo tem como objetivo caracterizar a resposta imune e perfil de citocinas em pacientes infectados com o vírus da Hepatite Delta. **Material e Método:** Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras biológicas. Foram coletadas 77 amostras de sangue periférico de pacientes diagnosticados com Hepatite Delta não tratados, e em tratamento, atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - Doutor Heitor Vieira Dourado, e foram coletadas 50 amostras, de candidatos a doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, enquadrados como grupo controle. Foi realizada a imunofenotipagem celular, hemograma, dosagens de citocinas e quimiocinas plasmáticas por CBA (*Cytometric Bead Array*). **Resultados:** Cerca de 92,2% da população apresentam positividade para o marcador anti-Hbe, foi observado maior prevalência do sexo masculino. Os resultados revelaram que os pacientes em tratamento apresentaram quadros de leucopenia e trombocitopenia. Aumento significativo no percentual de monócitos clássicos ativados e inflamatórios ativados, na expressão de TLR-2 e TLR-9 em monócitos, linfócitos T CD4+, T CD8+, células dendríticas mielóides mDC, células T regulatórias, e linfócitos B1, além do aumento nas concentrações das citocinas IL-6, TNF- α , IL-10, e quimiocinas CCL-2 (MCP-1), CXCL-8 (IL-8), CXCL-9 (MIG), CXCL-10 (IP-10), em paciente com hepatite Delta, estando em tratamento ou não, quando comparado ao controle. **Conclusão:** Em conclusão, nossos dados sugerem processo da resposta imune ativo, com perfil pró e anti-inflamatório atuante, podendo está associado ao desenvolvendo de lesão hepática devido a coinfeção de ambos os vírus, e ao tratamento por longo tempo, possibilitando formas mais grave da doença, o que abre prerrogativas para avaliação da resposta imune destes pacientes.

Palavras-chaves: Hepatite B, Hepatite Delta, Resposta Imune, citocinas.

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis D virus (HDV) is an incomplete viral particle whose infectivity depends on the hepatitis B virus (HBV). HBV / HDV superinfection or co-infection increases the risk of fulminant hepatitis and promotes the development of hepatic fibrosis in these patients. In Brazil, the State of Amazonas has been considered an endemic area for hepatitis B and Delta. In this region, HDV infection is often associated with more severe forms of liver disease. **Objective:** This study aims to characterize the immune response and cytokine profile in patients infected with the Hepatitis Delta virus. **Material e Methods:** For this study, biological samples were used. seventy seven peripheral blood samples were collected from untreated and treated patients diagnosed with Hepatitis Delta, attended at the Amazon Tropical Medicine Foundation - Dr. Heitor Vieira Dourado, and 50 samples were collected from blood donors from the. Hematology and Haemotherapy of Amazonas, framed as a control group. Cellular immunophenotyping, hemogram, cytokine and plasma chemokine dosages were performed by CBA (Cytometric Bead Array). **Results:** About 92.2% of the population present positivity for the anti-Hbe marker, a higher prevalence was observed in males. The results showed that patients undergoing treatment had leukopenia and thrombocytopenia. TLR-2 and TLR-9 expression in monocytes, CD4 + T-lymphocytes, CD8 + T cells, dendritic myelogenous mDC cells, regulatory T cells, and B1 lymphocytes, as well as increased concentrations of activated classical and activated monocytes (IL-8), CXCL-9 (MIG), CXCL-10 (IP-10), cytokines IL-6, TNF- α , IL-10, and chemokines CCL- in a patient with Delta hepatitis being treated or not, when compared to the control. **Conclusion:** In conclusion, our data suggest a process of active immune response, with an active pro and anti-inflammatory profile, and may be associated with the development of liver injury due to coinfection of both viruses and long-term treatment, allowing more severe forms of the disease, which opens prerogatives for the evaluation of the immune response of these patients.

Key words: Hepatitis B, Hepatitis Delta, Immune response, cytokines.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Descrição das fluorescências e perfil celular dos anticorpos monoclonais que serão utilizados na citometria de fluxo.....	38
Tabela 2: Dados demográficos e características clínico-epidemiológicas dos pacientes coinfectados com os vírus HBV/HDV e grupo controle.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da infecção crônica pelo HBV no mundo.....	12
Figura 2: Distribuição geográfica da prevalência da infecção por HBV no Brasil.....	13
Figura 3: Organização estrutural e genética do HBV.....	14
Figura 4: Prevalência dos genótipos da hepatite B no Mundo.....	15
Figura 5: Distribuição dos genótipos do HBV prevalentes no Brasil	16
Figura 6: Distribuição Geográfica da Infecção pelo vírus da Hepatite Delta no mundo.	17
Figura 7: Aspectos clínicos da Hepatite Delta.	19
Figura 8: Partícula do vírus da Hepatite Delta.	19
Figura 9: Mapa da distribuição global dos genótipos do HDV em diferentes regiões do mundo.....	20
Figura 10: Recomendações de tratamento para Hepatite D crônica.	23
Figura 11: Ciclo de vida HDV e HBV.	26
Figura 12: Estrutura dos RNAs do HDV.	27
Figura 13: Representação da resposta imune a vírus.	29
Figura 14: Fases da progressão da infecção pelos vírus HBV e HDV.....	31
Figura 15: Fluxograma de Atividades.	36
Figura 16: Identificação dos Linfócitos T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺), Linfócitos ativados (CD69 ⁺), Linfócitos B (CD19 ⁺) e B1 (CD5 ⁺ CD19 ⁺) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).	39
Figura 17: Identificação dos Linfócitos Treg (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).....	40
Figura 18: Identificação das Células NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺) e NKT (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).	41
Figura 19: Identificação dos Monócitos (CD14 ⁺) clássicos e Monócitos Ativados (CD14 ⁺ CD16 ⁺ HLADR ⁺), Monócitos não clássicos (CD14 ^{low} CD16 ⁺ HLADR ⁺), no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).	42
Figura 20: Identificação das Células Dendríticas Mielóides (CD14 ⁻ CD11c ⁺ CD123 ⁻) e Plasmocitóides (CD14 ⁻ CD11c ⁻ CD123 ⁺) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).....	42
Figura 21: Identificação da Expressão dos receptores TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em Monócitos no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).	43
Figura 22: Frequência (valores absoluto), de subpopulações de monócitos em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (A, B, C, D,) Pacientes foram	

categorizados como não tratados (**NT**) e tratados (**T**), e comparados aos não infectados controles negativo (**CN**). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de monócitos (CD14+), ativação celular (HLADR+), monócitos inflamatórios (CD14+CD16+HLADR+), e monócitos não clássicos (CD14^{low}CD16+HLADR+). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wal*..... 49

Figura 23: Expressão do receptor Toll-Like-2, Toll-Like-4 e Toll-Like-9 em monócitos dos pacientes HBV/HDV e controles negativos. (**A, B, C,**) Pacientes foram categorizados como não tratados (**NT**) e tratados (**T**), e comparados aos não infectados controles negativos (**CN**). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a expressão do receptor TLR-2 (CD14+CD282+), TLR-4 (CD14+CD284+) e TLR-9 (CD14+CD289+). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*..... 50

Figura 24: Frequência (valores absoluto), de população de células NK e NKT em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (**A, B,**) Pacientes foram categorizados como não tratados (**NT**) e tratados (**T**), e comparados aos não infectados controles negativo (**CN**). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem células NK (CD3-CD16+CD56+) e células NKT (CD3+CD16+CD56+). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*..... 51

Figura 25: Frequência (valores absoluto), de população de células mDC e pDC em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (**A, B,**) Pacientes foram categorizados como não tratados (**NT**) e tratados (**T**), e comparados aos não infectados controles

negativo (**CN**). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de mDC (CD14-CD11c+CD123-) e pDC monócitos (CD14-CD11c-CD123+). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. 52

Figura 26: Frequência (valores absoluto), de população de Linfócitos T CD3+ CD4+ CD8+ em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (**A, B, C, D, E**) Pacientes foram categorizados como não tratados (**NT**) e tratados (**T**), e comparados aos não infectados controles negativo (**CN**). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos T CD3+ (CD3+), linfócitos T CD4+ ativados (CD3+CD4+ CD69+), e linfócitos T CD8+ ativados (CD3+CD8+ CD69). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. 53

Figura 27: Frequência (valores absoluto), de população de frequência dos linfócitos T reguladores (Treg), B, B1 em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (**A, B, C,**) Pacientes foram categorizados como não tratados (**NT**) e tratados (**T**), e comparados aos não infectados controles negativo (**CN**). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos Treg (CD4+CD25+FoxP3+), linfócitos B (CD19+), linfócitos B1 (CD5+CD19+). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. 54

Figura 28: As concentrações séricas das citocinas do perfil TH1 em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (**A, B, C**) Pacientes foram categorizados como não tratados (**NT**) e tratados (**T**), e comparados aos não infectados controles negativo (**CN**). Os testes *Cytometric beads array* (CBA) foram usados para quantificar as concentrações de IL-2, TNF- α , e IFN- γ . Os resultados são expressos em gráficos de

coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.55

Figura 29: As concentrações séricas das citocinas do perfil TH2/TH17 em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (A, B, C, D) Pacientes foram categorizados como não tratados (NT) e tratados (T), e comparados aos não infectados controles negativo (CN). Os testes *Cytometric beads array* (CBA) foram usados para quantificar as concentrações de IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A. Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.56

Figura 30: As concentrações séricas das quimiocinas do perfil CCL-2 (IP-10), CXCL-8 (IL-8), CCL-5 (RANTES), CXCL-9 (MIG), CXCL-10 (MCP-1) em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (A, B, C, D, E) Pacientes foram categorizados como não tratados (NT) e tratados (T), e comparados aos não infectados controles negativo (CN). Os testes *Cytometric beads array* (CBA) foram usados para quantificar as concentrações de CCL-2 (IP-10), CCL-5 (RANTES), CXCL-8 (IL-8), CXCL-9 (MIG), CXCL-10 (MCP-1). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT- Alanina Aminotransferase

AST- Aspartato Aminotransferase

APCs- Células Apresentadoras de Antígeno

Anti-HBc- Anticorpos do vírus da hepatite B

Anti-HCV- Anticorpos do vírus da hepatite C

Anti-HDV -Anticorpo contra o vírus da hepatite D

CBA- Cytometric Bead Array

CTLA-4- Antígeno associado a linfócitos T citotóxico

DP-1- Receptor responsivo dominante -1

EDTA- Etileno diaminotetra acetato

FMT-HDV- Fundação de Medina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

HBsAg- Antígeno de superfície da Hepatite B

HBV- Vírus da Hepatite B

HBcAg- Antígeno do vírus B

HBeAg- Antígeno do vírus B

HEMOAM- Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

HDAg- Antígeno do vírus Delta

HCC- Carcinoma Hepatocelular

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

HDV- Vírus da Hepatite Delta

HSPG- Proteoglicano sulfatado carregado negativamente

IFN- γ - Interferon Gama

IL- Interleucina

iNKT- Células natural Killer do tipo T invariante

JAK- Proteína kinase

L-HDAg- Proteína maior do vírus Delta

LTCD4- Linfócitos T Auxiliares

LTCD8- Linfócitos T Citotóxicos

MCP-I - Proteína 1 Quimioatraente de Monócitos

mDC- Células dendríticas mielóides

MCH- Hemoglobina Globular Média

MCHC- Concentração de Hemoglobina Globular Média

MCV- Volume Globular Médio

MPV- Volume Plaquetário Médio

MMP- Metaloproteinases de matriz

MHC- Complexo de Histocompatibilidade

MVB- Corpo multi-vesicular

NAT- Teste de ácidos nucleicos

NF-K β - Fator de Transcrição

NUCs- Análogos nucleotídeos

NTCP- Receptor Transportador Transmembranar

NK- Células natural Killer

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAMPS- Padrões moleculares associado a patógeno

PMNs- neutrófilos polimorfonucleares

PBS- Solução salina com fosfato

PBS-P- Solução Tamponada com Fosfato, Albumina e Saponina

PBS-W- Solução Tamponada com Fosfato e Albumina

PE- Ficoeritrina

PerCP- Clorofilpiridina

pDC- Células dendríticas plasmocitóides

RIG- Retinoic acid-inducible gene I

RBC- Contagem Total de Hemácias

RDW- Variação no Tamanho das Hemácias

RT- Transcriptase reversa

S-HDAg- Proteína menor do vírus Delta

SUPS- Partículas Subvirais

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

TCR- Receptor de Células T

TRAIL- receptor indutor de apoptose

TLR-4- Receptor do tipo toll- like 4

TLR-7- Receptor do tipo toll- like 7

TLR-8- Receptor do tipo toll- like 8

TLR-9- Receptor do tipo toll- like 9

TGF- β - Fator de crescimento transformante

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UFAM- Universidade Federal do Amazonas

WBC- Contagem Total de Leucócitos

μL - Microlitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	11
2.1 Epidemiologia da Hepatite B	11
2.2 Vírus da hepatite B (HBV)	13
2.3 Genótipos do HBV	15
2.4 Hepatite Delta	17
2.5 Vírus HDV	19
2.6 Genótipos do HDV	20
2.7 Transmissão dos vírus HBV e Delta.....	20
2.8 Tratamento	21
2.9 Diagnósticos da infecção pelo vírus HBV e HDV	24
3.10 Avaliação do estadiamento de doença hepática	25
2.11 Ciclo do HBV e HDV	25
2.12 Imunopatogênese dos Vírus HBV/ HDV	28
4. OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo Geral	33
4.2 Objetivos Específicos.....	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Modelo de Estudo	34
5.2 População de estudo	34
5.3 Critérios de Inclusão, Não-Inclusão e Exclusão	34
5.4 Aspectos Éticos	35
5.5 Coleta e conservação das amostras	35
5.6 Imunofenotipagem Celular	36
5.6.1 Identificação da População de Linfócitos T CD4 ⁺ , TCD8 ⁺ , Linfócitos T ativados CD69 ⁺ , Linfócitos B (CD19 ⁺) e B1 (CD5 ⁺ CD19 ⁺).	39
5.6.2. Identificação dos Linfócitos T regulatórios (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺).....	39
5.6.3. Identificação da População de Células NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺) e NKT (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	40
5.6.4. Identificação dos Monócitos (CD14 ⁺) e Monócitos Ativados (CD14 ⁺ CD80 ⁺)	41
5.6.5. Identificação das Células Dendríticas Mielóides (CD14 ⁻ CD11c ⁺ CD123 ⁻) e Plasmocitóides (CD14 ⁻ CD11c ⁻ CD123 ⁺)	42
5.6.6. Identificação da Expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em Monócitos	43

Figura 21: Identificação da Expressão dos receptores TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em Monócitos no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).	43
5.7 Dosagem de Citocinas Plasmáticas por CBA (<i>CytometricBeadArray</i>).....	43
5.8 Análises Estatísticas	44
6.RESULTADOS	45
6.1 Dados Demográficos e Características Clínicas.....	45
6.2 Perfil de Resposta Imune Celular e Citocinas nos pacientes com Hepatite Delta.	48
6.2.1 Monócitos	48
6.2.2 Expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em Monócitos	49
6.2.3 Células NK e NKT.....	50
6.2.4 Células Dendríticas mielóide (mDC) e plasmocitóides (pDC)	51
6.2.5 Linfócitos T	52
6.2.6 Linfócitos Treg, B e B1.....	53
6.3 Concentração das citocinas séricas em pacientes com hepatite Delta.....	54
6.3.1. Citocinas pró-inflamatórias Perfil Th1	54
6.3.2. Citocinas séricas do perfil Th2, Th17 e Treg.....	55
6.4 Concentração das quimiocinas séricas de pacientes com hepatite Delta.....	56
7. DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	84
Anexo 01: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (CAAE: 46865015.8.3001.5262).....	84
Anexo 02: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (CAAE: 49652815.8.0000.0009).....	86

INTRODUÇÃO

De aproximadamente 350 milhões de portadores crônicos do vírus B, cerca de 15 a 20 milhões tornam-se infectados pelo vírus Delta (HDV), resultando numa coinfeção persistente com o desenvolvimento de fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) (WINER & PLOSS, 2015).

No Brasil, a coinfeção pelos vírus HBV/HDV apresenta-se de forma elevada na região da Amazônia Ocidental, onde são comuns os relatos de quadros graves da doença e padrões clínicos severos (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A interação do vírus com resposta imunológica do hospedeiro define o curso clínico da infecção. O desenvolvimento da fase crônica da doença, é resultado de uma resposta imune deficiente, impossibilitando a eliminação viral durante a coinfeção, associado à diversas manifestações clínicas graves (ABBAS, 2013; SUKOWATI *et al* 2016).

As indicações para tratamento estão baseadas na carga viral, presença ou ausência de cirrose, na evidência de agressão hepatocelular (aumento aminotransferases ou pela histopatologia do órgão). Para o tratamento recomenda-se terapia com interferon peguilado com base na chance de seroconversão HBeAg/anti-HBe, se caso não ocorrer resposta ao interferon peguilado, é indicado terapia combinada com análogos de nucleotídeos (NUCs) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, 2015).

O uso de terapias antivirais é uma abordagem terapêutica promissora no tratamento da infecção crônica. O controle imunológico na infecção pelo vírus Delta é essencial para o *clearance viral*. Portanto, restaurar a imunidade funcional pode auxiliar na diminuição de dano hepático (YOU, *et al.*, 2014; JEULIN *et al.*, 2014).

Assim, na busca de tentar compreender fatores imunológicos que possam estar associados a forma mais grave da doença, o presente estudo busca descrever a resposta imune e perfil de citocinas em pacientes com hepatite Delta.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia da Hepatite B

A hepatite B é uma doença assintomática de prognóstico muito variado que pode evoluir tanto para cura quanto para o desenvolvimento de infecção crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (HCC) (BUSCA & KUMAR, 2014). A Hepatite B é um problema mundial de saúde, principalmente em países em desenvolvimento. O HBV é um dos menores vírus que infectam o homem, o qual possui um forte tropismo pelas células hepáticas. Seu período de incubação pode variar de 30 a 180 dias em média, esse valor pode ser menor dependendo do estado imunológico do hospedeiro, (SILVA *et al.*, 2012).

No período de 1999 a 2016 foram notificados 212.031 casos confirmados de hepatite B no Brasil, pelo Sistema de Informação de Agravos e Notificações (Sinan), no qual o maior número de casos concentra-se na região Sudeste (35,4%), seguida das regiões Sul (31,6%), Norte (14,2%), Nordeste (9,4%) e Centro-Oeste (9,3%). Nos últimos três observou-se uma tendência de estabilidade entre as regiões do Brasil, com exceção da região Norte, que apresentou diminuição na proporção de casos (BRASIL, 2017).

As taxas de prevalência do antígeno de superfície (HBsAg) nas populações se caracterizam, por áreas com níveis endêmicos baixos (<2%), níveis intermediários (2-7%), e aquelas regiões com altos níveis de prevalência (acima de > 8%) (**Figura 1**). As regiões da Ásia, Sul do Pacífico, África subsaariana, Ártico, Austrália, Nova Zelândia e as populações da América do Sul e do Oriente Médio e extensas regiões subtropicais são consideradas como as mais endêmicas (BRASIL, 2008).

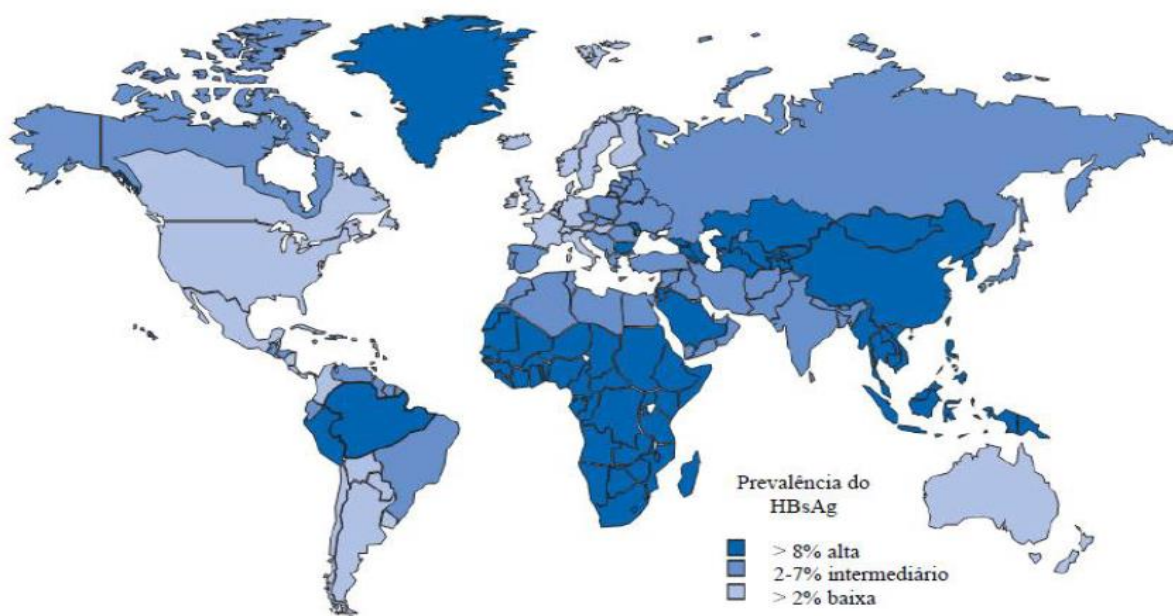


Figura 1: Distribuição geográfica da infecção crônica pelo HBV no mundo.
Fonte: BRASIL, 2008.

No Brasil, a prevalência da infecção pelo HBV também demonstra níveis de distribuições heterogêneos, apresentando níveis elevados nas regiões Norte e Sul do país (**Figura 2**). A região da Amazônia é caracterizada por apresentar os maiores níveis de prevalência do antígeno de superfície (HBsAg) positivo na população, sendo mais prevalente da região de Rondônia, Roraima, Acre e Amazonas (BRASIL, 2008; BRASIL, 2011).

Na Amazônia a prevalência está relacionada com maiores evidências de transmissão sexual, o uso de drogas intravenosa, e a imigração de pessoas infectadas de países endêmicos, isso tem mostrado um risco aumentado nesta região (BRAGA *et al.*, 2012). Os países do mundo inteiro estão cada vez mais conectados através de viagens e migrações, portanto, as migrações locais e globais tem implicações para a saúde, uma vez que as doenças infecciosas não permanecem isoladas geograficamente (KHAN, *et al.*, 2013).

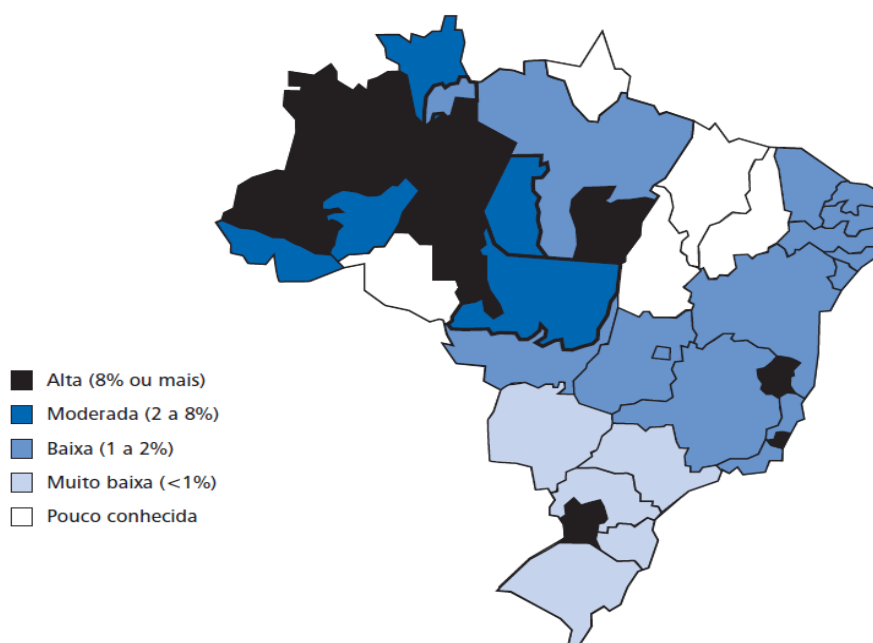


Figura 2: Distribuição geográfica da prevalência da infecção por HBV no Brasil.
Fonte: BRASIL, 2008.

2.2 Vírus da hepatite B (HBV)

O vírus da hepatite B (HBV) pertence a família *Hepadnaviridae*, ao gênero *Orthohepadnavirus* e tem predileção por pelas células hepáticas. No entanto, partículas de DNA do HBV também podem ser detectadas nos rins, pâncreas e células mononucleares (KIDD, *et al.*, 2002; GANEM, *et al.*, 2004).

As partículas virais infecciosas são esféricas com diâmetro de aproximadamente 42 nanômetros de diâmetro, que é formado pelo genoma viral, por um envelope externo lipoprotéico, que constitui o antígeno de superfície do HBV (HBsAg), e por um nucleocapsídeo icosaédrico formado pelo antígeno intracelular do core (HBcAg) expresso em hepatócitos infectados (**Figura 3.A**), (BLUNBERG *et al.*, 1965; DANE *et al.*, 1970).

O genoma do HBV é composto por uma molécula de DNA parcialmente dupla de aproximadamente, 3.200 pares de bases (3,2kb). Existem quatro ORFs (Open reading Frame) a região S, região C, região X e região P, que no genoma que resultam na transcrição e tradução de diferentes tipos de proteínas. Ainda compondo o genoma, na porção terminal de cada fita, há duas curtas regiões repetitivas de 11 nucleotídeos, DR1 e DR2, que servem de domínios para replicação viral. A região S é

dividida em região pré-S1, pré-S2 e S, as quais codificam as proteínas do envelope viral (**Figura 3.B**) (GANEM & PRINCE, 2004; NASSAL, 2015).

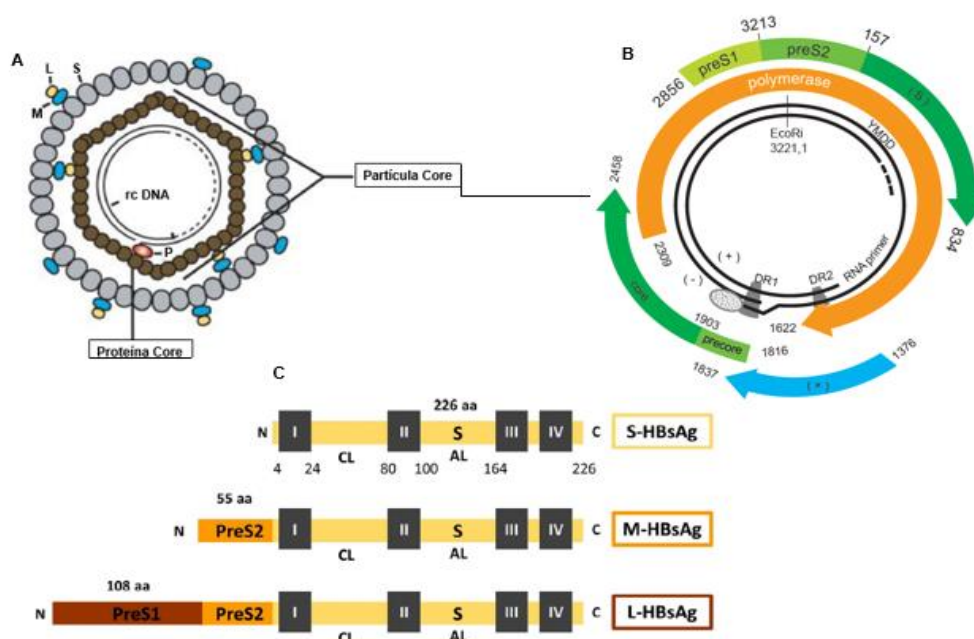


Figura 3: Organização estrutural e genética do HBV

Fonte: Adaptado por ALFAIATE *et al.*, 2015, LAMONTAGNE, *et al.*, 2016; KAO, 2011.

A transcrição simultânea das regiões pré-S1, pré-S2 e S produz a proteína maior, composta de 389 a 400 aminoácidos, conhecida como proteína L (grande). A segunda proteína do envelope, a proteína M (média), é formada pela transcrição das regiões pré-S2 e S, consistindo em 281 aminoácidos, por fim a terceira proteína, a qual é a menor entre elas, proteína S (pequena), surge pela transcrição da região S, conhecida como HBsAg contendo 226 aminoácidos (**Figura 3.C**). A região pré-core possui dois códons de iniciação na mesma fase de leitura aberta e codifica duas proteínas como HBcAg e HBeAg, a região P é considerada a maior ORF e codifica a polimerase viral com 832 aminoácidos e peso molecular de 92,3 kDa, que é funcionalmente dividida em três domínios: o domínio proteína terminal, que está relacionado ao processo de formação do capsídeo e início da síntese de fita negativa, o domínio transcriptase reversa (RT), está envolvido no processo de transcrição reversa durante a replicação do HBV e o domínio ribonuclease H, responsável por degradar o RNA pré-genômico facilitando a sua replicação (BECK & NASSAL, 2007; GUPTA, *et al.*, 2014).

2.3 Genótipos do HBV

O HBV é classificado em genótipos, os quais diferem entre si através da mudança das sequências de nucleotídeos na região S. Atualmente existem dez tipos de genótipos do vírus da hepatite B, estes recebem classificação de A á J, distintos entre si pela sequência de nucleotídeos no genoma, variando quanto a sua distribuição geográfica (SUNBUL,2014).

Atualmente, os genótipos do HBV demonstram-se distribuídos em todo o mundo. Na Europa, os genótipos mais frequentes são A e D, no Norte da África e nos Estados Unidos prevalecem os genótipos B e C, igualmente presentes no Sudeste da Ásia. O genótipo E, é comum no Oeste da África, o F está difundido na área central e Sul da América, o genótipo G apresenta-se frequente na França, e Norte da América, e o H na América Central, o I no Vietnã e Laos, por fim o genótipo J, no Japão (**Figura 4**) (FERREIRA; BORGES, 2007; TAKKENBERG *et al.*, 2010; SUNBUL,2014).

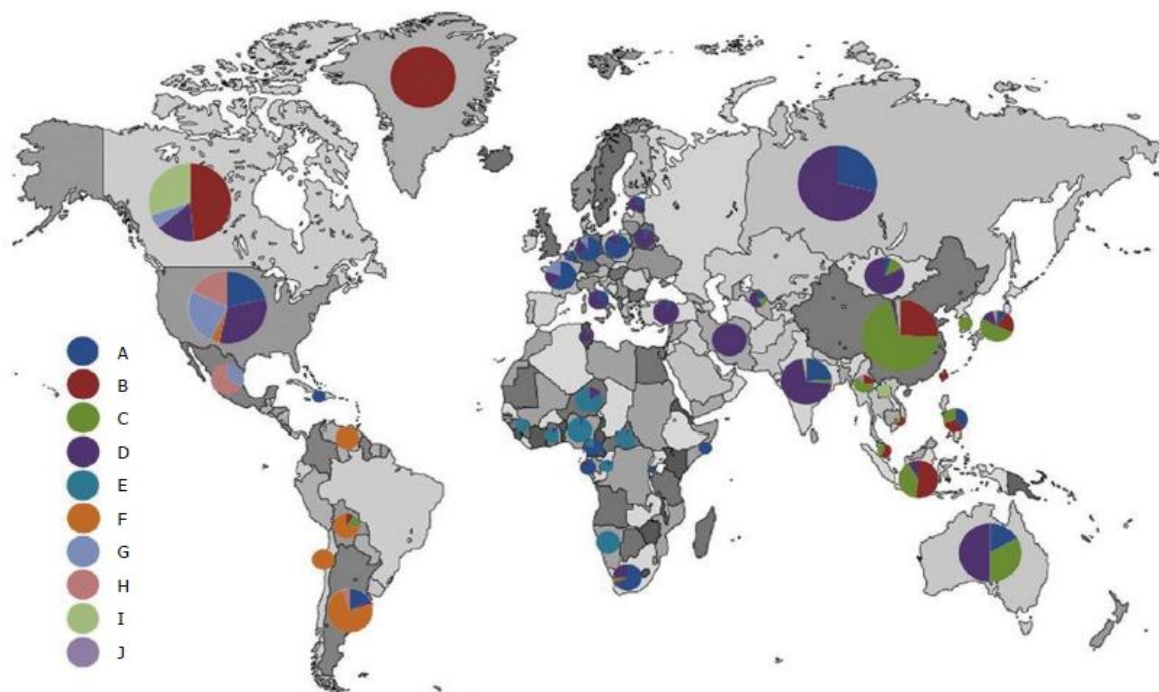


Figura 4: Prevalência dos genótipos da hepatite B no Mundo
Fonte: SUNBUL, 2014.

Alterações na estrutura genética desses genótipos podem resultar em diferentes níveis de patogenicidade, sendo relacionadas com maior ou menor risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma ou cirrose no fígado. Além das diferenças citadas, a heterogeneidade dos genótipos do HBV parece estar relacionada com

diferenças na evolução clínica da infecção e na resposta ao tratamento antiviral (RONCATO *et al.*, 2008).

Segundo dados publicados por Mello e colaboradores, (2007), no Brasil predominam os genótipos A, D e F. Na região Amazônica relataram inicialmente o predomínio do genótipo F, em comunidades indígenas isoladas, contudo com uma maior circulação do genótipo A (DIAS *et al.*, 2012; VICTORIA *et al.*, 2008). No Acre, VIANA e colaboradores, (2005) descreveram em seu estudo a ocorrência dos genótipos A e D, mostrando a presença dos genótipos circulantes nesta região (Figura 5).

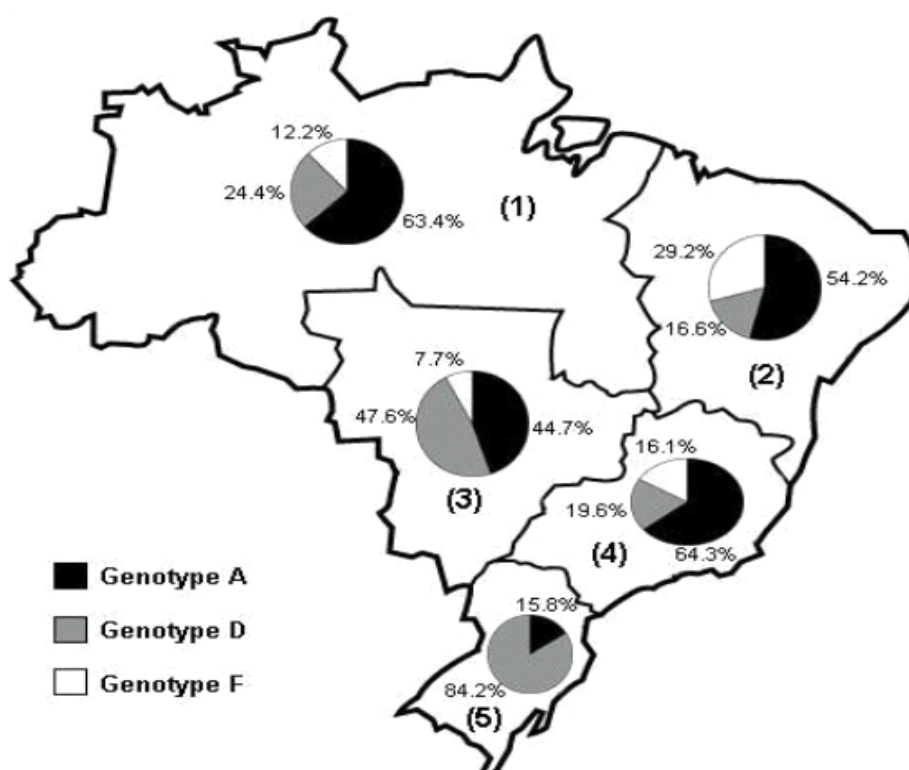


Figura 5: Distribuição dos genótipos do HBV prevalentes no Brasil
Fonte: MELLO, 2007

A região da Amazônia Brasileira legal é caracterizada por apresentar os maiores níveis de prevalência e endemecidade do antígeno de superfície (HBsAg) positivo na população, sendo mais prevalente na região de Rondônia, Roraima, Acre e Amazonas (BRASIL, 2011). No Amazonas, há um predomínio do genótipo A, seguido pelo D e F em doadores de sangue, sendo que o A foi significativamente mais frequente nos candidatos a doadores de sangue em comparação com os outros grupos estudados (CRISPIM *et al.*, 2014).

O genótipo F apresenta uma grande disseminação de subgenótipos, presentes em populações indígenas do Sul da América e América Central, foram classificados de F1-F4 decorrente de estudos publicados no norte da Amazônia. A prevalência dos subgenótipos mostrou que o subgenótipo F2 foi mais prevalente nos estados brasileiros da região Amazônica, correspondendo a 100% de sua prevalência (MELLO, *et al.*, 2013).

2.4 Hepatite Delta

Dentre os 350 milhões de pessoas portadores do vírus B, cerca de 20 milhões encontram-se infectadas pelo vírus Delta entre os portadores crônicos do HBV (ABBAS, 2015). Destes, são considerados portadores crônicos da infecção pelo HDV cerca de 5%, levando a uma carga global de prevalência no mundo (ROMEO & PERBELLINI, 2015; RIZETTO, 2015). Assim, as taxas de infecção pelo HDV apresentam-se geralmente mais elevadas em regiões onde o vírus da hepatite B é endêmico (NGUYEN, *et al.*, 2007; MULYANTO, *et al.*, 2009) (**Figura 6**).

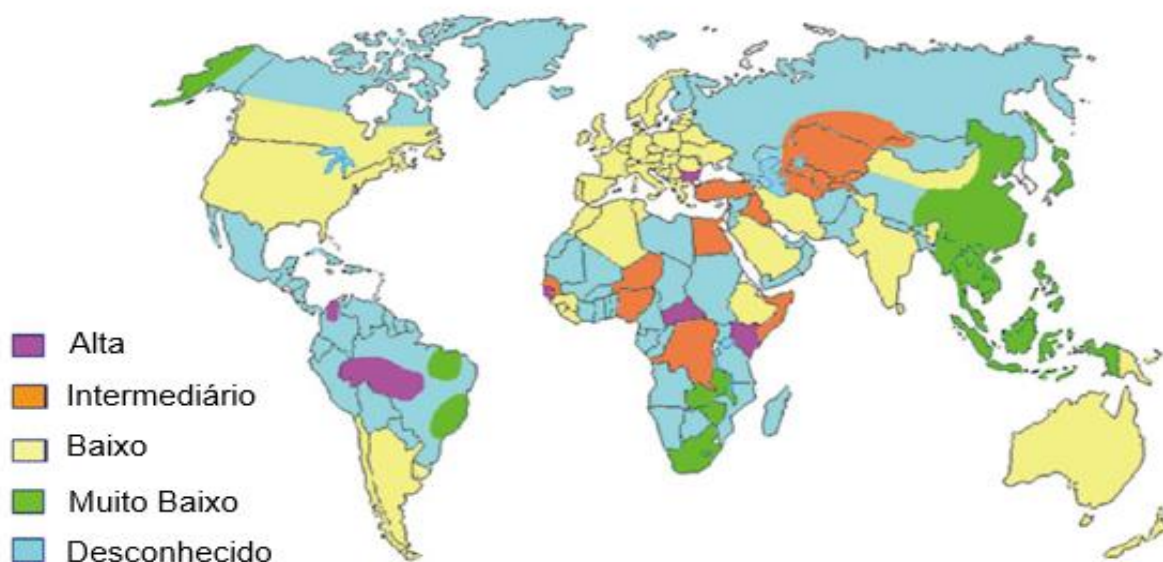


Figura 6: Distribuição Geográfica da Infecção pelo vírus da Hepatite Delta no mundo.
Fonte: ROMEO & PERBELLINI., 2015.

Os pacientes coinfetados são mais comumente encontrados nas regiões do Mediterrâneo, em algumas partes da Rússia, Groenlândia, Amazônia Brasileira, e em determinadas áreas da África Central, Venezuela e Peru (FONSECA, 2002; CRISPIM *et al.*, 2014).

No Brasil entre o período de 1999 a 2016 foram notificados 3.791 casos de hepatite D pelo Sistema de Informação de Agravos e Notificações (Sinan), com maiores ocorrências de casos na região Norte (76,8%) seguido da região Sudeste (9,8%), Sul (5,3%), Nordeste (5,0%) e Centro-Oeste (3,1%) (BRASIL, 2017).

Surtos de superinfecção do HDV foram relatados na Venezuela, Equador, Mongólia e Groelândia (NAKANO *et al.*, 2001; BORRESEN *et al.*, 2010) que são semelhantes aos registrados em Samara (Rússia), Okinawa (Japão), África Central e na Bacia Amazônica. Assim, enquanto ainda ocorrerem surtos e migração aumentada da população de países endêmicos, a ameaça de infecção pelo HDV permanece (FLODGREN, *et al.*, 2000).

Na região Amazônica brasileira, especialmente na calha do rio Purus, uma forma atípica de hepatite crônica já se fazia presente há mais de 60 anos. Em decorrência do primeiro registro ter sido no município de Lábrea (Estado do Amazonas, Brasil), tal forma de hepatite grave recebeu a denominação de "febre negra de Lábrea" (FONSECA, 2002).

A hepatite D se desenvolve em duas formas clínicas: a coinfecção, que ocorre pela presença dos dois vírus simultaneamente, com taxa de progressão para a cronicidade entre 2 e 5%. A superinfecção acontece quando os pacientes já estão na fase crônica da hepatite B e entram em contato com o vírus Delta. A superinfecção pelo HDV em portadores do HBsAg se revela mais grave e de pior prognóstico, pois a antigenemia pré-existente do HBsAg favorece uma replicação intensa do HDV e conseqüente grave dano hepático. Os pacientes com superinfecção progridem para hepatite crônica em aproximadamente 90% dos casos (**Figura 7**)(SOUZA *et al.*, 2017).

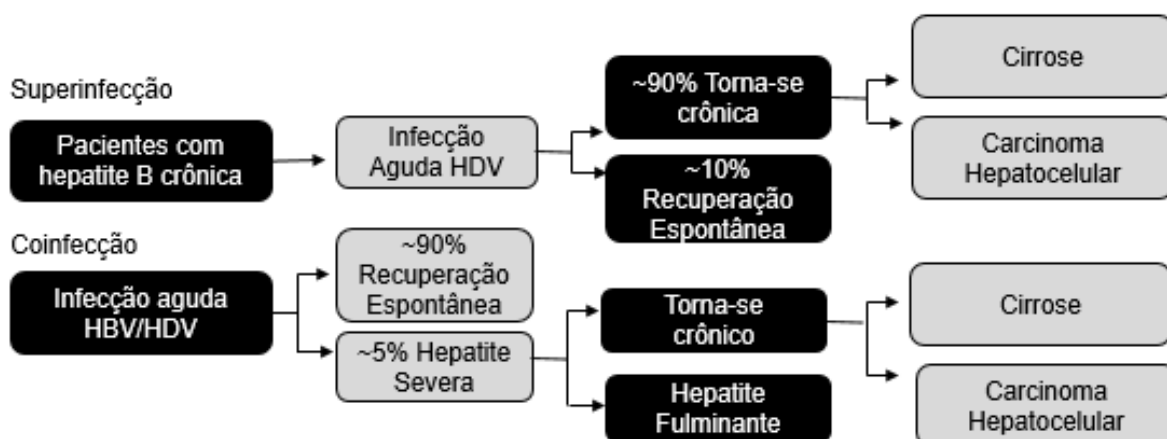


Figura 7: Aspectos clínicos da Hepatite Delta.
Fonte: SOUZA, 2017.

2.5 Vírus HDV

O HDV é o único membro da família *Deltaviridae*, gênero *Deltavirus*, é composto por uma partícula esférica de, aproximadamente 36nm de diâmetro, que apresenta em sua porção mais externa, um envelope bilipídico contendo formas de HBsAg, do qual o HDV depende para conseguir infectar novas células. O nucleocapsídeo é composto por uma molécula de RNA circular de fita simples com polaridade negativa contendo 1.700 nucleotídeos (**Figura 8**). A única proteína codificada pelo genoma viral é o HDVAg. O RNA viral é uma ribozima, ou seja, uma molécula de ácido nucléico com capacidade catalítica (RIZZETO *et al.*, 1977; FONSECA, 2002).

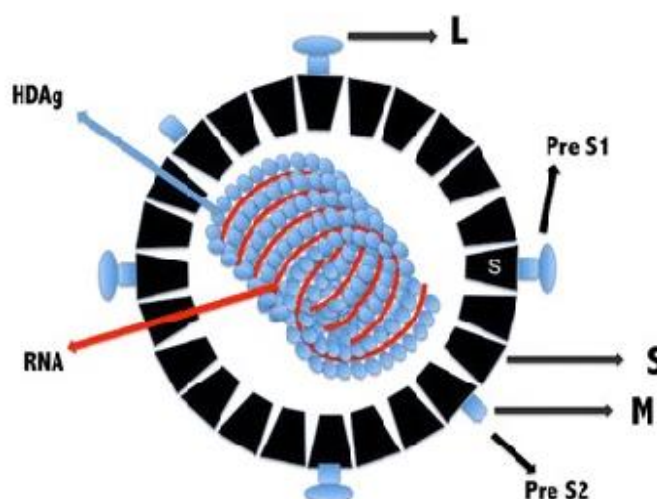


Figura 8: Partícula do vírus da Hepatite Delta.
Fonte: SOUZA *et al.*, 2017.

2.6 Genótipos do HDV

Oito genótipos de HDV foram identificados até agora, os genótipos 1, 2 e 3 são os mais comuns, cada um com uma distribuição geográfica distinta. O genótipo 1 é predominante na Europa e Central da Ásia, o genótipo 2 é encontrado principalmente na Ásia Oriental e o genótipo 3 é encontrada exclusivamente na América do Sul, onde foi relatado por produzir surtos graves de hepatite crônica na região do Amazonas (GOUVÊA, *et al.*, 2008; GOUVEA, *et al.*, 2009; MORA, *et al.*, 2011). Outros genótipos HDV podem ser encontrados em várias regiões da África, mas a sua patogenicidade não é bem estudada (GRABOWSKI & WEDEMEYER, 2010). Os genótipos 5, 6, 7 e 8 são prevalente na Nigéria (**Figura 9**) (ALFAIATE, *et al.*, 2015). O genótipo 2 e 4 encontram-se no Japão e em Taiwan e podem estar associados com uma forma menos grave da doença (LEE, *et al.*, 1996, JI, *et al.*, 2012).

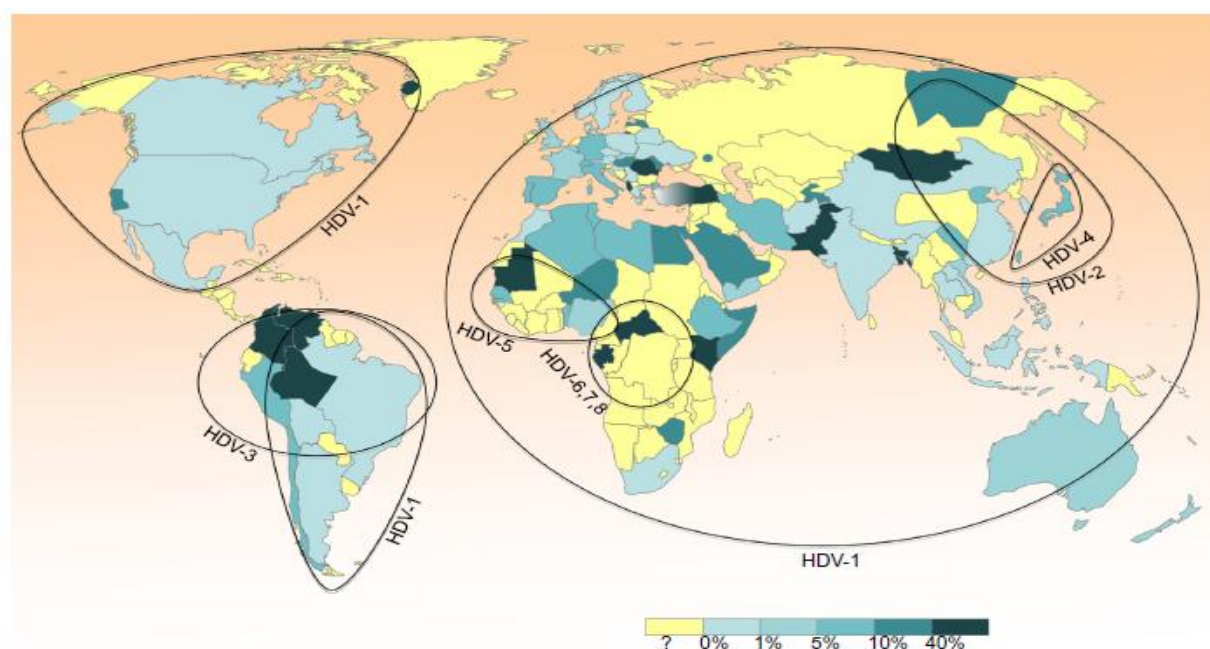


Figura 9: Mapa da distribuição global dos genótipos do HDV em diferentes regiões do mundo.
Fonte: ALFAIATE *et al.*, 2015.

2.7 Transmissão dos vírus HBV e Delta

A transmissão do HBV ocorre por via sexual no momento do contato com fluidos corpóreos do parceiro, por transmissão vertical, via parenteral e via percutânea,

caracterizando principalmente como grupos de riscos os indivíduos que utilizam hemoderivados, drogas injetáveis ilícitas, hemodiálises e compartilhamento de objetos pessoais (BRASIL, 2008; FERREIRA & SILVEIRA, 2004; SILVA, *et al.*, 2012).

A transmissão vertical ocorre por contágio de mãe para filho, isto pode acontecer desde o nascimento até os cinco anos de idade. A via vertical ocorre de mães positivas tanto para o antígeno de superfície (HBsAg) quanto para o antígeno “e” da hepatite B (HBeAg). Mulheres portadoras, HBsAg positivas, apresentam de 70% a 90% de chance de transmissão perinatal, sendo que quase 100% destes tornam-se cronicamente infectados (FONSECA, 2002; ASPINALL *et al.*, 2011).

Outra forma de contágio é a transmissão direta ou indiretamente através do contato pessoal entre familiares. O contato íntimo entre moradores de um mesmo domicílio e o uso comum de objetos pessoais, como escovas de dente, lâminas de barbear são apontados como possíveis veículos de transmissão (SUGIURA & BERTOLINI, 2010).

A transmissão intrafamiliar, sugerida em vários estudos, tem os pais e irmãos como principais reservatórios, contribuindo para o padrão de hiperendemicidade do HBV e HDV na Amazônia. A transmissão domiciliar no Estado do Amazonas, é demonstrada pela elevada frequência de infecção pelo vírus da hepatite B, entre os contatos de casos índices das formas fulminantes e alta prevalência entre os irmãos, sugerindo a presença da circulação viral no ambiente familiar (BRASIL, *et al.*, 2003; BRAGA, *et al.*, 2012).

2.8 Tratamento

O desafio do tratamento é curar a hepatite B com terapia finita que irá erradicar o DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) e eliminar a possibilidade de reativação da viremia sem a persistência do vírus da hepatite B. Assim, a infecção pelo HDV também se resolve por requerer proteínas do envelope do HBV, para a produção de suas partículas virais infecciosas. No entanto, mesmo com a erradicação dos vírus HBV/HDV, o acometimento da doença hepática desenvolvida pela interação vírus e resposta imune do hospedeiro permanece por anos (NASSAL, 2015; THOMAS, *et al.*, 2015).

O tratamento tem como objetivo a prevenção ou redução do desenvolvimento de cirrose hepática e do carcinoma hepatocelular. Além disso, também objetiva-se a supressão viral, normalização dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), diminuição do dano hepático e soroconversão, e têm sido utilizados como parâmetros para inferir a probabilidade de benefícios da terapêutica em longo prazo (BRASIL, 2016).

O tratamento da hepatite D em todo portador de hepatite B com HDV-RNA positivo ou anti-HDV-IgM positivo, deve ser considerado independentemente dos níveis de aminotransferases. A terapia de escolha recomendada como "padrão ouro" é o uso do interferon peguilado alfa 2 α durante 24 a 48 semanas com base na chance de soroconversão dos marcadores HbeAg para Anti-HBe, caso não ocorra a soroconversão, o tratamento deve seguir por tempo infinito, ou terapia dupla com análogos de nucleotídeos (NUCs) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, 2015).

Porém, o tratamento com interferon está associado a uma carga de doses semanais, levando a efeitos colaterais, que variam de doenças semelhantes a influenza, alopecia, leucopenia e trombocitopenia. O efeito colateral mais problemático da terapia com interferon é a habilidade emocional, que se manifesta em ansiedade, irritabilidade e depressão (UHL, *et al.*, 2014). Nos casos em que não ocorrer resposta ao interferon peguilado, aos pacientes não respondedores ou intolerantes com contraindicação ao tratamento com interferon pode ser iniciado tratamento com análogos nucleotídeos (NUCs), somente se o DNA do HBV for avaliado maior > 2.000UI/mL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, 2015; YURDAYDIN & IDILMAN, 2015).

O interferon alfa peguilado tem mostrado eficácia superior ao convencional e possui um maior tempo de meia vida, dessa forma pode ser administrado uma vez por semana apenas, promovendo maior conforto ao paciente, efeitos antivirais, antiproliferativos e imunomoduladores (FERREIRA, 2000; ABBAS, 2015). A lamivudina foi o primeiro análogo nucleosídeo aprovado para o tratamento para o HBV, demonstrando benefícios em tratamentos de curto prazo na redução de HBV-DNA, normalização da ALT e melhora no aspecto histológico do fígado, (WIENS, *et al.*, 2010).

Entecavir é um potente inibidor da DNA polimerase do HBV, no organismo humano, é fosforilado em trifosfato (composto ativo) pelas cinases celulares. Após quatro anos de tratamento com entecavir em pacientes que não receberam análogos de nucleotídeos anteriormente, menos que 1% dos pacientes apresentaram resistência ao medicamento (FERREIRA & BORGES, 2007). O entecavir apresenta eficácia reduzida quando há presença de mutações, encontradas especialmente em pacientes experimentados com outros análogos de nucleotídeos, como lamivudina e telbivudina. O seu uso é deve ser evitado em pacientes já experimentados com outros medicamentos (LEE, *et al.*,2014).

O medicamento tenofovir disoproxil fumarato é convertido no organismo, forte inibidor da polimerase viral, se ligando diretamente a elas, o que leva a uma maior segurança no seu uso (FERREIRA & BORGES, 2007). É estruturalmente similar ao adefovir, mas pode ser administrado em doses maiores, devido à sua maior segurança e tolerabilidade. Esse medicamento constitui a primeira linha de tratamento para a hepatite B crônica. Apresenta elevada potência de supressão viral e alta barreira genética de resistência contra as mutações do HBV (WIENS, *et al.*, 2010; KIM, *et al.*,2014).

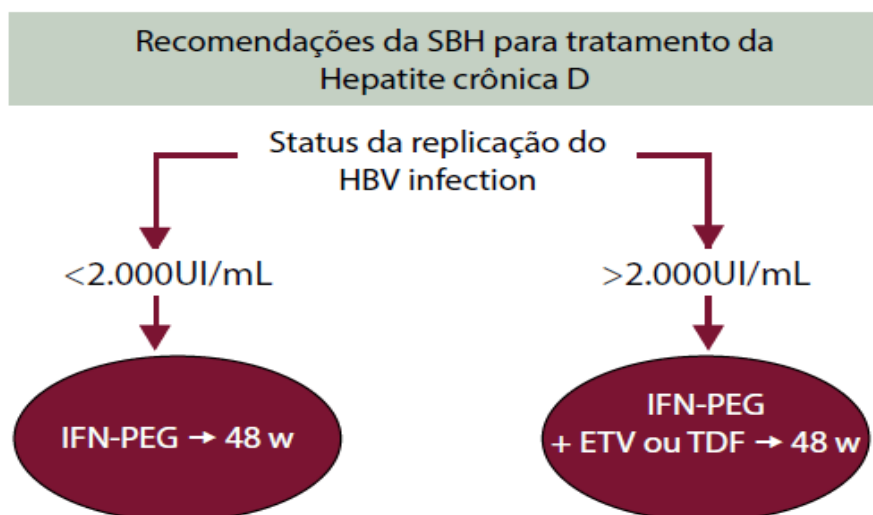


Figura 10: Recomendações de tratamento para Hepatite D crônica.
Fonte: Sociedade Brasileira de Hepatologia, 2015

2.9 Diagnósticos da infecção pelo vírus HBV e HDV

O diagnóstico sorológico varia de acordo com a fase da evolução clínica da doença no paciente, sendo que os primeiros sinais de anormalidades são identificados pela elevação das transaminases séricas (ALT/AST), indicativos de dano hepático. A fase aguda é caracterizada pela presença do antígeno (HBsAg) confirmando a presença do vírus no soro do indivíduo, este emerge durante o período de incubação viral. Porém deve-se considerar o período de janela imunológica e o aparecimento sorológico do marcador anti-Hbc, e suas frações IgM (marcador de hepatite B recente) e IgG, (marcador de Infecção passada) (SILVA *et al*, 2012).

O anticorpo anti-HBs é o marcador que surge após o desaparecimento do HBsAg, e este se mantém detectável no soro por toda a vida do paciente, tendo em vista ser um anticorpo protetor, também sendo caracterizado como marcador de cura (por soro-conversão ou imunização vacinal) (BRASIL, 2011).

Com o processo de infecção persistente os portadores do HBV tornam-se doentes crônicos, podendo estes evoluir para quadros de cirrose e carcinoma hepatocelular. Os portadores crônicos apresentam os marcadores HBsAg persistentes por um período igual ou superior a seis meses, não havendo o processo de soroconversão para o anti-HBs (SCHMIDT, *et al.*, 2013).

O antígeno HBeAg é o marcador indicativo de replicação viral ativa, e surge nos primeiros dias da fase clínica, sua persistência é indicativo de evolução para a cronicidade da doença no paciente. Nas fases iniciais do período crônico, detecta-se, em níveis altos, o HBsAg, o HBeAg e o anti-HBc IgG, além do DNA viral (CAMPOS, *et al.*, 2013).

A suspeita diagnóstica pode ser guiada por dados clínicos e epidemiológicos. A confirmação diagnóstica e laboratorial e realiza-se por meio dos marcadores sorológicos do HDV, posterior à realização dos exames para o HBV (BRASIL, 2005).

O diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite Delta pode ser realizado tanto pela detecção de anticorpos anti-HDV quanto pela pesquisa de marcadores diretos, como o antígeno do HDV, e detecção do genoma viral circulante (CIANCIO; RIZZETTO, 2013).

3.10 Avaliação do estadiamento de doença hepática

A análise histológica da biópsia hepática permanece como o “padrão-ouro” para o diagnóstico e o estadiamento da hepatite, uma vez que se avalia a morfologia do fígado, o tipo do infiltrado celular e o grau da atividade inflamatória no tecido. É ainda capaz de demonstrar evidências de doenças associadas, estabelece com precisão um diagnóstico diferencial e contribui para a análise da resposta terapêutica (BRASIL, 2017).

Outro método caracterizado como não “invasivo” é a eletrografia hepática (FIBROSCAN), que permite a estratificação dos graus de fibrose. Uma de suas principais vantagens é a avaliação de uma área maior do que a avaliada por fragmento de biópsia hepática (COUTO *et al.*, 2016; BRASIL, 2017).

Vários métodos não-invasivos podem ser utilizados em lugar da biópsia hepática. Entre os biomarcadores estão o *fibrosis-4* (FIB-4) e *AST to Platelet Ratio Index* (APRI) são simples sistemas de pontuação (scores) que utilizam resultados das transaminases e plaquetas. Eles apresentam desempenho superior à relação AST/ALT e acurácia de 86% na caracterização da fibrose avançada (BRASIL, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, 2015).

O APRI é calculado com a fórmula:

$$\frac{(\text{AST/ limite superior da normalidade AST})}{\text{plaquetas}(10/\text{L}) \times 100}$$

O FIB-4 utiliza-se:

$$\frac{(\text{Idade} \times \text{AST} (\text{u/L}))}{\text{plaquetas}(10/\text{L}) \times \text{raiz quadrada de ALT} (\text{u/L})}$$

2.11 Ciclo do HBV e HDV

A infecção pelos vírus em uma mesma célula, é mediada pelo polipeptídeo cotransportante de taurocolato de sódio (NTCP), sendo um transportador transmembranar localizado na membrana basolateral de hepatócitos que promove a

ligação do domínio pre-S1 do HBsAg, precedido por ligação dos vírus aos proteoglicanos altamente sulfatados carregados negativamente (HSPG). Contudo, a replicação do HBV e do HDV parece ser totalmente independente. O nucleocapsídeo do HBV (NC) é transportado para o núcleo da célula, onde o DNA viral circular relaxado (rcDNA) é convertido em DNA covalentemente circular fechado (cccDNA), para que ocorra a transcrição reversa na célula infectada. Fragmentos de DNA de HBV são integrados no genoma da célula hospedeira (**Figura 11**)(YANG, *et al.*,2014; ALFAIATE, *et al.*, 2015).

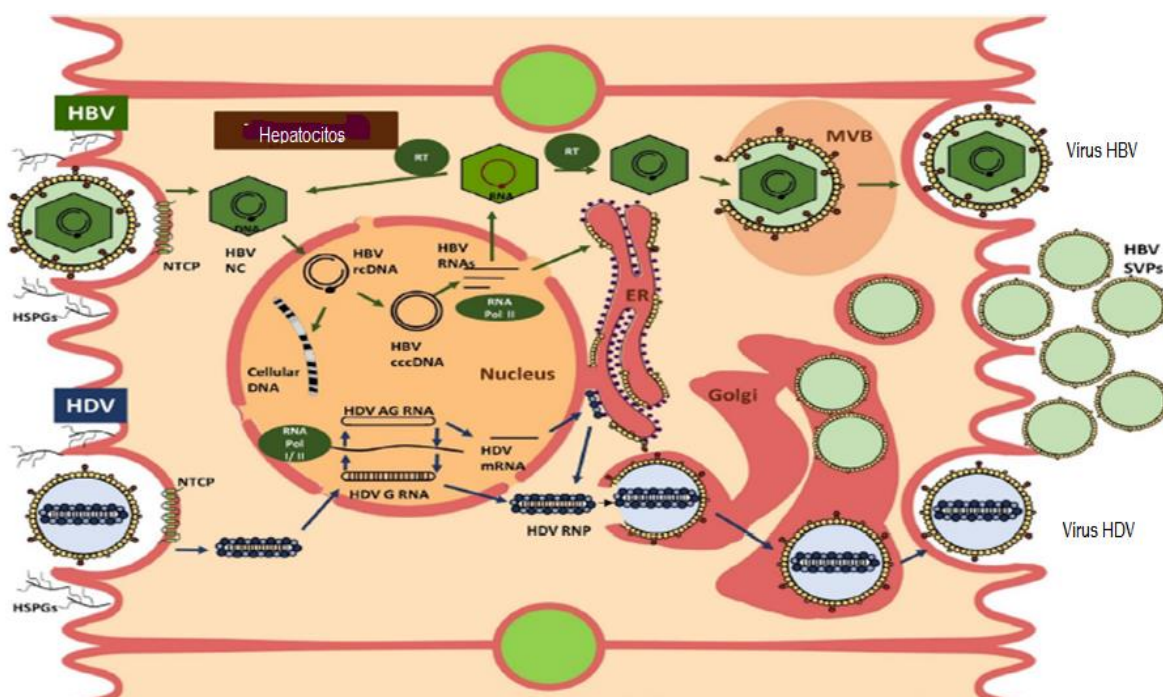


Figura 11: Ciclo de vida HDV e HBV.

Fonte: ALFAIATE *et al.*,2015.

O cccDNA é usado como molde para a transcrição dos RNAs pregenômicos e subgenômicos para a formação das proteínas no núcleo, mediada pela RNA Pol II que podem ser imaturos e se submetem a retro-transcrição pela transcriptase reversa (RT), para formar a replicação do genoma através da transcrição do pregenômico (pgRNA) traduzindo para a síntese parcial da cadeia positiva formando as proteínas estruturais virais. Os vírus são montados e liberados através da via corpo multivesicular (MVB) (ALFAIATE, *et al.*, 2015; LAMONTAGNE, *et al.*,2016).

A replicação do genoma do HDV começa pela interação com receptor heparan sulfato proteoglicanos (HSPGs), através do domínio pre-S1 da HBsAg-L e do ciclo antigênico do domínio S (SUREAU & NEGRO, 2016). Após ligar-se a NTCP através

da região N-terminal do HBsAg-L, e se funde com a membrana plasmática ou sofre endocitose, podendo ocorrer o processo de fusão para libertar o complexo de ribonucleoproteína (RNP). A replicação do genoma do HDV é exclusivamente nuclear e ocorre através de um mecanismo circular contínuo, que envolve a formação de três tipos de RNAs, genômico (RNA_g), antigenômico (RNA_{ag}) e mensageiro (RNA_m), e essa replicação depende de três tipos de enzimas para sua replicação (polimerases I /II, a ribonucleoproteína, e a adenosina ADAR1) (ALFAIATE, *et al.*,2015; ALDABE, *et al.*, 2015; SUREAU & NEGRO,2016).

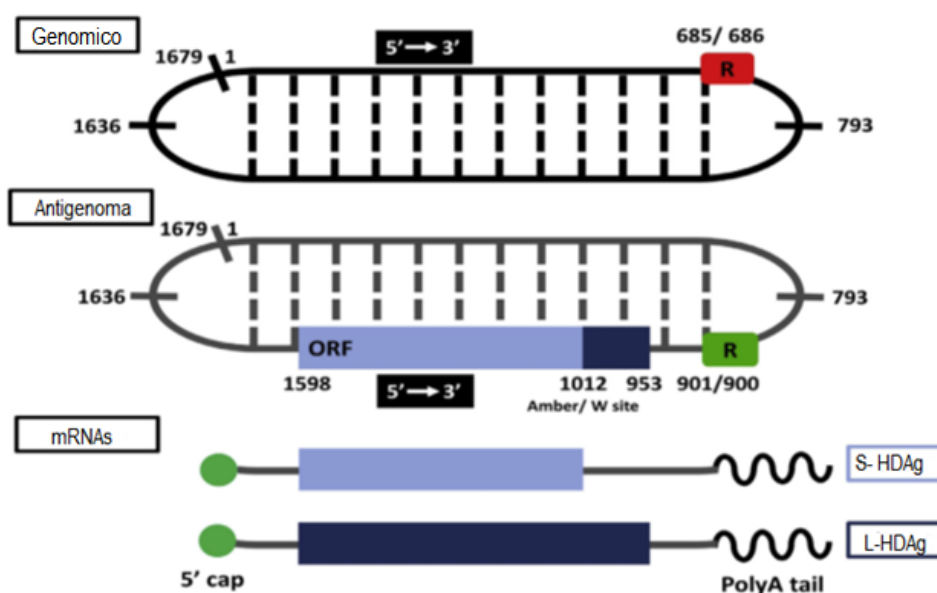


Figura 12: Estrutura dos RNAs do HDV.
Fonte: ALFAIATE,2015.

O genoma do HDV tem função de ribonucleoproteína (RNP) que é uma enzima catalítica que autocliva o RNA antigenômico em monômeros em um mecanismo circular contínuo, para servir de molde para o RNA genômico, que, posteriormente, ocorre a síntese do RNA mensageiro dando origem a molécula antigênica HDAg, e inicia-se a formação de duas isorformas da proteína antigênica: proteína menor (S-HDAg) e a proteína maior (L-SHAg (TAYLOR,2015;SUREAU & NEGRO,2016; LEMPP & URBAN,2016)).

A ADAR1 é uma desaminase de adenosina cuja função é editar o RNA do HDV fazendo a troca dos aminoácidos no códon RNA antigenômico. Quando o códon UAG converte para um códon de triptofano UGG a maquinaria de transcrição reconhece a

mudança de códon e após a replicação e transcrição o RNAm codifica a proteína de cadeia longa do HDV (HDAg-L) (POLSON, *et al.*, 1998; CASEY, 2012).

Após a tradução, a proteína HDAg retorna ao núcleo para regular a replicação viral ou ligar-se ao genoma viral circular, formando as ribonucleoproteínas que, posteriormente, serão enviadas ao retículo endoplasmático e encontram as proteínas de superfície do HBV, ocorrendo a montagem da partícula viral infectante no complexo de golgi e posterior liberação do vírus completo para contaminação de novos hepatócitos (LEMPP *et al.*, 2016).

2.12 Imunopatogênese dos Vírus HBV/ HDV

A fase inicial da infecção viral é caracterizada pela ativação de células natural killer (NK), a fim de limitar a disseminação da infecção e para iniciar desenvolvimento eficiente de uma resposta imunitária adaptativa (BUSCA & KUMAR, 2014). Essas células estão envolvidas na citotoxicidade direta de células infectadas, e induz a produção de citocinas como interferon- α e γ (IFN- α e IFN- γ) que desenvolve um estado antiviral contra os vírus, e fator de necrose tumoral (TNF- α) que apresenta interação com ligante indutor de apoptose (TRAIL), que induz morte celular dos hepatócitos (BALMASOVA *et al.*, 2014).

O mecanismo de reconhecimento de células infectadas por vírus é atribuído a imunidade inata, através do reconhecimento de estruturas virais (RNA e DNA) denominados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), pelos receptores do tipo *Toll-like* (TLR7, TLR8, TLR9) mais específicos para DNA e receptores do tipo RIG que reconhece RNA viral, endossômicos presentes em células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos, células natural killer e células dendríticas plasmocitóides (BOEHME, *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2014).

Após o reconhecimento, o vírus é internalizado e processado pelas células dendríticas (DCs) e são apresentados através dos receptores de células T e MHC de classe I/II, por interação de moléculas coestimulatórias CD80/CD86 e CD28, para linfócitos T. Após apresentação, as células T CD4⁺ naive se proliferam e se diferenciam em vários subconjuntos de células efetoras caracterizadas pela produção de citocinas distintas, e por suas funções efetoras distintas (Th1, Th2, Th17, Treg),

determinadas pelo perfil de citocinas produzidas e pelas propriedades funcionais celular (**Figura 13**) (CRUVINEL, *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2015).

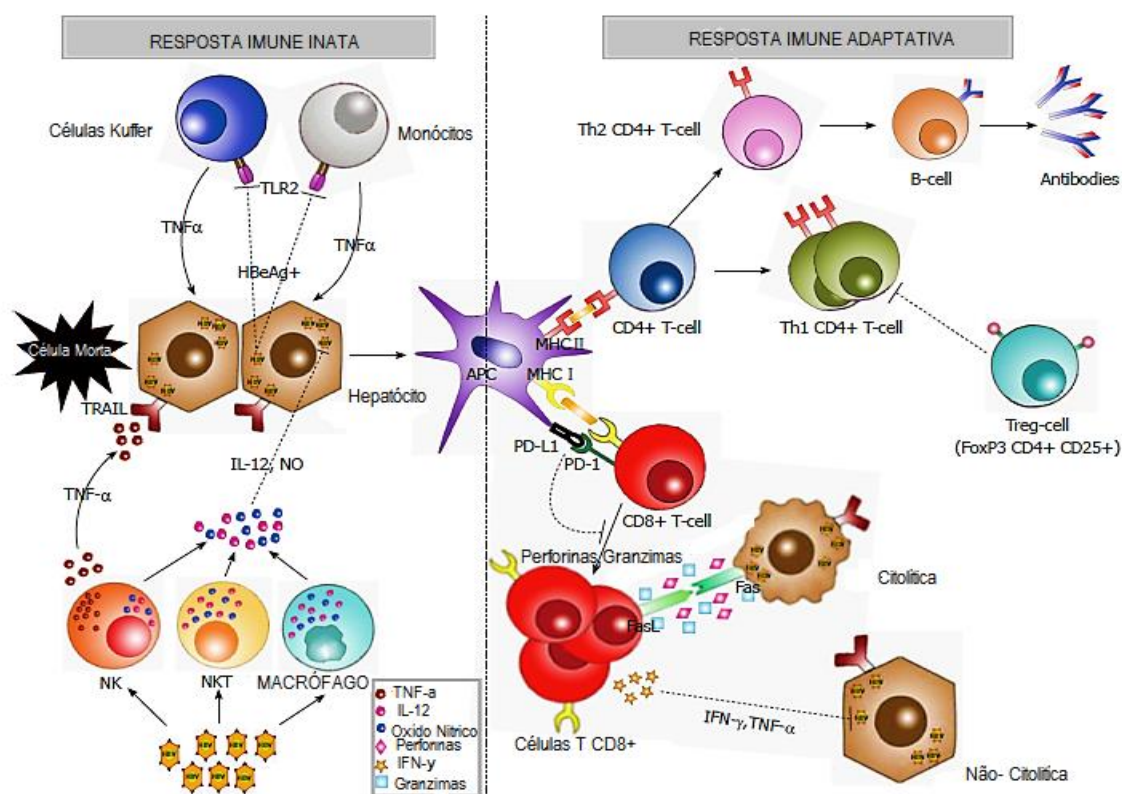


Figura 13: Representação da resposta imune a vírus.
Fonte: YOU *et al.*, 2014

A resposta celular mediada por linfócitos T CD4+ coordena subpopulações específicas e produção de citocinas na resposta imune, como produção de citocinas inflamatórias do perfil Th1 (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IFN, TNF), que estão envolvidos na imunidade celular efetora, as citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-15) desencadeando uma resposta humoral levando a neutralização e opsonização do vírus, impedindo sua entrada nos hepatócitos (LOPES & SCHINONI, 2011; RAMEZANI, *et al.*, 2012; JEULIN, *et al.*, 2013).

O perfil de subpopulação Th17 induz a produção de citocinas pró- inflamatórias como IL-6, TGF-β, IL-22 e IL-23 e tem sido visto que esta resposta contribui para a progressão da fibrose hepática em pacientes crônicos infectados pelo HBV (CHENG, *et al.*, 2015).

Em resposta a produção de citocinas inflamatórias exacerbada contra os vírus, são produzidas citocinas T regulatórias como IL-10 e Fator de crescimento transformante (TGF-β), caracterizadas por regular as respostas imune, causando um

efeito antagonista na ação de citocinas inflamatórias, que induz a supressão da imunopatologia do vírus (BOEHME & COMPTON, 2004; CONDE, *et al.*, 2013).

Os linfócitos T citotóxicos exercem papel importante na imunidade adaptativa, principalmente contra células infectadas por vírus e células tumorais. O reconhecimento do antígeno através da interação do TCR com o MHC de classe I, desencadeia a liberação de proteínas citotóxicas (perforinas, granzimas) pelos linfócitos T citotóxicos caracterizadas por levar a processos citolíticos e eliminação dos reservatórios virais (BERTOLETTI & GEHRING, 2006; JEULIN, *et al.*, 2013).

As proteínas quimioatraentes envolvidas na resposta a infecção, são as quimiocinas do tipo (RANTES) que recruta células para regiões periportais no fígado durante a inflamação. A proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) é ativada por leucócitos no processo inflamatório (CHEONG, *et al.*, 2007).

A interação entre os vírus apresenta três fases, a primeira caracterizada pela replicação ativa do HDV e diminuição da replicação do vírus HBV; na segunda fase, há uma reativação da replicação do HBV e supressão da replicação do HDV e a terceira fase, com o desenvolvimento da cirrose hepática e carcinoma hepatocelular, causados pela replicação ou presença de ambos os vírus (**Figura 14**) (ABBAS, 2013).

Um dos fatores associado a progressão da doença é a inibição das vias de sinalização de IFN- α pelo HDV, inibindo ativação da tradução de proteínas kinase (JAK) e ativação de genes de STAT que pode está relacionado com a supressão de HBV, podendo estar implicado na persistência e falha do tratamento do HBV (NEGRO, 2014).

A proteína HDAg ativa o fator de transcrição NF- κ B por meio da ácido hidrofosfórico oxidase-4 que por sua vez causa o estresse oxidativo nos hepatócitos e pode contribuir para o processo necroinflamatório grave na infecção por HDV e a sua progressão para HCC (ABBAS, 2013; DASTGERDI & TACKE 2015).

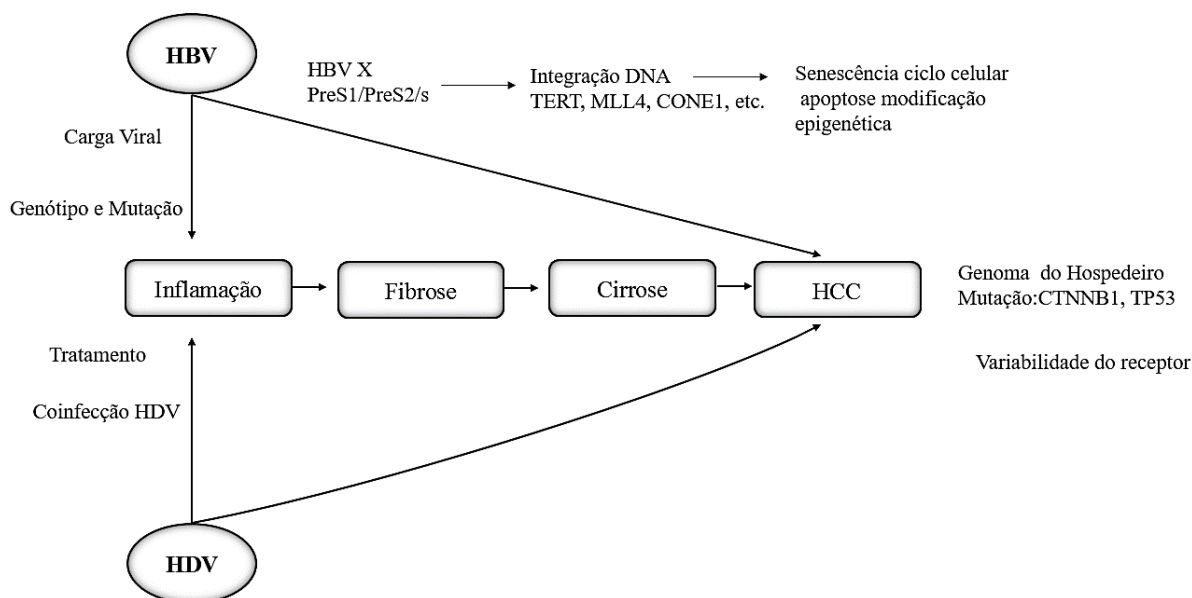


Figura 14: Fases da evolução da infecção pelos vírus HBV e HDV.
Fonte: SUKOWATI *et al.*, 2016, adaptado por SOUZA, PS.

Não obstante, a cronificação da doença pode estar relacionada à exaustão de células T CD8⁺ pela expressão aumentada de alguns receptores inibitórios de morte programada como o receptor responsivo dominante -1 (PD-1), o antígeno associado a linfócitos T citotóxico (CTLA-4) que na ativação de células T requer um sinal mediado pelo receptor de células T (TCR), acompanhado por um sinal coestimulativo com molécula CD28. Contudo, o inibidor CD28-B7 membro da família CTLA-4 é geralmente induzido mediante o acoplamento ao TCR o que prejudica a ativação de células T (YE, *et al.*, 2015; YOU, *et al.*, 2014).

Uma vez que a infecção por HDV provoca hepatite fulminante e cirrose hepática, a proteína L-HDAg pode estimular a citocina TGF- β que, por sua vez, pode induzir a transformação de células estreladas em miofibroblastos, induzindo a produção e acúmulo de colágeno I na extremidade da matriz extracelular, levando a perda da microvilosidade da matriz, ocasionando a fibrose, tornando resistente a degradação por metaloproteinases de matriz (MMP). As células de Kupffer induz produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela NADPH oxidase que possibilita a toxicidade celular e conseqüentemente o estresse oxidativo e morte dos hepatócitos (ABBAS, 2013; CZAJA, 2014).

Assim, uma desregulação dessa resposta leva a um processo de inflamação crônica do fígado e, conseqüentemente, a incapacidade do fígado de reparação que

conduz a um processo fibrótico, com aparecimento de formas mais graves como cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (HCC) (STAUFFER, *et al.*, 2013; LI, *et al.*,2015).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Caracterizar a resposta imune e perfil de citocinas em pacientes coinfectados com o vírus da Hepatite Delta em pacientes não tratados e em tratamento.

4.2 Objetivos Específicos

- Descrever o perfil de subpopulações de linfócitos T e B, células NK e NKT, células dendríticas e monócitos em pacientes coinfectados com os vírus da Hepatite B (HBV) e Delta (HDV);
- Quantificar as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF- α e quimiocinas MCP-1 (CCL2), IL-8 (CXCL8), RANTES (CCL5), IP-10 (CXCL10) e MIG (CXCL9) em pacientes coinfectados com os vírus da Hepatite B (HBV) e Delta (HDV);
- Associar o perfil de citocinas e quimiocinas com os marcadores celulares analisados em pacientes coinfectados com os vírus da Hepatite B (HBV) e Delta (HDV).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo, transversal realizado com pacientes diagnosticados com hepatite Delta, atendidos no ambulatório de Hepatopatia da Fundação de Medicina Tropical- Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

5.2 População de estudo

Para a realização deste estudo foram coletadas 77 amostras de pacientes diagnosticados com hepatite Delta, atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Estes pacientes foram segregados em um grupo não tratado (n=13) e grupo em tratamento (n=64). Para o grupo controle, foram coletadas 50 amostras de candidatos doadores de sangue (CN) que se apresentaram na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) por demanda espontânea.

5.3 Critérios de Inclusão, Não-Inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes diagnosticados com hepatite Delta, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos, com e sem tratamento, e que procuraram atendimento na FMT-HVD. Não foram incluídas mulheres grávidas e pacientes de origem indígena e transplantados.

Não foram incluídos pacientes que apresentaram coinfeção com os vírus da imunodeficiência adquirida-HIV (anti-HIV-I e II), HTLV (anti-HTLV I e II), doença de Chagas (teste Elisa), sífilis (VDRL) pacientes que apresentaram quadro clínico-laboratorial de cirrose hepática descompensada, pacientes diabéticos descompensados, pacientes com relato de consumo diário de bebida alcoólica, pacientes com distúrbios psiquiátricos, pacientes renais crônicos e pacientes com síndrome plurimetabólica.

Para o grupo controle, foram selecionados candidatos a doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), de ambos os sexos, com idade mínima de 18 anos residentes em Manaus, que não

apresentaram reatividade para Hepatite B (anti HBc, HBsAg), HCV (anti-HCV), HIV (anti-HIV-I e II), HTLV (anti-HTLV I e II), doença de Chagas (teste ELISA), sífilis (VDRL).

5.4 Aspectos Éticos

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas a partir dos projetos aprovados pelos CEPs intitulados *“Estadiamento da fibrose hepática de pacientes infectados pelo vírus da Hepatite Delta por métodos não invasivos na região Norte do Brasil”* e *“Identificação e Seleção de Peptídeos Miméticos Reativos aos soros de pacientes HCV⁺ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro”*. Vale ressaltar que do segundo projeto utilizamos apenas as amostras controles.

Os projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD e Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas sob os respectivos números de CAAE: 46865015.8.3001.5262 e 49652815.8.0000.0009.

5.5 Coleta e conservação das amostras

Os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa, assinando posteriormente o *termo de Consentimento livre e Esclarecido*. Foi aplicado um questionário com perguntas relevantes para o estudo, como nome do candidato, data de nascimento, número de registro, data da coleta, etnia, sexo, presença de comorbidade e utilização de medicamentos. As amostras de sangue foram coletadas com sistema de coleta a vácuo, em tubos 5 tubos de 5mL, sendo três tubos de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e dois tubos sem anticoagulante (**Figura 15**).

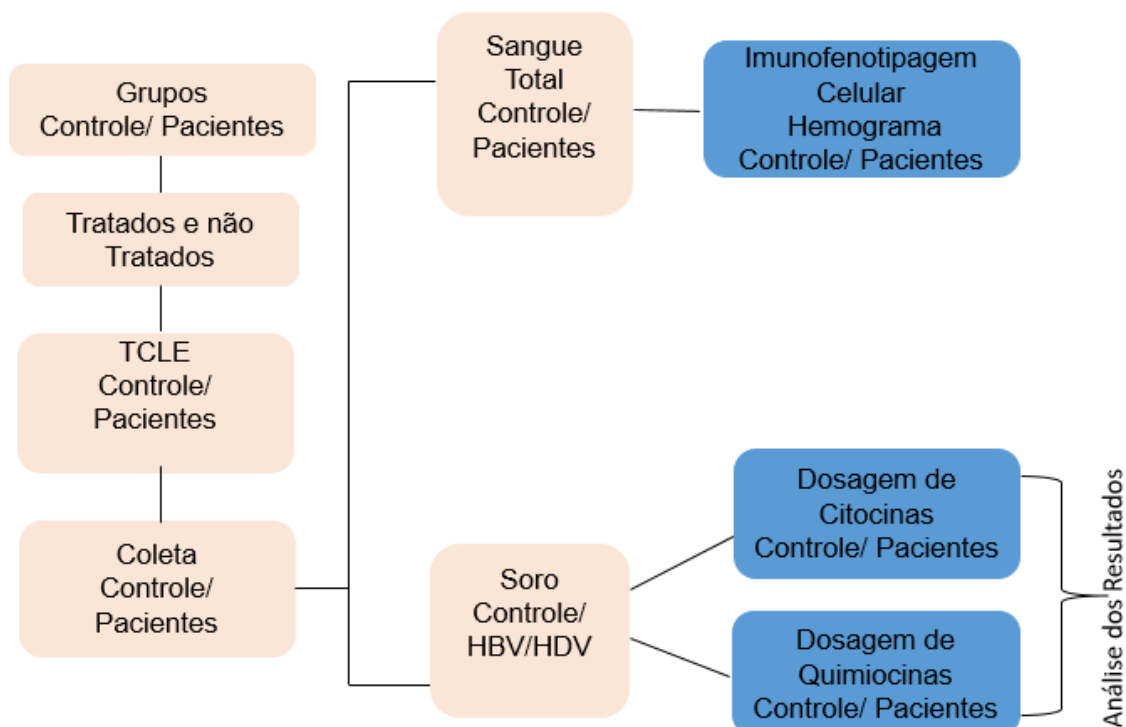


Figura 15: Fluxograma de Atividades.

5.6 Imunofenotipagem Celular

A imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos T e B, células NK, células dendríticas mielóides (mDC) e plasmocitóides (pCD) e monócitos foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos (**Tabela 1**).

Inicialmente foram incubados 100 μ L de sangue total nos tubos 1-11 e 200 μ L nos tubos 10 e 11 com 1 μ L de cada anticorpo nos seus respectivos tubos. Estes, foram homogeneizados e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a marcação, as hemácias foram lisadas com o uso da solução de lise (*BD FACSTTM Lysing Solution, Cat. N^o 349202, Lot: 24299, BD[®] Biosciences San Jose, CA, USA*), diluída 10 vezes em água destilada.

Os tubos foram novamente homogeneizados e incubados por 10 minutos nas mesmas condições. Passado a fase de incubação, os tubos foram centrifugados a 1500rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 2 mL de PBS-W (8,0 g de NaCl, 1,16 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂PO₄, 0,2 g de KCl e 5,0 g de BSA, qsp 1L H₂O destilada, pH: 7,2) para lavagem do botão

de células formado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados novamente a 1500rpm/5min. Após a centrifugação, foram adicionados 100 µL de anticorpo anti-FoxP3 AF488, diluído (10:100) de PBS-P (tubos 10) e 100 µL de anticorpo anti-FoxP3 AF488, diluído (10:100) em PBS-P (tubo 11) complementando o protocolo. Após a incubação as células foram lavadas com 2 mL PBS-W e centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos. Ao final do procedimento, o sobrenadante foi descartado e as células foram colocadas em 300 µL de solução Fixadora (40,0 g de (CH₂O) n H₂O, 0,106 g de NaOH, 40,04 g de C₂H₆AsOONa e 26,6 g de NaCl, qsp 200mL de H₂O destilada, pH: 7,2) e foram armazenadas até o momento da leitura.

As amostras foram adquiridas no Citômetro de Fluxo *FACSCalibur*[®] (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) da Fundação HEMOAM. Para a identificação morfológica e imunofenotípica das células foi utilizado o programa *FlowJo* (v9.4), com o auxílio de “*gates*” para a seleção das populações de interesse, em gráficos que combinaram características morfológicas (tamanho e granulosidade) com características imunofenotípicas através das fluorescências dos anticorpos monoclonais utilizados para identificar as células alvos. Os gráficos utilizados foram do tipo “*dot plot*”, “*contour plot*” e histograma, pois apresentam uma melhor visualização das estratégias de análise.

Tabela 1: Descrição das fluorescências e perfil celular dos anticorpos monoclonais que serão utilizados na citometria de fluxo.

Tubo	Anticorpo	Fluorescência	Clone	Lote	Cat.N°	Marca	Perfil Celular
01	-	-	-	-	-	-	CN
02	Human Anti-CD3	PercP	SK7	2229903	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Linf.T CD4⁺, CD8⁺ e Ativação Celular
	Human Anti-CD4	PE	MT310	00070964	R0805	<i>Dako</i>	
	Human Anti-CD8	FITC	B9.11	34	A07756	<i>Beckman Coulter</i>	
	Human Anti-CD69	APC	FN50	68183	555533	<i>BD® Biosciences</i>	
03	Human Anti-CD5	FITC	UCHT2	63832	555352	<i>BD® Biosciences</i>	Linf. B
	Human Anti-CD19	PE	HIB19	66211	555413	<i>BD® Biosciences</i>	
04	Human Anti-CD3	PercP	SK7	2229903	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Células NK e NKT
	Human Anti-CD16	FITC	368	70067	555406	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD56	PE	B159	05803	555516	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD69	APC	FN50	68183	555533	<i>BD® Biosciences</i>	
05	Human Anti-CD14	APC	M5E2	87809	555399	<i>BD® Biosciences</i>	Subtipos de Monócitos
	Human Anti-CD16	FITC	368	70067	555406	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-HLA-DR	PE	G46-6	30413	555558	<i>BD® Biosciences</i>	
06	Human Anti-CD14	APC	M5E2	87809	555399	<i>BD® Biosciences</i>	Células Dendríticas
	Human Anti-CD11c	PE	3.9	B140910	301606	<i>BioLegend®</i>	
	Human Anti-CD123	FITC	6H6	B140008	306014	<i>BioLegend®</i>	
07	Human Anti-CD14	FITC	M5E2	87809	555399	<i>BD® Biosciences</i>	Mónocitos e TLR2+
	Human Anti-CD282	PE	M5E2	B154790	309708	<i>Biolegend</i>	
08	Human Anti-CD14	FITC	M5E2	87809	555399	<i>BD® Biosciences</i>	Mónocitos e TLR4+
	Human Anti-CD284	PE	HTA25	B156775	312806	<i>Biolegend</i>	
09	Human Anti-CD4	FITC	RPA-T4	75982	555346	<i>BD® Biosciences</i>	Mónocitos e TLR9+
	Human Anti- CD289	PE	G43-25B	08429	555380	<i>BD® Biosciences</i>	
10	-	-	-	-	-	-	CN Intracelular
11	Human Anti-CD4	PE	MT310	00070964	R0805	<i>Dako</i>	Linf. Treg
	Human Anti-CD25	PercP	MEM-181	521760	PC218T100	<i>BD® Biosciences</i>	

5.6.1 Identificação da População de Linfócitos T CD4⁺, TCD8⁺, Linfócitos T ativados CD69⁺, Linfócitos B (CD19⁺) e B1 (CD5⁺CD19⁺).

A identificação das populações de Linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), Linfócitos T ativados (CD69⁺), Linfócitos B (CD19⁺) e B1 (CD5⁺CD19⁺) foram realizados primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 16A**) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Em seguida foram elaborados cinco gráficos: 1) SSC x CD3 PercP (**Figura 16B**); 2) CD69 APC x CD4 PE (**Figura 16C**); 3) CD69 APC x CD8 FITC (**Figura 16D**); 4) SSC x CD19 PE (**Figura 16E**); 5) SSC x CD5 FITC (**Figura 16F**). Em seguida foram selecionadas as populações positivas para CD3⁺CD4⁺ (Linfócitos T CD4⁺), CD3⁺CD8⁺ (Linfócitos T CD8⁺), CD19⁺ (Linfócitos B), CD5⁺CD19⁺ (Linfócitos B1).

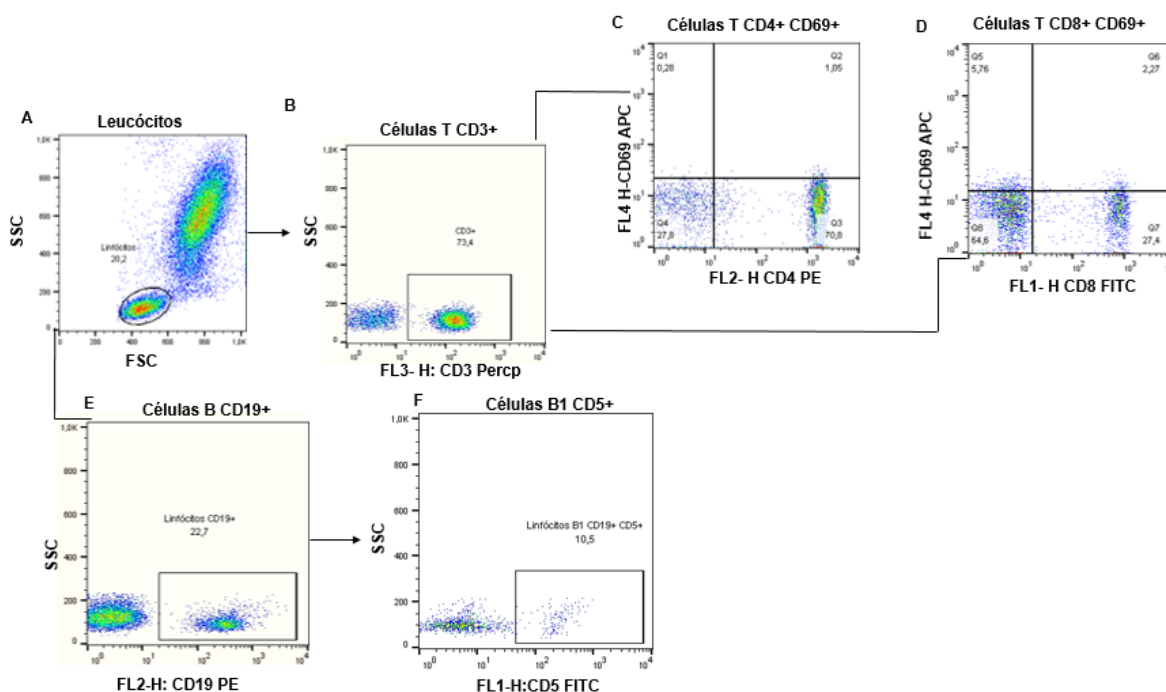


Figura 16: Identificação dos Linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), Linfócitos ativados (CD69⁺), Linfócitos B (CD19⁺) e B1 (CD5⁺CD19⁺) no programa *FlowJo* (v9.4).

5.6.2. Identificação dos Linfócitos T regulatórios (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)

A identificação dos Linfócitos T regulatórios (Treg) foi feita com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 17A**) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Após, foi elaborado um gráfico de SSC x CD4 PE (**Figura 17B**); e em seguida foi criado um gráfico CD25 APC x FoxP3 AF488 (**Figura 17C**). Com a população de LT CD4⁺. A

população positiva para $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ foi selecionada, caracterizando os linfócitos Treg.

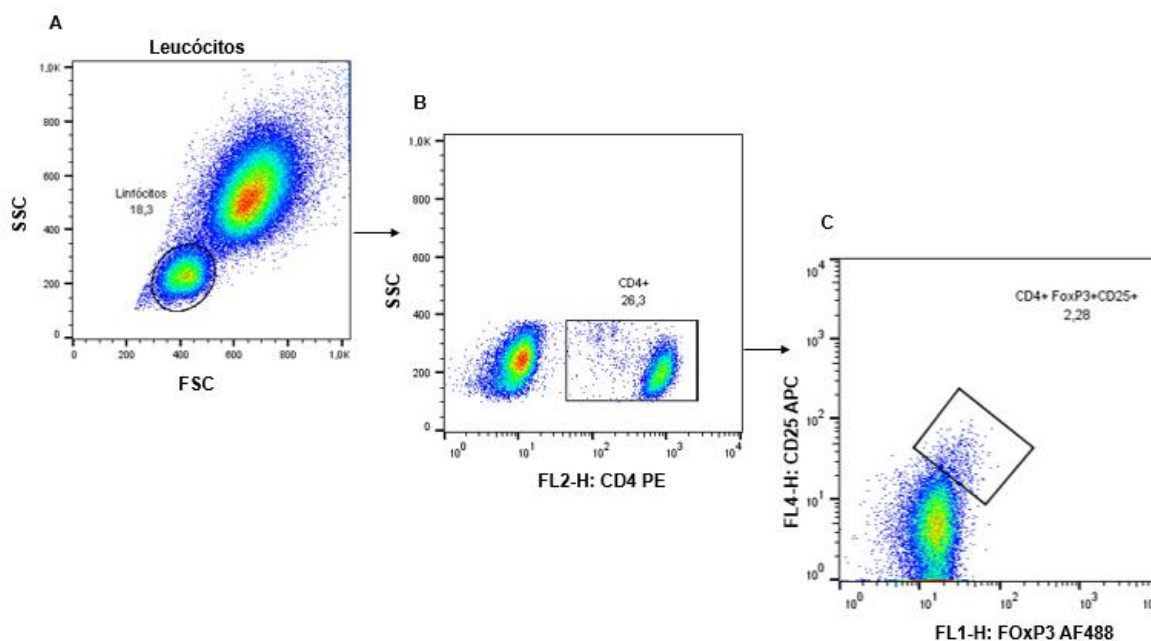


Figura 17: Identificação dos Linfócitos Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) no programa *FlowJo* (v9.4).

5.6.3. Identificação da População de Células NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$) e NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$)

A identificação das populações de Células NK ($CD3^-/CD16^+/CD56^+$) e NKT ($CD3^+/CD16^+/CD56^+$) foi realizada primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 18A**) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Após, foi elaborado um gráfico de SSC x CD3 Percp ($CD3^-/CD3^+$ PercP) (**Figura 18B**). Em seguida foram elaborados dois gráficos: 1) CD16 FITC x CD56 PE (**Figura 18C**); 2) CD16 FITC x CD56 PE (**Figura 18D**). Ao final foram selecionadas as populações $CD3^-/CD16^+/CD56^+$ (Células NK) e $CD3^+/CD16^+/CD56^+$ (Células NKT).

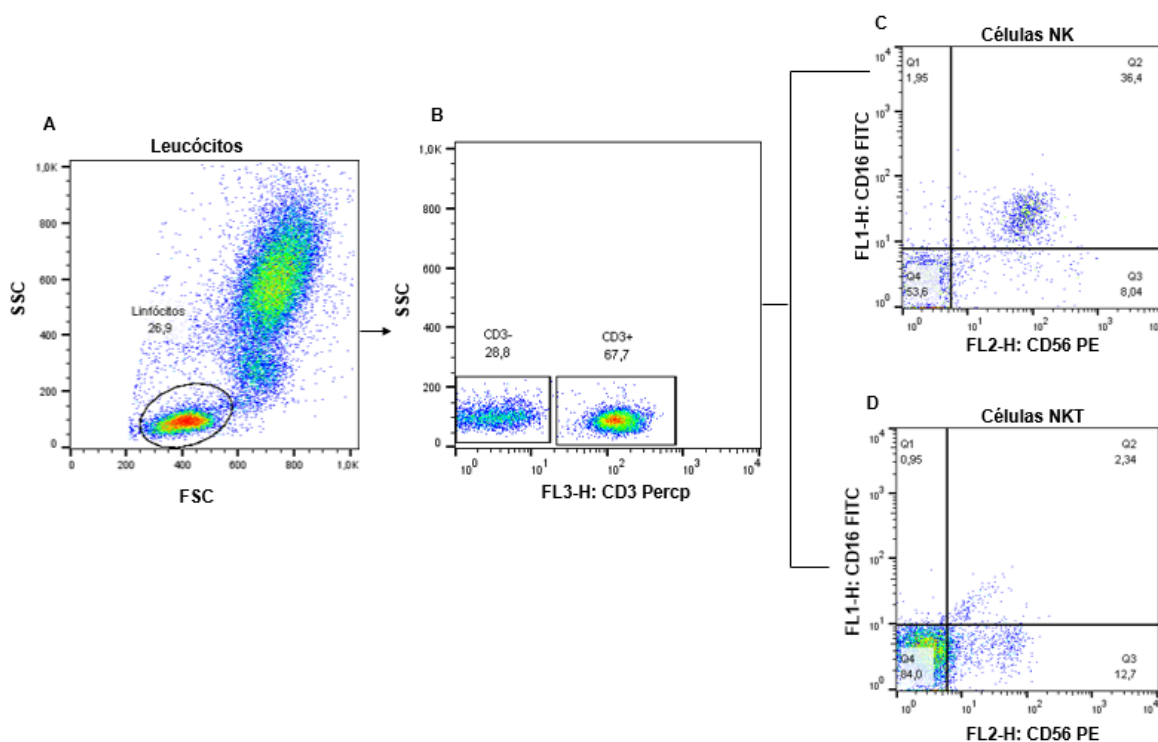


Figura 18: Identificação das Células NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$) e NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$) no programa *FlowJo* (v9.4).

5.6.4. Identificação dos Monócitos ($CD14^+$) e Monócitos Ativados ($CD14^+CD80^+$)

Para identificação de Monócitos e Monócitos Ativados foi realizado um gráfico de SSC x CD14 FITC (**Figura 19A**) e uma “gate” foi criada na região positiva para monócitos ($CD14^+$). Em seguida, foi feito um gráfico de CD16 FITC x CD14 APC (**Figura 19B**), selecionando a população ($CD14^+$) monócitos clássicos, ($CD14^+CD16^+HLADR^+$), que são conhecidas como monócitos inflamatórios ativados ou intermediários, ($CD14^{low}CD16^+HLADR^+$) são conhecidas como monócitos não clássicos ativados ou patrulhador.

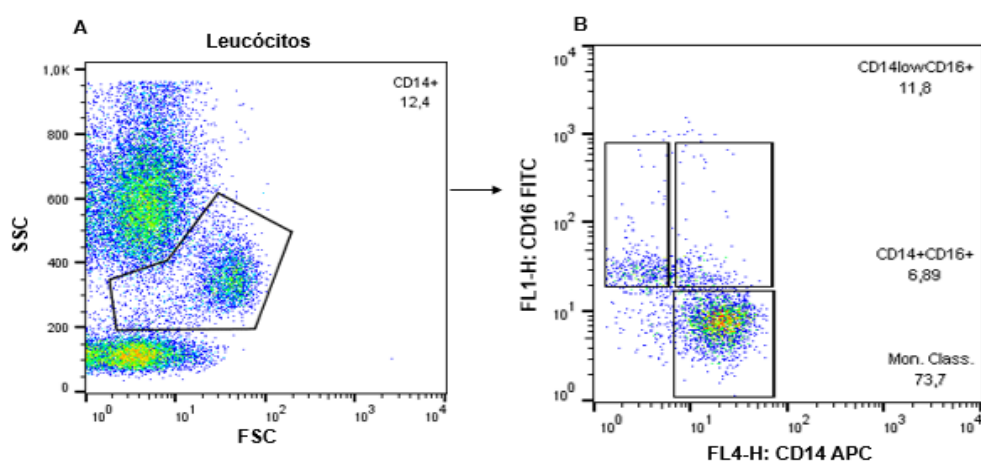


Figura 19: Identificação dos Monócitos (CD14⁺) clássicos e Monócitos Ativados (CD14⁺CD16⁺HLADR⁺), Monócitos não clássicos (CD14^{low}CD16⁺HLADR⁺), no programa *FlowJo* (v9.4).

5.6.5. Identificação das Células Dendríticas Mielóides (CD14⁻CD11c⁺CD123⁻) e Plasmocitóides (CD14⁻CD11c⁻CD123⁺)

Para identificação de Células Dendríticas Mielóides (mDCs) e Plasmocitóides (pDCs) foram realizadas primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 20A**) e uma “gate” foi criada na região das células mononucleadas. Após, foi elaborado um gráfico de SSC x CD14 APC (**Figura 20B**) e selecionando a população CD14⁻. Em seguida foi elaborado um gráfico CD11c PE x CD123 FITC (**Figura 20C**). Ao final foram selecionadas as populações CD14⁻CD11c⁺CD123⁻ (mDCs) e CD14⁻CD11c⁻CD123⁺ (pDCs).

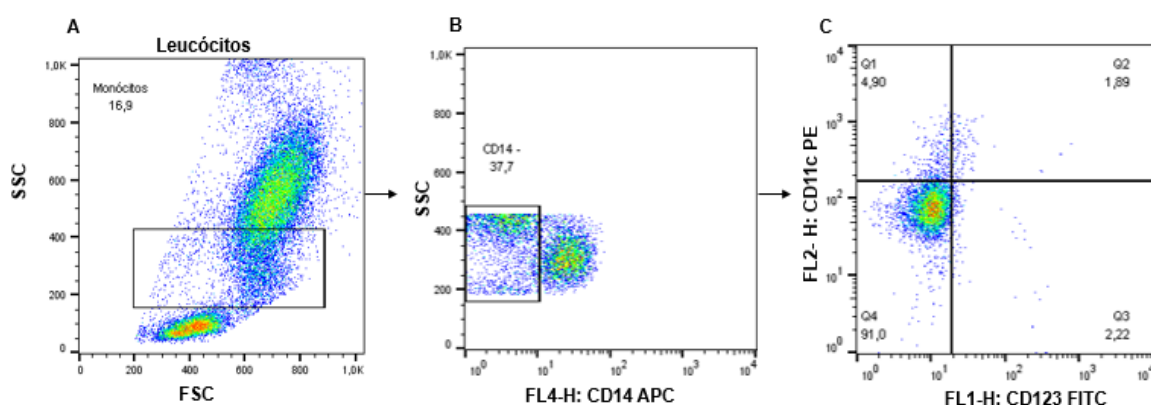


Figura 20: Identificação das Células Dendríticas Mielóides (CD14⁻CD11c⁺CD123⁻) e Plasmocitóides (CD14⁻CD11c⁻CD123⁺) no programa *FlowJo* (v9.4).

5.6.6. Identificação da Expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em Monócitos

Para a análise da expressão do Receptor do tipo Toll -2, 4 e 9 em monócitos foi feito um gráfico de SSC x CD14 FITC (**Figura 21A**) e uma “gate” foi feita na região positiva para monócitos (CD14+). Em seguida foi analisado a expressão por Intensidade Média de Fluorescência (MFI) do TLR2 (CD282+), TLR4 (CD284+), e TLR9 (CD289+), nessas células, com três gráficos distintos (**Figura 22 B, C, D**).

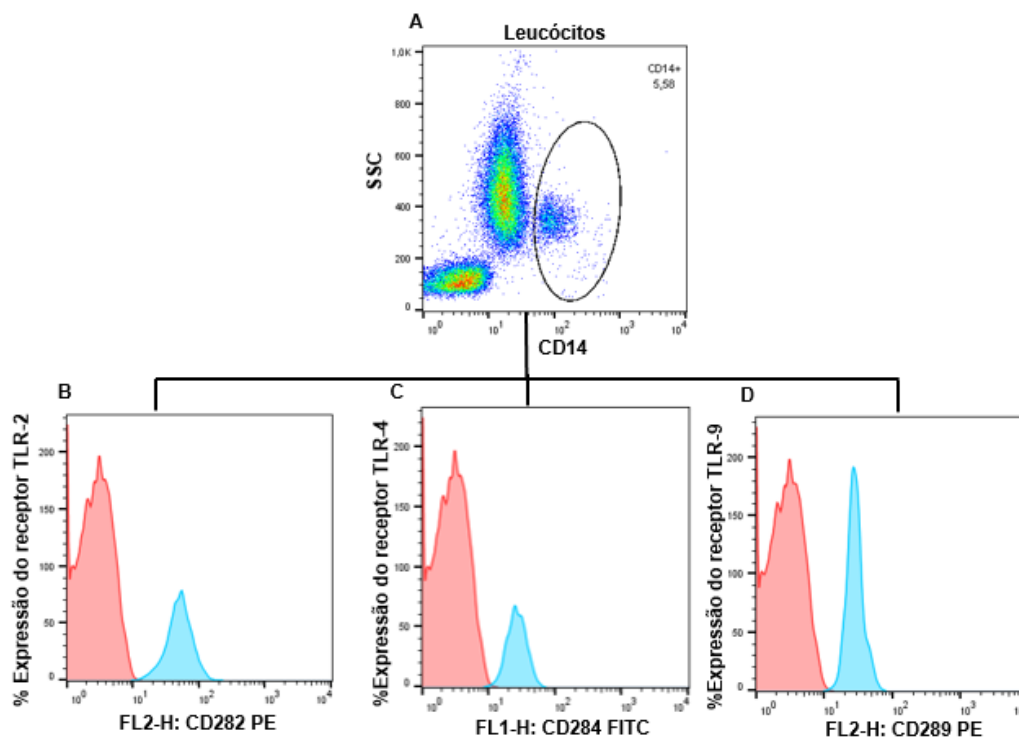


Figura 21: Identificação da Expressão dos receptores TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em Monócitos no programa *FlowJo* (v9.4).

5.7 Dosagem de Citocinas Plasmáticas por CBA (*CytometricBeadArray*)

A dosagem de citocinas e quimiocinas das amostras de plasma dos pacientes com hepatite Delta e do grupo controle foram realizadas por citometria de fluxo, utilizando o kit Th1, Th2 e Th17 *BD*, *Cytometric Bead Array* (CBA) com o Kit *BD™ Human Th1/Th2/Th17 Cytokine* (*BD®Biosciences, San Diego, CA, USA*), de acordo com as especificações descritas pelo fabricante. Foram quantificadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL17A e quimiocinas MCP-1(CCL-2), IL-8(CXCL-8), Rantes(CCL-5), IP-10 (CXCL-10) e MIG (CXCL-9).

O Kit *BD™ CBA* utiliza uma série de partículas (microesferas ou *beads*) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada *bead* de captura está conjugada a um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra é realizada através do fluorocromo ficoeritrina (PE) conjugado a anticorpos que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a *bead*. Os complexos formados de *bead* de captura + citocina da amostra + anticorpo de detecção são quantificados através da citometria de fluxo. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o citômetro de fluxo BD FACS Canto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) do HEMOAM.

Para o cálculo das concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina foi utilizado o software *FCAP-Array™ (v3.0.1)*.

5.8 Análises Estatísticas

Os dados foram tabulados no excel (versão Microsoft Excel 2013). As análises estatísticas dos dados da imunofenotipagem dos leucócitos e os níveis séricos das citocinas e quimiocinas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA)*. Todos os dados foram considerados apresentando uma distribuição não paramétrica, e, portanto, as análises comparativas entre os grupos foram realizadas por meio da análise de variância ANOVA seguido pelo teste de *Kruskal-Wallis*. A significância estatística foi definida em ambos os casos em $p < 0,05$.

6.RESULTADOS

Foram coletadas 77 amostras de sangue periférico de pacientes diagnosticados com hepatite Delta, atendidos na Fundação de Medicina Tropical - Dr. Heitor Vieira Dourado. Foram coletadas 50 amostras de candidatos a doadores de sangue atendidos na Fundação HEMOAM, enquadrados como grupo controle.

6.1 Dados Demográficos e Características Clínicas

O grupo de pacientes com hepatite Delta apresentou média idade (tratados $46,00 \pm 10,43$ e não tratados $45,75 \pm 13,00$) maior que os indivíduos do grupo controle ($32,42 \pm 11,75$), respectivamente. Do total de indivíduos inclusos na pesquisa observou-se maior prevalência do sexo masculino, entre o grupo de pacientes HBV/HDV e indivíduos controles (41/36) quando comparados com pacientes o sexo feminino (36/14), respectivamente (**Tabela 02**).

Dentro do grupo de pacientes estudados, 64 (87,1%) indivíduos estavam em tratamento e 13 (16,88%) não haviam iniciado tratamento no período da coleta. Dentre os pacientes tratados, do total de indivíduos incluso no estudo 29 (37,66%) apresentaram complicações hepáticas, como hipertensão portal (**Tabela 02**).

Dos 64 pacientes que foram submetidos a terapias com análogos de nucleosídeos e interferon, 58 pacientes foram submetidos ao tratamento com entecavir, 2 pacientes com tenofovir, 2 pacientes com lamivudina, e 2 pacientes com interferon. Portanto, para as análises das variáveis estudadas, os grupos foram classificados como controle negativo (CN), em tratamento (T) e não tratados (NT) (**Tabela 02**).

Em relação as análises hematológicas observamos uma diminuição significativa no número de hemácias (RBC) ($p < 0,0002$), hemoglobina (HBC) ($p < 0,0053$), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) ($p < 0,0015$), hematócrito (HCT) ($p < 0,0397$), no grupo de pacientes em tratamento em relação ao grupo controle e grupo de pacientes não tratados. Em relação a amplitude dos glóbulos vermelhos (RDW), observamos um aumento significativo ($p < 0,0001$) no grupo de pacientes em tratamento quando comparados ao controle, e grupo de

pacientes não tratados ($p < 0,0333$) quando comparados ao grupo de pacientes em tratamento. Quanto ao volume corpuscular médio (VCM) observou-se uma diminuição significativa no grupo de pacientes não tratados ($p < 0,0029$) quando comparado ao grupo controle e ao grupo de pacientes em tratamento (**Tabela 02**).

Quanto a contagem dos leucócitos totais (WBC) foi observada uma diminuição significativa no grupo em tratamento ($p < 0.0001$) em relação ao controle e um aumento significativo no grupo dos pacientes não tratados ($p < 0,0012$), em relação ao grupo em tratamento (**Tabela 02**).

Em relação às plaquetas (PLT) observou-se uma diminuição significativa no grupo em tratamento ($p < 0.0001$) em relação ao grupo controle, e um aumento no grupo de pacientes não tratados ($p < 0.0016$), quando comparado com o grupo em tratamento. O volume médio plaquetário (VPM) não apresentou diferença significativa ($p < 0,1687$) entre os grupos (**Tabela 02**).

Quanto ao percentual de reatividade dos marcadores sorológicos para HBV/HDV nos grupos tratados (T) e não tratados (NT) pode-se observar que todos os pacientes com hepatite Delta apresentam reatividade para o marcador HBsAg, anti-Hbc e anti-HDV, cerca de 92% apresentam reatividade para o marcador Anti-Hbe, e apenas 7% apresentaram reativos para o marcador HbeAg (**Tabela 02**).

Tabela 2: Dados demográficos e características clínico-epidemiológicas dos pacientes coinfetados com os vírus HBV/HDV e grupo controle.

Características Clínicas e Epidemiológicas	Grupo controle (N=50)	Paciente HBV/HDV+ (N=77)		p valor
		Tratados (N=64)	N. Tratados (N=13)	
Idade (M ±DP)	32,42±11,75	46,00±10,43 45,75±13,00		< 0.0001
Gênero (masculino/ feminino)	(36/14)	(41/36)		-
Hipertensão Portal	-	29 (37,66%)	-	
Tratamento				
Entecavir	-	58 (90,6%)	-	
Tenofovir	-	2 (3,1%)	-	
Lamivudina	-	2(3,1%)	-	
IFN +NUS	-	2(3,1%)	-	
Dados Hematológicos (Média ±DP)				
	CN	T	NT	
RBC (unid. x 10 ⁶ /mm ³)	5,098±0,6238	4,929±1,971	5,893±3,090	<0,0002 ^a
Hematócrito (%)	44,52±5,630	42,93±13,18	48,29±20,05	<0,0397 ^a
Hemoglobina g/dL	15,07±1,825	14,72±6,359	17,06±9,231	<0,0053 ^a
VCM (fL)	87,43±4,433	87,95±15,34	78,46±21,75	<0,0029 ^a
HCM (pg)	29,61±1,624	29,81±3,532	29,70±4,011	0,0878
RDW (%)	13,54±0,7290	14,96±3,195	13,00±4,806	< 0.0001 ^a <0.0333 ^b
CHCM (g/dL)	34,00±1,746	32,58±1,865	33,09±2,399	<0,0015
WBC (unid. x 10 ⁶ /mm ³)	6,283±1,477	4,631±1,929	6,557±1,531	< 0.0001 ^a < 0.0012 ^b
VPM	7,892±0,8773	10,33±9,706	13,15±14,42	0,1687
Plaquetas (Unid.x10 ⁶ /mm ³) (M ±DP)	246,6±53,56	88,68±58,03	167,9±85,19	< 0.0001 ^a < 0.0016 ^b
Marcadores Sorológicos				
		T	NT	
HBsAg	-	64 (100%)	13 (100%)	
HBeAg	-	5 (7,8%)	1 (7,7%)	
Anti-HBe	-	59 (92,2%)	12 (92,3%)	
Anti-HBc	-	64 (100%)	13 (100%)	
Anti-HDV	-	64 (100%)	13 (100%)	

a= comparação do grupo controle (CN) com grupo de paciente em tratamento (T); b= comparação entre os grupo de paciente não tratado (NT) com grupo em tratamento (T). Realização da análise foi feita por teste não paramétrico *Kruskal-Wal*.

6.2 Perfil de Resposta Imune Celular e Citocinas nos pacientes com Hepatite Delta.

A resposta imune celular foi analisada na população de pacientes com hepatite Delta e grupo controle. Foi avaliado a expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em monócitos, NK e NKT, células dendríticas, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos Treg, linfócitos B, B1.

6.2.1 Monócitos

Inicialmente foram analisadas as subpopulações de monócitos, sendo monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), monócitos ativados (CD14⁺HLADR⁺), monócitos inflamatórios ativados (CD14⁺CD16⁺HLADR⁺) e monócitos não clássicos ativados (CD14^{low}CD16⁺HLADR⁺), entre os grupos não tratados (NT), em tratamento, e indivíduos controles (CN).

Observamos aumento significativo no percentual de monócitos ativados (CD14⁺HLADR⁺) e monócitos inflamatórios ativados (CD14⁺CD16⁺HLADR⁺) tanto no grupo de pacientes não tratados quanto no grupo de pacientes em tratamento quando comparados com indivíduos controles ($p < 0.0001$) (**Figura 22.B e C**). Também foi observado uma diminuição na população de monócitos não clássicos (CD14^{low}CD16⁺HLADR⁺) no grupo de pacientes em tratamento quando comparados ao grupo controle ($p < 0.0001$) (**Figura 22.D**). Enquanto que os monócitos clássicos (CD14⁺), não observamos diferenças significativas ($p < 0,8939$) entre os não tratados e em tratamento, quando comparados ao grupo controle (**Figura 22.A**).

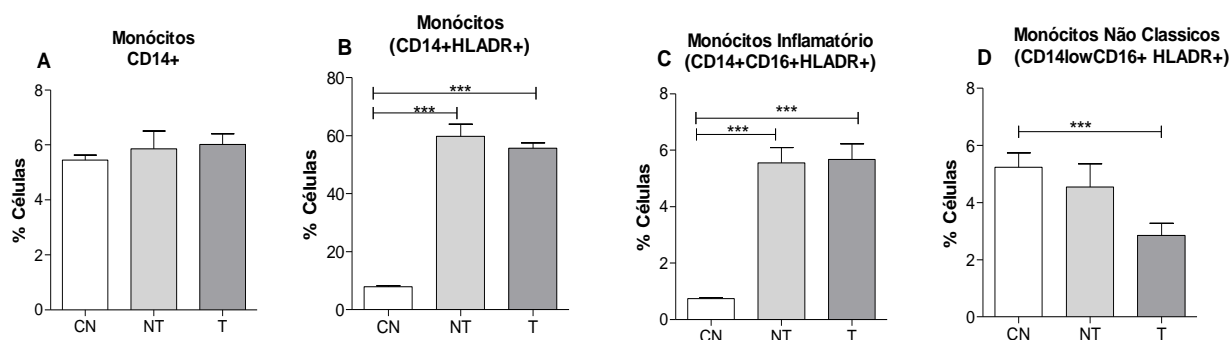


Figura 22: Frequência (valores absoluto), de subpopulações de monócitos em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (A, B, C, D,) Pacientes foram categorizados como não tratados (NT) e tratados (T), e comparados aos não infectados controles negativo (CN). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de monócitos (CD14+), ativação celular (HLADR+), monócitos inflamatórios (CD14+CD16+HLADR+), e monócitos não clássicos (CD14^{low}CD16+HLADR+). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wal*.

6.2.2 Expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em Monócitos

Foram realizadas as análises da expressão dos receptores TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em monócitos. Ao analisarmos a expressão do receptor TLR-2 e TLR-9 observamos aumento significativo da expressão desses receptores nos grupos dos pacientes não tratados e em tratamento em relação ao controle ($p < 0.0001$) (**Figura 23. A, C**). Além disso, pode-se observar uma diminuição significativa na expressão de TLR-4 no grupo dos pacientes em tratamento, quando comparados aos indivíduos do grupo controle ($p < 0,0065$) (**Figura 23.B**).

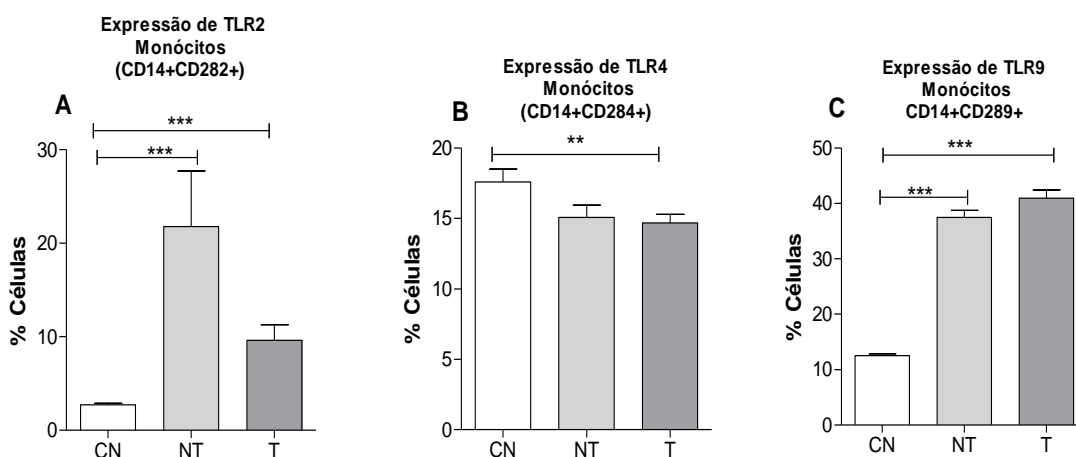


Figura 23: Expressão do receptor Toll-Like-2, Toll-Like-4 e Toll-Like-9 em monócitos dos pacientes HBV/HDV e controles negativos. (A, B, C.) Pacientes foram categorizados como não tratados (NT) e tratados (T), e comparados aos não infectados controles negativos (CN). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a expressão do receptor TLR-2 (CD14+CD282+), TLR-4 (CD14+CD284+) e TLR-9 (CD14+CD289+). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

6.2.3 Células NK e NKT

A analisarmos as células NK e NKT, que são responsáveis por induzir morte de células infectadas por vírus, observamos que não houve diferenças significativas no percentual de células NK, entre o grupo de pacientes não tratados e em tratamento quando comparados com os indivíduos controle negativo ($p < 0,5190$) (**Figura 24.A**). Enquanto as células NKT apresentaram uma diminuição significativa, entre o grupo não tratados e em tratamento, quando comparadas com os indivíduos controles ($p < 0,0001$) (**Figura 24.B**).

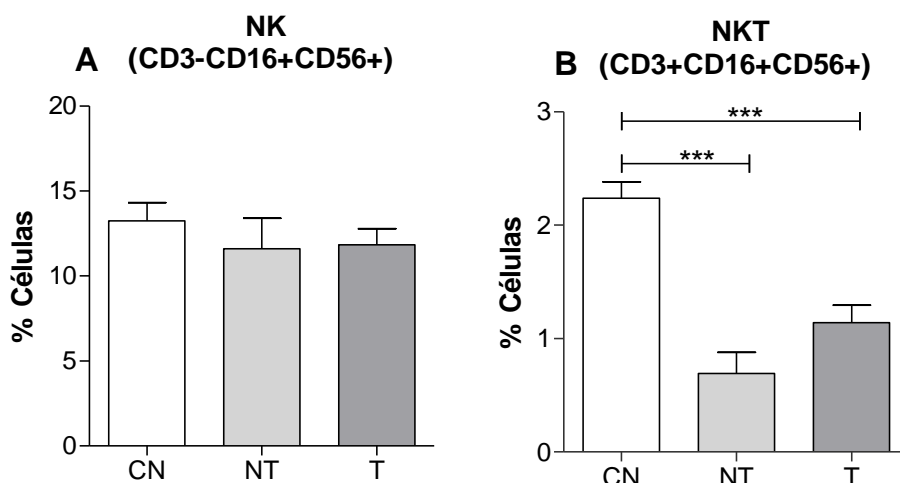


Figura 24: Frequência (valores absoluto), de população de células NK e NKT em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (A, B,) Pacientes foram categorizados como não tratados (NT) e tratados (T), e comparados aos não infectados controles negativo (CN). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem células NK (CD3-CD16+CD56+) e células NKT (CD3+CD16+CD56+). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

6.2.4 Células Dendríticas mielóide (mDC) e plasmocitóides (pDC)

Como demonstrado na Fig. 25.B, na análise das classes de células dendríticas mielóides, que são responsáveis inteiramente por reconhecer e apresentar os antígenos aos linfócitos, observou-se aumento significativo das células dendríticas mielóides no grupo de pacientes não tratados e em tratamento quando comparado ao grupo controle ($p < 0.0001$) (**Figura 25.A**). Em relação as células plasmocitóides podemos observar uma diminuição significativa no grupo em tratamento, quando comparado os grupos não tratados e controles negativos ($p < 0,0158$) (**Figura 25.B**).

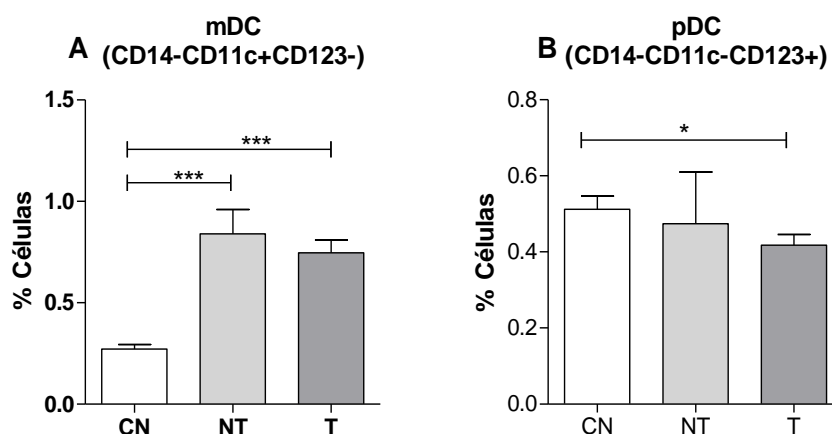


Figura 25: Frequência (valores absoluto), de população de células mDC e pDC em pacientes HBV/HDV e controles negativos. **(A, B,)** Pacientes foram categorizados como não tratados **(NT)** e tratados **(T)**, e comparados aos não infectados controles negativo **(CN)**. Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de mDC (CD14-CD11c+CD123-) e pDC monócitos (CD14-CD11c-CD123+). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

6.2.5 Linfócitos T

Para melhor compreensão do perfil de resposta imune nos pacientes com hepatite Delta, além de células e receptores presentes na imunidade inata, avaliamos também os linfócitos T, que são células da resposta imune adaptativa.

Foram analisados os linfócitos T CD3+ totais sendo observado uma diminuição significativa no percentual destas células em indivíduos tratados, em relação ao grupo controle ($p < 0.0002$). Por outro lado, observamos um aumento significativo desta célula no grupo de pacientes não tratados em relação ao grupo de paciente sem tratamento ($p < 0,0114$) (**Figura 26.A**). Ao analisarmos o percentual de linfócitos T CD4+ totais e linfócitos T CD4+ ativados, foi observado um aumento significativo no percentual dessas células em pacientes em tratamento e, pacientes não tratados, quando comparados com o grupo controle ($p < 0.0001$ / $p < 0.0001$). (**Figura 26 B, C**).

Em relação aos linfócitos T CD8+ totais, observou-se aumento significativo no grupo de pacientes não tratados e em tratamento em comparação com o grupo controle negativo ($p < 0.0001$) (**Figura 26.D**). Em relação aos L T CD8+ ativados,

observou-se aumento significativo apenas em indivíduos em tratamento quando comparados com o grupo controle ($p < 0,0063$) (**Figura 26.E**).

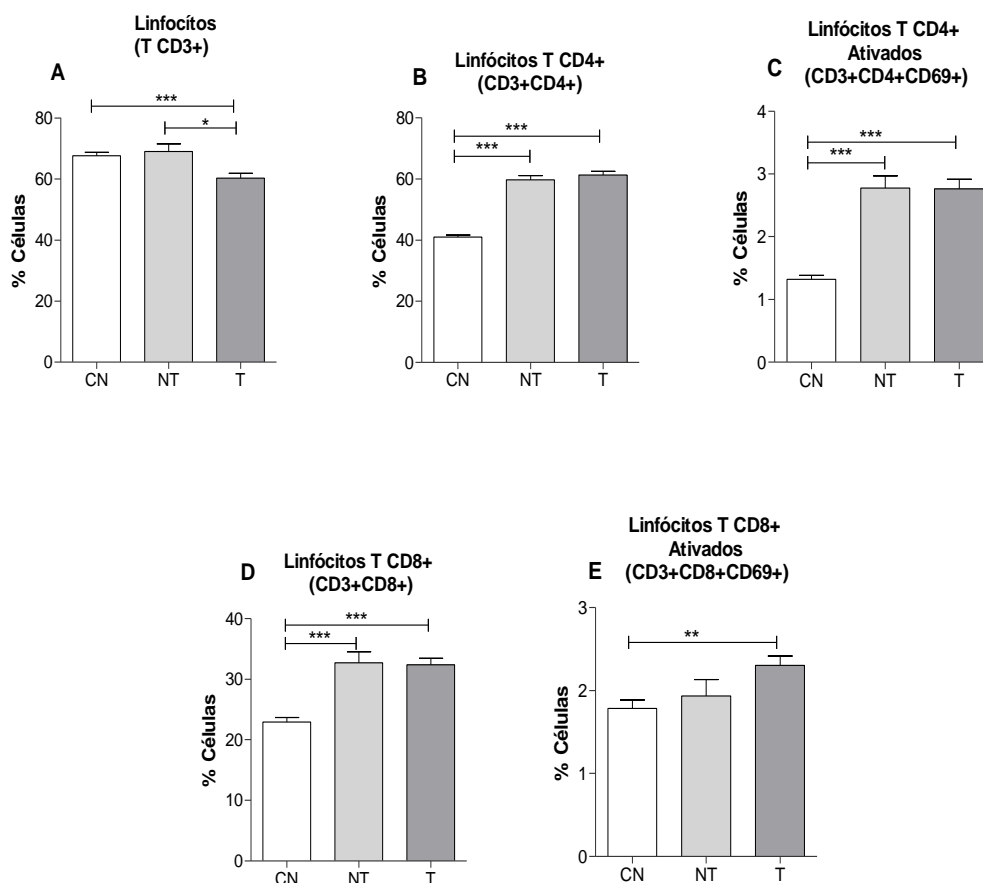


Figura 26: Frequência (valores absoluto), de população de Linfócitos T CD3+ CD4+ CD8+ em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (**A, B, C, D, E**) Pacientes foram categorizados como não tratados (**NT**) e tratados (**T**), e comparados aos não infectados controles negativo (**CN**). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos T CD3+ (CD3+), linfócitos T CD4+ ativados (CD3+CD4+CD69+), e linfócitos T CD8+ ativados (CD3+CD8+ CD69). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

6.2.6 Linfócitos Treg, B e B1

A análise Treg, responsáveis pela supressão/regulação da resposta imune demonstrou aumento significativo desta células, no grupo de pacientes não tratados

($p < 0.0002$) e em tratamento ($p < 0.0001$), em relação ao grupo controle (**Figura 27.A**).

Quanto ao percentual de LB, observamos que não houve diferenças significativas ($p < 0,0612$) entre os grupos estudados ($p < 0,0612$) (**Figura 27.B**). Por outro lado, ao analisarmos os linfócitos B1 foi possível observar um aumento significativo dessas células no grupo em tratamento ($p < 0,0047$), em relação ao grupo controle (**Figura 27.C**).

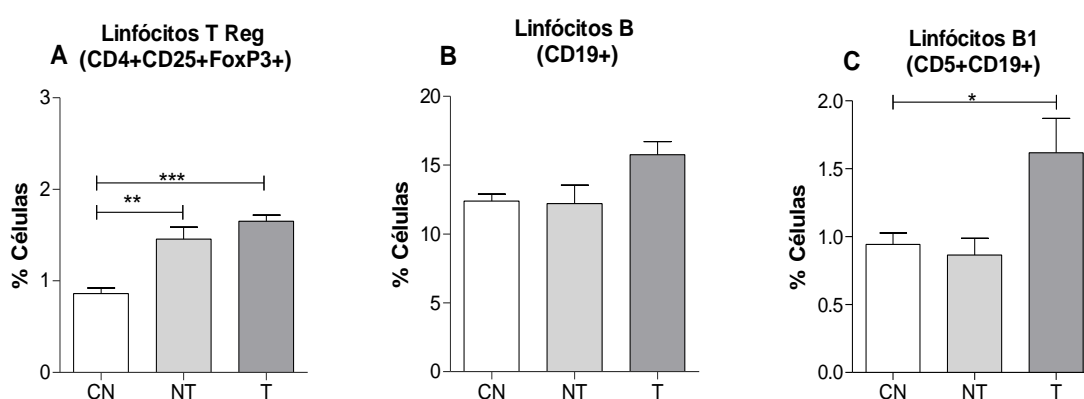


Figura 27: Frequência (valores absoluto), de população de frequência dos linfócitos T reguladores (Treg), B, B1 em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (**A, B, C,**) Pacientes foram categorizados como não tratados (**NT**) e tratados (**T**), e comparados aos não infectados controles negativo (**CN**). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos Treg (CD4+CD25+FoxP3+), linfócitos B (CD19+), linfócitos B1 (CD5+CD19+). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

6.3 Concentração das citocinas séricas em pacientes com hepatite Delta.

O perfil de citocinas dos pacientes com hepatite Delta, foi traçado com a análise das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, TNF- α e IFN- γ descritas por intensidade média florescente (MFI).

6.3.1. Citocinas pró-inflamatórias Perfil Th1

As concentrações da citocina IL-2 mostraram-se aumentadas com diferenças significativas ($p < 0,0074$) no grupo dos tratados, quando comparadas ao grupo não

tratado e controle negativo (**Figura 28.A**). Na análise da citocina TNF- α observamos um aumento significativo ($p < 0,0018$) no grupo tratados e não tratados, quando comparados ao controle (**Figura 28.B**). Em relação as concentrações de IFN- γ não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados ($p < 0,0421/ p < 0,0321$) (**Figura 28.C**).

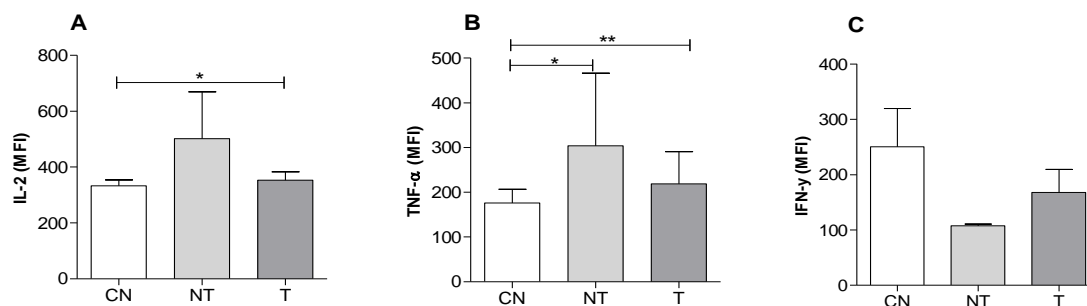


Figura 28: As concentrações séricas das citocinas do perfil TH1 em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (**A, B, C**) Pacientes foram categorizados como não tratados (**NT**) e tratados (**T**), e comparados aos não infectados controles negativo (**CN**). Os testes *Cytometric beads array* (CBA) foram usados para quantificar as concentrações de IL-2, TNF- α , e IFN- γ . Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

6.3.2. Citocinas séricas do perfil Th2, Th17 e Treg

A concentração de IL-10 mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,0025$) no grupo dos pacientes não tratados, e aumento significativo ($p < 0,0163$) no grupo em tratamento, em relação ao grupo controle (**Figura 29.B**). Também foi observado aumento significativo de IL-6, entre o grupo em tratamento quando comparado ao controle negativo ($p < 0,0040$) (**Figura 29.C**).

Em relação as concentrações séricas de citocina IL-17A observou-se diminuição significativa no grupo de pacientes em tratamento ($p < 0,0001$) e pacientes não tratados ($p < 0,0013$) em relação ao grupo controle (**Figura 29.D**). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações séricas de IL-4 entre os grupos comparados ($p < 0,1888$) (**Figura 29.A**).

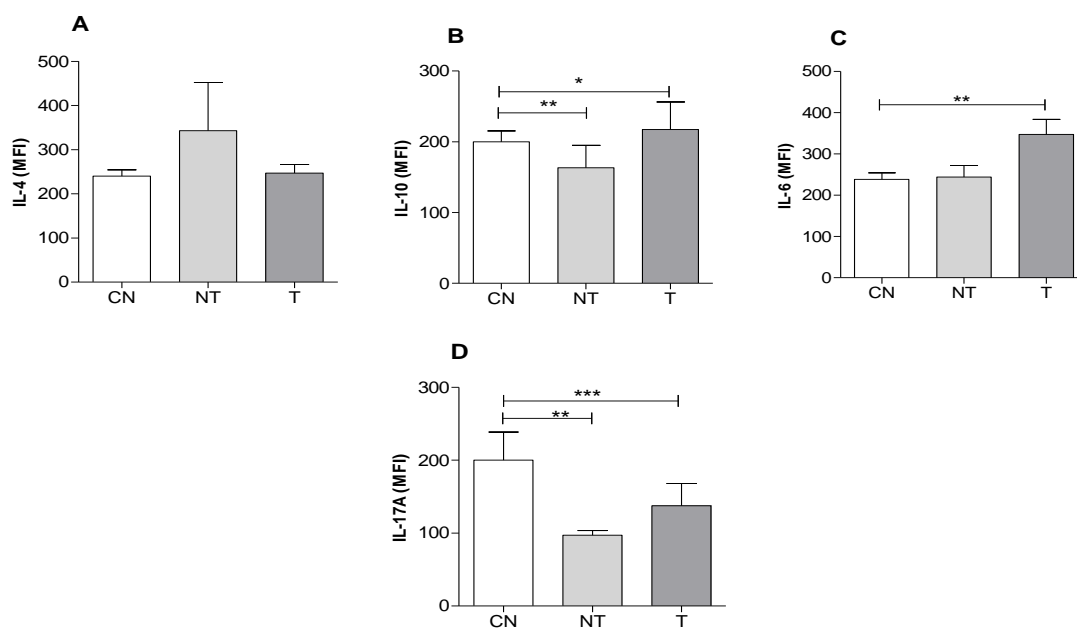


Figura 29: As concentrações séricas das citocinas do perfil TH2/TH17 em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (A, B, C, D) Pacientes foram categorizados como não tratados (NT) e tratados (T), e comparados aos não infectados controles negativo (CN). Os testes *Cytometric beads array* (CBA) foram usados para quantificar as concentrações de IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A. Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

6.4 Concentração das quimiocinas séricas de pacientes com hepatite Delta.

O perfil de quimiocinas dos pacientes com hepatite Delta, foi traçado com a análise das quimiocinas CCL-2 (MCP-1), CCL-5 (RANTES), CXCL-8 (IL-8), CXCL-9 (MIG), CXCL-10 (IP-10) descritas por intensidade média fluorescência (MFI).

Em relação as quimionas CCL-2 (MCP-1), CXCL-8 (IL-8), CXCL-9 (MIG) e CXCL-10 (IP-10) observamos aumento significativo no grupo de pacientes não tratados ($p < 0,0001$) e em tratamento ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo controle (Figura 30. A, B, D e E).

Não observamos diferenças significativas na MIF de CCL-5 entre os grupos analisados, em relação ao controle ($p < 0,5001$) (Figura 30.C).

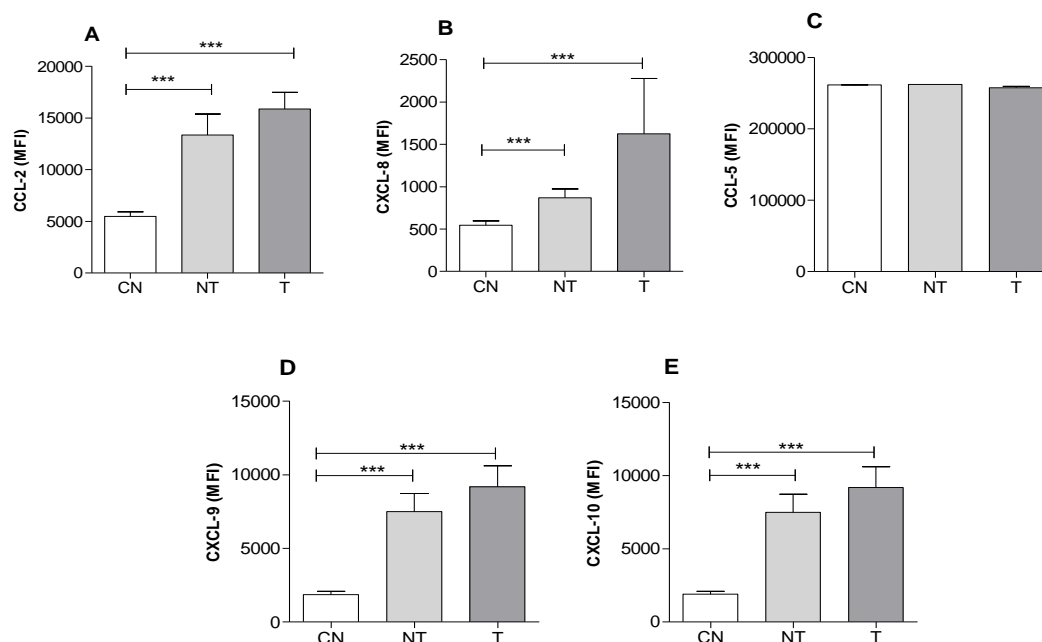


Figura 30: As concentrações séricas das quimiocinas do perfil CCL-2 (IP-10), CXCL-8 (IL-8), CCL-5 (RANTES), CXCL-9 (MIG), CXCL-10 (MCP-1) em pacientes HBV/HDV e controles negativos. (A, B, C, D, E) Pacientes foram categorizados como não tratados (NT) e tratados (T), e comparados aos não infectados controles negativo (CN). Os testes *Cytometric beads array* (CBA) foram usados para quantificar as concentrações de CCL-2 (IP-10), CCL-5 (RANTES), CXCL-8 (IL-8), CXCL-9 (MIG), CXCL-10 (MCP-1). Os resultados são expressos em gráficos de coluna, destacando a porcentagem média das populações, é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

7. DISCUSSÃO

A Hepatite Delta é uma doença inflamatória grave, com processo patogênico diferenciado, que está relacionado aos fatores biológicos dos vírus e hospedeiro. As respostas de células T são fracas ou indetectáveis em pacientes com hepatite B crônica, que acredita-se ser a causa dominante da replicação persistente do HBV/HDV, induzindo o acometimento de fibrose e carcinoma hepatocelular SUKOAWATI *et al.*, 2016.

Dada a importância da interação vírus e sistema imunológico, é de extrema importância o uso de terapias antivirais específicas, como um fator crucial para obter melhores estratégias terapêuticas, clínicas e patológicas dos indivíduos. Por isso, vários fatores do hospedeiro que envolve uma resposta imune inata e adaptativa

foram propostos para avaliar a influência da terapia na resposta imunológica dos indivíduos.

Nesse trabalho avaliamos as alterações clínicas e imunológicas causadas pela interação dos vírus HBV/HDV em pacientes diagnosticados com doença hepática crônica avançada compensada em tratamento com análogos de nucleosídeos e interferon preconizados pelo Ministério da Saúde.

Em nosso estudo observou-se maior prevalência da hepatite Delta em indivíduos do gênero masculino, entre o grupo de pacientes e controles respectivamente, quando comparados ao sexo feminino. A análise das faixas etárias na população de pacientes com hepatite Delta foi maior em indivíduos maiores de 40 anos, acompanhando a faixa etária de indivíduos positivos para hepatite B em nossa região (COUTO *et al.*, 2017; VICTORIA *et al.*, 2008). Contudo, em um estudo da região Amazônica realizado por Oliveira *et al.*, (2015) observaram que a faixa etária de indivíduos diagnosticados com hepatite Delta foi entre 12 e 31 anos, sugerindo que a infecção pode acontecer precocemente e pode estar relacionado a transmissão intrafamiliar como justificativa para a presença de casos em idade precoce.

As infecções virais induz o acometimento de cirrose hepática, e conseqüentemente a destruição dos hepatócitos, propiciando a formação de cicatrizes que resultam na formação nódulos de regeneração e aumento do fluxo portal (MARTINELLI, 2004).

Neste estudo observou-se que 37,66% da população estudada apresentou hipertensão portal, é a alteração mais frequente associada á cirrose, que é caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo nas veias portais que levam o sangue dos órgãos abdominais para o fígado, induzindo complicações como aumento do baço, surtos hemorrágicos a partir de varizes esôfágicas, sempre acompanhada de plaquetopenia e leucopenia (MARTINELLI, 2004; IWAKIRI, 2014).

Segundo dados relatados por Demir *et al.*, (2014) vários fatores podem estar associados com a progressão da fibrose, como contagem baixas de plaquetas, idade avançada e gênero masculino, indicando que esses parâmetros estão relacionados ao acometimento e desenvolvimento da fibrose hepática durante a infecção crônica.

Em nosso estudo foi observada diminuição no número de hemácias (RBC), hemoglobina, hematócrito (HCT), e plaquetas no grupo de pacientes tratados. Segundo Adinofi *et al.*,(2001) e Oliveira *et al.*, (2015), em seus estudos houve maior prevalência de trombocitopenia e leucopenia, em pacientes com hepatite B.

As drogas aprovadas para o tratamento da hepatite B e D podem levar a resposta virológica sustentada (perda do DNA-HBV e soroconversão de HBeAg/anti-Hbe) em até um terço dos casos tratados (FERREIRA & BORGES,2007). A população estudada apresenta reatividade para os marcadores, HBsAg, anti-HDV e anti-Hbc comprovando a infecção de ambos os vírus. Em nosso estudo foi observado que 92,2% de pacientes em tratamento fez a soroconversão para anti-Hbe, embora apenas 7,8% apresentaram-se reagentes para HBeAg nos primeiros anos de tratamento. Somente um paciente apresentou reatividade para HbeAg após cinco anos de tratamento.

Dados obtidos por OLIVEIRA *et al.*, (2015), também demonstraram maior prevalência do marcador anti-Hbe (76%) na sua população em relação ao marcador HBeAg (18%), e ainda observaram índices de plaquetas e leucócitos baixos, em pacientes tratados.

O processo de evolução da infecção pelos HBV/HDV varia muito de pessoa para pessoa. Alguns indivíduos controlam a infecção eficientemente e eliminam o vírus com ou sem uma inflamação hepática clinicamente evidente. Outros pacientes não conseguem eliminar o vírus e desenvolve infecção crônica, o que muitas vezes leva ao desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (GAMEM & PRINCE.,2004; BERTOLETI A & GEHRING., 2006).

Existem varios fatores que podem influenciar nos desfecho clínico da doença. A ativação contínua dos monocitos pode explicar a persistência da infecção crônica e inflamação hepática. O mecanismo da inflamação crônica envolve o recrutamento de vários tipos de células da imunidade inata, incluindo monócitos, macrófagos e células NK (KARLMARK *et al.*,2008). Na infecção pelo HBV os monócitos pró-inflamatórios CD14⁺CD16⁺, não- clássicos de fenótipo CD14^{low}CD16⁺, são capazes de induzem aumento de secreção de citocinas pró-inflamatórias e capacidade de promover a fibrose na infecção (HEITBROCK *et al.*,2007).

Em relação ao percentual de monócitos no presente estudo, foi observado aumento de monócitos inflamatórios ativados no grupo de pacientes com hepatite não tratados e em tratamento, enquanto os monócitos não clássicos apresentaram-se diminuídos somente no grupo em tratamento quando comparados com o grupo controle.

Dados encontrados Zang *et al.*, (2011), avaliaram o aumento de monócitos no sangue periférico, e macrófagos derivados do fígado em pacientes com hepatite B crônica. Estes autores observaram aumento de CD14⁺CD16⁺HLADR⁺, CD14⁺CD16⁻, e uma baixa expressão dos monócitos CD14^{low}CD16⁺, sugerindo uma função essencial no controle da doença hepática, produzindo citocinas pirogênicas como TNF- α , IL-6, e IL-12, induzindo um microambiente inflamatório e danos no fígado em pacientes com CHB.

Ainda, dados da literatura descrevem a importância dos receptores TLRs, no reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (ZOU *et al.*, 2016). Zang *et al.*, (2010) demonstraram uma alta expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 em monócitos, e evidenciaram que TLR-2 e TLR-4, modulam ativação de células T regulatórias, em pacientes com infecção crônica. Estes resultados sugerem que ativação de células Treg, contribua para uma imunotolerância na infecção causada pelo vírus HBV.

Nosso dados evidenciaram a expressão de TLR-2 aumentadas nos grupos de pacientes com hepatite Delta, não tratados e em tratamento quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, observamos diminuição da expressão de TLR-4 no grupo de pacientes não tratados e em tratamento, quando comparados ao grupo controle. Podendo estar associado a uma não ativação desse receptor pelo vírus nos pacientes tratados.

Um estudo realizado por Chen *et al.*, (2008), verificaram desregulação na expressão de TLR-2 e TLR-4 pela proteína HBsAg, tendo capacidade de induzir a diminuição de sua expressão, impossibilitando a indução de citocinas por células mononucleares do sangue periférico em paciente crônicos não tratados. Wu *et al.*, (2009), evidenciaram uma diminuição na expressão do TLR-4, sugerindo que as proteínas dos vírus da hepatite B podem suprimir a atividade antiviral induzida pelo

receptor nas células do fígado. Contudo, essa diminuição na expressão de TLR-4 se mantém durante o tratamento aqui analisados, o que pode indicar uma desregulação decorrente do processo crônico já instalado.

No presente estudo verificamos aumento na expressão de TLR-9 relevante entre o grupo de pacientes com hepatite Delta, não tratados e em tratamento. sugerindo uma restituição de resposta eficiente em pacientes tratados.

Dados obtidos por Xu *et al.*, (2008) evidenciaram o aumento de TLR-9 na hepatite B crônica relacionando com a inibição do HBV. Huang *et al.*, (2014) por outro lado, verificaram uma inibição da expressão dos receptores TLR-9 em monócitos de pacientes crônicos infectados por HBV, porém esses pacientes foram submetidos a monoterapias com interferon peguilado e entecavir por 24 -72 semanas, avaliando pré e pos tratamento, e observaram após o tratamento uma restauração eficiente na expressão positiva desse receptor no decorrer do tratamento.

Células NK tem um papel efetor envolvida nas respostas imunes inatas nas infecções virais. Exercem atividade antiviral através de efeito citotóxico direto ou através da produção de citocinas imunorreguladoras (IFN- γ).As células NK e NKT são importantes para a depuração viral e indução de lesão hepática em pacientes com hepatite B encontrados numa fase aguda da doença(SEAMAN, 2000).

Li *et al.*, (2011) observaram o aumento das células NK e NKT na resposta imunológica precoce para eliminação viral.Todavia, nossos dados demostram que não houve diferença significativa entre os grupos analisados na população de células NK. Porém ainda observamos uma diminuição na população de células NKT nos grupos analisados quando comparado ao controle, uma vez que o vírus pode inibir a ação dessas células na infecção crônica.

Os dados obtidos por Tjwa *et al.*, (2011), descreveram uma não ativação da expressão de células NK em pacientes infectados pelo HBV, mostrando que pacientes numa fase crônica da doença tem uma capacidade prejudicada de se tornarem ativadas. Dados obtidos por Sun *et al.*, 2015 atribuíram ao desequilíbrio dos receptores, e disfunção das células NK, as proteínas virais do HBV.

Por outro lado, Zheng *et al.*, (2015) demonstraram em pacientes com lesão intra-hepática, imunossuprimidos, relacionados a infecção crônica pelo vírus HBV, uma expressão aumentada de células NK, contribuindo com atividade citolítica acelerando a lesão hepática nesses pacientes. Micco *et al.*, (2013) demonstram que o tratamento com interferon peguilado alfa por 18 meses, melhora significativamente a expressão de células NK em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B. Zhao *et al.*, (2013) evidenciaram uma recuperação de células NK, conseqüentemente uma diminuição da carga viral, induzido por tratamento com entecavir durante 24 semanas, o que não foi observado neste estudo nos pacientes em tratamento.

ZHU *et al.*,(2015), observaram uma diminuição de células iNKT invariáveis (iNKT), em 250 pacientes com hepatite B crônicas, associando essa diminuição ao processo inflamatório nesta fase, e ainda submeteram 13 pacientes ao tratamento com tenofovir, porém, ao final do tratamento não foi possível observar uma reativação dessas células, relacionando a gravidade da doença. Para os pacientes com hepatite Delta em tratamento parece haver uma restauração destas células nestes indivíduos, ainda que um aumento discreto desta população quando comparados com o grupo não tratado.

Paralelamente, estudamos as células dendríticas que são células especializadas na captura e apresentação de antígenos para os linfócitos T, são atraídas e ativadas por elementos da resposta inata, e viabilizam a sensibilização de linfócitos Th1 da resposta imune adaptativa

Nossos resultados revelam que as porcentagens das DCs mielodes (mDCs) apresentaram-se aumentadas no grupo de pacientes com hepatite Delta quando comparado ao grupo controle, mostrando a regulação positivas dessas células na infecção crônica, e em tratamento. Porém observamos a porcentagem de células dendríticas plasmocitóides em pacientes com hepatite Delta, entre os grupos analisados e comparado ao controle, observamos uma diminuição dessas células no grupo de paciente em tratamento.

Segundo Tavakoli *et al.*, (2008) o aumento de mDC no sangue de pacientes com infecção por HBV, sugere que as células estão fenotipicamente intactas na infecção, esses dados corroboram com os achados no presente estudo. Contudo, a

proteína HBsAg mostra ser capaz de prejudicar a função dessas células, impossibilitando a transcrição do gene IFN- α induzida por receptores do tipo TLR- 7 e 9 em células dendríticas plasmocitóides (pDC), induzindo progressão da doença, visto que as pDCs, são os principais componentes da resposta imune antiviral, devido à sua capacidade de secretar IFN tipo I (XIE *et al.*, 2009; WOLTMAN *et al.*, 2011; MARTINET *et al.*, 2012).

Estudos obtidos por Lu *et al.*, (2008) demonstraram que pacientes submetidos a 8 dias de terapia com entecavir em cultura celular, resultou de uma regulação positivamente na função de células mDC aumentando a expressão de MHC II e das moléculas coestimulatórias CD1a, CD80, e CD83, e HLADR, para aumentar a resposta imune aos linfócitos T, fortalecendo assim a resposta imunológica antiviral.

Em nosso estudo foi possível observar uma diminuição significativa no percentual de células T CD3⁺ totais em pacientes com hepatite Delta, durante o tratamento, e por outro lado, um aumento no percentual de células T CD3⁺ no grupo não tratado e controle. No percentual de células T CD4⁺ e CD8⁺ totais e CD4⁺ ativados observamos um aumento significativo na expressão dessas células nos grupos não tratados e em tratamento comparados ao controle. Porém, observamos um aumento significativo na ativação da expressão de linfócitos TCD8⁺ no grupo de indivíduos em tratamento quando comparados com o grupo controle.

Zhang *et al.*, (2011) evidenciaram aumento de células linfócitos CD4⁺ em pacientes com hepatite crônica, e associaram esse aumento a liberação de citocinas IL-6, contribuindo com lesão hepática. Segundo Barboza *et al.*, (2009) ao avaliar os receptores de ativação como CD69⁺, em células CD4⁺ em pacientes cronicamente infectados, e indivíduos controles, porém após estimulação com a proteína HbcAg viral, foi possível demonstrar que as células CD4⁺ não aumentou os níveis de CD69 durante a estimulação, portanto sugerem que um ambiente inibitório predominante pode ser responsável por um mecanismo patogênico para a persistência viral.

Um estudo realizado por Cao *et al.*, 2011 evidenciaram um declínio de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes com infecção crônica pelo HBV. Porém 13 pacientes foram submetidos ao tratamento com adefovir dipivoxil, durante 72 semana, as proporções de células T CD8⁺ sofreu um aumento médio de 218 células / μ L ao final

do tratamento de 72 semanas. Evidenciando que as células T CD8⁺ anormalmente ativadas na infecção crônica pelo HBV podem ser parcialmente revertidas pela terapia antiviral.

Em contraste, a infecção crônica por HBV é caracterizada por respostas de células T CD8⁺ específicas para HBV fracas ou indetectáveis e pela presença de células T CD8⁺ específicas para HBV, exauridas funcionalmente e incapazes de remover o vírus. Tem sido demonstrado que múltiplos mecanismos podem contribuir para a disfunção de células T específicas para o HBV na infecção crônica, como alta carga viral persistente e altos níveis de antígeno, expressão sustentada de múltiplas moléculas inibitórias incluindo PD-1, TIM-3, CTLA-4 e sinais imunossupressores excessivos encontrados no microambiente hepático (SCHURICH *et al.*, 2011).

You *et al.*, (2008) avaliaram o tratamento com entecavir por 48 semanas em pacientes crônicos para hepatite B, a indução da supressão da carga viral, que consequentemente resulta numa restauração parcial e melhoria da resposta imunitária celular comprometida. A restauração estava claramente associada à diminuição da carga viral sérica, indicando uma estreita correlação entre a carga viral e as subpopulações de linfócitos T, CD3⁺CD4⁺ e CD8⁺.

Segundo JIANG *et al.*, (2011) submeteram pacientes com hepatite B crônica ao tratamento com monoterapia com adefovir dipivoxil e entecavir por 12-48 semanas, para avaliar o potencial nível terapêutico na resposta imunológica defeituosa nesses pacientes. Foram submetidos 29 pacientes tratados com entecavir e 28 tratados com adefovir, após o tratamento observaram aumento na expressão de células TCD3⁺CD4⁺ e CD8⁺, inibição da carga viral, comparando que ambas as terapias efetivamente levaram à eliminação viral, o que corrobora em parte com nossos resultados. Precisamos levar em consideração que os pacientes estudados estão em tratamento contínuo, o que pode influenciar na restauração destas células.

As células Treg desenvolvem propriedades imuno-moduladoras/imunossupressoras em resposta a infecção crônica por HBV. Os dados avaliados são reforçados por estudos que mostram mudanças na população de células T reguladoras (Tregs) em pacientes cronicamente infectados pelo HBV mantendo a

tolerância imunológica contra antígenos próprios e estranhos, devido à sua capacidade de produzir IL-10 e TGF- β (SHE *et al.*, 2015).

As células Treg inibem o dano patológico excessivo inibindo a ativação das células T CD8⁺ específicas para o HBV, o que pode ajudar na infecção viral persistente. Além de inibir células T CD4⁺/CD8⁺ *in vivo*, as células Treg também inibem a ativação de células específicas, prevenindo uma resposta inflamatória excessiva. Mostramos aqui que o aumento da prevalência de CD4⁺ CD25⁺ Tregs no sangue periférico está associado com a replicação do HBV e gravidade da doença em pacientes HBV (PENG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2012).

Em nossos dados verificamos um aumento significativo no percentual de células T regulatórias, em pacientes com hepatite Delta, tanto no grupo não tratado e em tratamento comparados ao controle. Segundo dados da literatura as células Tregs acredita-se que o aumento de T regulatórias sejam responsáveis pela cronicidade da infecção pelo vírus da hepatite B, provavelmente pela inibição das respostas de células T específicas para o HBV. Porém descreveram que a função das T reguladoras também pode ser benéfica, limitando danos hepáticos imunomediados em pacientes cronicamente infectados (KONDO & SHIMOSEGAWA., 2015).

Segundo JIANG *et al.*, (2011) submeteram pacientes com hepatite B crônica ao tratamento com monoterapia com adefovir dipivoxil e entecavir por 12-48 semanas, após o tratamento foi observada uma diminuição no número de células T regulatórias em ambos os grupos, sugerindo que o efeito antiviral das drogas pode ser atribuído não apenas ao seu efeito direto na supressão do vírus, mas também às suas capacidades imunorreguladoras.

A resposta imune humoral é baseada em anticorpos protetores anti-envelope. Por um lado, os anticorpos são complexos com partículas livres, removendo-os da circulação e, por outro lado, impedem a ligação do HBV aos hepatócitos, desempenhando assim um papel crítico na depuração viral. Fatores virais e do hospedeiro podem retardar ou inibir a neutralização mediada por anticorpos do HBV (JEULIN *et al.*, 2013).

Segundo Xu *et al.*, (2015) a frequência de células B apresentaram-se diminuídas em pacientes com infecção crônica ocasionada pelo HBV, relacionando a uma exaustão no papel dessas células nesta fase. Por outro lado FARCI *et al.*, (2010) evidenciou um resultado inverso, com um aumento de anticorpo contra o antígeno do vírus, na insuficiência hepática aguda. Wang *et al.*, (2014) observaram aumento de células B, Treg, e produção de IL-10, em pacientes com hepatite B crônica e hepatite C crônica, associaram esse aumento à fraca erradicação do vírus e à lesão hepática nesses pacientes. Além disso, os níveis séricos de IL-10 estão associados às crises hepáticas.

A infecção pelo vírus HBV induz o acometimento da progressão para o carcinoma hepatocelular, em todo o mundo. As lesões afetadas pela infecção são predominantemente imunomediadas pelas citocinas, que desempenham um papel significativo na modulação de quase todas as fases da resposta imune do hospedeiro (SAXENA & KAUR, 2015).

As citocinas são moléculas protéicas, produzidas principalmente por células imunes/não-imunes. São potentes moléculas imuno-modulatórias e os principais protetores contra a infecção viral, analisando o padrão de resposta do hospedeiro ou inibindo a replicação viral (CHEN *et al.*, 2005).

No presente estudo observamos um aumento da concentração de IL-2 e TNF- α no grupo de pacientes com hepatite Delta. Contudo, não foi possível observamos diferenças significativas nas concentrações de IL-4 e IFN- γ nos grupos analisados, podendo estar associado ao mecanismo de desregulação dos efeitos antivirais desta citocina, induzido por mecanismo de escape viral na infecção.

Na infecção crônica o papel de polarização celular e imunomodulação são atribuídos a IL-2, e IFN- γ , segundo dados obtidos. Dados obtidos por Nicolette *et al.*, (2016), ao relataram que pacientes tratados com interferon peguilado por 24 semanas, e evidenciaram o aumento da concentração da citocina IL-2, sugerindo que o aumento de IL-2 está associado a uma resposta eficiente, com uma indução de polarização celular em paciente que completaram o tratamento, visto que IL-2 estimula o crescimento e a proliferação de linfócitos T, dados esses que corroboram com os encontrados neste estudo. Contudo, a grande maioria dos pacientes aqui avaliados,

utiliza a terapia com entecavir e isso pode contribuir para a divergência dos nossos resultados.

Na hepatite B crônica a IL-6, e TNF- α são contribuintes ativos com respostas inflamatórias no processo de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (HE & KARIN., 2011). O aumento IL-6 na hepatite B crônica induz a regulação da expressão de gene através de fatores transcrição como NF-kB, conduzindo ativação do processo inflamatório, e inibindo a replicação do HBV nos hepatócitos (HOSEL *et al.*, 2009). Por outro lado, ZHANG *et al.*, (2011) verificaram o aumento de IL-6 na infecção crônica, relacionando esse aumento a lesão hepática. Nossos resultados demonstram um aumento da IL-6 durante o tratamento dos pacientes com hepatite Delta, quando comparado aos demais grupos. Isto pode indicar que o tratamento contínuo para essa patologia não descarta a inflamação persistente ainda que a infecção esteja controlada ou eliminada.

Ainda, na hepatite crônica tem se observado aumento de TNF- α , induzindo inibição de partículas virais do HBV (GUIDOTTI *et al.*, 1994; PURO *et al.*, 2007). Segundo JIANG *et al.*, (2011) evidenciaram o aumento de TNF- α por 48 semanas em pacientes crônicos tratados com adefovir e entecavir monoterapias, associando ao aumento da lesão hepática, esses resultados corroboram com a expressão aumentada de TNF- α , encontrado no presente estudo.

Ao analisamos a concentrações de IL-17 mostrou-se diminuída entre os grupos em tratamento e não tratados, comparados ao controle. Dados publicados na literatura evidenciaram que as concentrações IL-17 aumentada na hepatite B crônica e na indução da progressão da fibrose hepática. Isso sugere que a IL-17 pode não apenas induzir a inflamação, mas também pode contribuir para a progressão da doença e cronicidade em pacientes com infecção crônica (DU *et al.*, 2013).

Segundo dados obtidos por Hao *et al.*, (2013); ZENG *et al.*, (2012), verificaram uma diminuição acentuada de citocina IL-17, após tratamento com telbivudina por 48-52 semanas, sugerindo que essa citocina induz respostas excessivas e inespecíficas envolvidas na patogênese da inflamação hepática crônica e do dano hepatocelular associados ao HBV. A resposta Th17, especialmente, pode exacerbar os processos inflamatórios que levam à insuficiência hepática, porém sugeriram que o tratamento

pode diminuir o dano hepático na infecção. Segundo Zang *et al.*, (2010), verificou que pacientes com infecção crônica apresentavam uma diminuição de IL-17 após 12 meses de tratamento com entecavir, dados similares aos encontrados no presente estudo. Ainda no presente estudo, observamos uma diminuição na expressão de IL-10 no grupo não tratado, e um aumento no grupo em tratamento. Na hepatite B crônica a expressão de IL-10 está associada imunotolerância/imunomodulação suprimindo a resposta específica de células T, ou induzindo uma imunomodulação da lesão induzida (SHEN *et al* 2015; KONDO *et al.*, 2015). YANG *et al.*, (2012) avaliou aumento de IL-10 em pacientes com insuficiência hepática induzida pelo HBV, relacionando a gravidade da lesão hepática.

Segundo Zeng *et al.*, (2012) submeteram pacientes com infecção crônica ao tratamento por 52 semanas com telbivudina estruturalmente relacionada a lamivudina, observaram uma diminuição na expressão de IL-10, sugerindo não haver complicações de lesão hepáticas envolvidas.

As quimiocinas são proteínas secretadas que funcionam principalmente na ativação e migração de leucócitos. A IL-8 é predominantemente um fator ativador e quimiotático para leucócitos neutrofílos polimorfonucleares circulantes. Os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) são os leucócitos mais abundantes no organismo e desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro por fagocitar microorganismos invasores (MOLLINEDO *et al.*, 1999).

Nossos resultados demonstram que pacientes crônico com hepatite Delta e em tratamento apresentam um aumento de CCL-2, CXCL-8, CXCL-9 e CXCL-10. Sheron & Williams., (1992), observaram expressão aumentada desta quimiocina em pacientes com hepatite B crônica, a produção dela estar associada ao papel indutor da inflamação na progressão da infecção. Segundo Maher *et al.*, (1997) verificaram a migração de PMNs para o fígado de camundongos infectados por vírus estando associada à exacerbação da doença hepática. O tratamento com IFN- α em pacientes com hepatite B crônica, esta associado a um aumento de IL-8, e inibição do HBV em células de hepatócito humano (HAGA *et al.*,2017).

Segundo Zhou *et al.*, (2010) relataram que IP-10, exerce efeito quimioatrativo de células inflamatória e dano celular durante a infecção pelo vírus, neste estudo

observaram o aumento de IP-10 em pacientes crônicos, mostrou que a proteína HBx estimula a ativação da expressão de IP-10, e conseqüentemente ativa fator de transcrição NF-Kb e aumenta a migração de leucócitos na infecção. Segundo Zhao *et al.*, (2017) o aumento na expressão de IP-10 promoveu diretamente a apoptose de hepatócitos. Com base nesses achados, o aumento de IP-10 podem prever a gravidade da doença e a diminuição dos níveis de HBsAg após a terapia com entecavir.

Estudo descrito na literatura segundo Shin *et al.*, (2002) observaram padrão de expressão aumentadas de quimiocinas quimioatraente de monócitos MCP-1, e IL-8, e uma fraca expressão de Rantes e IP-10 em células de hepatoma associou como fortes indutores na progressão da lesão hepática.

Segundo Tan *et al.*, (2010) observaram o aumento de CXCL-9 e CXCL-10, por sua vez medeiam mecanismos patogênicos distintos de lesão hepática em pacientes HBV agudos e crônicos.

A infecção pelo vírus da hepatite Delta induz uma interação com sistema imune inato e adaptativo, desenvolvendo uma indução de lesão hepática grave devido a permanência dos vírus por anos. O tratamento baseado na eliminação do HBV não garante eliminação completa necessitando que o tratamento seja por tempo infinito. O que também não elimina a possibilidade do desenvolvimento da forma mais grave da doença o que abre prerrogativas para avaliação da resposta imune destes pacientes.

8. CONCLUSÃO

A infecção pelos vírus HBV/HDV apresenta várias fases de padrões de replicação, o que possibilita padrões mais grave da doença. O processo crônico é resultado de uma resposta imune deficiente ou exacerbada, impossibilitando elucidar a infecção, podendo progredir para cirrose e carcinoma hepatocelular, causado pela replicação de ambos os vírus. Portanto, restaurar a imunidade funcional é uma abordagem imunoterapêutica promissora no tratamento da infecção crônica. Porém, o papel de cada componente na resposta imune aos vírus ainda permanece pouco compreendido. Frente aos resultados do presente estudo, podemos concluir que:

- A expressão de TLR-2 e TLR-9 em monócitos apresentam-se aumentados enquanto a expressão de TLR-4 apresentam-se diminuídos em pacientes com hepatite Delta;
- Os monócitos inflamatórios encontram-se aumentados em pacientes com hepatite Delta;
- As células NKT apresentaram-se diminuídas em pacientes com hepatite Delta porém, com níveis maiores do que os pacientes não tratados;
- O aumento no percentual de mDC, linfócitos TCD4+, CD8+ e Treg sugerem perfil de resposta eficiente nos pacientes com hepatite Delta estando em tratamento ou não;
- Os linfócitos B1 apresentaram aumento gradativo, indicando modulação da resposta imune e memória celular;
- O perfil de citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 com presença de IL-10 regulando o processo inflamatório persistente. A IL-6 pode estar agindo também como citocina reguladora pois sua ação pode estar relacionada com a diminuição de IL-17 em pacientes em tratamento;
- O perfil de quimiocinas CCL-2 (MCP-1), CXCL-8 (IL-8), CXCL-9 (MIG), CXCL-10 (IP-10) apresenta-se aumentado durante o tratamento, indicando maior migração de leucócitos para o tecido e contribuindo para uma resposta fagocítica inflamatória e eliminação viral.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Z. Life cycle and pathogenesis of hepatitis d virus: a review. **World journal of hepatology**, v. 5, n. 12, p. 666. 2013.

ADINOLFI L E, *et al.* Hepatic fibrosis plays a central role in the pathogenesis of thrombocytopenia in patients with chronic viral hepatitis. **British Journal of haematology**, v, 2, n 113, p 590595. 2001.

ALFAIATE, D. *et al.* Hepatitis delta virus from biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. **Antiviral research**, v. 122, p. 112–129. 2015.

ALVARADO,MM. *et al.* Dynamics of hepatitis d (delta) virus genotype 3 in the amazon region of south america. **Infection, genetics and evolution**, ago,v. 11, n. 6, p. 1462–1468. 2011.

ARAÚJO, SILVA, N C. Acidentes perfurocortantes e medidas preventivas para hepatite b adotadas por profissionais de enfermagem nos serviços de urgência e emergência de teresina , piauí accidents with sharp instruments and hepatitis b among introdução metodologia. **Revista brasileira de saúde ocupacional**, v. 7657, n. 130, p. 175–183. 2014.

ASPINALL, E J. *et al.* Hepatitis b prevention, diagnosis, treatment and care: a review. **Occupational medicine**, v. 61, n. 8, p. 531540.2014.

BRAGA W S. *et al.* Hepatitis D virus infection in the Western Brazilian Amazon - far from a vanishing disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 45, p 691-695, 2012.

BALMASOVA, I P. *et al.* Immunopathogenesis of chronic hepatitis b. **World journal of gastroenterology**,v. 20, n. 39, p. 14156.2014.

BARBOZA L. *et al.* Altered T cell costimulation during chronic hepatitis B infection. **Cellular Immunology**, v. 257, n 61, p 68. 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Material instrucional para capacitação em vigilância epidemiológica das hepatites virais / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de treinamento para teste rápido hepatites b (hbsag) e c (anti-hcv)**, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento da hepatite viral crônica b e coinfeções**, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais**, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções, Conitec, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico das hepatites virais-SINAN. Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV), 2017.

BRASIL L M. *et al.* Prevalence of hepatitis B virus markers within household contacts in the State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 36, p 565-570.2003.

BECK, J; NASSAL, M. Hepatitis b virus replication. **World journal of gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 48–64.2007.

BERTOLETTI, A. *et al.* The immune response during hepatitis b virus infection. **Journal of general virology**, v. 87, n. 6, p. 1439–1449.2006.

BOEHME, K W; COMPTON, T. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. **Journal of virology**, v. 78, n. 15, p. 7867–7873.2004.

BORRESEN, M L. *et al.* Hepatitis d outbreak among children in a hepatitis b hyper-endemic settlement in greenland. **Journal of viral hepatitis**, mar, v. 17, n. 3, p. 162–170.2010.

BROUW ML, *et al.* Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B vírus, *Immunology*, v 126, p 280–289. 2008.

BRANCH, A D. *et al.* An ultraviolet-sensitive rna structural element in a viroid-like domain of the hepatitis delta virus. **Science**, v. 243, p. 649–652.1989.

BERTOLETTI A; GEHRING AJ, *et al.* The immune response during hepatitis B vírus infection, **Journal of General Virology**, v 87, p 1439 1449.2006.

BONI C, *et al.* Lamivudine Treatment Can Restore T Cell Responsiveness in Chronic Hepatitis B, **The American Society for Clinical Investigation**, v 102, p 968–975. 1998.

BUSCA, A; KUMAR A. Innate immune responses in hepatitis b virus (hbv) infection. **Virology journal**, p. 18. 2014.

BLUNBERG B S. *et al.* A "New" Antigen in Leukemia Sera. **Clinical Science**, v191. 1965.

CAMPOS, M. *et al.* Clinical manifestations of hepatitis b : its association with serum. **Revista de ciências médicas e biológicas**, v. 12, p. 501–505.2013.

CASEY J L. Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. **Curr Top Microbiol Immunol**, v 35, p 123143. 2012.

CAO W, *et al.* Parallel decline of CD8+CD38+ lymphocytes and viremia in treated hepatitis B patients, **World J Gastroenterol**, v 17, p 2191-2198. 2011.

CHEN Z, *et al.* Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. **Clinical Immunology**, v 128, p 400–408. 2008.

CHENG, L. Restoring homeostasis of cd4 + t cells in hepatitis-b-virus-related liver fibrosis. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 38, p. 10721.2015.

CHEN C. *et al.* Association of cytokine and DNA repair gene polymorphisms with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. **International Journal of Epidemiology**, v 34, p 13101318. 2005.

CHEONG, J Y. *et al.* Polymorphisms are not associated with the outcome of hepatitis b virus infection : results from a large scale single ethnic population. **Medical sciences**, v. 22, n. 13, p. 529–35.2007.

CIANCIO, A; RIZZETTO, M. Chronic hepatitis d at a standstill: where do we go from here? **Nature reviews gastroenterology & hepatology**, 10 set, v. 11, n. 1, p. 6871.2013.

CONDE, S R S. *et al.* Cytokine association of cytokine gene polymorphisms and serum concentrations with the outcome of chronic hepatitis b. **Cytokine**, v. 61, n. 3, p. 940–944.2013.

COOKSLEY H, *et al.* Hepatitis B Virus e Antigen Loss during Adefovir Dipivoxil Therapy Is Associated with Enhanced Virus Specific CD4 T Cell Reactivity, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v 52, p. 312–320. 2008.

CRISPIM, M A E. *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis b and hepatitis delta viruses circulating in the western amazon region, north brazil. **Bmc infectious diseases**, 21 dez, v. 14, n. 1, p. 94.2014.

CRUVINEL, W. *et al.* Sistema imunitário – parte i fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista brasileira reumatologia**, v. 55, n. 11, p. 434–61.2010.

COUTO I, *et al.* Prevalence and predictors for compensated Advanced Chronic Liver Disease (c-ACLD) in patients with chronic Hepatitis Delta Virus (HDV) infection. **Plos one**, v,12, n 3, p,0174453. 2017.

CZAJA, A J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 10, p. 2515.2014.

DANE D S. *et al.* Virus-like particles in serum of patients with Australiaantigen-associated hepatitis. **Lancet**, v 1, p 695-8. 1970.

DASTGERDI ; TACKE, F. *Virus*. v. 4, n. 2, p. 36–41.2015.

DEMIR N A, *et al.* Evaluation of the Relation Between Hepatic Fibrosis and Basic Laboratory Parameters in Patients With Chronic Hepatitis B Fibrosis and Basic Laboratory Parameters, **Hepatitis Monthly**, v,14, p 16975. 2014.

DU H J. Expression of Interleukin-17 associated with disease progression and liver fibrosis with hepatitis B virus infection: IL-17 in HBV infection. **Diagnostic Pathology**, v 8, p 40. 2013.

DIAS, A LB. *et al.* Molecular characterization of the hepatitis b virus in autochthonous and endogenous populations in the western brazilian amazon. **Revista brasileira de medicina tropical**, v. 45, n. 1, p. 9–12. 2012.

FARCI P. *et al.* B cell gene signature with massive intrahepatic production of antibodies to hepatitis B core antigen in hepatitis B virus–associated acute liver failure, **Medical Sciences**, v 107, p 1003854107. 2010.

FERREIRA, M S; BORGES, A S. Avanços no tratamento da hepatite pelo vírus. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 40, n. 4, p. 451–462.2007.

FERREIRA C; SILVEIRA T. Viral Hepatitis: epidemiological and preventive aspects. **Rev. Bras. Epidemiol**, v 4, p 473-87. 2004.

FERREIRA M S. Diagnosis and treatment of hepatitis B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 33, p 389-400. 2000.

FLODGREN, E. *et al.* Recent high incidence of fulminant hepatitis in samara , russia : molecular analysis of prevailing hepatitis b and d virus strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3311–3316.2000.

FONSECA, J C F. Hepatite d. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 35, n. 2, p. 181–190.2002.

GOUVEA, M S. *et al.* Hepatitis b virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (labrea black fever) in the western brazilian amazon region. **Journal of general virology**, v. 90, n. 11, p. 2638–2643.2009.

FUDUKA R. *et al.* The expression of IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN- γ) mRNA using liver biopsies at different phases of acute exacerbation of chronic hepatitis B. **Clin Exp Immunol**, v 100, p 446451.1995.

GAMEM D; PRINCE AM. Hepatitis B Virus Infection natural history and clinical consequences, **new england jornal of medicine**, v,35, p 1118-29. 2004.

GOMES, M S. *et al.* Hepatitis d and b virus genotypes in chronically infected patients from the eastern amazon basin. **Acta tropica**, v. 106, n. 3, p. 149–155.2008.

GRABOWSKI, J ; WEDEMEYER, H. Hepatitis delta: immunopathogenesis and clinical challenges. **Digestive diseases**,v. 28, n. 1, p. 133–138.2010.

GUIDOTTI L G. *et al.* Interleukin-2 and Alpha/Beta Interferon Down-Regulate Hepatitis B Virus Gene Expression In Vivo by Tumor Necrosis Factor-Dependent and -Independent Pathwayst. **Journal of virology**, v 68, p. 12651270. 1995.

HAO C. Kinetics of Th17 Cytokines during Telbivudine Therapy in Patients with Chronic Hepatitis B. **Viral Immunology**, v 26, p 336342. 2013.

HAGA Y. *et al.* Interferon induces interleukin 8 and bone marrow stromal cell antigen 2 expression, inhibiting the production of hepatitis B virus surfasse antigen from human hepatocytes. **Biochemical and Biophysical**, v 1, p 06. 2017.

HEITBROCK LZ. The CD14 CD16 blood monocytes: their role in infection and inflammation, **Journal of Leukocyte Biology**, v 81, p 0741-540. 2007.

HE G; KARIN M. *et al.* NF- κ B and STAT3 key players in liver inflammation and câncer. **Nature**, v 21, p 159168. 2011.

HOSEL M. *et al.* Not Interferon, but Interleukin-6 Controls Early Gene Expression in Hepatitis B Virus Infection. **Hepatology**, v 50, p 6. 2009.

HUANG YW, *et al.* Reduced toll like receptor 9 expression on peripheral CD14+ monocytes of chronic hepatitis B patients and its restoration by effective therapy. **International medical press**, v 19, p 637643. 2014.

IWAKIRI Y. Pathophysiology of Portal Hypertension. **Clin Liver Dis**, v 18, p 281291. 2014.

JEULIN, H. *et al.* Clinical impact of hepatitis b and c virus envelope glycoproteins. **World journal of gastroenterology**, v. 19, n. 5, p. 654.2013.

JI, J ; SUNDQUIST, K ; SUNDQUIST, J. A population-based study of hepatitis d virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma. **journal of the national cancer institute**,v. 104, n. 10, p. 790–792.2012.

JIANG, X. *et al.* Regulation of microrna by hepatitis b virus infection and their possible association with control of innate immunity. **World journal of gastroenterology**,v. 20, n. 23, p. 7197.2014.

JIANG Y, *et al.* Enhancing the antihepatitis B virus immune response by adefovir dipivoxil and entecavir therapies, **Cellular & Molecular Immunology**, v 8, p 75–82. 2011.

KIDD, K; MIYAKAWA, Y. Genetic variability in hepatitis b viruses. **Journal of general virology**,v. 83, p. 1267–1280.2002.

KIM J H. *et al.* Molecular diagnosis and treatment of drug-resistant hepatitis B virus. **World J Gastroenterol**, v 20, p 57085720. 2014.

LAMONTAGNE R J. *et al.* **Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis**, v2, p 163186. 2016.

LEE J H. *et al.* Prior Exposure to Lamivudine Increases Entecavir Resistance Risk in Chronic Hepatitis B Patients without Detectable Lamivudine Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v 58, p. 17301737. 2014.

LEMPP F; URBAN S. Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. *Nature*, v 13, 2016.

LI, H. *et al.* The role of immune cells in chronic hbv infection. **Journal of clinical and translational hepatology**, v. 3, n. 4, p. 277–283.2015.

LI, Y J. *et al.* Rna-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic rnas associate with different nuclear bodies. **Journal of virology**, v. 80, n. 13, p. 6478–6486.2006.

LI J, *et al.* Dynamic changes of cytotoxic T lymphocytes (CTLs), natural killer (NK) cells, and natural killer T (NKT) cells in patients with acute hepatitis B infection, **Virology Journal**, v 8, p 199. 2011.

LOK, A S; MCMAHON, B J. Chronic hepatitis b. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 507–539.2007.

LOPES, T G; SCHINONI, M. I. Aspectos gerais da hepatite b. **Revista de ciências médicas e biológicas**, v. 10, p. 337–344.2011.

LU GF, *et al.* Entecavir up-regulates dendritic cell function in patients with chronic hepatitis B, **World J Gastroenterol**, v14, p 1617-1621. 2008.

MARUYAMA T. *et al.* Serology of acute exacerbation in chronic hepatitis B vírus. **Gastroenterology**, v 105, p 1141-1151. 1993.

MARTINET J, *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Efficient Stimulation of Antiviral Immunity in the Context of Chronic Hepatitis B Virus Infection, **HEPATOLOGY**, v 001, p 000. 2012.

MARTINELLI A L. Portal Hypertension. **Medicina**, v 37, p 253261. 2004.

MAHER J. *et al.* Adenovirus-Mediated Expression of Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant in Rat Liver Induces a Neutrophilic Hepatitis, **Hepatology**, v 25, p 3. 1997.

MELLO, F C. *et al.* Hepatitis b virus genotypes circulating in brazil: molecular characterization of genotype f isolates. **BMC microbiology**,v. 7, n. 1, p. 103.2007.

MELLO F C. *et al.* Phylogeography and evolutionary history of hepatitis B virus genotype F in Brazil. **Virology Journal**, v 10, p 236. 2013.

MICCO L, *et al.* Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B, **Journal of Hepatology**, v 58, p 225–233. 2013.

MOLLINEDO F. *et al.* Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Trends Immunology Today**, v 20, p 537. 1999.

MULYANTO *et al.* A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis b virus in indonesia identification of two novel subgenotypes, b8 and c7. **Archives of virology**, v. 154, n. 7, p. 1047–1059.2009.

NASSAL M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. **Gut**, v 13, p 309809. 2015.

NAKANO, T. *et al.* Characterization of hepatitis d virus genotype III among yucpa indians in venezuela. **Journal of general virology**, v. 82, p. 2183–2189.2001.

NEGRO, F. Hepatitis d virus coinfection and superinfection. **Cold spring harb perspect med**, v. 4, p. 1–9.2014.

NICOLETE L D. *et al.* Correlation between T_H1 response standard cytokines as biomarkers in patients with the delta virus in the western Brazilian Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v 111, p 275276. 2016.

NGUYEN, V T. *et al.* Highly endemic hepatitis b infection in rural vietnam. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 22, p. 2093–2100.2007.

OLIVEIRA, M. S. De *et al.* Hepatite b crônica e a superinfecção por vírus d em pacientes na amazônia ocidental brasileira. **Revista de epidemiologia e controle de infecção**,v. 5, n. 2, p. 72–78.2015.

PENG, G. *et al.* Circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. **Immunology**, v.123, p 5765.2007.

POURKARIM, M R. *et al.* Molecular characterization of hepatitis b virus (hbv) strains circulating in the northern coast of the persian gulf and its comparison with worldwide distribution of hbv subgenotype d1. **Journal of medical virology**, v. 86, p. 745–757.2014.

POLSON A G. *et al.* Hepatitis Delta Virus RNA Editing Is Highly Specific for the Amber/W Site and Is Suppressed by Hepatitis Delta Antigen. **Molecular and Cellular Biology**, v 18, p 19191926. 1998.

PURO R; SCHNEIDER R J. Tumor Necrosis Factor Activates a Conserved Innate Antiviral Response to Hepatitis B Virus That Destabilizes Nucleocapsids and Reduces Nuclear viral DNA. **Journal of Virology**, v 81, p. 73517362. 2007.

RAMEZANI, A. *et al.* The influence of human leukocyte antigen and il-10 gene polymorphisms on hepatitis b virus outcome. **Hepatitis monthly**, v. 12, n. 5, p. 320–325.2012.

RIZZETTO M. Immunofluorescence detection of new antigenantibody system (S/anti-5) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. **Gut**, v 18, p 997-1003. 1977.

ROMEO, R. Hepatitis delta virus: making the point from virus isolation up to. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 22, p. 2389–2395.2015.

RONCATO, M.; BALLARDIN, P. A. Z.; LUNGE, V. R. Influência dos genótipos no tratamento da hepatite b. **Revista hcpa**, v. 28, p. 93–188.2008.

SCHMIDT F. *et al.* T-cell responses in hepatitis b and c virus infection: similarities and differences. **Emerging microbes & infections**, mar, v. 2, n. 3, p. 1–8.2013.

SILVA, A L. *et al.* Hepatites virais : b , c e d : atualização . **Revista brasileira clínica medica**, v. 10, n. 3, p. 206–18.2012.

SHIN E C. *et al.* Expression patterns of cytokines and chemokines genes in human hepatoma cells. **Medical journal**, v 43, p657. 2002.

SEAMAN WE. Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells. **Arthritis & Rheumatism**, v 43, p1204–1217. 2000.

SHERON N; WILLIAMS R. *et al.* IL-8 as a circulating cytokine: induction by recombinant tumour necrosis factor-alpha. **Clin. exp. Immunol**, v 89, p 100-103. 1992.

SHEN C. *et al.* Increased CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells correlate with poor short-term outcomes in hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure patients. **Journal of Microbiology, Immunology**, v 48, p 137e146. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, **Recomendações da SBH** para Diagnóstico e Tratamento das **Hepatites B e Delta**.2015.

SOUZA L F. *et al.* Hepatitis delta: virological and clinical aspects. **Virology Journal**, v 14, p 177. 2017.

SUNBUL M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. **World J Gastroenterol**, v 14; p 54275434. 2014.

SUREAU C; NEGRO F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. **Journal of Hepatology**, v 64, p S102S116. 2016.

STAUFFER, J K A. Chronic inflammation, immune escape and oncogenesis in the liver: a unique neighborhood for novel intersections. **Hepatology**,v. 56, n. 4, p. 1567–1574.2013.

SUGIURA, C E ; BERTOLINI, D A. Transmissibilidade do vírus da hepatite b (hbv) em uma família de origem japonesa do noroeste do paraná. **Revista saúde pesquisa**, v. 3, p. 273–278.2010.

SUKOWATI, C H. Significance of hepatitis virus infection in the oncogenic initiation of hepatocellular carcinoma. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 4, p. 1497.2016.

SUN C, *et al.* NK cell receptor imbalance and NK cell dysfunction in HBV infection and hepatocellular carcinoma, **Cellular & Molecular Immunology**, v,12, p 292–302. 2015.

TAN A T. *et al.* A longitudinal analysis of innate and adaptive immune profile during hepatic flares in chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v 52, p 330339. 2010.

TAKKENBERG, R B. *et al.* New developments in antiviral therapy for chronic hepatitis b. **Vox sanguinis**, v. 98, n. 4, p. 481–494.2010.

TAVAKOLI S, *et al.* Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection, **Clinical and Experimental Immunology**, **151**: 61–70.

TJWA ET, *et al.* Viral load reduction improves activation and function of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B, *Journal of Hepatology*, v 54, p 209–218. 2011.

THOMAS E. *et al.* Viral Hepatitis: Past and Future of HBV and HDV. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v 5, p 021345. 2015.

UHL P. *et al.* Current Status in the Therapy of Liver Diseases. **Int. J. Mol. Sci**, v 15, p 7500-7512. 2014.

VIANA, S. *et al.* High prevalence of hepatitis b virus and hepatitis d virus in the. **The american society of tropical medicine and hygiene high**, v. 73, n. 4, p. 808–814.2005.

VICTORIA, F S. *et al.* Characterization of HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B in Western Brazilian Amazonia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p.2737.2008.

ZHANG JY, *et al.* Hyper-Activated Pro-Inflammatory CD16⁺Monocytes Correlate with the Severity of Liver Injury and Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis B. **Plos one**, v 6, p 17484. 2011.

ZHANG YE, *et al.* Overexpression of Toll-like receptor 2/4 on monocytes modulates the activities of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in chronic hepatitis B virus infection. **Virology**, v 34, p 397. 2010.

ZANG J Y. Decreased Ratio of Treg Cells to Th17 Cells Correlates with HBV DNA Suppression in Chronic Hepatitis B Patients Undergoing Entecavir Treatment. **Plos one**, v 5, p 13869. 2010.

ZHANG, F. *et al.* Roles of circulating soluble interleukin (IL)-6 receptor and IL-6 receptor expression on CD4+ T cells in patients with chronic hepatitis B. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p 267271. 2011.

ZHAO PW, *et al.* Downregulation and altered function of natural killer cells in hepatitis B virus patients treated with entecavir, **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v 40, p 190–196. 2013.

ZHENG Q, *et al.* Activated natural killer cells accelerate liver damage in patients with chronic hepatitis B virus infection, **Clinical and Experimental Immunology**, v 180, p 499–508. 2015.

ZENG Y. *et al.* Effects of Telbivudine Treatment on the Circulating CD4+ T-Cell Subpopulations in Chronic Hepatitis B Patients. **Mediators of Inflammation**, v 12, p 789859. 2012.

ZOU, ZQ, *et al.* Innate immune targets of hepatitis B virus infection, **World J Hepatol**, v 18, p 716-725.2016

ZHOU Y. *et al.* Hepatitis B Virus Protein X-induced Expression of the CXC Chemokine IP-10 Is Mediated through Activation of NF- κ B and Increases Migration of Leukocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v 285, p 1215912168. 2010.

ZHU H. *et al.* Preserved Function of Circulating Invariant Natural Killer T Cells in Patients With Chronic Hepatitis B Virus Infection. **Medicine**, v 94, n 24. 2015.

WANG, L. Crosstalk between innate and adaptive immunity in hepatitis b virus infection. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 30, p. 2980.2015.

WANG L. *et al.* Increased numbers of CD5+CD19+CD1dhighIL-10+ Bregs, CD4+Foxp3+ Tregs, CD4+CXCR5+Foxp3+ follicular regulatory T (TFR) cells in CHB or CHC patients. **Journal of Translational Medicine**, v 12, p 251. 2014.

WEBSTER, G J. *et al.* Longitudinal analysis of cd8 α t cells specific for structural and nonstructural hepatitis b virus proteins in patients with chronic hepatitis b : implications for immunotherapy. **Journal of virology**, v. 78, n. 11, p. 5707–5719.2004.

WINER, B Y. *et al.* Determinants of hepatitis b and delta virus host tropism. **Curr opin virol**, v. 13, n. 609, p. 109–116.2015.

WIENS C. *et al.* CHRONIC HEPATITIS B: A Review about clinical and therapeutic aspects. **Visão Acadêmica**, v.11, p 15185192. 2010.

WU J, *et al.* Hepatitis B Virus Suppresses Toll-like Receptor Mediated Innate Immune Responses in Murine Parenchymal and Nonparenchymal Liver Cells. **Hepatology**, v 49, p 406.2009.

KAWAI T; AKIRA S, *et al.* Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity, **Cell Press Immunity**, v 27, p565-0871.2011.

KARLMARK KR, *et al.* Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease, **chemokines in liver disease**, v 2, p 233,242. 2008.

KONDO Y; SHIMOSEGAWA T. Significant Roles of Regulatory T Cells and Myeloid Derived Suppressor Cells in Hepatitis B Virus Persistent Infection and Hepatitis B Virus-Related HCCs, **Int. J. Mol. Sci**, v 16, p 33073322. 2015.

XIE Q, *et al.* Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9, **Microbes and Infection**, v 11, p 515523. 2009.

XU N, *et al.* Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma. **Acta pharmacol sin**, v, 29, p 239–244.2008.

XU X. *et al.* Reversal of B-cell hyperactivation and functional impairment is associated with HBsAg seroconversion in chronic hepatitis B patients, **Cellular & Molecular Immunology**, v 12, p 309316. 2015.

YANG J. *et al.* Phenotypes and clinical significance of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells (Tregs) in patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF). **Journal of Translational Medicine**, v 10, p 193. 2010.

YE, B. *et al.* T-cell exhaustion in chronic hepatitis b infection: current knowledge and clinical significance. **Cell death and disease**, 19 mar, v. 6, n. 3, p. e1694.2015.

YOU, C. R. Update on hepatitis b virus infection. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 37, p. 13293-13305.2014.

YOU, J. *et al.* Impact of viral replication inhibition by entecavir on peripheral T lymphocyte subpopulations in chronic hepatitis B patients. **Bio med central**, v. 8, p 123. 2008.


YURDAYDIN C; IDILMAN R. Therapy of Delta Hepatitis. **Cold Spring Harb Perspect**

Med, v 5, p 021543. 2015.

KHAN M A. *et al.* Transmission Model of Hepatitis B Virus with the Migration Effect.
BioMed Research International, v 13, p 150681. 2013.

ANEXOS

Anexo 01: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (CAAE: 46865015.8.3001.5262).

<p>INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - IPEC / FIOCRUZ</p> 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
Elaborado pela Instituição Coparticipante
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p> <p>Título da Pesquisa: Estadiamento da fibrose hepática de pacientes infectados pelo vírus da Hepatite Delta por métodos não-invasivos na região Norte do Brasil</p> <p>Pesquisador: Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 1</p> <p>CAAE: 46865015.8.3001.5262</p> <p>Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM</p> <p>Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ</p> <p>DADOS DO PARECER</p> <p>Número do Parecer: 1.223.737</p> <p>Apresentação do Projeto: Estudo observacional de corte transversal realizado em cooperação entre as unidades: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) (Manaus, AM, Brasil). Os pacientes, estima-se a inclusão de 350, serão recrutados exclusivamente no FMT-HVD.</p> <p>Objetivo da Pesquisa: Objetivo Primário: O objetivo primário deste projeto será avaliar a prevalência transversal do estadiamento da fibrose hepática por métodos não-invasivos, assim como identificar os fatores de risco associados à presença de fibrose significativa (F2) e cirrose hepática (F=4) em pacientes com hepatite Delta. Objetivo Secundário: Os objetivos secundários deste projeto serão:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Comparar o desempenho dos métodos não-invasivos (APRI, FibroTest e das sondas M e XL do Fibroscan) na avaliação da fibrose hepática; 2. Estimar a sensibilidade e especificidade dos métodos não-invasivos utilizando modelo estatístico sem exame padrão-ouro (análise de classes latentes); 3. Correlacionar os estágios de fibrose com fatores associado à doença hepática;
<p>Endereço: Avenida Brasil 4365 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@ipec.fiocruz.br</p>

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.223.737

4. Quantificar a esteatose hepática por método não-invasivo (CAP).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Elastografia transitória é um método não invasivo isento de potenciais complicações. A coleta de sangue pode estar relacionada apenas um leve desconforto pode ocorrer associado à picada da agulha. Pode haver sensação momentânea de tontura ou pequena reação local, mas esses efeitos são passageiros.

Benefícios:

Os pacientes e médicos assistentes serão beneficiados com uma avaliação não-invasiva completa do estadiamento da fibrose hepática. Além disso, o projeto viabilizará a utilização de novos métodos na avaliação hepatopatias na região norte do país acometida por uma doença endêmica levando ao desenvolvimento científico e tecnológico da região. O uso de métodos não-invasivos na prática clínica poderá reduzir as possíveis complicações relacionadas à biópsia hepática e permitirá a implementação de medidas precoces a fim de prevenir complicações graves no acompanhamento a longo prazo nos pacientes portadores de hepatite Delta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Excelente projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências e nem inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

A aprovação do projeto será referendada na reunião deste CEP que será realizada em 16 de setembro de 2015.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE do projeto Fibro-Delta_v1_13-05-15 (1).doc	25/06/2015 16:59:18		Aceito

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

**Anexo 02: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (CAAE:
49652815.8.0000.0009).**

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPITÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Pesquisador: ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49652815.8.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.982.466

Apresentação do Projeto:

Emenda apresentada ao Projeto de Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPITÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO.

Trata-se de um estudo descritivo, transversal constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre Biotecnologia & Saúde intitulado: "Desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao diagnóstico e terapia de doenças infecciosas tropicais", que será desenvolvido pelos grupos de Pesquisa "Virologia" da Universidade Federal do Pará – UFPA, em parceria com os grupos "Imunologia Básica e Aplicada" da Universidade Federal do Amazonas e "Nanotecnologia" da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. Ainda apoiado das Universidade da Califórnia (UCDAVIS) e da Universidade de Miami(UM). Aprovado pelo Edital Pró-Amazônia n. 047/2012.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a reatividade em soro de indivíduos HCV+ para peptídeos miméticos ao HCV identificados pela técnica phage display e caracterizar o perfil de resposta imune celular no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células.

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.982.466

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco de contaminação dos colaboradores da pesquisa com sangue contaminado com o vírus da Hepatite C.

Benefícios:

Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de pacientes que possam prever e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda apresentada ao projeto justificada pela necessidade de conhecer o perfil celular dos pacientes a fim de entender seu papel no desenvolvimento da fibrose hepática.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos obrigatórios apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_769229_E1.pdf	05/08/2016 10:46:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Andrea_guarda_chuva.pdf	05/08/2016 10:39:15	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	carta_emenda_adendo.pdf	05/08/2016 10:24:31	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/09/2015 15:32:42	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 15:30:02	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.pdf	09/09/2015 15:21:14	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.docx	09/09/2015 14:46:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br