



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

**TAÍS GARDENIA SANTOS LEMOS LOPES**

**PERFIL LINFOCITÁRIO DE INDIVÍDUOS INFECTADOS  
PELO VÍRUS DA HEPATITE B**

Salvador  
2012

**TAÍS GARDENIA SANTOS LEMOS LOPES**

**PERFIL LINFOCITÁRIO DE INDIVÍDUOS INFECTADOS  
PELO VÍRUS DA HEPATITE B**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Orientadora:** Profa. Dra. Songeli Menezes Freire

**Co-Orientadora:** Profa. Dra. Maria Isabel Schinoni

Salvador  
2012

Ficha catalográfica elaborada por Dario C. Assis, Bibliotecário CRB -5.

L864p Lopes, Taís Gardênia Santos Lemos  
Perfil linfocitário de indivíduos infectados pelo vírus da hepatite B. / Taís Gardênia Santos Lemos Lopes. – Salvador, 2012.

59f. il.

Orientadora: Profa. Dra. Songeli Menezes Freire.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, 2012.

.  
1. Hepatite B. 2. Linfócitos. 3. Imunofenotipagem- tratamento. I. Freire, Songeli Menezes, II. Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, IV. Título.

CDU 616.36-002

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO  
PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos dez dias do mês de dezembro de dois mil e doze, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós- Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a **Defesa Pública da Dissertação** da Pós-graduanda **Tais Gardenia Santos Lemos Lopes**, através da Comissão Julgadora composta pelos Professores **Songeli Menezes Freire**, **Maria Isabel Schinoni** e **Álvaro Bertho dos Santos**. O título da Dissertação apresentado foi **Perfil linfocitário de indivíduos infectados por hepatite B**. Ao final dos trabalhos, os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Profa. Dra. Songeli Menezes Freire APROVADA

Profa. Dra. Maria Isabel Schinoni APROVADA

Prof. Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos APROVADA

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma, lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, 10 de dezembro de 2012

Profa. Dra. Songeli Menezes Freire

Profa. Dra. Maria Isabel Schinoni

Prof. Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos

*A todos aqueles que amo e que me  
ajudaram a realizar este trabalho.*

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a Deus que me permitiu completar mais esta etapa em minha vida, dando-me forças para prosseguir a cada obstáculo;

À minha querida mãe Neyde, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, auxiliando e incentivando-me em mais esta conquista;

À minha Tia Graça, à minha sobrinha Gabriela e a todos os meus familiares que tanto ajudaram na realização deste sonho e compreenderam a distância;

Às Profas. Dra. Songelí Menezes Freire e Profa. Dra. Maria Isabel Schinoni pela orientação, paciência, confiança e ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo Corrêia de Araújo, Coordenador da Pós-Graduação, pelo incentivo, confiança e estímulo ao conhecimento científico;

Ao Prof. Dr. Raymundo Paraná e ao Núcleo de Hepatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) pela parceria e auxílio prestado;

Ao Dr. Andreas Stöcker, ao Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz (LACEN-BA) e à equipe de coleta do Diagnóstico Molecular das Hepatites B e C pela colaboração na execução deste trabalho;

À Bruna, Vanessa e Clécia, não apenas pela colaboração na realização deste trabalho, como também pela amizade e auxílio nos momentos difíceis;

A Geraldo, Alan e Maryane, por tão pacientemente me ajudar nas aquisições e análises das amostras;

Aos voluntários que tão generosamente participaram deste estudo, possibilitando e contribuindo para a realização deste trabalho;

Aos colegas de mestrado, por dividirem as dificuldades desta jornada e aos funcionários e amigos do Labimuno.

*"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes".*

Martin Luther King

Lopes, Taís Gardenia Santos Lemos. **Perfil linfocitário de indivíduos infectados pelo vírus da Hepatite B**. 2012. 126f. il. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2012.

## RESUMO

**Resultados:** O vírus da hepatite B (HBV) é um vírus envelopado cujo material genético é armazenado sob a forma de DNA de fita dupla, pertencente à família *Hepadnaviridae* e que apresenta um tropismo primário por células hepáticas. O HBV é transmitido principalmente pelas vias parenteral e sexual e é considerado 50 a 100 vezes mais infeccioso que o HIV. A hepatite B desencadeia uma resposta imune mediada por células, principalmente por células T e células *Natural Killer* (NK), consideradas principais responsáveis pela lesão hepática.

**Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil linfocitário em sangue periférico de indivíduos no curso da infecção pelo vírus da hepatite B. **Material e métodos:** Foi realizada a contagem total dos leucócitos (citômetro automatizado – Wiener lab. Counter 19) e a contagem linfocitária por análise imunofenotípica em citometria de fluxo (FACSCalibur – BD, software Cell Quest, utilizando os kit Lymphogram<sup>®</sup> e Perfect-Count Microspheres<sup>®</sup>), identificando os valores relativos e absolutos de linfócitos B, linfócitos T totais, linfócitos T auxiliar, linfócitos T citotóxicos e células NK de 50 voluntários com hepatite B crônica e 41 voluntários não infectados. Foram realizadas comparações quanto ao tratamento e à carga viral. Os softwares SPSS versão 18 e GraphPad versão 5 foram utilizados para o cálculo.

**Resultados:** Não foram encontradas diferenças nos leucócitos totais e nos linfócitos B entre as populações estudadas. As populações de linfócitos T e de linfócitos T citotóxicos, independente do tratamento e da carga viral, apresentaram-se menores nos indivíduos com hepatite B, enquanto que os valores das células NK foram maiores nos mesmos indivíduos.

**Conclusão:** O perfil linfocitário dos indivíduos infectados pelo HBV apresentou uma diminuição de linfócitos T e de linfócitos T citotóxicos e um aumento de células NK.

**Palavras Chaves:** hepatite B, linfócitos, imunofenotipagem, tratamento.



Lopes, Taís Gardenia Santos Lemos. Lymphocyte profile of individuals infected by the hepatitis B virus. 2012. 126f. il. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2012.

## ABSTRACT

**Introduction:** HBV is a Hepadnaviridae and enveloped virus, whose genetic material is stored in the form of double stranded DNA and it has a main tropism for liver cells. HBV is transmitted mainly sexually and perenterally, and is considered 50-100 times more infectious than HIV infection. The hepatitis B infection triggers an immune response mediated by cells, particularly T cells and *Natural Killer* cells (NK cells), which are responsible for liver damage. **Objective:** The aim of this study is to evaluate the profile of the lymphocytes in peripheral blood of individuals infected with hepatitis B. **Material and methods:** The leukocyte count was performed by automated cytometer (Wiener lab. Counter 19) and the lymphocyte counts were performed by immunophenotyping analysis in flow cytometry (FACSCalibur-BD Biosciences Cell Quest Software, using the kits Lymphogram<sup>®</sup> e Perfect-Count Microspheres<sup>®</sup>), identifying the relative and absolute values of B lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes and NK cells from 50 volunteers with chronic hepatitis B and 41 uninfected volunteers. Comparisons were made as to treatment and viral load. The software SPSS version 18 and GraphPad version 5 were used to perform the calculations. **Results:** No differences were found in total leukocytes and lymphocytes B in the populations studied. T lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes, regardless of treatment and the viral load, was lower in subjects with hepatitis B, whereas NK cells had higher values in these individuals. **Conclusion:** The profile of lymphocytes of individuals infected with HBV was characterized by a decrease of T-lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes and an increase of NK cells.

**Keywords:** hepatitis B lymphocytes, immunophenotype, treatment.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática do HBV	16
<b>Figura 2</b>	Curso dos marcadores sorológicos durante a hepatite B	21
<b>Figura 3</b>	Resposta imune inespecífica ao HBV.	23
<b>Figura 4</b>	Interação entre as diferentes células na resposta imune contra o HBV	24
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática da fibrose hepática	26
<b>Figura 6</b>	Gráficos dot plot para identificação dos subtipos linfocitários.	37
<b>Figura 7</b>	Contagem absoluta dos leucócitos totais	42
<b>Figura 8</b>	Contagem absoluta e relativa dos linfócitos T totais	43
<b>Figura 9</b>	Contagem absoluta e relativa dos linfócitos T auxiliares	44
<b>Figura 10</b>	Contagem absoluta e relativa dos linfócitos T citotóxicos	46
<b>Figura 11</b>	Razão entre os linfócitos T auxiliares e os linfócitos T citotóxicos	47
<b>Figura 12</b>	Contagem absoluta e relativa das células NK	47
<b>Figura 13</b>	Contagem absoluta e relativa dos linfócitos B	48

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Classificação Metavir	27
-----------------	-----------------------	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características dos indivíduos infectados com Hepatite B.	40
<b>Tabela 2</b>	Drogas antivirais usadas pelos pacientes	40
<b>Tabela 3</b>	Relação entre o tratamento e a carga viral.	40
<b>Tabela 4</b>	Contagem absoluta e proporcional dos leucócitos totais e subtipos linfocitários dos indivíduos infectados e saudáveis (mediana e percentis 25-75%).	41
<b>Tabela 5</b>	Contagem absoluta e proporcional dos subtipos linfocitários dos indivíduos não tratados, tratados (mediana e percentis 25-75%) (teste de Mann-Whitney).	41
<b>Tabela 6</b>	Contagem absoluta e proporcional dos subtipos linfocitários dos indivíduos com carga viral abaixo e acima de 2000 UI/mL (mediana e percentis 25-75%) (teste de Mann-Whitney).	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

AgHBc	Antígeno de <i>Core</i> do HBV
AgHBe	Antígeno <i>e</i> do HBV
AgHBs	Antígeno de Superfície do HBV
ALT	Alanina Aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo Anti-Antígeno de <i>Core</i> do HBV
Anti-HBe	Anticorpo Anti-Antígeno <i>e</i> do HBV
Anti-HBs	Anticorpo Anti-Antígeno de Superfície do HBV
CMV	Cytomegalovirus (Citomegalovírus)
EBV	Epstein-Barr Virus (Vírus Epstein-Barr)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Separação Celular Ativada por Fluorescência)
FDA	United States Food and Drugs Administration
HBV	Hepatitis B Virus (Vírus da Hepatite B)
HBV-DNA	Hepatitis B Virus – Deoxyribonucleic Acid (Material genético – ácido desoxirribonucleico – do Vírus da Hepatite B)
HCC	Hepatocarcinoma Celular
HCV	Hepatitis C Virus (Vírus da Hepatite C)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HTLV	Human T-Lymphotropic Vírus (Vírus Linfotrópico as Subpopulações de Linfócitos T Humano)
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
IFN	Interferon
IL	Interleucina
MHC-I	Major Histocompatibility Complex Class 1 (complexo principal de histocompatibilidade classe I)
MHC-II	Major Histocompatibility Complex Class 2 (complexo principal de

histocompatibilidade classe II)

ORF	Open Reading Frames (Quadros de Leitura Aberta)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
Th1	T Helper Cell type 1 (Célula T Auxiliares com perfil de resposta Tipo 1)
Th2	T Helper Cell type 2 (Célula T Auxiliares com perfil de resposta Tipo 2)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS HBV	16
2.2	EPIDEMIOLOGIA E VIAS DE TRANSMISSÃO	17
2.3	HISTÓRIA NATURAL DA HEPATITE B	18
2.4	ASPECTOS DO IMUNODIAGNÓSTICO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HEPATITE B	20
2.5	IMUNOPATOGENIA	22
2.5.1	Resposta imune inata ao HBV	23
2.5.2	Resposta imune adaptativa	23
2.5.3	O Fígado e as alterações hepáticas no curso da hepatite B	26
2.6	TRATAMENTO	27
2.6.1	Tipos de Tratamento	28
2.6.2	Terapia Baseada em Interferon	29
2.6.3	Análogos de Nucleotídeo/Nucleosídeo	30
2.6.3.1	Lamivudina	30
2.6.3.2	Adefovir	31
2.6.3.3	Entecavir	31
2.6.3.4	Tenofovir	32
2.7	PREVENÇÃO	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	35

4.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO, COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	35
4.3	SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES VOLUNTÁRIOS	35
4.4	AVALIAÇÃO DO LEUCOGRAMA E DO PERFIL LINFOCITÁRIO	36
4.5	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL	38
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4.7	FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS DO ESTUDO</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>51</b>
	<b>ANEXO A (PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO EMITIDO PELO COMITÊ DE ÉTICA)</b>	<b>56</b>
	<b>ANEXO B (TCLE)</b>	<b>57</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A Hepatite B é uma infecção ocasionada pelo Vírus da Hepatite B (HBV), que pode causar uma inflamação crônica no fígado e evoluir para cirrose hepática e hepatocarcinoma, representando, assim, um grande problema de saúde pública. Estima-se que dois bilhões de pessoas foram infectadas com o HBV e mais de 240 milhões estão infectados cronicamente por esse vírus. Cerca de 600 mil pessoas morrem todo ano em função de complicações da hepatite B (WHO, 2012).

Em 1965, foi relatada a descoberta do antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs), conhecido na época como antígeno Austrália (AgAu), e do anticorpo específico a este antígeno, o anti-HBs. Pouco tempo depois, em 1971, caracterizava-se uma estrutura nomeada de partícula de Dane, o pacote viral completo do vírus da hepatite B. Desde então, progressos consideráveis têm sido feitos a respeito da epidemiologia, virologia, história natural e tratamento desse vírus primariamente hepatotrópico (PURCELL, 1993).

A interação entre o vírus e a resposta imunológica do hospedeiro define o curso clínico da infecção, além de ser responsável pela patogenia e pelas manifestações clínicas da doença. A cronificação da doença é resultado de uma resposta imune deficiente ou debilitada, incapaz de resolver a infecção. Dos pacientes com infecção aguda, 90% evoluem para a cura espontaneamente, sem precisar de tratamento e 10% evolui para uma infecção crônica, variando de portadores inativos com baixos níveis de replicação do vírus a pacientes com alta carga viral. A inflamação ativa pode progredir para uma cirrose ou hepatocarcinoma celular (HCC). Infecções adquiridas no período perinatal ou durante a infância estão associadas com uma falha no clareamento do vírus e desenvolvimento de infecção crônica (PYRSOPOULOS, 2011).

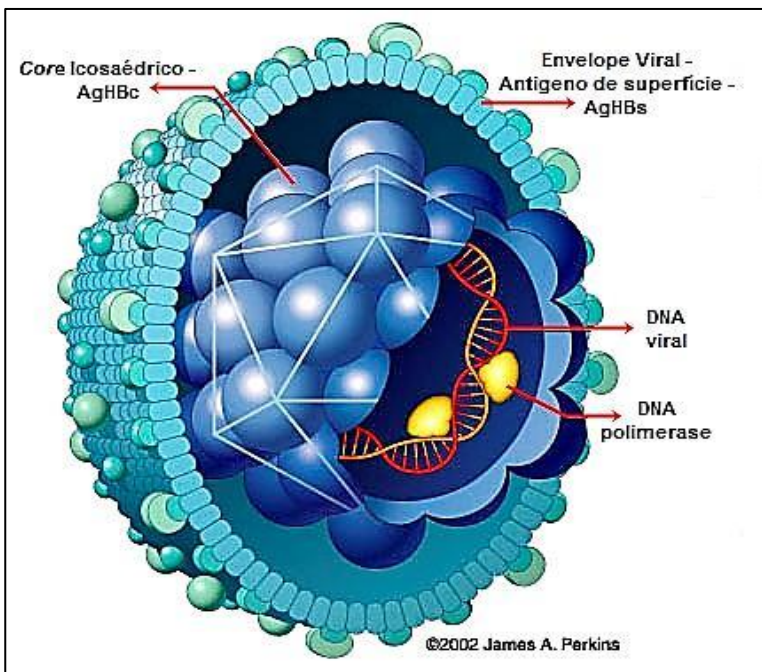
O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o perfil linfocitário em sangue periférico de indivíduos portadores da infecção pelo vírus da hepatite B.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS HBV

O HBV é um vírus pertencente à família *Hepadnaviridae* com tropismo principal pelas células hepáticas. Apresenta-se como uma partícula esférica de 42 nm de diâmetro (chamada de partícula de Dane), constituída por um invólucro externo (envelope viral) e por um nucleocapsídeo. O envelope viral é composto de lipídios, proteínas e carboidratos. Sobre a superfície do envelope está um mosaico de glicoproteínas, conhecido coletivamente como antígeno de superfície do HBV (AgHBs). No interior da partícula se encontra o nucleocapsídeo icosaédrico, contendo o antígeno do *core* (AgHBc), o genoma viral e a proteína DNA polimerase, além de proteínas do hospedeiro (Figura 1) (RODRÍGUEZ-FRIAS; JARDI, 2008).

**Figura 1** – Representação esquemática do HBV.



**Fonte:** Adaptado de <http://www.ibibiobase.com/.../HBV.jpg>

secretada como antígeno “e” (AgHBe), presente no soro de pacientes com replicação do HBV. Em algumas situações podem ocorrer mutações nesta região pré-core ou na região promotora (chamada BCP do inglês “Basic Core Promoter”) que impedem a expressão do AgHBe. Com isso, o paciente pode apresentar replicação do HBV e sorologia negativa para o

Seu genoma viral – uma cadeia de DNA de fita dupla parcial e circular – contém cerca de 3200 nucleotídeos e apresenta quatro fases de leitura aberta (ORF – Open Reading Frames): S, C, P e X. A região S codifica proteínas de superfície do envelope (AgHBs). O gene C possui dois códons de iniciação em fase que codificam duas proteínas. Quando a tradução ocorre a partir do primeiro códon, codifica-se uma proteína, que depois de processada, é

AgHBe. Quando o gene C é traduzido a partir do segundo códon, codifica-se a proteína do *core*, o AgHBc, que está presente no nucleocapsídeo de vírions em células hepáticas, não sendo detectado no soro. Além disso, o AgHBc está integrado ao genoma viral e à DNA polimerase, sendo essencial para a função e maturação do vírion. O gene P codifica a DNA polimerase, a qual também funciona como uma transcriptase reversa e é alvo de vários antivirais. O gene X codifica o AgHBx, que parece estar envolvido nos processos de carcinogênese, através de transativação de promotores celulares e virais (CARRILHO; ONONITA, 2008; RODRÍGUEZ-FRIAS; JARDI, 2008).

Atualmente, o HBV é classificado em oito genótipos (A-H), baseado numa divergência mínima do DNA viral de pelo menos 8%. A prevalência dos genótipos varia de acordo com a região. O genótipo C, quando comparado com o B, parece estar mais associado com uma baixa taxa de soroconversão espontânea do AgHBe e uma longa duração com altos níveis de replicação, acompanhado de uma atividade inflamatória mais severa, podendo levar a um maior progresso da doença, com uma resposta menos favorável ao tratamento com agentes antivirais (PYRSOPOULOS, 2011; FATTOVICH; BORTOLOTTI; DONATO, 2008).

As mutações na região pré-core do HBV são mais comuns nos genótipos B, C e principalmente no D. Os genótipos A e B respondem melhor ao tratamento com interferon  $\alpha$  quando comparados aos C e D. No Brasil predominam os genótipos A e F (este com uma prevalência menor), contudo, estudos utilizando técnicas mais sensíveis demonstraram haver a presença do genótipo D em populações antes não suspeitadas (FERREIRA; BORGES, 2007; PARANÁ et al, 2009).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA E VIAS DE TRANSMISSÃO

O HBV é considerado um dos vírus mais infectivos. Uma só partícula é capaz de infectar o ser humano. O período de incubação varia de seis semanas a seis meses. No hepatócito, o vírus da hepatite B replica-se produzindo  $10^{11}$  cópias por dia, enquanto que o vírus da hepatite C e o HIV produzem  $10^9$  cópias por dia. O HBV pode sobreviver até uma semana fora do corpo humano, 1 a 3 dias no plasma e de 10-100 dias no hepatócito (FONSECA, 2008).

A hepatite B é transmitida, fundamentalmente, por vias parenteral e sexual, através da exposição de sangue e outros fluidos biológicos contaminados, como por exemplo, no compartilhamento de seringas e agulhas entre usuários de drogas, em transfusões de sangue ou hemoderivados e em acidentes com material biológico. A transmissão também pode se dar por outros tipos de exposições percutâneas, incluindo tatuagens, *piercings*, uso compartilhado de utensílios perfuro-cortante que tenham sido utilizados por portadores do HBV (como barbeadores, navalhas, lâminas de depilação, tesouras, alicates de unha entre outros) (MELO; ISOLANI, 2011; LIAW; CHU, 2009).

A transmissão da hepatite B também se dá verticalmente, da mãe para o filho, principalmente em áreas endêmicas. A transmissão perinatal ocorre mais frequentemente durante o parto e mais raramente (menos que 2%) intra-uterina (SHEPARD et al, 2006).

A frequência de infecção e os padrões de transmissão variam em diferentes partes do mundo. Aproximadamente 45% da população global vive em áreas com alta prevalência de hepatite B crônica (havendo mais de 8% da população AgHBs positivo), 43% vive em áreas com prevalência moderada (tendo 2 a 7% da população AgHBs positivo) e 12% em áreas com baixa prevalência (menos de 2% da população AgHBs positivo) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011).

No Brasil, a prevalência de infectados com o HBV é de 7% na Amazônia, em algumas regiões do Espírito Santo e de Santa Catarina e menos que 2% nas demais regiões, (BRASIL, 2012b).

De acordo com o Ministério da Saúde, entre os anos de 1999 e 2009, 96.044 casos de hepatite B foram confirmados. Desses, mais de 50% se concentraram em indivíduos entre 20 e 39 anos, com quadro de evolução aguda em cerca de 90% (BRASIL, 2010). Na Bahia, no ano de 2010, foram confirmados 403 casos de hepatite B (BRASIL, 2012a).

### 2.3 HISTÓRIA NATURAL DA HEPATITE B

A infecção aguda pelo HBV costuma ser benigna, assintomática, com alto índice de cura – dois terços dos indivíduos infectados evoluem para a cura, um terço tem manifestações clínicas. Apenas 10% tornam-se portadores crônicos do vírus, podendo evoluir para a hepatite crônica, cirrose hepática e hepatocarcinoma. O risco de cronicidade está estritamente

relacionado com o tempo de infecção – quando adquirida no período perinatal possui uma grande tendência à cronificação (>90%). Os imunodeprimidos (transplantados; co-infectados pelo HIV) também possuem um alto índice de cronificação (BRANDÃO-MELLO, 2008). A hepatite B crônica é um processo dinâmico, com uma fase ativa e uma fase tardia com baixa replicação viral e remissão histológica da doença. Cerca 1 a 2% dos casos agudos podem apresentar formas graves como hepatite fulminante ou necrose sub-fulminante (FERREIRA; BORGES, 2007).

A história natural da infecção pelo HBV, geralmente, compreende fases bem diferenciadas:

- 1) *Fase imunotolerante* – costuma ser muita curta em indivíduos que se infectaram quando adultos. Contudo, em crianças que adquiriram o HBV por transmissão perinatal ou nos primeiros anos de vida, a fase imunotolerante pode durar de 10 a 30 anos. Essa fase é caracterizada pela presença de AgHBe, altos níveis de HBV-DNA, níveis normais ou ligeiramente aumentados de alanina aminotransferase (ALT), atividade necroinflamatória discreta com fibrose ausente ou mínima. A maioria dos pacientes com sustentação de altos níveis de replicação por um longo período irá desenvolver lesão progressiva no fígado levando a cirrose ou hepatocarcinoma (HCC) (OO; MUTIMER, 2011; FATTOVICH, BORTOLOTTI, DONATO, 2008). Estudos experimentais sugerem que a função primordial do AgHBe seria a de induzir ao portador do HBV (AgHBs +) o estado de imunotolerância (FONSECA, 2007).
- 2) *Fase imunoativa* – Esta fase é marcada pelo início da resposta imunológica do hospedeiro contra o HBV, que reconhece o vírus como “não próprio” e inicia uma resposta contra o hepatócito infectado (o que resulta em dano ao fígado). É caracterizada por elevados níveis de ALT (o que indica uma vigorosa resposta e conseqüentemente maior dano hepatócito), assim como de carga viral e uma inflamação hepática ativa, com ou sem fibrose visível no ultrassom ou biópsia. O AgHBe pode ser identificado no soro e, nesses indivíduos, percebe-se um declínio (mas não uma eliminação) nos níveis séricos da carga viral, eventualmente resultando na soroconversão de AgHBe para Anti-HBe (ASPINALL, 2011; MCMAHON, 2009). A duração dessa fase em pacientes com infecção aguda é de,

aproximadamente, três a quatro semanas (período sintomático). Para pacientes com infecção crônica, pode durar 10 ou mais anos, podendo culminar no desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular. Menos de 1% dos indivíduos infectados desenvolvem formas de hepatite fulminante pelo HBV (PYRSOPOULOS, 2011).

- 3) *Fase não replicativa (portador inativo do HBV)* – A principal característica desta fase é a soroconversão do AgHBe para o Anti-HBe. Outras características são: títulos de HBV-DNA indetectáveis ou baixos ( $< 2000$  IU/mL –  $10^4$  cópias/mL), os níveis persistentemente normais de ALT e lesão histológica hepática mínima, com melhoria da fibrose. Muitos portadores do HBV permanecem inativos durante toda a vida, enquanto outros evoluem para a soroconversão do AgHBs para o anti-HBs (FATTOVICH; BORTOLOTTI; DONATO, 2008). Um número bem pequeno de portadores inativos desenvolve hepatite crônica B anti-HBe positivo (hepatite crônica residual pelo HBV), que é caracterizada por altos níveis de aminotransferases, altos níveis de carga viral e doença hepática ativa (histológica). Invariavelmente, esses pacientes evoluem para cirrose hepática, contudo, o curso clínico e as sequelas da hepatite crônica B variam de indivíduo para indivíduo (FONSECA, 2007).

A reativação da doença ou quarta fase ocorre em cerca de 20 a 30% dos pacientes após a soroconversão do AgHBe para anti-HBe. Caracteriza-se pela sustentação de elevados níveis de carga viral, elevadas aminotransferases e doença ativa histológica. Esses pacientes são, em geral, portadores de mutantes do vírus B (com mutação nas regiões pré-core e promotora do core do genoma viral) que deletam a expressão de AgHbe e são hoje denominados portadores de hepatite crônica B AgHBe negativa (FERREIRA; BORGES, 2007).

## 2.4 ASPECTOS DO IMUNODIAGNÓSTICO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HEPATITE B

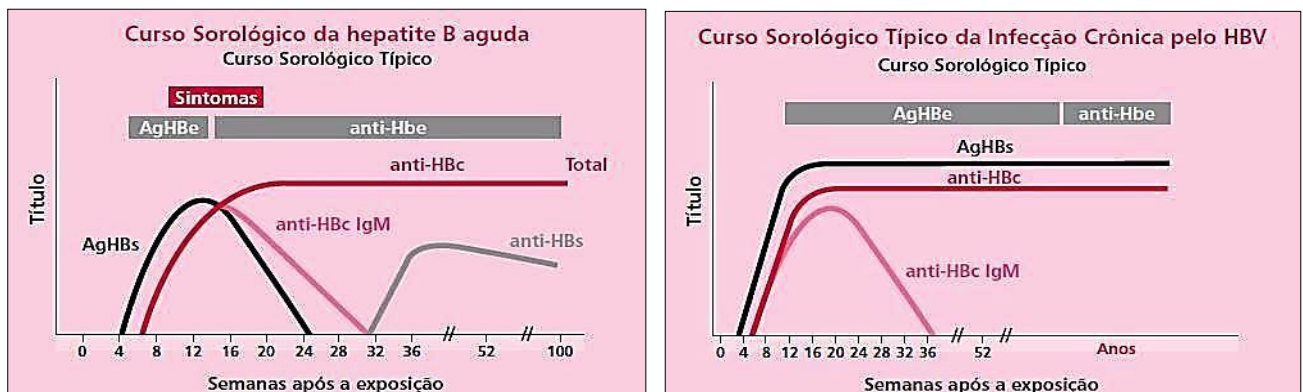
O diagnóstico confirmatório da infecção pelo HBV é baseada em uma gama de achados bioquímicos, histológicos e sorológicos. Um número de antígenos virais e seus respectivos anticorpos podem ser detectados no soro após a infecção e a interpretação

adequada dos resultados é essencial para o diagnóstico correto (LIANG, 2009). Esses antígenos e anticorpos podem ser detectados através de testes sorológicos (pesquisa de antígenos e anticorpos) e moleculares (pesquisa qualitativa e quantitativa do DNA viral). Várias técnicas são empregadas no diagnóstico sorológico, contudo, as mais utilizadas atualmente são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e a quimiluminescência. Pode-se, também, realizar a pesquisa dos antígenos AgHBs e AgHBc no tecido hepático (marcadores virais teciduais) pela imunohistoquímica (PARANÁ; SCHINONI; OLIVEIRA, 2008).

O curso sérico de antígenos e anticorpos específicos da Hepatite B, nas fases aguda e crônica da infecção, está representado na figura 2.

O AgHBs é o marcador mais importante para o diagnóstico das infecções agudas e crônicas pelo HBV. É o primeiro marcador sorológico, sendo detectado de 6 a 10 semanas após a exposição ao vírus. Sua presença indica que o indivíduo está infectado e pode transmitir o vírus. Sua persistência por mais de seis meses torna-o um marcador de cronicidade. O anti-HBs é o único anticorpo que confere imunidade contra o HBV. Surge, em geral, entre a primeira e a décima semana após o desaparecimento do AgHBs. Um título igual ou acima de 10 mU/mL indica imunidade (valor preditivo de 97,6%) que pode ser ativa (resposta vacinal – se detectado de forma isolada; contato prévio com o vírus – se detectado juntamente com o anti-HBc) ou passiva (uso de imunoglobulina anti-hepatite B ou transferência de anticorpos maternos durante a gestação) (BRASIL, 2009; RODRÍGUEZ-FRIAS; JARDI, 2008).

**Figura 2:** Curso dos marcadores sorológicos durante a hepatite B.



Fonte: Brasil, 2008.

O AgHBc é um antígeno intracelular, que não pode ser detectado no soro. Seu respectivo anticorpo, anti-HBc total, está presente em todas as infecções por HBV e não é desenvolvido por indivíduos vacinados. Geralmente persiste por toda vida e pode ser usado

como marcador de infecção pregressa. A fração IgM do anti-HBc, contudo, está presente em indivíduos com infecção aguda e indica uma infecção recente por HBV. O anti-HBc IgM aparece no início dos sintomas, até 30 dias depois do aparecimento do AgHBs e em geral é detectável por cerca de seis meses. Por outro lado, o anti-HBc IgG permanece detectável por muitos anos, em geral, por toda vida e sua presença marca uma exposição ao HBV no presente ou no passado (memória imunológica) (GONÇALES; CAVALHEIRO, 2006; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011).

O AgHBe aparece concomitantemente ao AgHBs e está correlacionado com altos níveis de replicação viral e infectividade. A persistência do AgHBe (após o terceiro mês da doença aguda) também é um sinal de cronificação da doença, pois indica falha do sistema imunológico do hospedeiro em debelar a replicação viral. Sua ausência, entretanto, não pode ser interpretada como suspensão/diminuição da replicação viral. A perda de AgHBe e o aparecimento do anti-HBe, em geral, é um marcador sorológico favorável ao clareamento do vírus (durante uma infecção aguda). Em alguns pacientes, contudo, por conta de mutações na região pré-core ou na região promotora, o AgHBe não é detectável, porém a replicação viral é significativa. Esses pacientes apresentam altos níveis de HBV-DNA (>2000 UI/mL) e sorologia negativa para AgHBe (LIANG, 2009; PARANÁ; SCHINONI; OLIVEIRA, 2008).

Em geral, a carga viral é quantificada através de técnicas de PCR, incluindo PCR em tempo real, o que tem se mostrado muito mais sensível e confiável. A quantificação da carga viral é um componente extremamente importante na avaliação de pacientes com infecção crônica por HBV e na avaliação da eficácia do tratamento antiviral (LOK; MCMAHON, 2007).

## 2.5 IMUNOPATOGENIA

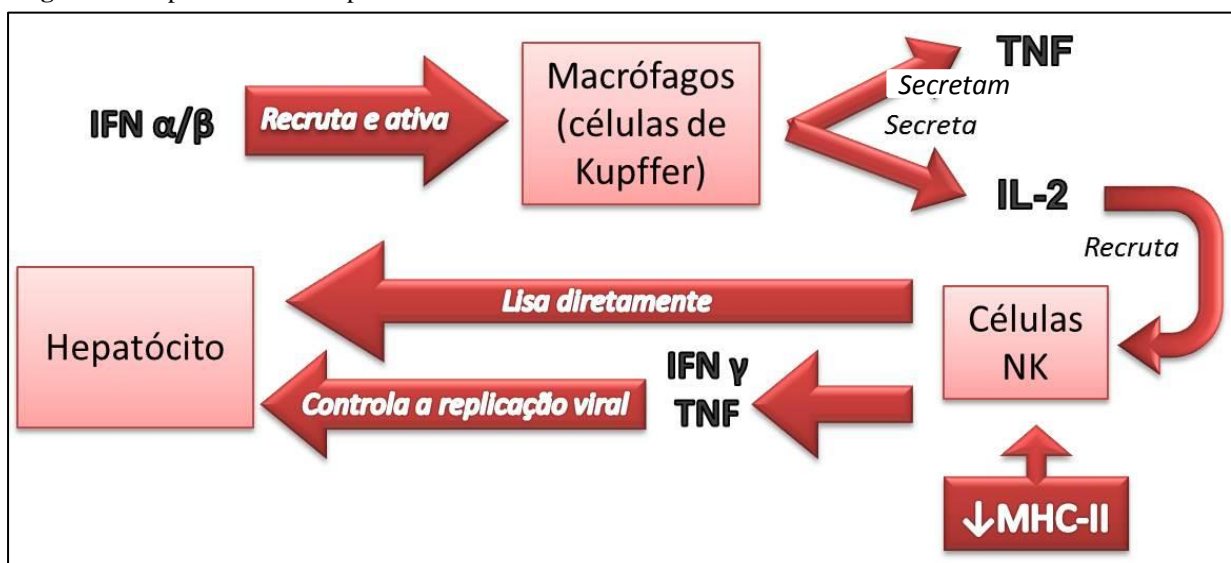
Muitos estudos vinculam o prognóstico da infecção por HBV com o estado funcional do sistema imunológico. A hepatite B desencadeia uma resposta imune mediada por células, principalmente por células T CD4+ e CD8+, que são responsáveis pela lesão hepática (uma vez que o HBV é um vírus não citopático) e pelas células *Natural Killer* (NK) (LI et al, 2011).



### 2.5.1 Resposta imune inata ao HBV

As respostas iniciais (após a primeira semana de infecção) à infecção pelo HBV são não específicas e incluem o sistema interferon (tipo I – IFN  $\alpha/\beta$ ; e tipo II – IFN  $\gamma$ ), células NK e ativação não específica das células de Kupffer – uma população especial de macrófagos encontrada no fígado entre outras células do parênquima e estroma hepático além do órgão linfóide. Os IFN  $\alpha/\beta$  interferem na síntese viral por indução de diversas proteínas, além de recrutar e ativar macrófagos (incluindo as células de Kupffer), que secretam diversas citocinas como TNF e IL-2. Esta última citocina recruta as células NK, que também são ativadas após reconhecerem que o complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I) está expresso fracamente (ou não está expresso). Essas células podem lisar, então, as células infectadas pelo HBV diretamente. A modulação da resposta imune e a produção de fator de necrose tumoral (TNF) e IFN  $\gamma$  contribuem para o controle precoce da replicação viral (BARONE; VISO, 2006; BERTOLETTI; GEHRING, 2006; REHERMANN, 2003).

**Figura 3:** Resposta imune inespecífica ao HBV.



### 2.5.2 Resposta imune adaptativa

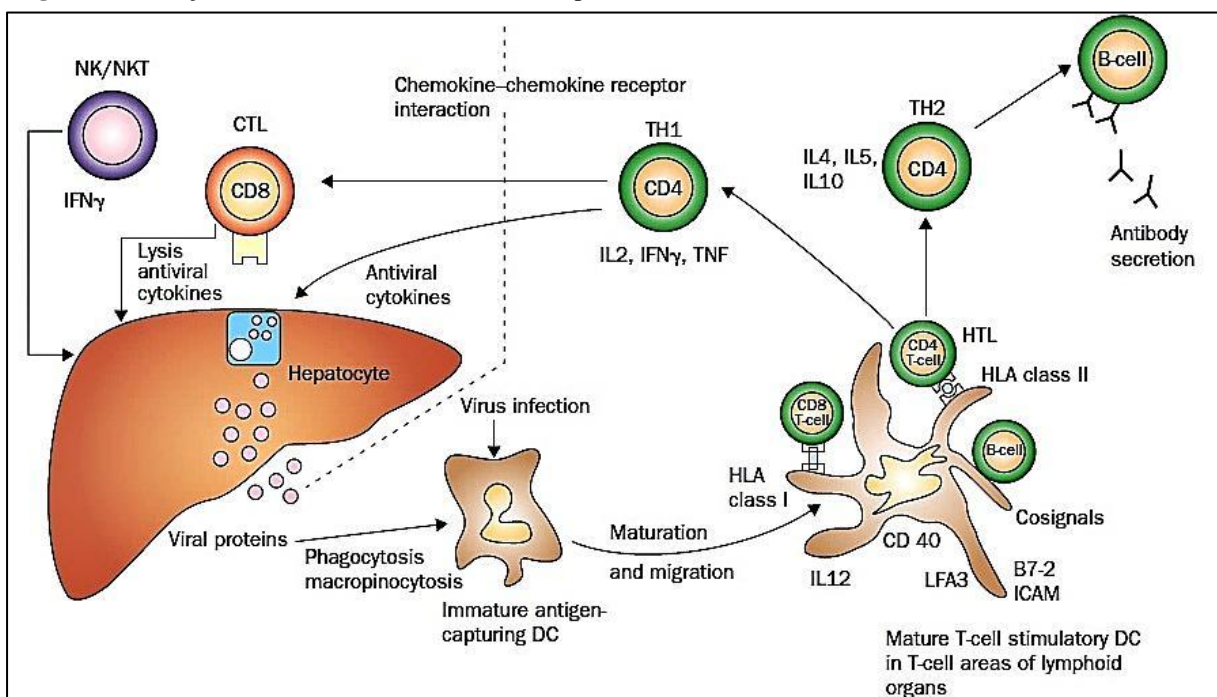
Após os eventos da resposta inata, torna-se importante uma resposta imunológica mais específica contra as proteínas virais. A resposta imune adaptativa é composta de uma rede

complexa de células efetoras, as quais possuem um papel chave no desenvolvimento da imunidade ao HBV (Figura 3) (JUNG; PAPE, 2002).

Quando a intensidade da resposta imune ao HBV é alta, a infecção se resolve em cura, havendo o clareamento do vírus. Quando, contudo, a intensidade é baixa, há uma sustentação e persistência da infecção, levando à cronicidade da doença. Os pacientes cronicamente infectados, que adquirem HBV na idade adulta, geralmente apresentam um defeito na resposta específica dos linfócitos T. Uma ativação prolongada de linfócitos T pode resultar num esgotamento de células T e até mesmo em uma deleção clonal. A extensão dessas vias imunes inibitórias pode definir o curso da hepatite crônica de estado imunotolerante e estado de portador sadio à cirrose (BARONE; VISO, 2006; LIU et al, 2010).

Os linfócitos T CD4+ (ou linfócitos T auxiliares) reconhecem os antígenos peptídicos exógenos através de moléculas de MHC classe-II de células apresentadoras de antígeno (APC). Podem ser subdivididas em: células T auxiliares tipo 1 (Th1), que secretam IFN- $\gamma$  e IL-2; e células T auxiliares tipo 2 (Th2), que secretam IL4, IL-5 e IL-6. Linfócitos T CD8+ (ou linfócitos T citotóxicos) reconhecem e direcionam as células novas que exibem antígenos virais sintetizados endogenamente, apresentados por moléculas de MHC classe-I, e as destroem para prevenir a replicação viral. Além disso, produzem diversas citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), linfotóxina e IFN- $\gamma$ . Este último reforça as defesas antivirais tornando as células adjacentes resistentes à infecção (BARONE; VISO, 2006).

**Figura 4:** Interação entre as diferentes células na resposta imune contra o HBV.



Fonte: JUNG; PAPE, 2002, *The Lancet*.

Uma resposta vigorosa mediada por células T CD4+ a vários antígenos do core do HBV tem sido detectada no sangue periférico de quase todos os pacientes com hepatite aguda autolimitada. Contudo, a resposta específica ao envelope viral é bem menos vigorosa nos mesmos pacientes. O desenvolvimento dessa resposta ao core é temporariamente associada com o clareamento do HBV e é provavelmente essencial para um controle eficiente da viremia através de vários mecanismos. Essas respostas de células T CD4+ exercem seus efeitos através da produção de citocinas. O perfil de citocinas secretado pelos linfócitos T auxiliares core-específicos, na hepatite B aguda autolimitada, mostrou a produção de citocinas Th1, com prevalência da produção de IFN- $\gamma$ , o que sugere que os efeitos mediados pela resposta Th1 podem contribuir para a injúria celular hepática e recuperação da doença (JUNG; PAPE, 2002). Estudos demonstraram que os linfócitos T CD4+ contribuem, indiretamente, para o controle da infecção em função de facilitarem a indução e manutenção de uma resposta com células T CD8+ e B vírus-específicas (CHISARI; ISOGAWA; WIELAND, 2010).

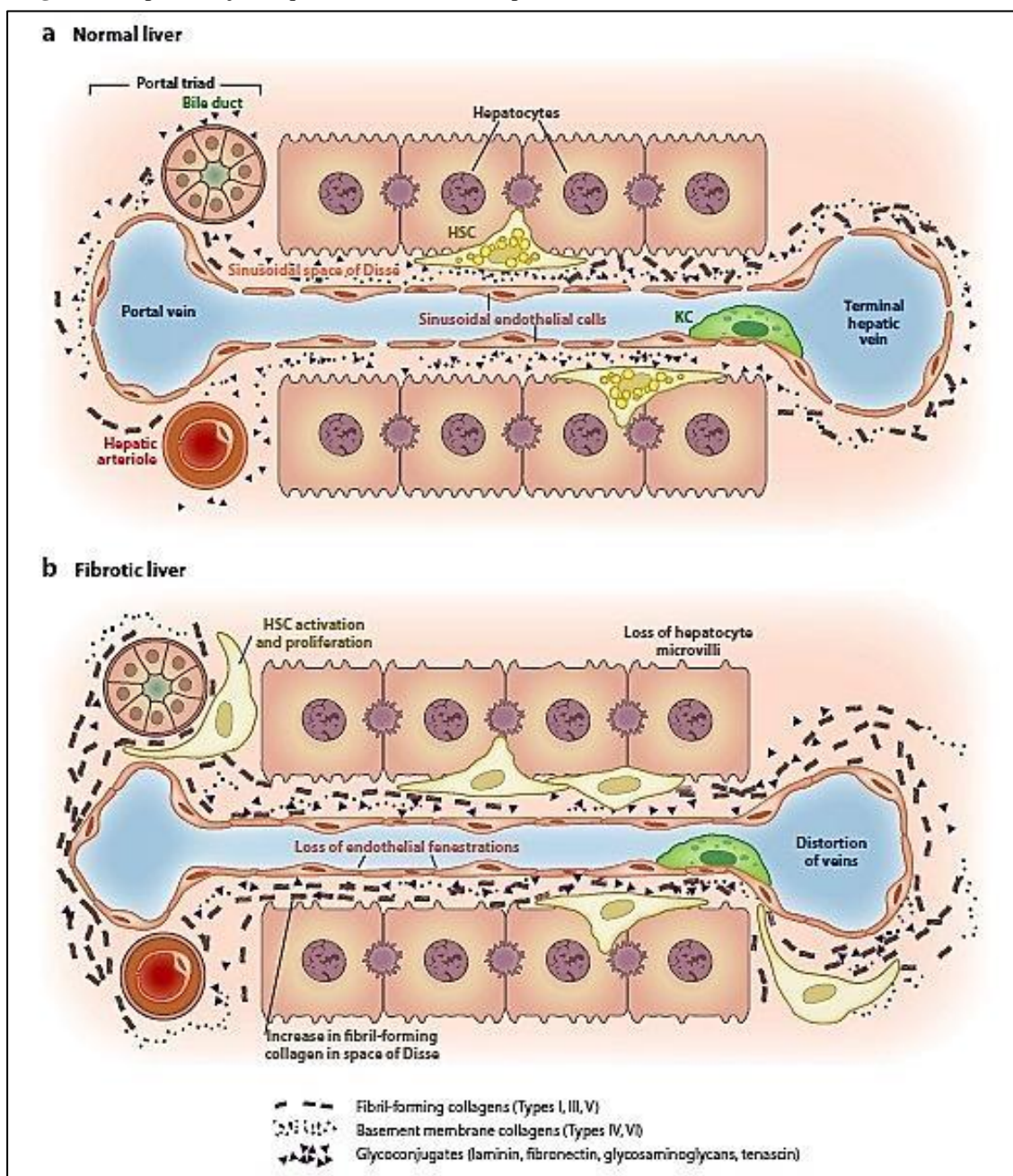
Os linfócitos T CD8+ tem um papel fundamental no clareamento viral e na patogenia da doença hepática. Estudos têm demonstrado que a inibição da replicação viral pode ser independente do dano ao fígado, e que a funcionalidade das células T CD8+ HBV-específicas são mais importantes que o número de células T para controlar a replicação do HBV. Em experimentos com chimpanzés, a depleção de células T CD8+ (mas não de células T CD4+) alteraram o curso clínico e virológico da doença, demonstrando que o clareamento viral e o início da doença hepática coincidem com o acúmulo de células T CD8+ vírus-específicas e a indução de IFN- $\gamma$  no fígado. Sobretudo, a depleção de células T CD8+ no auge da viremia atrasa o clareamento viral e o aparecimento da hepatite até o retorno das células T, provando que o clareamento viral e a doença hepática são mediados pelas células T CD8+ vírus-específicas. Apesar dos linfócitos T CD8+ contribuírem para o dano hepático, sua interação com o hepatócito também resulta na elaboração de citocinas antivirais que podem curar as células infectadas, levando a uma resolução da infecção por HBV, sem uma insuficiência hepática fulminante (CHANG, 2010; CHISARI; ISOGAWA; WIELAND, 2010).

Em um estudo realizado na China, o grupo de You e colaboradores (2009) demonstraram por citometria de fluxo, que a composição das subpopulações de linfócitos T em sangue periférico difere entre os estágios clínicos da hepatite B crônica. Pacientes na fase imunotolerante apresentaram o maior número de células T CD8+ e o menor número de células T CD4+, quando comparados com pacientes nas outras duas fases. Durante a infecção

crônica encontraram diminuição no equilíbrio das subpopulações de linfócitos T, que está relacionado com um aumento da proporção de linfócitos T CD8+ e um decréscimo da proporção de linfócitos T CD4+. Também foi demonstrado que a insuficiência de células T estava significativamente associada ao nível de replicação do vírus, indicando que a carga viral é um forte fator preditivo para subpopulações de linfócitos T.

### 2.5.3 O fígado e as alterações hepáticas no curso da hepatite B

**Figura 5:** Representação esquemática da fibrose hepática.



Fonte: HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011. *Pathol. Mech. Dis.*

Como já citado anteriormente, o HBV não é um vírus citopático, sendo a resposta imune descontrolada que lesiona o fígado, causando uma fibrose.

A fibrose hepática é uma resposta de cicatrização, reversível, caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular, após uma agressão hepática (figura 4). Se a lesão for aguda ou autolimitada, essas mudanças são temporárias e a arquitetura do fígado é restituída ao seu estado normal. Contudo, se a injúria for sustentada, a inflamação crônica estimula o acúmulo de matriz extracelular, levando à substituição progressiva do parênquima do fígado por tecido cicatricial fibrótico. Este processo resulta em cirrose – estágio final da doença hepática, caracterizada morfológicamente pela presença de fibrose difusa e severa, nódulos regenerativos e distorção tanto no parênquima hepático como na arquitetura vascular. A cirrose possui um mau prognóstico e alta mortalidade (GUIDOTTI; CHISARI, 2006; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011).

Para avaliar o comprometimento hepático, a escala Metavir tem sido um sistema difundido entre os especialistas para a classificação semi-quantitativo da atividade inflamatória e da fibrose por avaliação histomorfológica (THEISE, 2007), e esta, encontra-se resumida no Quadro 1:

**Quadro 1:** Classificação Metavir.

<b>Classif.</b>	<b>Atividade Inflamatória</b>	<b>Classif.</b>	<b>Fibrose</b>
<b>A0</b>	Ausente	<b>F0</b>	Ausente
<b>A1</b>	Atividade Leve	<b>F1</b>	Fibrose portal sem septos
<b>A2</b>	Atividade Moderada	<b>F2</b>	Fibrose portal com raros septos
<b>A3</b>	Atividade Intensa	<b>F3</b>	Numerosos septos sem cirrose
		<b>F4</b>	Cirrose

**Fonte:** Adaptado de Theise (2007). **Modern Pathology.**

## 2.6 TRATAMENTO

Os principais objetivos do tratamento são suprimir a replicação viral (para alcançar a soroconversão do AgHBe e/ou níveis indetectáveis de HBV-DNA, reduzindo a necroinflamação hepática) e prevenir descompensação hepática. A longo prazo, os objetivos são reduzir o desenvolvimento da cirrose e do hepatocarcinoma celular (HCC) e, por fim, estender a sobrevivência (LIAW; CHU, 2009; ASPINALL et al, 2011).

Nenhum dos medicamentos consegue erradicar de maneira eficaz o HBV dos hepatócitos; o vírus, ao infectar uma célula hepática, desloca seu genoma (DNA) para o núcleo da célula do hospedeiro e então, se organiza em pequenos minicírculos de DNA covalentemente fechados (cccDNA), que mantêm a infecção intracelular e servem de molde para a transcrição do RNA-pré-genômico e só são destruídos com a morte dos hepatócitos (FERREIRA; BORGES, 2007).

No Brasil, o tratamento da hepatite B está indicado nas seguintes situações:

- ▶ Idade superior a 2 anos;
- ▶ Presença de AgHBs por mais de seis meses;
- ▶ ALT maior que o dobro do limite da normalidade;
- ▶ Presença de AgHBe ou HBV-DNA maior que  $10^4$  cópias/ml (aproximadamente 2000 UI/ml) (ainda que com a presença do anti-HBe)
- ▶ Biópsia hepática (realizada nos últimos 24 meses) com presença de atividade necro-inflamatória de moderada a intensa ( $\geq A2$ ) e/ou presença de fibrose de moderada a intensa ( $\geq F2$ );
- ▶ Ausência de contraindicação ao tratamento (BRASIL,2008; CHEINQUER, 2008).

### 2.6.1 Tipos de tratamento

Atualmente tem sido descritas seis drogas (divididas em dois grupos) disponíveis para o tratamento da hepatite B crônica: quatro análogos de nucleosídeos/nucleotídeos (lamivudina, adefovir, entecavir, tenofovir); e duas terapias baseadas em interferon (interferon alfa convencional e interferon alfa peguilado). Os análogos de nucleosídeos/nucleotídeos suprimem a replicação viral pela inibição da polimerase viral do HBV, enquanto que a terapia com interferon melhora a resposta imune do hospedeiro (ASPINALL et al, 2011).

Devem-se considerar duas importantes características dos medicamentos antivirais: potência e barreira genética à resistência. A droga ideal é potente e tem uma alta barreira genética à resistência (BHATTACHARYA; THIO, 2010).

### 2.6.2 Terapia baseada em interferon

Os interferons são um grupo de proteínas imunorreguladores sintetizadas por linfócitos T, macrófagos, fibroblastos e outros tipos de células, após estimulação com vírus, antígenos, mitógenos, DNA de dupla fita ou lectinas. Sintetizadas para fins terapêuticos, foram as primeiras terapias aprovadas para o tratamento da infecção pelo HBV. Os interferons aumentam a capacidade dos macrófagos para destruir células tumorais, vírus e bactérias. Bloqueiam a replicação viral, potencializam a atividade lítica das células NK, aumentam a expressão de MHC de classe I nas células infectadas por vírus e induzem o desenvolvimento de células Th1. São capazes de impedir a replicação viral, são anti-proliferativos e induzem febre. Têm um efeito imunomodulatório (INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS, 2012). Além disso, aumentam a soroconversão de AgHBe para anti-HBe, contudo, seu benefício é alcançado em apenas um terço dos pacientes tratados, não tendo sido observadas vantagens no prolongamento do tempo de tratamento (FERREIRA; BORGES, 2007; ASPINALL et al, 2011).

Atualmente temos as formulações interferon  $\alpha$ , interferon  $\alpha$  peguilado e interferon  $\alpha$  2b humano. O interferon  $\alpha$  peguilado tem mostrado uma maior eficácia e uma administração mais fácil, quando comparado com o convencional. A formulação interferon  $\alpha$  2b também tem mostrado bons resultados em pacientes AgHBe positivos, com 50% de soroconversão para anti-HBe. Além dessas formulações, tem sido recentemente descrito o interferon  $\lambda$ , pertencente à classe dos interferons tipo III, contudo pouco se sabe sobre eles. Estudos em células hepáticas murinas mostraram que o interferon  $\lambda$  é capaz de inibir a replicação do HBV com a mesma eficiência do interferon  $\alpha$ . Em humanos, porém, os resultados ainda não estão bem definidos. (INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS, 2012; ROBEK; BOYD; CHISARI, 2005; SADLER; WILLIAMS, 2008). Os interferons são pouco tolerados em função de seus efeitos colaterais severos, que incluem doenças semelhantes à gripe, anorexia, surtos de doenças autoimune, disfunção da tireoide, mielossupressão, surtos de hepatite, descompensação hepática e eventos neuropsiquiátricos adversos como depressão, irritabilidade e eventual tendência ao suicídio (LAM et al, 2011).

### 2.6.3 Análogos de nucleotídeo/nucleosídeo

Os análogos de nucleotídeos/nucleosídeos atingem seletivamente a DNA polimerase, suprimindo a carga viral, facilitando soroconversão do AgHBe, alcançando a normalização das aminotransferases e melhorando a fibrose hepática como consequência do clareamento do vírus. Boa parte dessas drogas foi inicialmente criada para o tratamento de pacientes HIV positivos. Só posteriormente, quando se descobriu que a DNA polimerase do HBV funciona como uma transcriptase reversa, começaram a ser usados por pacientes infectados com esse vírus. A duração da terapia depende principalmente da soroconversão do AgHBe para o anti-HBe e do AgHBs para o anti-HBs, podendo durar de seis meses até cinco anos. Em geral são bem tolerados pelos pacientes e eventos adversos severos são raramente encontrados (WIENS; CORRER; PONTAROLO, 2010; LAM et al, 2011).

As vantagens do uso dos análogos de nucleotídeos/nucleosídeos incluem disponibilidade oral e alta aceitabilidade pelos pacientes, controle precoce da hepatite (queda do ALT) e uma considerável melhoria na histologia do fígado; essa última incluindo a interrupção ou reversão parcial da fibrose se a supressão viral puder ser mantida. As desvantagens são taxas relativamente baixas de resposta sustentada pós-tratamento (por isso uma terapia prolongada é requerida para a maioria dos casos) e uma alta taxa de resistência à droga. Essa resistência é frequentemente seguida por um recomeço da atividade da hepatite (FARRELL; TEOH, 2006).

#### 2.6.3.1 Lamivudina

A lamivudina era, originalmente, usada em pacientes HIV positivos. Foi aprovado pela United States Food and Drugs Administration (FDA) em 1998, como o primeiro análogo de nucleosídeo para o tratamento da hepatite B crônica. Lamivudina é incorporada na cadeia crescente de DNA durante a transcrição reversa da primeira cadeia de DNA e síntese da segunda, resultando na inibição da síntese de HBV-DNA (LAM et al, 2011). A lamivudina é efetiva em suprimir a replicação viral tanto em pacientes AgHBe positivos como em pacientes AgHBe negativos e está associada com melhora histológica, soroconversão do AgHBe e normalização da ALT (BHATTACHARYA; THIO, 2010).



O maior problema da terapia por longo tempo com esse medicamento é a resistência à droga. A lamivudina tem uma baixa barreira genética à resistência (a menor entre as drogas atuais), desenvolvendo a resistência com uma mutação. Em função disso, não se recomenda o uso de lamivudina em monoterapia como primeira escolha para tratamento da hepatite crônica B, tanto em pacientes AgHBe positivos como nos negativos. Seu uso concentra-se em tratamentos de curto-prazo, como proteção contra reativação durante quimioterapia, último trimestre de gravidez em gestantes com carga viral alta (em geral maior que 100 milhões de cópias/mL) ou hepatite fulminante pelo HBV, apesar de não ser comprovada ainda a eficácia nessa última situação (CHEINQUER, 2008; BHATTACHARYA; THIO, 2010).

#### 2.6.3.2 Adefovir

Trata-se de um análogo de nucleotídeo (adenosina) que age inibindo a transcriptase reversa do HBV. É potencialmente nefrotóxica. Pacientes AgHBe positivos, após um ano de tratamento com essa droga, apresentaram melhora histológica, redução nos níveis séricos de HBV-DNA e elevados índices de soroconversão do AgHBe. Quando se prolonga o tratamento acima de um ano, os benefícios da terapia com essa droga são ainda maiores (FERREIRA; BORGES, 2007).

O adefovir possui uma baixa potência e uma barreira genética à resistência mediana. Seu uso em monoterapia deve ser mantido apenas nos pacientes que alcançam a negativação do HBV-DNA ao final de 48 semanas de tratamento (CHEINQUER, 2008). Pode ser usado em conjunto com lamivudina quando o paciente apresenta resistência a este medicamento (LAM et al, 2011).

#### 2.6.3.3 Entecavir

O entecavir é um análogo de nucleosídeo (guanossina) que inibe três passos da replicação do HBV: a iniciação da DNA polimerase do HBV; a transcrição reversa da fita negativa do HBV-DNA a partir do RNA mensageiro pré-genômico; e a síntese da fita positiva do HBV-DNA. É o mais potente antiviral entre os atuais análogos de nucleosídeos/nucleotídeos aprovados para uso em pacientes com hepatite B crônica, além de

possuir uma alta barreira genética, necessitando de três mutações para que o paciente desenvolva resistência à droga (CHEINQUER, 2008; BHATTACHARYA; THIO, 2010).

Após quatro anos de tratamento com entecavir, em pacientes que não receberam análogos de nucleosídeos/nucleotídeos anteriormente, menos de 1% dos pacientes apresentaram resistência ao medicamento (WIENS; CORRER; PONTAROLO, 2010; LAM et al, 2011).

O entecavir mostrou-se ativo não só em pacientes AgHBe positivos, como também em pacientes AgHBe negativos e em pacientes resistentes à lamivudina (FERREIRA;BORGES, 2007; LAM, 2011).

#### 2.6.3.4 Tenofovir

O tenofovir disoproxil fumarato foi inicialmente aprovado para o tratamento da infecção pelo HIV. Ele é fosforilado em sua forma ativa, liga-se diretamente com a DNA polimerase do HBV e assim suprime a replicação viral (LAM, 2011).

O tenofovir é estruturalmente similar ao adefovir, contudo é menos nefrotóxico, o que permite que seja administrado em doses maiores, aumentando a eficácia. Muitos estudos demonstram uma boa eficácia do tenofovir em pacientes com resistência à lamivudina, no entanto tem menor potência em pacientes com resistência ao adefovir (LOK; MCMAHON, 2007).

Assim, como o entecavir, o tenofovir apresenta uma alta potência e boa barreira genética à resistência (BHATTACHARYA; THIO, 2010).

## 2.7 PREVENÇÃO

Além de hábitos pessoais e conduta social de auto-preservação e não contato com fluidos biológicos/corpóreos de indivíduos infectados pelo vírus, outras recomendações são amplamente divulgadas.

A vacina contra a hepatite B é a medida preventiva mais efetiva em populações adultas com fatores de risco e também é eficiente em prevenir a infecção pelo vírus Delta. Estas

vacinas induzem a formação somente de anti-HBs. Desde 1998, o Programa Nacional de Imunizações (PNI), do Ministério da Saúde, recomenda que crianças, a partir do seu nascimento, sejam vacinadas contra a Hepatite B. A primeira dose deve ser aplicada nas primeiras 12-24h de vida, o que resulta numa elevada eficácia na prevenção da transmissão vertical. O esquema de vacinação consiste em três doses intramusculares nos tempos zero, um mês e seis meses. Até 2011, a idade máxima para receber a vacina pelo SUS era 24 anos. Em 2012, essa faixa etária foi ampliada para 29 anos (SÃO PAULO, 2006; BRASIL, 2010).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil linfocitário em sangue periférico de indivíduos durante a infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar e comparar o perfil linfocitário em sangue periférico de indivíduos com hepatite B crônica com o de indivíduos saudáveis.

Avaliar o efeito da carga viral no perfil linfocitário.

Avaliar o efeito do tratamento no perfil linfocitário.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 ASPECTOS ÉTICOS**

O sub-projeto cadastrado no SISNEP foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia (Anexo A) e foi realizado em cumprimento às exigências éticas. Todos os participantes deste estudo, cadastrados na Unidade de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), foram informados dos objetivos do projeto e ao concordarem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B) foram incluídos como voluntários neste estudo.

### **4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO, COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS**

Neste estudo transversal, foram incluídos pacientes na faixa etária de 18 a 65 anos, atendidos no Ambulatório da Unidade de Gastro-Hepatologia do HUPES/UFBA. Dados clínicos e laboratoriais foram extraídos do prontuário e transferidos a uma planilha com códigos.

Além disso, 41 voluntários com sorologia negativa para HBV, HCV, HIV, HTLV, foram selecionados para compor o grupo controle.

Amostra de 4 ml de sangue foi coletada de forma estéril (em tubos com EDTA), a vácuo, por profissional capacitado e habilitado para a análise do perfil linfocitário e atualização de marcadores sorológicos para hepatite B.

### **4.3 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES VOLUNTÁRIOS**

Foram incluídos neste estudo, pacientes monoinfectados para HBV que, atendidos no ambulatório de Gastro-Hepatologia da HUPES/UFBA, foram indicados, pelos hepatologistas clínicos do setor, para exame de carga viral (resultado disponível no prontuário do paciente). Para compor o grupo controle, foram incluídos voluntários com sorologia negativa para HBV.

Foram excluídos do presente estudo indivíduos positivos para HCV, HIV, HTLV, sífilis, doença de Chagas, mulheres grávidas ou ainda que relatassem uso de anti-inflamatório e corticoide na semana anterior à coleta, ou de outras medicações que pudessem induzir alteração linfocitária.

Dados clínicos e laboratoriais adicionais dos voluntários sobre o tratamento e quanto à carga viral foram obtidos do prontuário do paciente.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DOS LEUCÓCITOS TOTAIS E DO PERFIL LINFOCITÁRIO

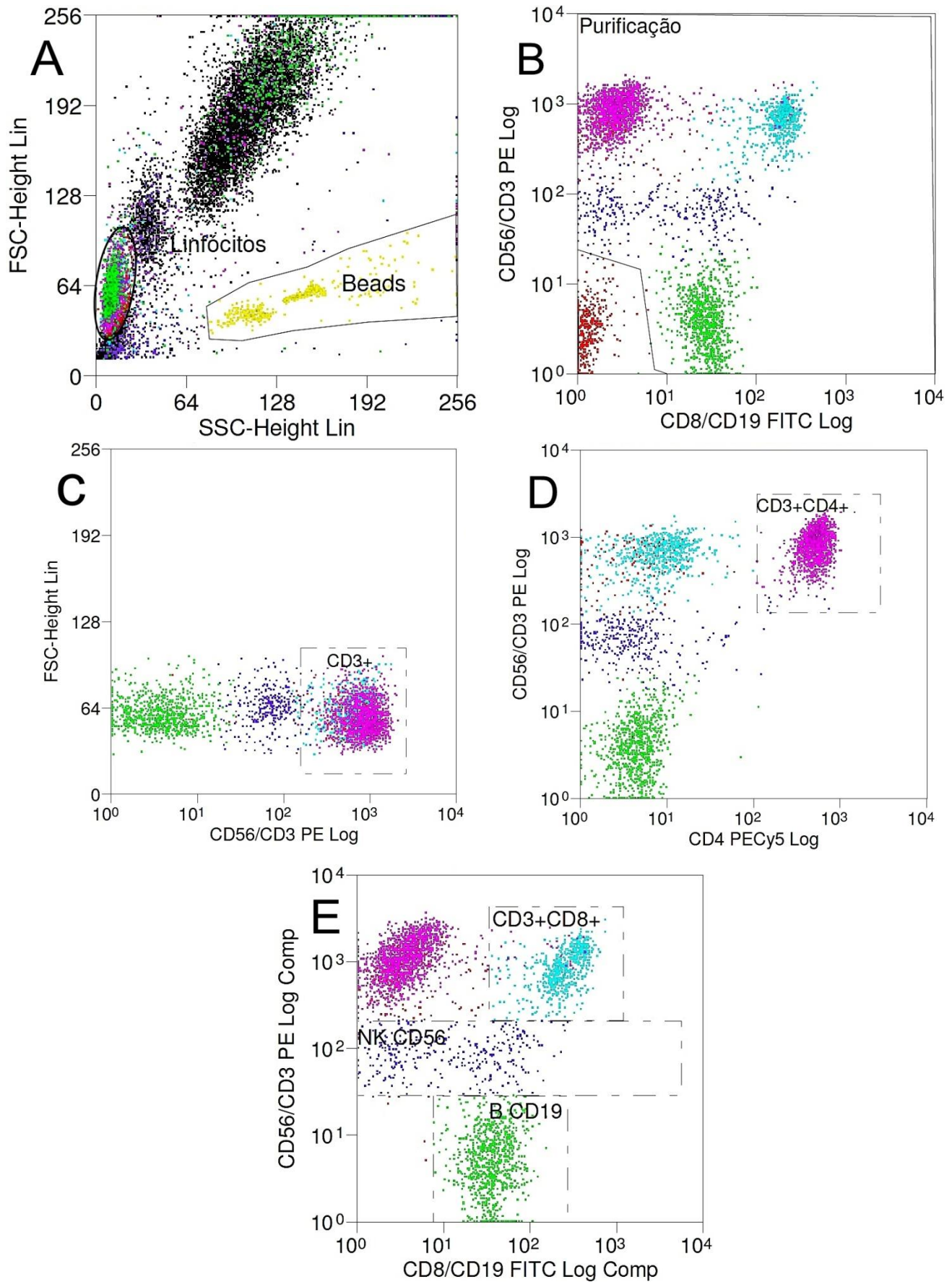
Além da contagem leucocitária total realizada por citômetro automatizado (Wiener lab. Counter 19), foi também realizada a contagem linfocitária pela análise imunofenotípica por citometria de fluxo (FACSCalibur – BD, software Cell Quest), utilizando o kit de reagentes de imunofluorescência direta de três cores, Lymphogram<sup>®</sup> e Perfect-Count Microspheres<sup>®</sup> (Cytognos-Espanha), obtendo-se valores relativos e absolutos.

O Lymphogram<sup>®</sup> é um reagente composto por anticorpos monoclonais contra os antígenos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD19, os quais são conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (CD8 e CD19), ficoeritrina (PE) (CD3 e CD56) e ficoeritrina-cianina-5 (PECy5) (CD4), possibilitando a identificação das populações de linfócitos T Totais e subpopulações (células T auxiliares e células T citotóxicas), células NK e linfócitos B simultaneamente (no mesmo tubo). A diferença de expressão dos antígenos torna possível a distinção dos subtipos celulares.

O Perfect-Count Microspheres<sup>®</sup> é um reagente composto por microesferas usadas na contagem absoluta dos subtipos celulares.

A figura 5 exemplifica como é realizada a identificação das células após a marcação com o Lymphogram<sup>®</sup>.

**Figura 6:** Gráficos dot plot para identificação dos subtipos linfocitários.



Inicialmente, seleciona-se a população de interesse (no caso, linfócitos) através de um gráfico dot plot baseando-se nas informações de tamanho e granulosidade obtidas nesse gráfico (figura 6A). A população selecionada é representada em um novo gráfico (gráfico de purificação), no qual se excluiu células não marcadas pelos monoclonais (retângulo interno menor) (figura 6B). Após esse passo, construiu-se novos gráficos para a distinção e contagem relativa de cada subtipo celular (figura 6C, 6D e 6E). As células marcadas por cada monoclonal exibem, em escala logarítmica, cores e intensidade de fluorescência distintas, permitindo a discriminação das subpopulações linfocitárias.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL

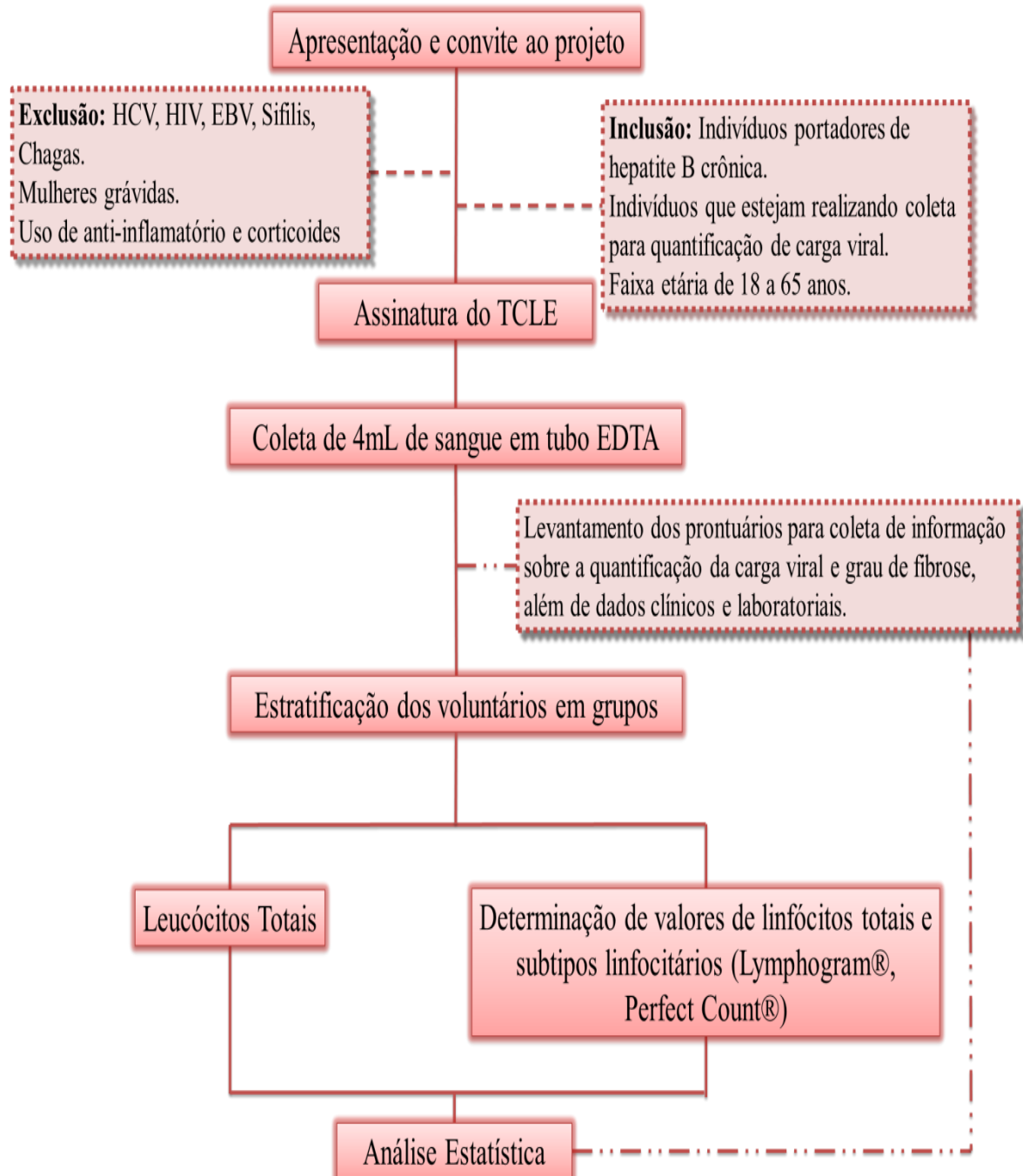
A coleta para a quantificação da carga viral foi realizada juntamente com a coleta para a marcação celular e a amostra foi encaminhada para o Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz (LACEN-BA), sendo utilizado método PCR Real Time e o resultado foi disponibilizado no prontuário do paciente.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise estatística descritiva. Adicionalmente uma análise estatística foi realizada utilizando-se os softwares SPSS versão 18 e GraphPad versão 5, ambos para Windows. Todos os dados estão apresentados em tabela com mediana e percentis 25-75%. O nível de significância adotado para este estudo foi de 5%. Foram realizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (pós-teste de Dunn) para comparar os grupos entre si.



## 4.7 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estudados 50 indivíduos infectados pelo HBV, com idade média de 40,12 (18-64 anos), sendo 29 (58%) homens e 21 (42%) mulheres. O grupo controle foi composto por 41 indivíduos, com idade média de 35 (21-58 anos), sendo 17 homens e 24 mulheres (tabela 1).

Dos 50 pacientes, 18 (36 %) estavam sob tratamento com antiviral (tabela 2) no momento da coleta; 33 (66%) possuíam carga viral abaixo ou igual a 2000 UI/mL e 17 (34%), acima desse valor (recomendado pelo Ministério da Saúde para se iniciar tratamento) (tabela 3).

**Tabela 1:** Características dos indivíduos infectados com Hepatite B.

	Indivíduos com Hepatite B		
	Total	Com carga viral abaixo de 2000UI/mL	Com carga viral acima de 2000UI/mL
<b>N</b>	50	33	17
<b>Sexo (homens/mulheres)</b>	(29/21)	(17/16)	(12/5)
<b>Idade<sup>1</sup></b>	40,12±12,2	41,48±11,3	37,47±13,7
<b>Presença de AgHBe</b>	4	3	1
<b>AST (U/L)<sup>1</sup></b>	39,92±24,7	36,01±17,6	31,27±7,8
<b>ALT (U/L)<sup>1</sup></b>	39,33±19,2	40,43±21,3	33,02±11,6
<b>GGT (U/L)<sup>1</sup></b>	49,77±50,5	55,38±56,2	32,00±19,7

<sup>1</sup>Média e desvio padrão.

**Tabela 2:** Drogas antivirais usadas pelos pacientes.

<b>Droga</b>	<b>N</b>
Entecavir	08
Tenofovir	05
Adefovir e Lamivudina	05
<b>Total</b>	<b>18</b>

**Tabela3:** Relação entre o tratamento e a carga viral.

Tratamento	Carga Viral		Total
	Abaixo de 2000 UI/mL	Acima de 2000 UI/mL	
Não	16	16	<b>32</b>
Sim	17	01	<b>18</b>
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>17</b>	<b>50</b>

Os resultados do leucograma e da contagem linfocitária estão esquematizados nas tabelas 4, 5 e 6.

**Tabela 4:** Contagem absoluta e relativa dos leucócitos totais e subtipos linfocitários dos indivíduos infectados e saudáveis (mediana e percentis 25-75%).

N	Indivíduo com Hepatite B		Grupo Controle	Valor de <i>P</i>
	50		41	
<sup>1</sup> Leucócitos Totais (x10 <sup>3</sup> /μL)	6,55 (5,12-7,40)		6,10 (5,60-7,63)	0,8952
<sup>2</sup> Linfócitos T (%)	68,65 (61,41-74,68)		75,18 (68,18-80,27)	0,0002*
CD3+ (Céls./μL)	1195 (795,5-1678)		1578 (1323-2017)	0,0019*
<sup>2</sup> Linfócitos T (%)	40,61 (32,50-46,86)		41,86 (38,65-49,73)	0,0760
CD4+ (Céls./μL)	666,3 (450,6-964,5)		918,7 (734,5-1090)	0,0068*
<sup>2</sup> Linfócitos T (%)	19,91 (15,65-27,40)		26,46 (21,87-31,32)	0,0011*
CD8+ (Céls./μL)	354,1 (200,1-565,7)		535,1 (410,1-800,6)	0,0014*
<sup>2</sup> Células NK (%)	16,87 (11,11-25,29)		13,55 (10,14-16,64)	0,0219*
(Céls./μL)	284,2 (184,0-459,8)		286,1 (150,5-448,6)	0,5446
<sup>2</sup> Linfócitos B (%)	13,92 (10,37-16,70)		11,85 (7,72-15,53)	0,0538
(Céls./μL)	237,0 (160,6-332,7)		215,1 (165,9-346,0)	0,9226
Relação CD4/CD8	2,01 (1,57-2,58)		1,67 (1,26-2,12)	0,0449*

\*Estatisticamente significativa (teste de Mann-Whitney)

<sup>1</sup>Citômetro automatizado (Wiener lab. Counter 19), <sup>2</sup>Lymprogram® e Perfect Count®.

**Tabela 5:** Contagem absoluta e relativa dos subtipos linfocitários dos indivíduos não tratados, tratados (mediana e percentis 25-75%) (teste de Mann-Whitney).

N	Indivíduos com Hepatite B		Valor de <i>P</i>
	Não tratados	Tratados	
N	32	18	
<sup>1</sup> Leucócitos Totais (x10 <sup>3</sup> /μL)	6,55 (5,40-7,77)	6,35 (4,60-7,30)	0,2884
<sup>2</sup> Linfócitos T (%)	69,99 (62,65-75,10)	65,50 (51,00-70,70)	0,1502
CD3+ (Céls./μL)	1241 (832,8-1741)	1118 (754,1-1565)	0,3834
<sup>2</sup> Linfócitos T (%)	41,27 (35,98-47,21)	38,75 (29,55-45,42)	0,1789
CD4+ (Céls./μL)	757,1 (521,1-1022)	618,9 (408,0-855,9)	0,2353
<sup>2</sup> Linfócitos T (%)	19,34 (15,69-28,29)	21,16 (15,58-25,69)	0,8501
CD8+ (Céls./μL)	365,8 (208,7-529,8)	343,1 (212,9-641,9)	0,9414
<sup>2</sup> Células NK (%)	15,63(10,99-19,96)	18,94 (11,59-33,86)	0,1387
(Céls./μL)	284,2 (206,5-359,6)	260,0 (162,1-334,8)	0,5218
<sup>2</sup> Linfócitos B (%)	14,15 (9,47-17,29)	12,65 (10,43-15,71)	0,8583
(Céls./μL)	236,5 (164,6-340,4)	260,0 (162,1-334,8)	0,9749
Relação CD4/CD8	2,18 (1,34-2,89)	1,96 (1,60-2,16)	0,1892

<sup>1</sup>Citômetro automatizado (Wiener lab. Counter 19), <sup>2</sup>Lymprogram® e Perfect Count®.

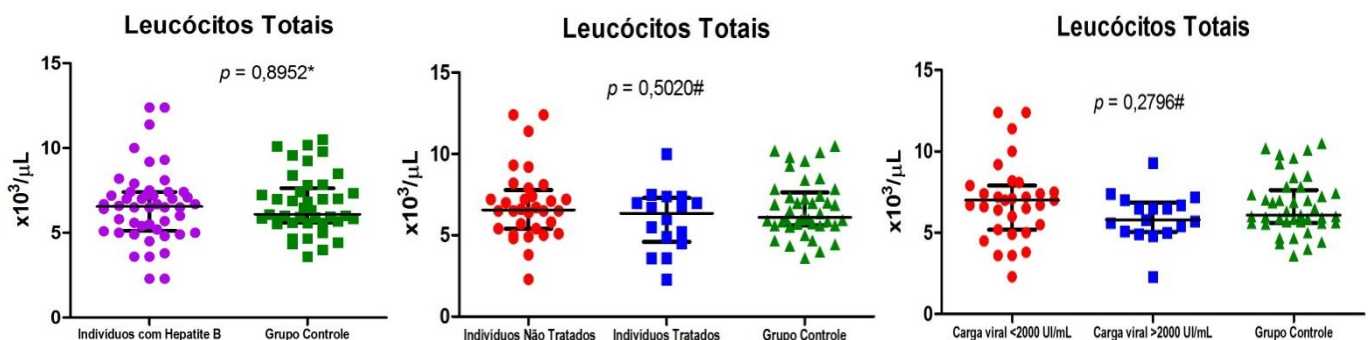
**Tabela 6:** Contagem absoluta e relativa dos subtipos linfocitários dos indivíduos com carga viral abaixo e acima de 2000 UI/mL (mediana e percentis 25-75%) (teste de Mann-Whitney).

	Indivíduos com Hepatite B		Valor de <i>P</i>
	Carga viral <2000 UI/mL	Carga viral >2000 UI/mL	
N	30	13	
<sup>1</sup> Leucócitos Totais (x10 <sup>3</sup> /μL)	7,00 (5,20-7,90)	5,80 (5,05-6,85)	0,1203
<sup>2</sup> Linfócitos T (%)	67,72 (61,09-71,52)	73,77 (59,31-78,36)	0,1502
CD3+ (Céls./μL)	1210 (743,8-1692)	1128 (795,0-1612)	0,6976
<sup>2</sup> Linfócitos T (%)	43,16 (31,75-46,95)	39,94 (33,89-47,80)	0,9916
CD4+ (Céls./μL)	691,3 (431,8-1116)	643,2 (485,0-914,3)	0,6516
<sup>2</sup> Linfócitos T (%)	19,89(15,69-24,39)	18,43 (15,31-32,20)	0,9247
CD8+ (Céls./μL)	361,3 (210,1-599,5)	327,9 (192,8-521,6)	0,5355
<sup>2</sup> Células NK (%)	17,08 (11,64-25,04)	15,27 (10,91-22,56)	0,4067
(Céls./μL)	334,3 (182,8-478,5)	270,8 (167,8-321,2)	0,1502
<sup>2</sup> Linfócitos B (%)	14,17 (10,73-16,68)	13,16 (9,24 -16,16)	0,4309
(Céls./μL)	261,9 (166,3-374,1)	205,6 (147,1-314,2)	0,2523
Relação CD4/CD8	2,00 (1,63-2,46)	2,17 (1,17-3,06)	0,8254

<sup>1</sup>Citômetro automatizado (Wiener lab. Counter 19), <sup>2</sup>Lymprogram® e Perfect Count®.

Não foram encontradas diferenças estatísticas no perfil de células imunes entre as populações de indivíduos não tratados e tratados e entre os indivíduos com carga viral abaixo e acima de 2000 UI/mL (tabelas 3 e 4). Em um estudo com 31 pacientes cronicamente infectados com o HBV, na Índia, Mukherjee e colaboradores (2010) também não encontraram diferenças estatísticas quando compararam o perfil linfocitário de indivíduos com carga viral abaixo e acima de 2000 UI/mL. Contudo, alguns estudos demonstram haver uma forte associação entre o perfil de linfócitos e a carga viral, na qual, quanto mais elevada esta for, maior o decréscimo de linfócitos T e suas subpopulações (YOU et al, 2008b; GU et al, 2009). You e colaboradores (2008c) também demonstraram haver uma associação entre o tratamento e o perfil linfocitário. Esses autores acompanharam 55 pacientes crônicos B durante tratamento com Entecavir e observaram que houve uma melhora do perfil das células T totais, células T auxiliares e células T citotóxicas. Eles sugerem que essa melhoria é uma consequência da supressão da replicação, ocasionada pelo medicamento.

**Figura 7:** Contagem absoluta dos leucócitos totais. Citômetro automatizado (Wiener lab. Counter 19).

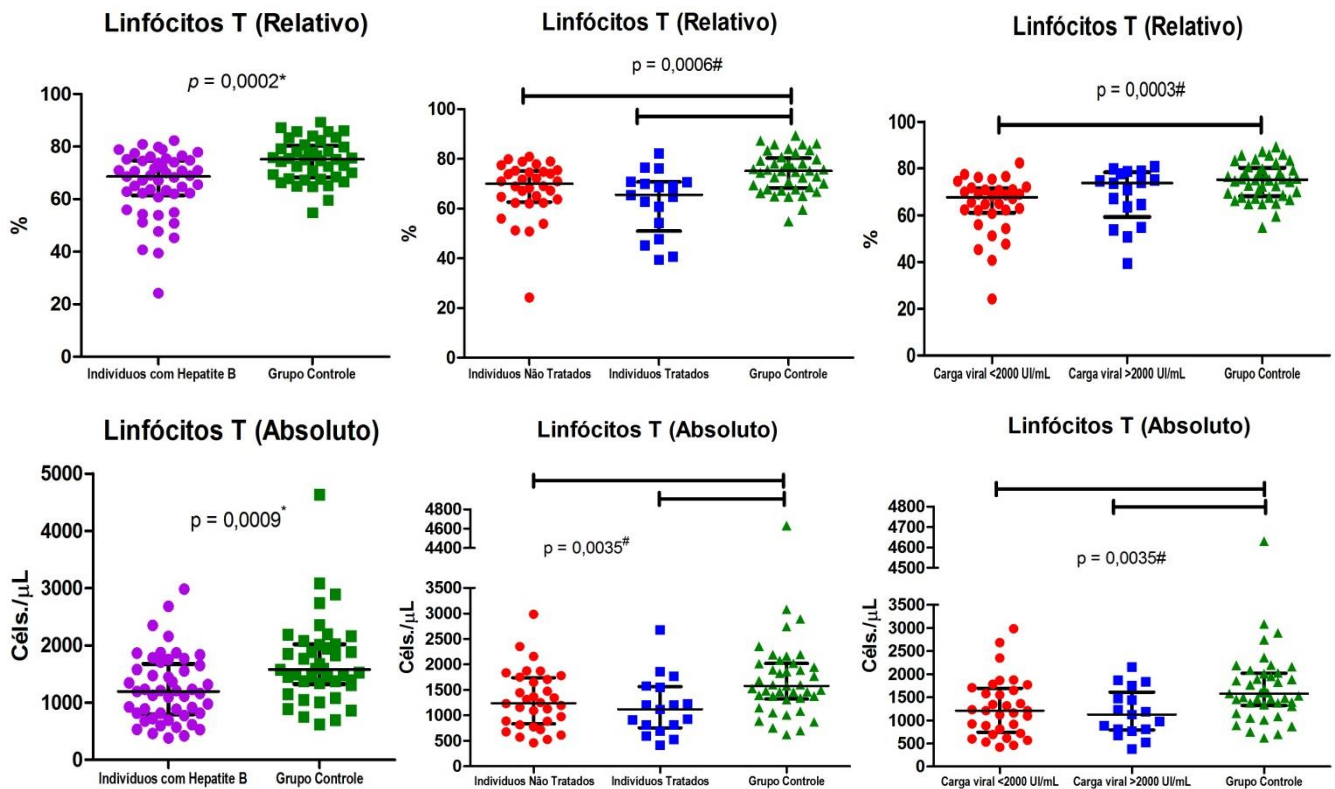


\*Valor *p* encontrado no teste de Mann-Whitney. # Valor *p* encontrado no teste de Kruskal-Wallis.

Também não foram encontradas diferenças estatísticas, para os leucócitos totais (figura 7), entre as populações estudadas. Os resultados encontrados apresentam-se dentro da faixa de referência considerada pela maioria dos laboratórios de análises clínicas ( $4-10 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), apesar de se apresentarem um pouco mais elevados que o valor encontrado por Cao, Qiu e Li (2011) em pacientes com hepatite B crônica na China.

Como mostra a figura 8, foram encontrados valores menores na população de linfócitos T totais (CD3+) dos pacientes crônicos B quando comparados com o grupo controle, sugerindo haver uma carência de células T em indivíduos com hepatite B crônica. De fato, estudos indicam haver uma supressão de células T nesses pacientes, revelando uma deficiência nas células imunes envolvidas na reação contra a infecção pelo HBV, causando a cronicidade da infecção (YOU et al, 2008a). Um decréscimo de células T totais, em relação a populações saudáveis, também foi observado nos estudos de Liu e colaboradores (2010), You e colaboradores (2009) (apesar do valor relativo de Linfócitos T ser menor que o aqui encontrado) e de Cao, Qiu e Li (2011), cujo valor das células T foi maior que o encontrado neste estudo.

**Figura 8:** Contagem relativa e absoluta dos linfócitos T totais. Lymphogram® e Perfect Count®.



\* Valor  $p$  encontrado no teste de Mann-Whitney. # Valor  $p$  encontrado no teste de Kruskal-Wallis.

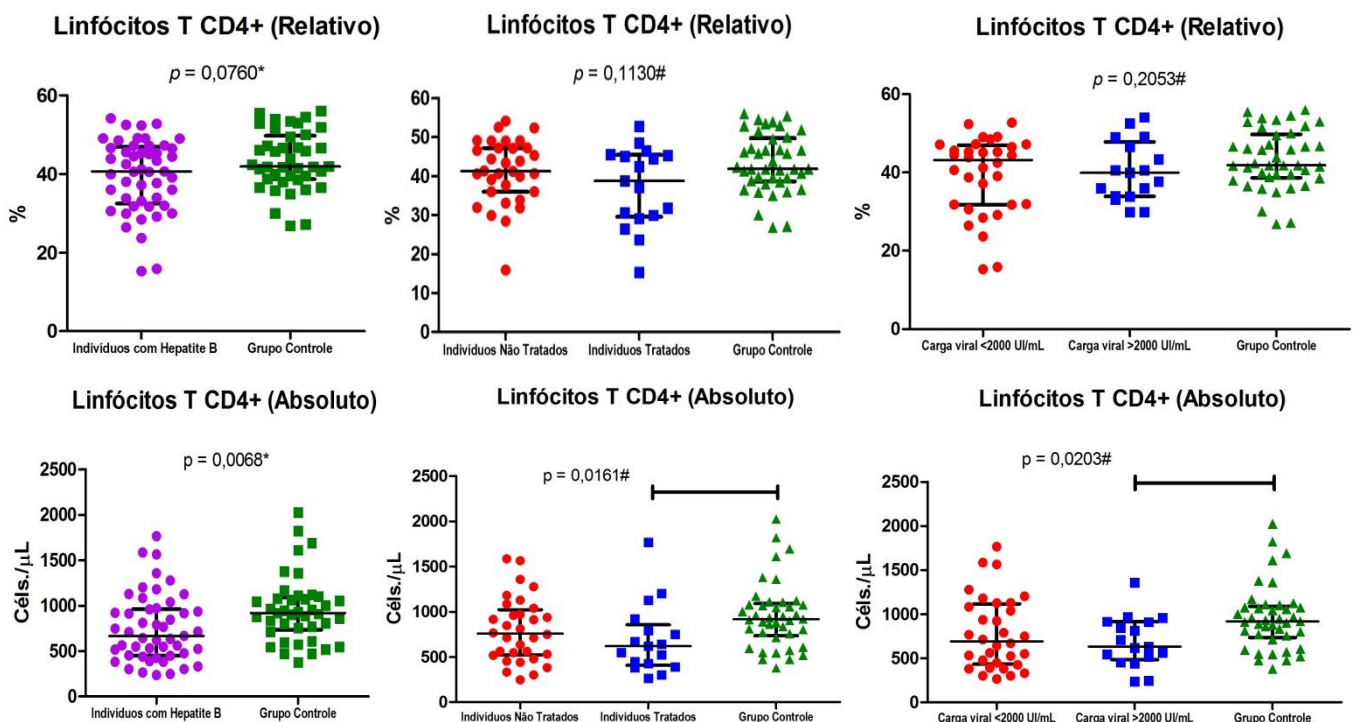
Valores menores de linfócitos T CD3+ de indivíduos com carga viral abaixo de 2000 UI/mL foram encontrados quando comparados com o grupo controle. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Mukherjee e colaboradores (2010). Estes autores também encontraram diferença estatística em indivíduos com carga viral acima de 2000 UI/mL e indivíduos saudáveis, o que não foi observado neste estudo. Os valores relativos dos linfócitos T totais aqui encontrados também foram semelhantes aos encontrados por esses autores.

Tanto os valores relativos como absolutos dos linfócitos T totais dos grupos de indivíduos não tratados e tratados foram menores quando comparados com o grupo controle (figura 8).

Os valores absolutos de linfócitos T, tanto para a população total de crônicos B, como para os subgrupos, foram menores que os encontrados por Torres e colaboradores (2009) e por Andreu-Ballester e colaboradores (2012), ambos em indivíduos saudáveis, reforçando a ideia de uma supressão dessas células em indivíduos com hepatite B.

Em indivíduos com hepatite B, os valores absolutos encontrados por Cao, Qiu e Li (2011) foram semelhantes aos encontrados neste estudo, quando comparados com os grupos “tratados”, “carga viral abaixo de 2000 UI/mL” e “carga viral acima de 2000 UI/mL”. Os grupos “não tratados” e a população total de infectados tiveram resultados maiores do que os encontrados por esses autores.

**Figura 9:** Contagem relativa e absoluta dos linfócitos T auxiliares. Lymprogram® e Perfect Count®.



\* Valor  $p$  encontrado no teste de Mann-Whitney. # Valor  $p$  encontrado no teste de Kruskal-Wallis.

Não foram encontradas diferenças estatísticas para os valores relativos de linfócitos T auxiliares (CD4+) (figura 9), o que também foi observado por Mukherjee e colaboradores (2010). Esse autor comparou os indivíduos crônicos B com os saudáveis e depois separou os infectados por carga viral (acima e abaixo de 2000 UI/mL), comparando cada grupo com os indivíduos controle, não achando diferença estatística entre eles.

Ainda assim, os valores relativos encontrados neste estudo foram maiores que os encontrados por You e colaboradores (2008a) e por Liu e colaboradores (2010), que observaram uma diminuição de linfócitos T CD4+ em pacientes com hepatite B crônica, quando comparados com indivíduos saudáveis. Segundo esses autores, as células T auxiliares possuem um papel fundamental no controle da resposta imune. Uma deficiência na resposta imunológica dessas células pode prejudicar a atividade das células T citotóxicas (CD8+) e a produção de anticorpos, impedindo assim o clareamento do vírus, levando à cronicidade da infecção. Liu e colaboradores (2010) também observaram que indivíduos com hepatite B aguda possuíam níveis maiores de linfócitos T CD4+ (comparados com indivíduos crônicos) e melhores prognósticos da doença, confirmando a importância dessas células para o clareamento viral.

No presente estudo, o valor absoluto dos linfócitos T auxiliares nos indivíduos crônicos foi menor que nos indivíduos saudáveis, resultado também encontrado por Cao, Qiu e Li (2011).

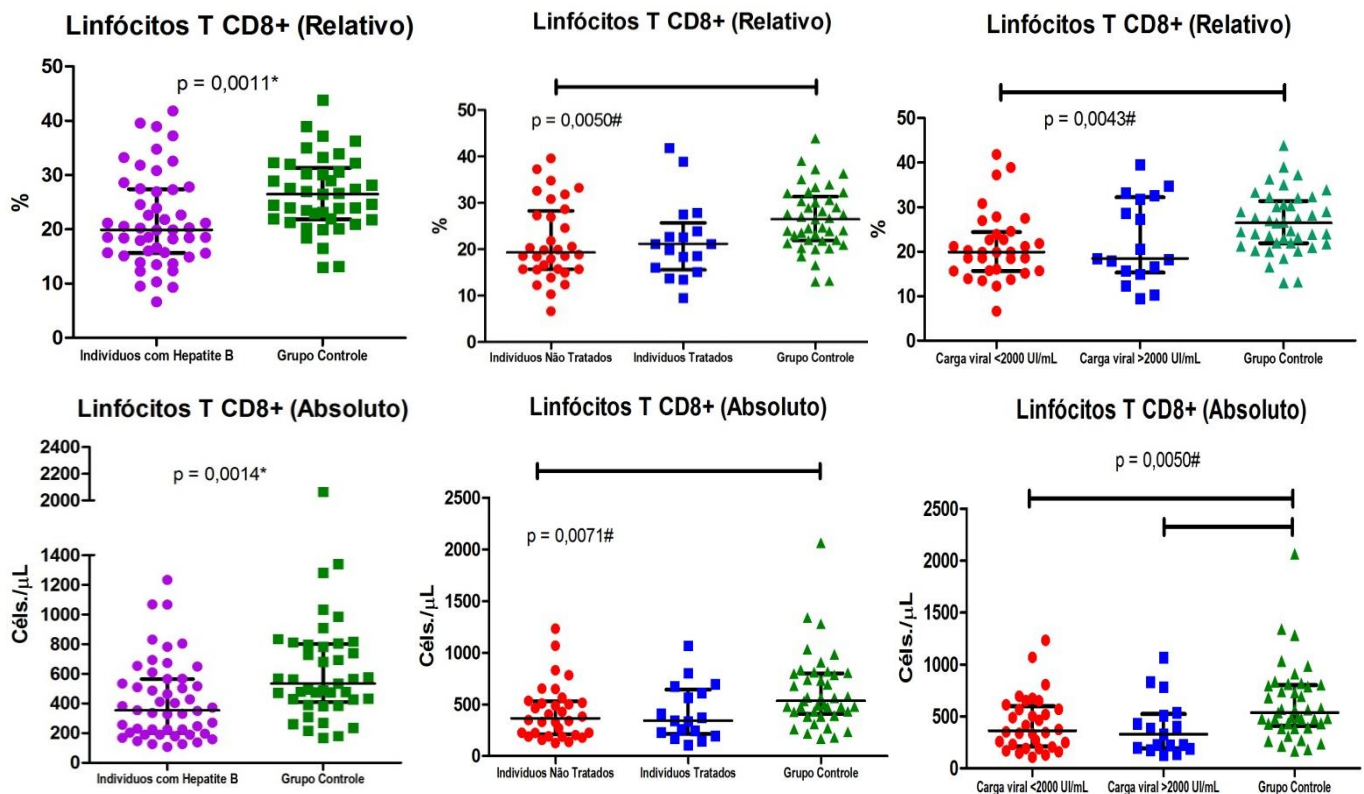
Observou-se também que indivíduos tratados e aqueles com carga viral acima de 2000 UI/mL obtiveram valores menores para as células T CD4+, quando comparados com o grupo controle. Pacientes que precisam ser tratados e pacientes com altos títulos de carga viral se encontram com a doença ativa, o que pode explicar o decréscimo de células T CD4+ nesses indivíduos.

Observaram-se valores mais baixos nos níveis de linfócitos T CD8+, dos indivíduos infectados pelo HBV, em relação ao grupo controle (figura 10), o que também foi observado por Cao, Qiu e Li (2011) e por Mukherjee e colaboradores (2010), em contraste com You e colaboradores (2008a, 2009) e Liu e colaboradores (2010), que encontraram um aumento de linfócitos T CD8+ em pacientes infectados pelo HBV.

Os linfócitos T CD8+ desempenham uma função essencial no clareamento viral e na patogênica da doença hepática. Eles reconhecem e direcionam as células novas que exibem antígenos virais sintetizados endogenamente, apresentados por moléculas de MHC classe I.

Em pacientes agudos, detecta-se uma vigorosa e policlonal resposta de células T CD8+, que leva ao clareamento viral. Em pacientes crônicos, contudo, essa resposta é fraca, havendo um aumento de células T supressoras, levando à sustentação e persistência da infecção. No fígado desses pacientes, podem ser encontradas células T CD8+ vírus-específicas, que contribuem para a patogenia da doença, porém, funcional e quantitativamente são incapazes de resolver a infecção (LIU et al, 2010; CHISARI; ISOGAWA; WIELAND, 2010).

**Figura 10:** Contagem relativa e absoluta dos linfócitos T citotóxicas. Lymprogram® e Perfect Count®.



**Figura 10:** Contagem relativa e absoluta dos linfócitos T citotóxicas. Lymprogram® e Perfect Count®.

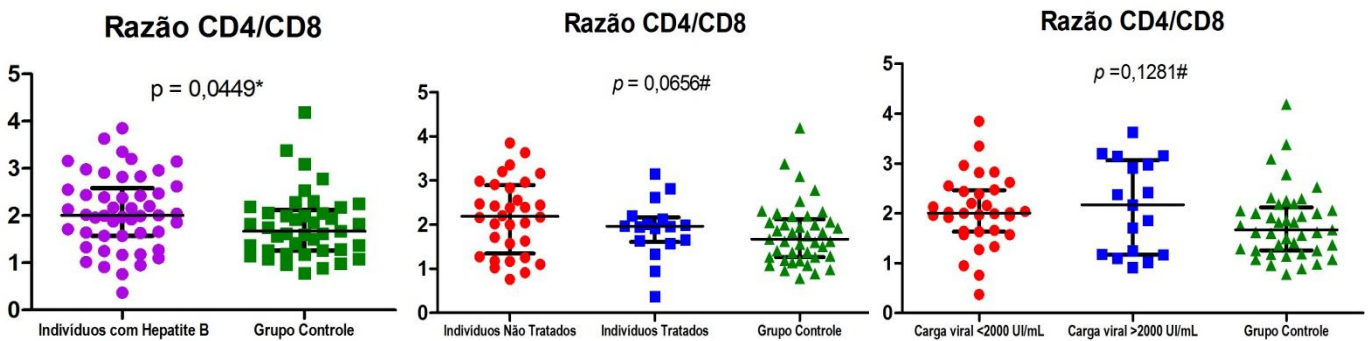
Como já citado anteriormente, as células T auxiliares promovem através de ativação a resposta de células T citotóxicas contra o HBV. A diminuição destas células pode estar influenciando nos baixos valores de células T CD8+ aqui encontrados. Além disso, a diminuição das células T auxiliares e, principalmente, das células T citotóxicas podem explicar o decréscimo das células T totais no pacientes com hepatite B crônica.

A razão entre os linfócitos T auxiliares e T citotóxicos se refere à proporção entre esses dois tipos celulares. No presente estudo, a razão foi maior na população infectada pelo HBV em comparação aos indivíduos saudáveis (figura 11), sendo caracterizada por uma proporção de 2:1, ou seja, o número de células T CD4+ é o dobro do número de células T CD8+. Tem sido descrita na literatura uma inversão dessa razão (ou seja, uma diminuição das



células T CD4+ e um aumento nas células T CD8+) You et al, (2008c), contudo, isto não foi observado neste estudo. Nos resultados encontrados por You e colaboradores (2009) e por Cao, Qiu e Li (2011) também não foi observada essa inversão, apesar dos valores encontrados por esses autores ainda serem menores (proporção de 1:1) do que os do presente estudo.

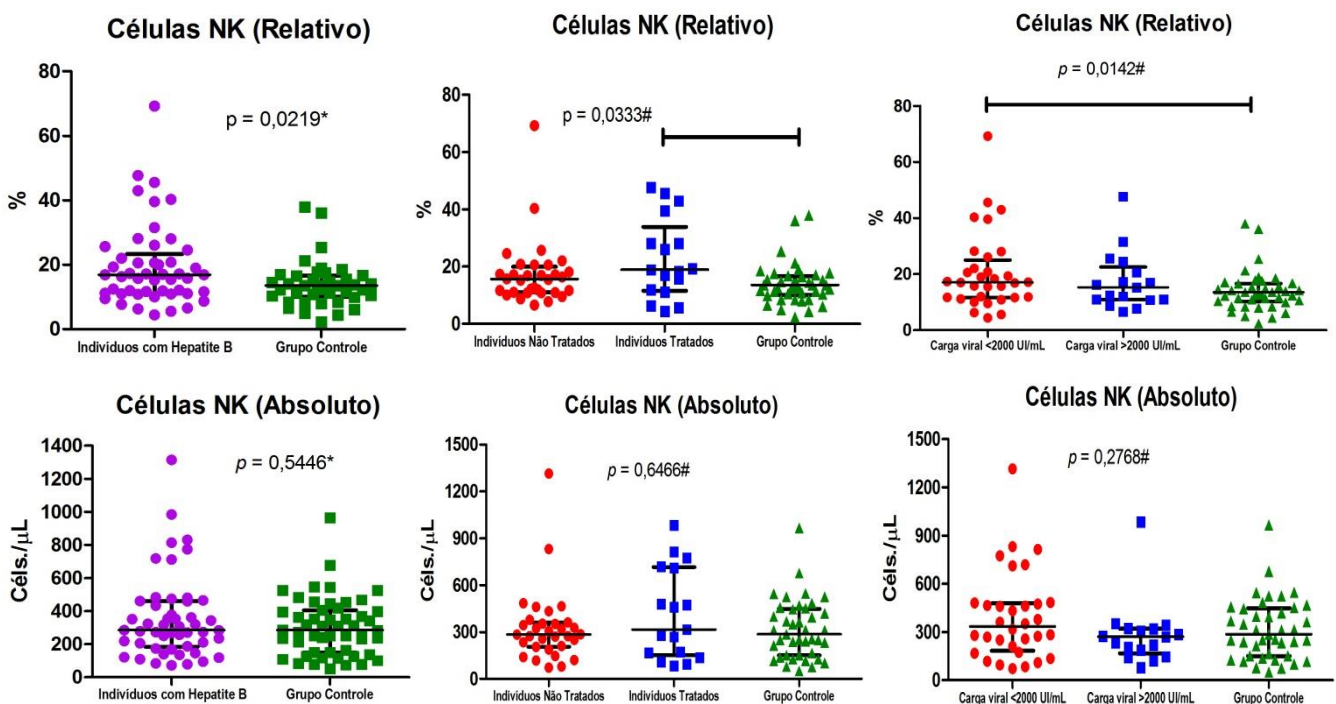
**Figura 11:** Razão entre os linfócitos T auxiliares e os linfócitos T citotóxicos. Lymprogram® e Perfect Count®.



\* Valor  $p$  encontrado no teste de Mann-Whitney. # Valor  $p$  encontrado no teste de Kruskal-Wallis.

Células NK (CD56+) geralmente são ativadas na fase inicial da infecção viral e tem um importante papel no controle da recirculação de células T vírus-específicas e da imunidade antiviral no fígado. Além de atingir e matar as células infectadas através da liberação de partículas tóxicas como granzimas e perforinas, as células NK secretam uma grande quantidade de citocinas inflamatórias e imunomoduladoras que exercem uma função antiviral, ativam e recrutam outras células para participar da resposta ao vírus (LI et al, 2011; GU et al, 2009).

**Figura 12:** Contagem relativa e absoluta das células NK. Lymprogram® e Perfect Count®.



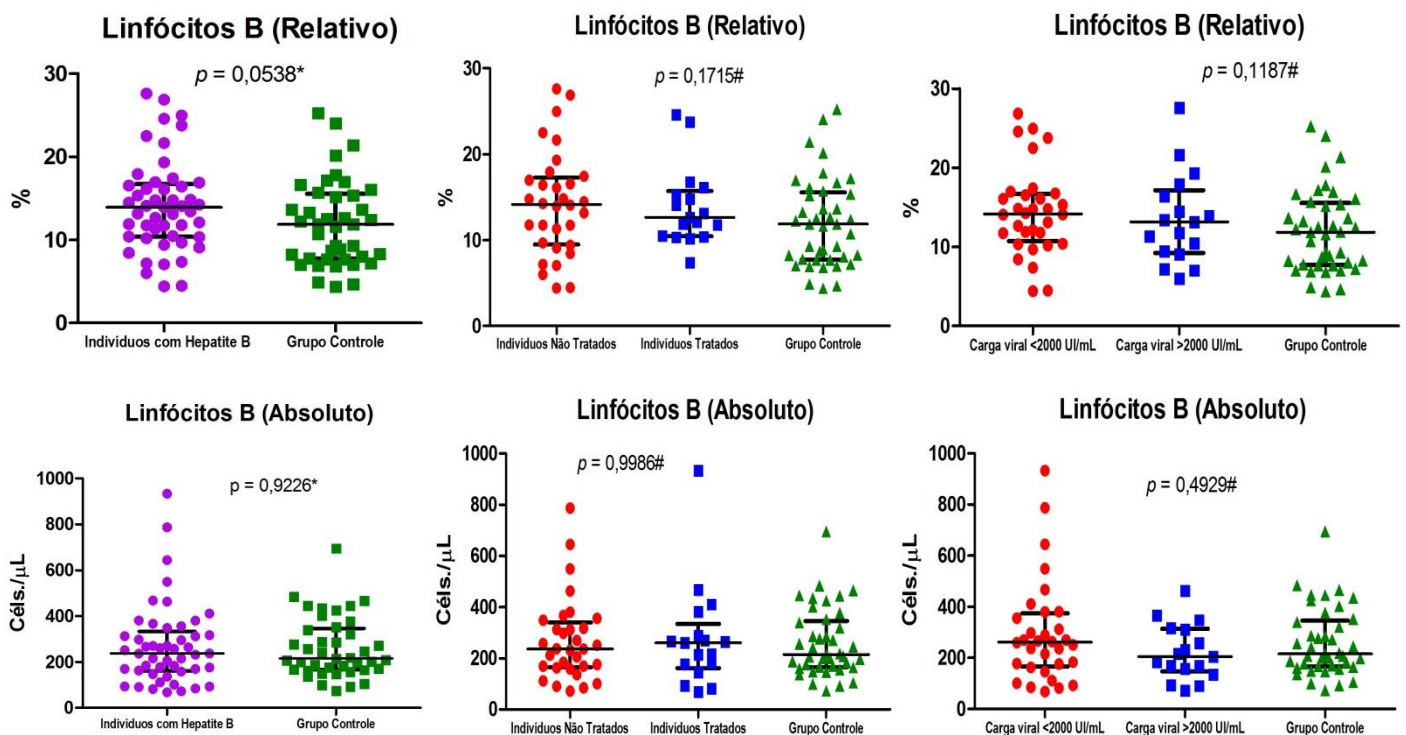
\* Valor  $p$  encontrado no teste de Mann-Whitney. # Valor  $p$  encontrado no teste de Kruskal-Wallis.

Os valores relativos das células NK dos pacientes infectados (total, tratados e com carga viral abaixo de 2000 UI/mL) foram maiores que os do grupo controle (figura 12). Segundo Liu e colaboradores (2010), também encontraram valores mais altos nos pacientes crônicos, que em indivíduos saudáveis, no estágio inicial da hepatite aguda há um aumento dos valores das células NK, que depois decresce à medida que a doença evolui para a cura. Nos indivíduos crônicos, entretanto, há uma prolongada e persistente inflamação, levando as células NK a manterem níveis relativamente altos. Em contraste, Gu e colaboradores (2009) acharam valores mais baixos de células NK em pacientes infectados comparados com o grupo controle, afirmam que na hepatite crônica há uma diminuição da quantidade e atividade das células NK.

Lang e colaboradores (2012) sugerem que, em pacientes com hepatite C, a depleção de células NK pode levar a um aumento das células T seguido da eliminação do vírus. Ainda, demonstraram haver uma associação entre a ativação das células NK e uma supressão de células T CD8+.

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as populações estudadas para os valores dos linfócitos B (figura 13). Esse resultado também foi observado por Mukherjee e colaboradores (2010) (que encontraram valores maiores que os aqui apresentados) e Cao, Qiu e Li (2011), que obtiveram resultados semelhantes aos deste estudo.

**Figura 13:** Contagem relativa e absoluta dos linfócitos B. Lymprogram® e Perfect Count®.



\*Valor  $p$  encontrado no teste de Mann-Whitney.  $^\#$  Valor  $p$  encontrado no teste de Kruskal-Wallis.

## 6. CONCLUSÕES

Dentro dos objetivos propostos e dos resultados expostos, foi possível concluir que:

- O perfil linfocitário da população de indivíduos infectados pelo HBV foi determinado por valores reduzidos de células T totais e de células T citotóxicas, quando comparados com os de indivíduos saudáveis;
- Foi possível observar um relativo aumento das células NK nos indivíduos infectados;
- Não foi possível observar diferenças no perfil linfocitário de indivíduos não tratados e indivíduos tratados;
- Não houve influência da carga viral no perfil linfocitário.

## **7. PERSPECTIVAS DO ESTUDO**

- Aumentar o número de pacientes para melhor avaliar o perfil linfocitário entre os subgrupos;
- Avaliar o efeito do tratamento dentro dos subgrupos de carga viral;
- Avaliar a o efeito da droga.

## REFERÊNCIAS

- ANDREU-BALLESTER, J.C. et al. Values for  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-Lymphocytes and CD4+, Cd8+, and CD56+, subsets in healthy adult subjects: assessment by age and aender. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, Valencia, v. 82b, n. 4, p. 238-244, Apr. 2012.
- ASPINALL, E. J. et al. Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. **Occupational Medicine**. v, 61, p. 531-540, 2011.
- BARONE, A. A; VISO, A. T. R. Patogenia da hepatite B e Delta. **Brazilian Journal Infectious Diseases**., Salvador, v. 10, n. 1, p. 11-14, ago. 2006.
- BERTOLETTI, A; GEHRING, A. J. The immune response during hepatitis B vírus infection. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 1439-1449, 2006.
- BHATTACHARYA, D; THIO, C L. Review of hepatitis B therapeutics. **Clinical Infectious Diseases**. v, 51, n. 10, p.1201-1208, 2010.
- BRANDÃO-MELLO, C. E. História natural da infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) em Indivíduos Imunocompetentes e Imunodeficientes. In: ARAUJO, E. S. A. (Ed.). **O aBc das hepatites: manual clínico para o manuseio e prevenção da hepatite B**. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008. p. 38-64.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de Dados do Sistema Único de Saúde – DATASUS. Disponível em: < <http://www.datasus.gov.br> >. Acesso em: 12 nov. 2012a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Doenças transmissíveis. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21920](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21920)>. Acesso em 23 nov. 2012b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde amplia faixa etária para vacinação gratuita contra Hepatite B a partir de 2011. 2010. Disponível em:<[http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspeDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=11563](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspeDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11563)>. Acesso em: 25 mai. 2011.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: o Brasil está atento**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 3. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2008. 60 p.
- CAO, W; QIU, Z. F; LI, T. S. Parallel Decline of CD8+CD38+ lymphocytes and Viremia in Treated Hepatitis B Patients. **World Journal. Gastroenterology**, Beijing, v. 17, n. 17, p. 2191-2198, May. 2011.

CARRILHO, F. J; ONO-NITA, S. K. Virologia do HBV. In: ARAUJO, E. S. A. (Ed.), 2008, **O aBc das hepatites**: manual clínico para o manuseio e prevenção da hepatite B. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008. p. 25-37.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Epidemiology and prevention of vaccine**: preventable diseases. 12. ed. Washington DC: Public Health Foundation, 2011.

CHANG, K. M. Hepatitis B Immunology for clinicians. **Clinical Liver Disease**, Philadelphia, v. 14, n.3, p. 409-424, Ago. 2010.

CHEINQUER, H. Atualização no tratamento da hepatite crônica B. In: ARAUJO, E. S. A. de (Ed.). **O aBc das hepatites**: manual clínico para o manuseio e prevenção da hepatite B. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008. p. 71-92.

CHISARI, F. V; ISOGAWA, M; WIELAND, S. F. Pathogenesis of hepatitis B vírus infection. **Pathologie Biologie**, v. 58, p. 258-266, 2010.

FARRELL, G. C; TEOH, N. C. Management of chronic hepatitis B vírus infection: a new era of disease control. **Internal Medicine Journal**. Austrália, v. 36, p. 100-113, 2006.

FATTOVICH, G; BORTOLOTTI, F; DONATO, F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. **Journal of Hepatology**, Brescia, v. 48, p. 335-352, 2008.

FERREIRA, C. T; SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: atualização. **Jornal de Pediatria**, v. 73, n. 6, p. 367-376, 1997.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Avanços no Tratamento da Hepatite pelo Vírus B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 40, n. 4, p. 451-62, jul./ago. 2007.

FERREIRA, O. **Estudo de doadores de sangue com sorologia reagente para hepatites B e C, HIV e sífilis no hemocentro de Ribeirão Preto**. 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado em Saúde na Comunidade) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FONSECA, J. C. F. Hepatite B: aspectos epidemiológicos. In: ARAUJO, E. S. A. (Ed.), , **O aBc das Hepatites**: manual clínico para o manuseio e prevenção da hepatite B. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008. p. 38-64.

\_\_\_\_\_. História natural da hepatite B crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 672-677, nov./dez. 2007.

GONÇALES, N. S. L; CAVALEIRO, N. P. Marcadores sorológicos da hepatite B e sua interpretação. **Brazilian Journal infectious Diseses**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 19-22, ago. 2006.

GU X. B. et al. Relationship between serum Hbv DNA level and HBV-specific, nonspecific cytotoxic T lymphocytes and natural Killer Cells in Patients with chronic hepatitis B. **Chinese Medical Journal**, Jiangu, v. 122, n. 18, p. 2129-2132, Set. 2009.

GUIDOTTI, L. G, CHISARI, F. V. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**, v. 1, p. 23-61, 2006.

HERNANDEZ-GEA, V, FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**, v. 6, p. 425-56, 2011.

INSTITUO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. Bio-Manguinhos. Interferon: Alfa 2b Humano Recombiante. 2012. 36p. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/bio\\_eng/media/monografia\\_interferon.pdf](http://www.fiocruz.br/bio_eng/media/monografia_interferon.pdf)>. Acesso em: 01 out. 2012.

JUNG, M. C; PAPE, G. Immunology of hepatitis B infection. **The Lancet**, v. 2, Jan. 2002.

LAM Y. F. et al. Current antiviral therapy of chronic hepatitis B: efficacy and safety. **Current Hepatitis Reports**, v. 10, p. 235-243, 2011.

LANG, P. A. et al. Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity. **PNAS**, Toronto, v. 109, n. 4, p. 1210-1215, Jan. 2012.

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

LIANG, T. J. Hepatitis B: the virus and disease. **Hepatology**, Baltimore, v. 49, n. 5, p. 513-521, May. 2009.

LIAW, Y. F; CHU, C. M. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**, London, v. 373, n. 9663, p. 582-592, Feb. 2009.

LIU, B. et al. Dynamic analysis of lymphocyte subsets of peripheral blood in patients with acute self-limited hepatitis B. **Health**, v. 2, n. 7, p 736-741, 2010.

LOK, A. S. F; MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B. **Hepatology**, Baltimore, v. 45, n. 2, p. 507-539, Jan. 2007.

MCMAHON, B. J. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. **Hepatology**, v. 49, n. 5, p. s46-s55, 2009.

MELO, F. C. A; ISOLANI, A. P. Hepatite B e C: do risco de contaminação por materiais de manicure/pedicure à prevenção. **Revista Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 6, n. 2, p. 72-78, maio/ago. 2011.

MUKHERJEE, R. M. et al. Relationship between serum HBsAg level, HBV-DNA level, and peripheral immune cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. **Hepatic Medicine: Evidence and Research**, Hyderabad, v. 2, p.157-162, Nov. 2010.

OO, Y. H; MUTIMER, D. J. Hepatitis B. **Medicine**. United Kingdom, v. 39, n. 9, p 545-549, Set. 2011.

- PARANÁ, R. et al. Diversidade genômica do vírus da hepatite B. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 79, n. 2, p. 37-38, jul. 2009.
- PARANÁ, R; SCHINONI, M. I; OLIVEIRA, A. P. Diagnóstico e monitorização da hepatite B. In: ARAUJO, E. S. A. (Ed.). **O aBc das Hepatites**: manual clínico para o manuseio e prevenção da hepatite B. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008. p. 65-70.
- PURCELL, R. H. The discovery of the hepatitis viruses. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 104, n. 4, p. 955-963, Abr. 1993.
- PYRSOPOULOS, N. T. Hepatitis B. medscape reference. 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/177632-overview>>. Acesso em: 25 mai. 2011.
- REHERMANN, B. Immune responses in hepatitis B vírus infection. **Seminars in Liver Disease**, v. 23, n. 1, 2003.
- ROBEK, M. D; BOYD, B. S; CHISARI, F. V. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. **Journal of Virology**, California, v. 79, n. 6, p. 3851-3854, Mar. 2005.
- RODRÍGUEZ-FRIAS, F; JARDI, R. Virología molecular del vírus de la hepatitis B. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 26, supl. 7, 2008.
- SADLER, A. J; WILLIAMS, B. R. G. Interferon-inducible antiviral effectors. **Nature Reviews Immunology**, Victoria, v. 8, n. 7, p. 559-568, Jul. 2008
- SÃO PAULO. Secretária da Saúde. Vacina contra hepatite B. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 1137-1140, dez. 2006
- SHEPARD, C. W. et al. Hepatitis B vírus infection: epidemiology and vaccination. **Epidemiologic Reviews**, Atlanta, v. 28, n. 1, p. 112-125, Ago. 2006.
- THEISE, N. D. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach. **Modern Pathology**. v. 20, p. S3-S14, 2007.
- TORRES, A. J. L. et al. Reference range for T lymphocytes populations in Blood Donors from two different regions in Brazil. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v. 13, n. 3, jun. 2009.
- WHO. World Health Organization. Hepatitis B. Fact sheet N°204. Jul. 2012. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>>. Acesso em: 19 set. 2012.
- WIENS, A; CORRER, C. J; PONTAROLO, R. Hepatite B crônica: uma revisão sobre os aspectos clínicos e terapêuticos. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 11, n. 2, p. 93-101, jul./dez. 2010.
- YOU, J. et al. Effect of viral load on T-lymphocyte failure in patients with chronic hepatitis B. **World Journal of Gastroenterology**, Kunming, v. 14, n. 7, p. 1112-1119, Fev. 2008a.



\_\_\_\_\_. Hepatitis B virus DNA is more powerful than HBeAg in predicting peripheral T-lymphocyte subpopulations in chronic HBV-infected individuals with normal liver function tests. **World Journal of Gastroenterology**, Kunming, v. 14, n. 23, p. 3710-3718, Jun. 2008b.

\_\_\_\_\_. Impact of viral replication inhibition by entecavir on peripheral T lymphocyte subpopulation in chronic hepatitis B patients. **BMC Infectious Diseases**, Kunming, v. 8, n. 123, Set. 2008c.

\_\_\_\_\_. Peripheral T-lymphocyte subpopulations in different clinical stages of chronic HBV infection correlate with HBV load. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 15, n. 27, p. 3382-2293, Jul. 2009.

## ANEXO A

(PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO EMITIDO PELO COMITÊ DE  
ÉTICA)

## PARECER/RESOLUÇÃO N.º 095/2009

**Registro CEP. 091/09** (Este n.º deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**Título do Projeto.** “Características imunobiológicas da resposta ao vírus da hepatite B em indivíduos soropositivos, soronegativos para HBV e co-infectados HBV/HTLV-I e II”.

**Patrocínio/Financiamento.** Proposta submetida à Instituição de fomento (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia/FAPESB). Orçamento muito expressivo, fundamentalmente para aquisição de instrumental. Contrapartida procedente.

**Pesquisadora Responsável.** Doutora Maria Isabel Schinoni, Professora Adjunta da Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia (UFBA). “Staff”: Raymundo Paraná Ferreira Filho, Professor Adjunto e Livre Docente em Hepatologia Clínica da Faculdade de Medicina da Bahia/FAMEB/UFBA; Denise Carneiro Lemaire, Professora, Biomédica pela UFBA; Antônio Fábio Medrado de Araújo, Professor Visitante da Pós-graduação *stricto sensu* em Imunologia da UFBA; José Roberto Meyer Nascimento, Professor Associado pela UFBA; Songeli Menezes Freire, Doutorando em Imunologia pela *Universidad de Buenos Aires, “UBA”* – Argentina, Professora, Colaboradora e Farmacêutica pela UFBA. “Currícula Vitae” apensos.

**Instituição.** Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos, Serviço de Gastro-Hepatologia, Universidade Federal da Bahia, CHUPES/SGH/UFBA.

**Área do Conhecimento.** 4.00, Medicina; 4.01, Ciências da Saúde; Nível P; Grupo III.

**Objetivos. Geral** — avaliar a prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) assim como a prevalência da co-infecção com o HTLV e estudar as características imunobiológicas da resposta celular aos antígenos virais em indivíduos soronegativos e soropositivos para estas infecções. **Específicos** — avaliar a soroprevalência de hepatite B (AgHBs, anti-HBc) e HTLV-I + II e avaliar a situação atual de imunidade ao vírus B (anti-HBs); definir o perfil de resposta celular de indivíduos, não infectados (AgHBs-, Anti-HBc) e vacinados, a antígenos do HBV *in vitro*; correlacionar o perfil imune de portadores de HBV mono-infectados e co-infectados com HTLV com fatores próprios do vírus B.

**Resumo.** O Estudo prevê a duração de 4 (quatro) anos e propõe a análise de 4.000 (quatro mil) indivíduos com idade entre 18 (dezoito) e 45 (quarenta e cinco) anos, ambos os sexos, oriundos da região de Jequié/Jiquiriçá, na Bahia, com posterior acompanhamento no Ambulatório de gastrohepatologia do C-HUPES. Cadastramento em banco de dados e estratificação por Grupos: G1) soropositivos para hepatite B; G2),

Recebido em  
20/11/2009  
Juliano P. Dias

## ANEXO B (TCLE)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA**  
**COMPLEXO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** Avaliação da resposta vacinal, soroprevalência da hepatite B e das características imunobiológicas da resposta a antígenos do vírus da hepatite B em indivíduos soropositivos, soronegativos para HBV e co-infectados HBV/HTLV-I/II.

**Pesquisador Responsável:** Dra. Maria Isabel Schinoni (Médico e Hepatologista ICS-HUPES-UFBA).

**Membros Pesquisadores:** Dr. Paraná Ferreira Filho – (Médico e hepatologista) HUPES-FA MEB-UFBA.

Dr. Roberto Jose Meyer Nascimento (Médico Imunologista ICS-UFBA).

Dra. Songeli M. Freire (Bioquímica e Imunologista ICS-UFBA).

Bruna Mattos Cavalcante (Biomédica Pós-Graduanda do ICS-UFBA).

Dr. Marcelo Silva (Medico pós-graduando do Complexo–HUPES-UFBA).

**Instituição/Setores:** Universidade Federal da Bahia. Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Ambulatório de Hepatologia) e Instituto de Ciências da Saúde (Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular)

**Endereço:** **NÚCLEO DE HEPATOLOGIA**  
 Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira, Rua Padre Feijó nº 29,  
 4º andar - Canela Cep: 40.110-170 Salvador-Bahia

**Telefones:** Ambulatório de Gastrohepatologia (71) 3237-1311  
 Lab. De Imunologia (71-3235-9682/Teleufba 71-32838935)

**NATUREZA E OBJETIVO DO ESTUDO**

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo de pesquisa. Antes de decidir, é importante que entenda porque a pesquisa está sendo realizada e o que ela envolverá. Por favor, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações seguintes e conversar sobre este estudo. Se houver qualquer dúvida nos pergunte. Utilize o tempo que for necessário para decidir se deseja participar desta pesquisa. Sua decisão não afetará de forma alguma sua relação com o médico do estudo ou seu tratamento médico agora ou no futuro.

Os objetivos principais deste projeto são investigar: a capacidade de resposta à vacina contra hepatite B, a capacidade de defesa ao vírus da hepatite B e os efeitos da co-infecção com o vírus da hepatite B e o vírus HTLV. A equipe médica justifica o objetivo da pesquisa pela necessidade atual de se esclarecer algumas perguntas sobre os mecanismos de resposta viral na infecção e na co-infecção, bem como da capacidade da resposta do indivíduo à vacina usada por recomendação do ministério da saúde.

**TRATAMENTO E PROCEDIMENTOS**

Caso você deseje e aceite participar do estudo terá o direito de saber os resultados dos exames realizados. A pesquisa consta de entrevista e levantamento de seus dados pessoais e clínicos. Posteriormente será feita a coleta de seu sangue por meio de um tipo de seringa estéril, chamada de

*Audinéa Lima dos Santos*  
 Secretária Executiva  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
 CEP/MS/UFBA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA**  
**COMPLEXO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS**

“vacutainer”. A coleta de sangue será realizado por profissional técnico capacitado e o procedimento de retirar o sangue em pessoas sensíveis pode causar pequeno desconforto, mas sem risco à saúde.

Depois da entrevista, com marcação de horário serão realizadas coletas de sangue em três fases, em cada vez pouco mais que uma colher de sopa cheia (10 mL) de sangue para os exames de teste **no soro** e teste no sangue sobre a sua capacidade de defesa contra hepatite. Caso necessite de tratamento você será orientado e acompanhado pelos médicos Dr. Raymundo Paraná Ferreira Filho e Dra. Maria Isabel Schinoni do grupo de Hepatologia do 4º. Andar do Ambulatório Magalhães Neto na Rua Padre Feijó nº 29, 4º andar – Canela, na cidade de Salvador.

#### **POSSÍVEIS BENEFÍCIOS**

Você receberá todos os resultados de exames realizados que poderão auxiliar o seu atendimento médico. Os exames estarão disponíveis conforme consta no protocolo que você receberá a após coleta do sangue. Caso haja indicação você será encaminhado para especialistas através do protocolo que lhe será entregue junto ao laudo conforme indicação dos médicos responsáveis por este projeto. Esse estudo também poderá auxiliar a ciência e aos médicos por tentar esclarecer perguntas atualmente comuns em relação a vacinação contra Hepatite B e em relação ao acompanhamento e tratamento de pacientes infectados pelo vírus da hepatite B e co-infectados pelos vírus da Hepatite B e HTLV.

#### **CONFIDENCIALIDADE**

Todas as informações prestadas sobre você serão mantidas em total sigilo e de acordo com as leis vigentes no país. Não haverá nenhum tipo de identificação quanto aos seus dados em quaisquer relatórios ou publicações científicas do estudo.

#### **RECUSA EM PARTICIPAR OU RETIRADA DO ESTUDO**

Ao ser incluído neste estudo, caso haja indicação você terá acompanhamento ambulatorial ou encaminhamento para área específica que se faça necessário. No entanto, sua participação é totalmente voluntária e caso não aceite participar, poderá abandonar o estudo a qualquer momento, sem que haja qualquer tipo de prejuízo de atenção médica. A indicação e atendimento não será modificada com a pesquisa e seguirá a orientação clínica normal do Ministério da Saúde.

#### **PAGAMENTOS**

Você não receberá nenhum tipo de pagamento para participar desta pesquisa.

#### **CONTATOS**

Sinta-se livre para fazer qualquer pergunta a qualquer momento durante o estudo. Caso tenha um problema médico ou tenha perguntas sobre os procedimentos, riscos e benefícios ou outras dúvidas, entre em contato com o **Dr. Marcelo Silva** no Ambulatório no endereço acima ou pelo telefone (73) 88391021 / (71) 88451503 ou com **Dr. Raymundo Paraná** e **Dra. Maria Isabel Schinoni** nos telefones 3237-1311 e com os **Dr. Roberto Meyer**, **Dra. Songeli Freire** e **Bruna Cavalcanti** no Laboratório de Imunologia (71-3235-9682 / 71-32838935) na Universidade Federal da Bahia.

Caso tenha perguntas sobre seus direitos como participante, você pode conversar com o médico, com a equipe deste estudo ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira que aprovou esta pesquisa, pelo telefone: (71) 3283-8043 ou no endereço Rua Augusto Viana, s/nº, Canela – Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, 1.º andar, CEP: 40.110-160 Salvador-Bahia, , e-mail: [cepmco@ufba.br](mailto:cepmco@ufba.br).

*Claudineia Lima dos Santos*  
 Secretária Executiva  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
 CEP/UFBA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA**  
**COMPLEXO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS**

**AUTORIZAÇÃO DO INDIVÍDUO**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-ESCLARECIDO.**

**Projeto:** Avaliação da resposta vacinal, soroprevalência da hepatite B e das características imunobiológicas da resposta a antígenos do vírus da hepatite B em indivíduos soropositivos, soronegativos para HBV e co-infectados HBV/HTLV-I/II.

Li, ou foi lido para mim, as informações contidas neste Termo de Consentimento e tive a oportunidade de fazer perguntas, as quais foram respondidas de forma satisfatória. Eu ou meu representante legalmente autorizado receberá uma cópia datada e assinada para meus arquivos. Minha assinatura ou impressão digital abaixo indicam que concordo em participar desta pesquisa.

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
 Assinatura do (a) paciente Data<sup>1</sup>

\_\_\_\_\_  
 Nome do (a) paciente em letras de forma



\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
 Assinatura do (a) representante legal Data<sup>1</sup>

\_\_\_\_\_  
 Nome do (a) representante em letras de forma

**DECLARAÇÃO DA PESSOA QUE EXPLICOU O CONSENTIMENTO**

Expliquei cuidadosamente ao paciente e/ou representante legal e ao (s) seu (s) familiar(s) todas as informações necessárias para participação nesta pesquisa.

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
 Assinatura da pessoa que apresentou a pesquisa se não for o Investigador-principal Data<sup>1</sup>

\_\_\_\_\_  
 Nome do (a) representante em letras de forma

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
 Assinatura do (a) representante legal Data<sup>1</sup>

\_\_\_\_\_  
 Nome do (a) representante em letras de forma

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
 Assinatura da Testemunha (no. 1) não pertencente ao grupo de pesquisa Data<sup>1</sup>

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
 Assinatura da Testemunha (no. 1) não pertencente ao grupo de pesquisa Data<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cada pessoa que assina o consentimento deve, pessoalmente, registrar a data de sua assinatura. mente, registrar a data de sua assinatura.

Claudinéa Lima dos Santos  
 Secretária Executiva  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
 ORBATOQUÍMICA

D