



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS INTERATIVOS DE ÓRGÃOS E
SISTEMAS

MAURÍCIO DE SOUZA CAMPOS

NÍVEIS DE CITOCINAS PLASMÁTICAS EM INDIVÍDUOS COM HEPATITE B
CRÔNICA NAIVE E SOB TRATAMENTO ANTIVIRAL

Salvador
2014

MAURÍCIO DE SOUZA CAMPOS

**NÍVEIS DE CITOCINAS PLASMÁTICAS EM INDIVÍDUOS COM HEPATITE B
CRÔNICA NAIVE E SOB TRATAMENTO ANTIVIRAL**

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

Orientação: Dra. Songeli Menezes Freire
Co-orientação: Dra. Maria Isabel Schinoni

Salvador
2014

MAURÍCIO DE SOUZA CAMPOS

**NÍVEIS DE CITOCINAS PLASMÁTICAS EM INDIVÍDUOS COM HEPATITE B
CRÔNICA NAIVE E SOB TRATAMENTO ANTIVIRAL**

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

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Liana Machado de Codes Foulon

Dra. Maria Isabel Schinoni

Dr. Mário Guimarães Pessoa

A Hipócrates, Michel Foucault e aos
grandes mestres da ciência, dedico.

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo, Coordenador da Pós-Graduação, pelo zelo e dedicação dispensados 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 Mestre Geraldo Pedreira e à doutoranda Rosa Guedes, pela imprescindível ajuda nas aquisições e análises das amostras.

Ao Dr. Luciano Kalabric e à doutoranda Cida, pesquisadores da FIOCRUZ-Bahia, pela cooperação na realização desse estudo.

Aos alunos de iniciação científica, pelas horas dedicadas a auxiliar-me nessa jornada.

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

Aos funcionários e amigos do Labimuno.

Ao PRONEX e a CAPES pelo financiamento da pesquisa.

"Há, verdadeiramente, duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe, está a ignorância".
Hipócrates.

RESUMO

Introdução: A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) compreende um amplo espectro de quadros clínicos que vai desde a manifestação aguda e autolimitada até a forma crônica, com possibilidade de desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. A proteína 10 induzida por INF- γ (IP-10) é uma quimiocina CXC que pode ser secretada pelos hepatócitos e endotélio sinusoidal no fígado de pacientes com hepatite viral. Por ligação ao receptor CXCR3, IP-10 exerce efeito quimiotático em células NK, células T ativadas e células dendríticas, modulando, dessa forma, a resposta imunológica. Sabe-se que o IFN- γ estimula a secreção de IP-10 por células infectadas pelo vírus da hepatite C, mas no contexto da infecção pelo HBV, essa relação ainda é pouco conhecida. **Objetivo:** descrever os níveis das citocinas e quimiocinas séricas em pacientes com hepatite B crônica *naive* e sob tratamento antiviral. **Material e métodos:** foi realizada a dosagem de citocinas séricas de 24 voluntários com hepatite B crônica em tratamento e 33 voluntários com hepatite B crônica *naive*, utilizando o kit de CBA (Citokine Beads Array) da eBioscience e análise em FACScalibur BD. A citocina IP-10 foi quantificada utilizando o kit CBA da empresa BD conforme padronização prévia e recomendação do fabricante, e também analisada em FACScalibur BD. Os softwares SPSS versão 18 e GraphPad versão 6 foram utilizados para análise estatística. **Resultados:** foram encontradas diferenças estatísticas na comparação dos níveis de IP-10, IL-5 e TGF- β entre indivíduos com hepatite B crônica tratados e *naive*. Foram encontrados valores mais elevados de citocinas Th1 no soro de pacientes *naive*, quando comparados aos pacientes tratados. Os níveis séricos de IP-10 nos pacientes tratados e não tratados são mais elevados que os de INF- γ . **Conclusão:** os níveis séricos de citocinas Th1 entre pacientes não tratados estavam mais elevados do que em pacientes tratados. A amplitude dos níveis de INF γ foi maior nas amostras dos indivíduos com hepatite B sem tratamento. A correlação entre os níveis de INF γ e IL-10 foi inversa em amostras de indivíduos não tratados. O tratamento pareceu modular a produção de INF γ sem interferir nos níveis de IP-10 e IL-10. A correlação entre os níveis de IP-10 e IL-10 também foi inversa em amostras de indivíduos não

tratados. A IP-10 pode ser um marcador de maior sensibilidade que o INF-gama anteriormente descrito como a citocina chave no processo inflamatório na HBV.

Palavras Chaves: Hepatite B. Citocinas. IP-10. Resposta imune.

ABSTRACT

Background: infection with the hepatitis B virus (HBV) comprises a broad spectrum of clinical presentations ranging from acute and self-limited to the chronic form, with the possibility of development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The protein induced by INF- γ (IP-10) is a CXC chemokine that can be secreted by hepatocytes and sinusoidal endothelium in the liver of patients with viral hepatitis. By binding to CXCR3 receptor, IP-10 exerts a chemotactic effect on NK cells, activated T cells and dendritic cells, potentializing, thus, the immune response. It is known that IFN- γ stimulates IP-10 secretion by cells infected with hepatitis C, but in the context of HBV infection, this relationship is still poorly known. **Aim:** to describe the levels of cytokines and chemokines in serum patients with chronic hepatitis B naïve and under antiviral treatment. **Methods:** the dosage of serum cytokines of 24 volunteers with chronic hepatitis B treatment and 33 volunteers with chronic hepatitis B naïve was performed using the CBA kit (Cytokine Beads Array) from eBioscience and analyzed using FACScalibur BD. IP-10 cytokine was quantified using the CBA kit from BD company as previous standardization and recommendation of the manufacturer and also analyzed using FACScalibur BD. The SPSS software version 18 and GraphPad version 6 were used for statistical analysis. **Results:** statistical differences were found when comparing the IP-10 levels, IL-5 and TGF- β among individuals with chronic hepatitis B treated and naïve. Higher values of Th1 cytokines were found in the serum of treated patients when compared to naïve patients. The IP-10 serum levels in treated and untreated patients are higher than those of INF- γ . **Conclusion:** the serum levels of Th1 cytokines from untreated patients were higher than in patients treated. The breadth of the INF γ levels were higher in samples of individuals without hepatitis B treatment. The correlation between the levels of INF γ and IL-10 was reverse on samples from untreated individuals. The treatment appeared to modulate INF γ production without interfering on IP-10 and IL-10 production levels. The correlation between the IP-10 and IL-10 levels was also reverse in samples of untreated individuals. IP-10 may be a higher sensibility marker

than the INF γ priorly described as a key cytokine in the inflammatory process in hepatitis B.

Key Words: Hepatitis B. Cytokines.IP-10.Immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência de HBsAg no mundo	17
Figura 2	Prevalência de hepatite B no Brasil, por unidade federada	18
Figura 3	Representação esquemática do vírus da hepatite B.	19
Figura 4	Representação esquemática da cadeia dupla circular parcial do DNA HBV	21
Figura 5	Representação esquemática do ciclo de vida do HBV	24
Figura 6	Organização do genoma do vírus	24
Figura 7	Evolução da hepatite B crônica	28
Figura 8	Investigação laboratorial da hepatite B	31
Figura 9	Hepatite B aguda: interpretação dos marcadores sorológicos	32
Figura 10	Hepatite B crônica: interpretação dos marcadores sorológicos	32
Figura 11	Esquema da resposta imune ao vírus da hepatite B	36
Figura 12	Protocolo clínico terapêutico para tratamento de hepatite B crônica em pacientes AgHBe reagente não cirrótico	37
Figura 13	Protocolo clínico terapêutico para tratamento de hepatite B crônica em pacientes AgHBe não reagente, não cirrótico	38
Figura 14	Protocolo clínico terapêutico para tratamento de hepatite B crônica em pacientes ivirgens de tratamento, cirróticos, com AgHBereagente ou não reagente	39
Figura 15	Incidência cumulativa de resistência antiviral	41
Figura 16	Mecanismo de ação dos análogos de nucleotídeos	42
Figura 17	Níveis de citocinas Th1 em soro de indivíduos com HBV não tratados e em tratamento.	53
Figura 18	Níveis de IP-10 em soro de indivíduos com HBV não tratados e em tratamento	55
Figura 19	Níveis de citocinas Th2 em soro de indivíduos com HBV não tratados e em tratamento	58
Figura 20	Correlação entre os níveis de IFN/IL-10 e IP-10/IL-10 nos pacientes não tratados e tratados	61
Figura 21	Curva ROC IP-10 e INF	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos indivíduos infectados com Hepatite B	48
Tabela 2	Histórico de tratamento dos indivíduos infectados com Hepatite B	48
Tabela 3	Perfil sociodemográfico dos pacientes com hepatite B estudados	49
Tabela 4	Dados sorológicos dos pacientes com hepatite B estudados	49
Tabela 5	Medicamentos utilizados pelos pacientes com hepatite B estudados	50
Tabela 6	Níveis de citocinas no soro dos indivíduos tratados e não tratados (mediana, mediana e <i>p</i> -valor) (teste de Mann-Whitney).	51
Tabela 7	Correlação entre os valores de IP-10 em pacientes tratados e não tratados com os marcadores de lesão e função hepáticos pelo método de Spearman	60
Tabela 8	Níveis séricos de transaminases no soro de indivíduos tratados e não tratados	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AgHBc	Antígeno de <i>Core</i> do HBV
AgHBe	Antigeno <i>e</i> do HBV
AgHBs	Antígeno de Superfície do HBV
ALT	Alanina Aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo contra o Antígeno de <i>Core</i> do HBV
Anti-HBe	Anticorpo contra o Antigeno <i>e</i> do HBV
Anti-HBs	Anticorpo contra o Antígeno de Superfície do HBV
CMV	Cytomegalovirus (Citomegalovírus)
EBV	Epstein-BarrVirus (Vírus Epstein-Barr)
ELISA	Enzyme-LinkedImmunsorbentAssay (Ensaio Imunoenzimático)
FACS	FluorescenceActivatedCellSorting
FDA	United States Food and Drugs Administration
HBV	Hepatitis B Virus (Vírus da Hepatite B)
HBV-DNA	Material genético do HBV
HCC	Hepatocarcinoma Celular
HCV	Hepatitis C Virus (Vírus da Hepatite C)
HIV	HumanImmunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HTLV	Human T-Lymphotropic Virus (Vírus Linfotrópico as Subpopulações de Linfócitos T em Humanos)
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
IFN	Interferon
IL	Interleucina
MHC-I	Major Histocompatibility Complex Class1 (complexo principal de histocompatibilidade classe I)
MHC-II	Major Histocompatibility Complex Class2 (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 AuxiliaresTipo 1)
Th2	T Helper Cell type 2 (Célula T AuxiliaresTipo 2)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO VIRAL E DA HEPATITE B NO MUNDO E NO BRASIL	16
2.1	ASPECTOS GERAIS DO VÍRUS DA HEPATITE B (HBV).....	18
2.2	REPLICAÇÃO VIRAL.....	23
2.3	FORMAS DE CONTÁGIO DO HBV	26
2.4	A DOENÇA (MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA).....	27
2.4.1	Fases da doença	28
2.5	MARCADORES SOROLÓGICOS DA INFECÇÃO.....	30
2.6	RESPOSTA IMUNE AO HBV.....	32
2.7	TRATAMENTO DISPONÍVEL PARA HBV.....	36
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4	MATERIAL E METÓDOS	44
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	44
4.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	44
4.3	POPULAÇÃO DE ESTUDO E COLETA DE DADOS.....	45
4.4	SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES VOLUNTÁRIOS.....	45
4.5	FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.....	46
4.6	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E PROVAS BIOQUÍMICAS.....	46
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
7	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) compreende um amplo espectro de quadros clínicos que vai desde a infecção aguda e autolimitada até a forma crônica, com possibilidade de desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC) ou, ainda, de manifestar-se na forma fulminante da doença, com lesão irreversível do parênquima hepático, seguida de óbito (PUNGPAPONG; KIM; POTERUXA, 2007). Diferenças na montagem da resposta imune anti-HBV estão associadas ao prognóstico da infecção por HBV (REHERMANN et al., 2005). Durante o processo de lesão hepática crônica, os componentes do sistema imune adaptativo exercem papel fundamental na patogênese da inflamação, com destaque especial para as células T e as células resultantes de sua ativação e diferenciação. Pela liberação de citocinas (mediadores moleculares da resposta imune), células T *naive* podem diferenciar-se em subpopulações distintas de células efetoras: Th1, Th2, Th3, ou, ainda, Th17 e Th23, que vão determinar o perfil de citocinas produzidas, secretadas e presentes na corrente sanguínea. Quimiocinas, também liberadas durante o processo inflamatório, podem recrutar monócitos, neutrófilos e outras células efetoras do sistema imune, a partir do sangue, para os locais de infecção ou dano tecidual. Certas quimiocinas ativam as células do sistema imunológico para iniciar uma resposta imune ou para promover cicatrização de lesões (VINADER; PARRA; MONLEÓN, 2012). As interações citocinas/quimiocinas e diferentes tipos celulares fluem num processo dinâmico, apesar de serem sempre descritas como separadas ou com focos separados, por motivos didáticos.

No contexto da infecção pelo HBV, o fator de necrose tumoral (TNF), o interferon-gama (INF- γ), o fator de crescimento tumoral-beta 1 (TGF- β 1) e a interleucina-10 (IL-10) são descritos na literatura como citocinas fundamentais na evolução da patologia. Entre suas funções, destacam-se o estímulo para a diferenciação e o crescimento de linfócitos, a ativação de diferentes células efetoras para eliminação de antígenos, e a estimulação do crescimento das células hematopoiéticas (THIMME et al, 2002). Estudando os níveis séricos do TNF e sua relação com o grau de fibrose hepática, Kiki (2006) e colaboradores encontraram uma associação positiva dessa citocina com o índice de atividade histológica nos pacientes com hepatite B crônica que ativassem cirrose.

As quimiocinas, uma família de pequenas citocinas quimiotáticas que contém entre dois e quatro resíduos NH₂-terminais altamente conservados de aminoácidos cisteína, também são elementos essenciais na montagem da resposta imune contra um patógeno. Elas funcionam de modo a recrutar e ativar células do sistema imune para locais de inflamação através da ligação a um subconjunto de receptores acoplados à proteína G (ROSSI, 2000).

A proteína 10 induzida por INF- γ (IP-10) é uma quimiocina CXC que pode ser secretada pelos hepatócitos e endotélio sinusoidal no fígado de pacientes com hepatite viral (NISHIOJI, 2001). Por ligação ao receptor CXCR3, IP-10 exerce o efeito quimiotático em células NK, células T ativadas e células dendríticas (NEVILLE et al., 1997).

A infecção dos hepatócitos pelo HBV estimula uma resposta efetivamente de perfil Th1, com atividade das células NK e LT. Nesse sentido, o IFN- γ é um dos mediadores mais importantes da resposta imune ao HBV, assim como ocorre com outros agentes infecciosos intracelulares, e, juntamente com outras citocinas – IL-12, IL-2, IL-10, IL-8, IL-6, IL-4, IL-5, IL-1 β , e TNF, atuam no controle da replicação viral. Embora o IFN- γ estimule a secreção de IP-10 por células infectadas por diversos patógenos, a exemplo: vírus Sendai (LE GOFFIC et al, 2002), o vírus do sarampo (NAZAR et al, 1997), o vírus da raiva (NAKAMICHI et al, 2005), coronavírus (LAW et al, 2007) e HIV (ARSENIO et al, 2001), no contexto da infecção pelo HBV, essa relação ainda é pouco conhecida.

Os tratamentos da hepatite B crônica, disponíveis e liberados para uso no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde (MS), objetivam a supressão viral, a normalização dos níveis de alanina aminotransferases (ALT), com diminuição do dano hepático, a soroconversão para anti-HBs (SHIM et al., 2009), a prevenção ou redução do desenvolvimento de cirrose hepática e do carcinoma hepatocelular. Alguns *guidelines* atuais valorizam a diminuição dos níveis de ALT, da carga viral representada pelo HBV-DNA e negatificação do HBeAg com soroconversão para anti-HBe como marcadores de acompanhamento da evolução clínica dos pacientes (THIO, 2010). Estudos têm demonstrado o papel das citocinas séricas no clareamento da infecção (CHANG, 2010), mas as pesquisas acerca do tema ainda são incipientes e pouco se sabe acerca das possíveis alterações sobre componentes do sistema imune, como leucócitos e citocinas em pacientes tratados com a terapia antiviral disponível.

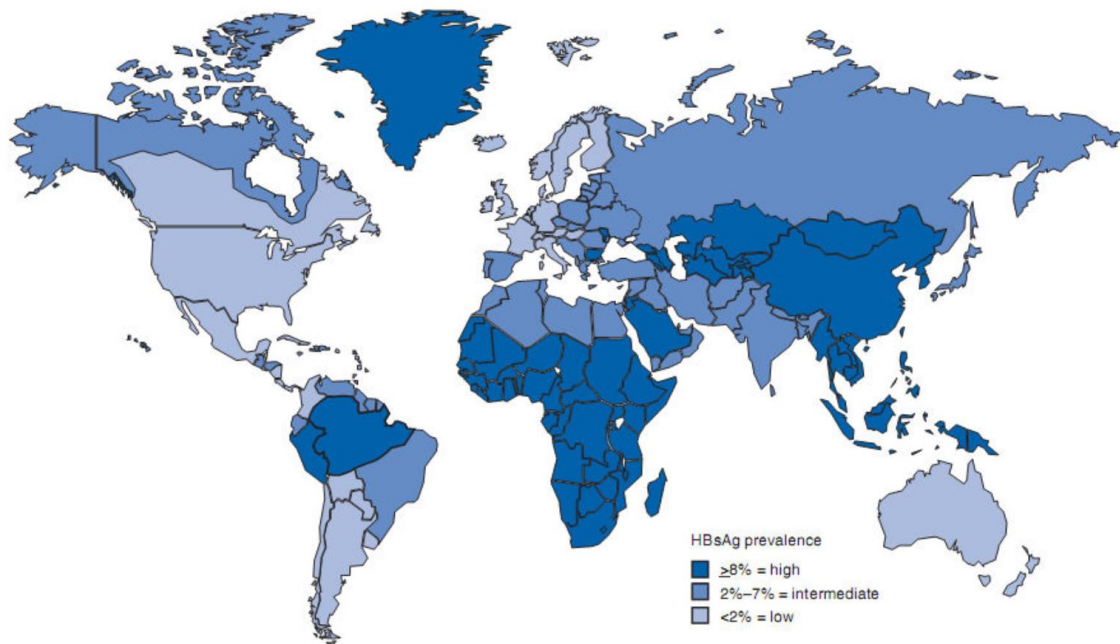
O presente trabalho teve como objetivo principal descrever os níveis das citocinas e quimiocinas plasmáticas, especialmente a IP-10, em pacientes com hepatite B crônica *naive* e sob tratamento antiviral. Os dados analisados nesta pesquisa podem servir como importante instrumento para avaliação do prognóstico e do efeito das drogas sobre o sistema imune dos pacientes submetidos ao tratamento com antivirais.

2 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO VIRAL E DA HEPATITE B NO MUNDO E NO BRASIL

A hepatite B continua sendo um grande problema de saúde pública visto a existência de evidência sorológica de a infecção passar de dois bilhões de indivíduos no mundo, sendo que, desses, 350 milhões permanecem cronicamente infectados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). A descoberta do vírus da hepatite B (HBV), na década de 1940, baseou-se nas diferenças epidemiológicas observadas nos casos de hepatite infecciosa. MacCallum (1947) introduziu os termos hepatite A, para os casos de infecção com repercussão epidêmica, e hepatite B, para os casos de transmissão pelo soro, termos esses adotados então pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

No mundo, a hepatite B é responsável por 30% dos casos de cirrose e 57% dos casos de carcinoma hepatocelular (CHC) (PERZ; ALTER, 2006). A incidência do CHC é maior nos países asiáticos e na maior parte da África, ultrapassando 80% de casos na China, em Singapura, na Coreia, na Índia e no Vietnã. Nos EUA, em 15 anos, os casos de CHC dobraram e houve aumento de 41% da mortalidade por esta doença (LEVANCHY, 2004). Em todo o mundo, o vírus da hepatite B (HBV) se configura como a principal causa de infecção crônica e pode levar à cirrose hepática e ao carcinoma hepatocelular (HADZIYANNIS; PAPTAEODORIDIS, 2006). Estudos têm demonstrado que a prevalência da infecção varia com a região geográfica, com áreas de alta (mais de 8%), média (entre 8% e 2%) e baixa endemicidade (menos de 2%). (Figura1).

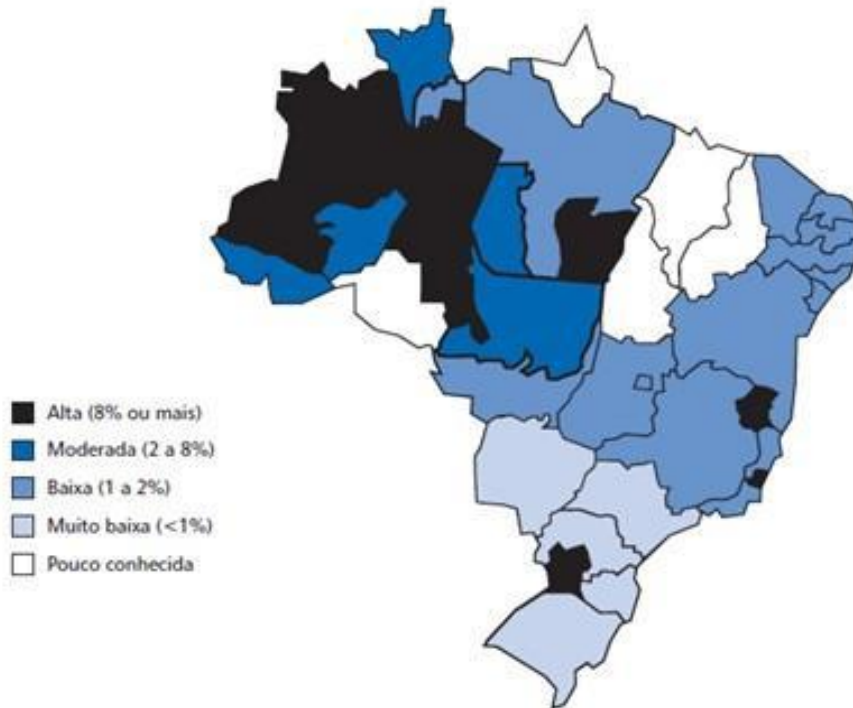
Figura 1 – Prevalência de HBsAg no mundo



Fonte: Distribuição geográfica da infecção crônica pelo VHB (CDC, 2008, adaptado).

No Brasil, as taxas de prevalência apresentam um padrão heterogêneo. A região da Amazônia e parte de alguns estados do Sul e Sudeste são consideradas áreas de alta e média endemicidade, respectivamente (PARANÁ; ALMEIDA, 2005). Há uma estimativa do Ministério da Saúde de que 15% da população brasileira já foi exposta ao HBV e que a taxa média de portadores crônicos nas capitais do Nordeste do país é de aproximadamente 0,5% (PEREIRA et al, 2009). Embora a infecção crônica pelo HBV seja definida pela presença de antígeno de superfície do vírus (HBsAg) por mais de seis meses no soro do paciente, recentemente, uma forma de infecção crônica tem sido descrita, na qual o HBV-DNA é detectado no soro ou no tecido do fígado de pacientes com HBsAg soronegativo, o que é conhecido como hepatite B oculta (SAID, 2011). Populações de regiões de alta endemicidade parecem ter maior prevalência de infecção oculta pelo HBV; no entanto, ela também tem sido detectada em populações específicas do Brasil (ALMEIDA et al, 2009). A figura 2 mostra a prevalência da hepatite B no Brasil, distribuída por região geográfica.

Figura 2 – Prevalência de hepatite B no Brasil, por unidade federada

Mapa 3. Prevalência de Hepatite B no Brasil, segundo unidade federada

Fonte: Gerência de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Vigilância Sanitária (RIO DE JANEIRO. Secretaria Municipal de Saúde, 2007)

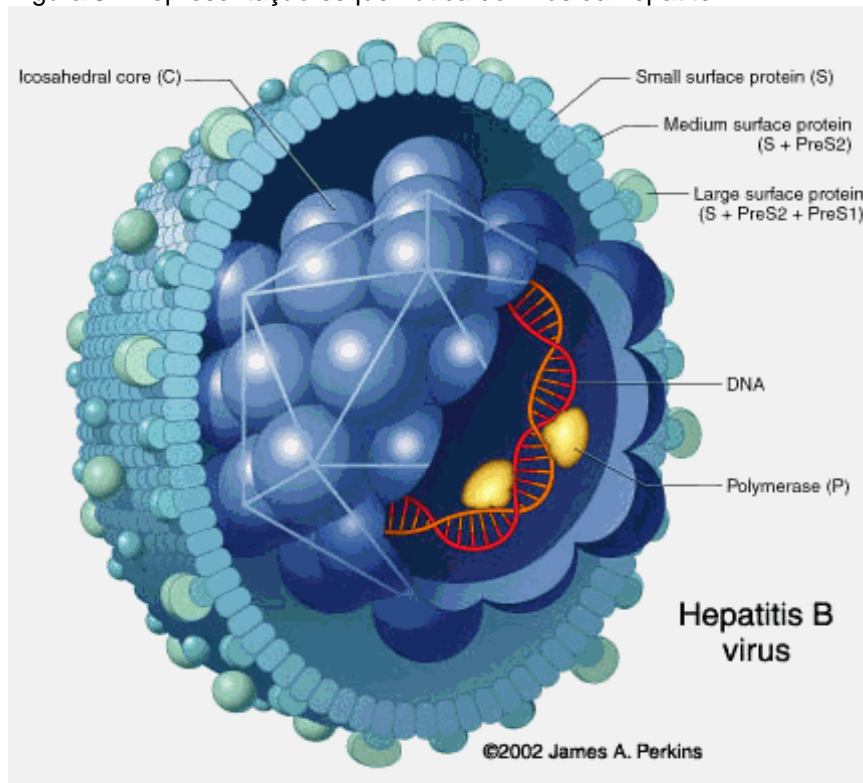
2.1 ASPECTOS GERAIS DO VÍRUS DA HEPATITE B (HBV)

O vírus da hepatite B foi identificado por Baruch Blumberg ao isolar um antígeno no soro de um aborígene australiano, que reagia com soro de hemofílicos politransfundidos, e o denominou Antígeno Austrália (BLUMBERG; ALTER; VISNICH, 1965). A relação do antígeno descoberto por Blumberg com a hepatite B só foi estabelecida posteriormente por Alfred Prince, que passou a denominá-lo antígeno SH (de hepatite sérica) (PRINCE, 1968).

O HBV pertence à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012). O vírion é formado externamente por um envelope composto por uma mistura de três glicoproteínas,

denominadas HBsAg (antígeno de superfície do HBV), e, internamente, por um núcleo capsídeo icosaédrico, composto pela proteína do core, que contém o genoma viral (BOWDEN, 2006; BRUSS, 2007; LIANG, 2009; KAO et al, 2000). As estruturas virais encontram-se demonstradas na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática do vírus da hepatite B.



Fonte: Disponível em: <<http://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

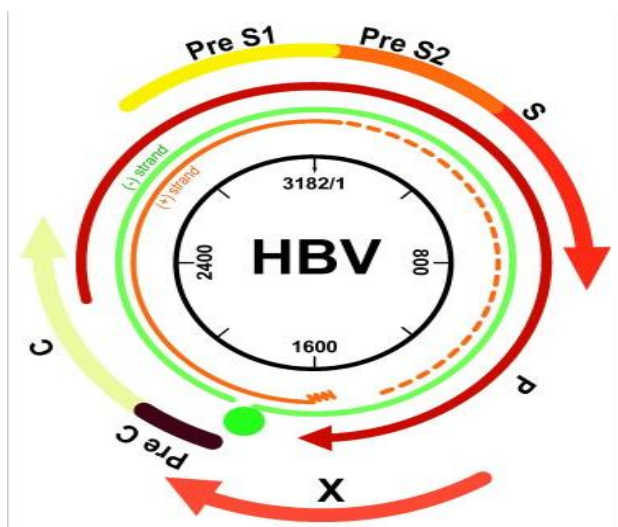
Existem oito genótipos do HBV que recebem denominação de A a H, distintos entre si pela sequência de nucleotídeos no genoma, variando quanto à distribuição geográfica (FONSECA, 2007). Pequenas variações nos genótipos do antígeno de superfície do vírus B (HBsAg) permitem estabelecer quatro subtipos: adw, ayw, adr e ayr.

Estudos sugerem que a resposta ao tratamento e que a evolução clínica para hepatite crônica variam em função desses genótipos, uma vez que alguns deles apresentam melhor resposta ao interferon, como o A e o B. Por outro lado, os genótipos C e F estão relacionados a maiores riscos de carcinogênese. Todavia, no momento, a identificação dos genótipos do HBV não é utilizada na rotina clínica para tomada de decisão terapêutica no Brasil, pois é necessária a implantação de uma rede de biologia molecular que ofereça suporte logístico para isso.

No Brasil, os genótipos A e F são prevalentes em algumas áreas da região Norte, sendo o genótipo F predominante em populações isoladas. Nos grandes centros urbanos da região Sudeste, há um predomínio dos genótipos A e D. Esse mesmo padrão de prevalência é encontrado no sudoeste do estado do Paraná. Ao redor do mundo, a distribuição geográfica dos subtipos virais também se mostra bastante heterogênea. Na China, os genótipos mais comuns são o B e o C; na Europa central, o A; nos países mediterrâneos e na Índia, o D; na África, o E; e nos Estados Unidos, o A e o C (PALUMBO, 2008).

O genoma do HBV é formado por uma fita de DNA circular, parcialmente dupla, com aproximadamente 3,2 Kilobases (Kb). A fita de polaridade negativa está ligada covalentemente em sua extremidade 5' à proteína terminal. Já a fita de polaridade positiva é incompleta e seu tamanho varia de 50 a 100% em relação ao tamanho da fita negativa (LIANG, 2009; PATIENT; HOURIOUX; ROINGEARD, 2009). O DNA do HBV apresenta quatro regiões de leitura aberta (*Open Reading Frame* - ORFs) denominadas Pré-S/S, Pré-Core/Core, Pol e X que codificam as proteínas virais estruturais e não estruturais (Figura 4). Essas regiões se sobrepõem, aumentando, assim, a capacidade de síntese protéica do vírion (BRUSS, 2007; LIANG, 2009; DANDRI; LOCARNINI, 2013; LAPINSKI; POGORZELSKA; FLISIAK, 2012). A figura 4 mostra a representação esquemática da cadeia dupla circular parcial do DNA HBV.

Figura 4 - Representação esquemática da cadeia dupla circular parcial do DNA HBV¹.



Fonte: Lee (1997)

A Região Pré-S/S é dividida estrutural e funcionalmente em Pré-S1, Pré-S2 e S, e codifica as proteínas do envelope : L (*large*), M (*middle*) e S (*small*), respectivamente, pelo uso alternativo de três códons de iniciação (GLEBE; URBANS, 2007; LIANG, 2009). A proteína L, com cerca de 400 aminoácidos (aa), é codificada pelas sequências Pré-S1, Pré-S2 e S, e exerce um papel importante na ligação do HBV a receptores específicos no hepatócito, bem como na montagem e na liberação do vírion da célula hospedeira (GLEBE;URBAN,2007; BRUSS 2007; LOCARNINI; 2004). A proteína M, com 281 aminoácidos, é codificada pelas regiões Pré-S2 e S. Embora sua função ainda não tenha sido esclarecida, sabe-se que sua ausência não interfere na formação do vírus, nem impede a infectividade viral (GLEBE, 2007; GLEBE; URBAN, 2007). A proteína S ou HBsAg, codificada pela região S, possui 266 aminoácidos. Nela, encontram-se os epítomos específicos, alvos primários da neutralização viral conferida pela resposta imune do hospedeiro (BRUSS, 2007; MICHEL; TIOLLAIS, 2010). Esta proteína é a utilizada com grande

¹ Ambas as cadeias de DNA da dupla fita são mantidas em conjunto por emparelhamento de bases ao longo de 250-300 nucleótidos nas suas extremidades 5'. A unidade de comprimento de cadeia (cadeia negativa) é ligada covalentemente à polimerase viral e tem uma sequência redundante de 9 nucleótidos nas suas extremidades. A cadeia complementar (cadeia positiva) está ligada a um oligorribonucleótidos limitado a sua extremidade 5'. A cadeia positiva é menor do que o comprimento da unidade e termina em diferentes posições, resultando na presença de uma região de cadeia simples de comprimento variável. Duas repetições de 11 pb, DR1 e DR2, localizadas nos terminais 5' das cadeias mais e menos, desempenham um papel crucial na replicação do ADN viral. Quatro grelhas de leitura aberta efetuada pela cadeia negativa são representadas por setas grandes.

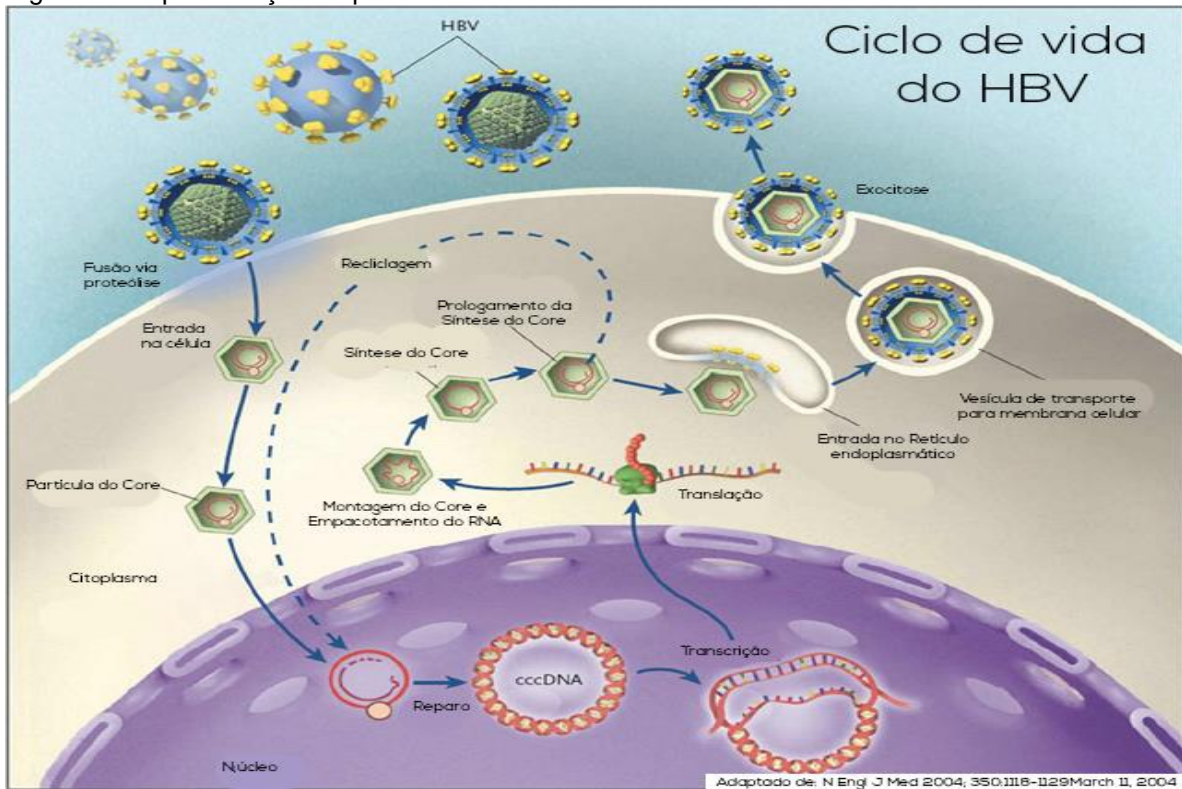
sucesso e eficácia na vacina atual contra hepatite B, disponível em quase todo o mundo (WHO, 2007).

A Região Pré-Core/Core codifica as proteínas (HBeAg) e core (HBcAg). A primeira é um antígeno solúvel e sua presença no soro de indivíduos infectados indica replicação viral elevada (LIANG, 2009). Esse antígeno tem sido relacionado à tolerância imune e persistência da infecção (LIANG, 2009; DANDRI; LOCARNINI, 2012). Já o HBcAg é encontrado no citoplasma e no núcleo dos hepatócitos infectados. Essa proteína forma o capsídeo viral e tem um agrupamento altamente básico de aminoácidos em sua porção C-terminal, com atividade de ligação ao RNA pré-genômico. Além disso, desempenha importante função na replicação do HBV e na indução de formação de anticorpos anti-HBc, independente de células T (LIANG, 2009). A região Pol corresponde aproximadamente 3/4 do genoma do HBV e codifica uma enzima viral multifuncional, com aproximadamente 800 aminoácidos, dividida em quatro domínios (LIANG, 2009): (I) proteína terminal ou primase, que atua na encapsidação e início da síntese da fita menor do DNA; (II) transcriptase reversa, que atua na síntese do genoma; (III) ribonuclease H (RNase H), que degrada o RNA pré-genômico e facilita a replicação viral (LIANG, 2009; LAPINSKI; POGORZELSKA; FLISIAK., 2012); (IV) região espaçadora, localizada entre os domínios da proteína terminal e da transcriptase reversa (NGUYEN; LUDGATE; HU, 2008). Finalmente, o gene X codifica um polipeptídeo, com aproximadamente 154 aminoácidos, detectado apenas nos hepatócitos infectados (HBxAg) (ZHANG; ZHANG; YE, 2006; LIANG, 2009). O antígeno X é uma proteína multifuncional, com atividade transativadora transcricional em vários promotores virais e celulares (MICHIELSEN; FRANCQUE; VAN DONGEN, 2005; BARBINI et al., 2012; KEW, 2011). Estudos em células primárias de hepatócitos humanos têm mostrado que a proteína X é essencial para o início e manutenção da replicação viral e importante regulador do desenvolvimento da infecção natural da hepatite B (LUCIFORA et al., 2011; GEARHART; BOUCHARD, 2011). Essa proteína tem sido associada ao desenvolvimento de carcinoma hepático em portadores crônicos do HBV (ZHANG; ZHANG; YE, 2006; ZHU et al., 2007; MARTIN-VILCHEZ et al., 2011; BARBINI et al., 2012; XU et al., 2013).

2.2 REPLICAÇÃO VIRAL

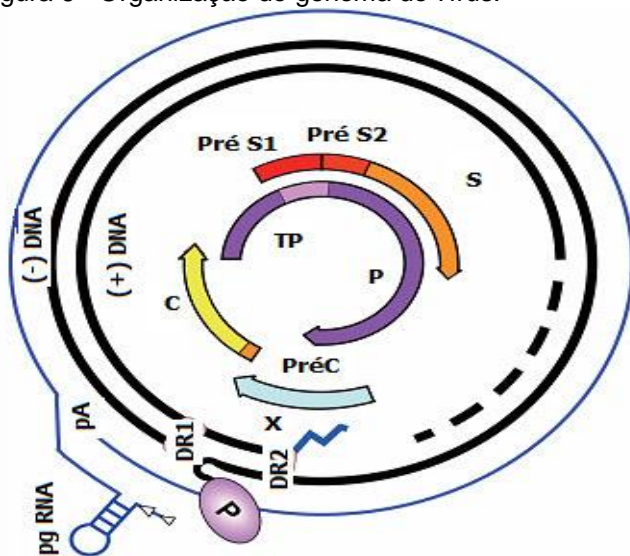
A capacidade de invasão celular pelo HBV está diretamente ligada a receptores específicos do vírus (o receptor da região pré-S1, aminoácidos 21-47) e da célula hospedeira, mas o receptor celular no hepatócito ainda não é conhecido. Dentro do hepatócito, o genoma do HBV encontra-se na forma relaxada ou RC-DNA (Figura 5). Esse DNA é circular, não covalentemente fechado, e tem cerca de 3,2 Kb de comprimento. Imediatamente após a introdução do material genético viral na célula, ele é enviado para dentro do núcleo, onde passa por reparado e ocorre a complementação da síntese da cadeia positiva (incompleta) do DNA. O genoma viral é, assim, convertido numa cadeia circular fechada de DNA, com ligações covalentes (cccDNA) pelo DNA polimerase viral (BECK; NASSAL, 2007). A partir da cadeia de cccDNA, são transcritos (pela RNA polimerase) vários genomas e sub-genomas de RNA. Esses RNA pré-genômicos (pgRNA) são seletivamente encapsulados, enviados para o citoplasma e, em seguida, convertidos na cadeia negativa do DNA pela transcriptase reversa. Durante esse processo, forma-se primeiramente um intermediário de RNA, com cerca de 3,4 Kb, ficando no interior do chamado vírus imaturo. Esse RNA constitui o molde para a síntese da cadeia negativa (-) do DNA.

À medida que essa cadeia transforma RNA em DNA, vai também degradando o RNA por meio da atividade da RNase H que também possui. Mas a degradação do RNA não é completa e o oligorribonucleótido terminal (que inclui a sequência repetida DR1) é emparelhado com a região DR2, perto do terminal 5' da mesma cadeia menos (-), onde atua como iniciador da síntese da cadeia mais (+). A síntese da cadeia positiva é então iniciada e as partículas do core, contendo DNA viral, são então envolvidas por AgHBs e secretadas para fora do hepatócito ou transportadas para o núcleo, onde se completa a síntese da cadeia positiva e se forma novamente o cccDNA. Desse modo, existem duas fontes de cccDNA: as novas partículas virais que entram no hepatócito e a realocização para o núcleo do DNA do HBV, sintetizado de novo no citoplasma do hepatócito.

Figura 5 - Representação esquemática do ciclo de vida do HBV².

Fonte: Adaptação de Raney, A.K. & McLachlan, A. (1991). *Molecular Biology of the Hepatitis B Virus*. A. McLachlan, p. 1-38. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Figura 6 - Organização do genoma do vírus.



Fonte: Beck e Nassal (2007).

² O HBV infecta hepatócitos através de um receptor da superfície celular ainda desconhecido. Após a entrada do vírion, ocorre o desencapsulamento e os nucleocapsídeos são transportados para o núcleo da célula onde RC-DNA é convertido em cccDNA, que é usado como molde para a transcrição de RNA pregenômico (pgRNA). No citoplasma, pgRNA é ligado pela polimerase viral e embalados em nucleocapsídeos, onde o DNA viral é sintetizado. Nucleocapsídeos são montados com proteínas do envelope viral no retículo endoplasmático, ou entregue como DNA viral de amplificação de cccDNA no núcleo celular.

No genoma do HBV, são reconhecidos quatro genes principais(Figura 6³):

- **Gene pré-S/S**: codifica as proteínas do invólucro do vírus (AgHBs), detectado no soro de pacientes infectados;

- **Gene pré-C/C**: codifica uma proteína solúvel (AgHBe), a proteína do invólucro externo; trata-se da proteína do nucleocapsídeo (AgHBc), o core, que possui o DNA viral. O core é composto por DNA (que se duplica dentro dos núcleos das células infectadas) e DNA polimerase;

- **Gene P**: codifica a DNA polimerase/transcriptase reversa;

- **Gene X**: codifica uma proteína de significado pouco claro.

O gene core ou C possui 2 códons de iniciação, a região pré-core e a região core, sendo possível a tradução a partir de um ou outro. Assim, é traduzido o AgHBe (a partir do pré-core) e quando a tradução se inicia na região do core é sintetizada uma proteína estrutural da nucleocapsídeo, o AgHBc (que protege o DNA viral da degradação por nucleases exógenas). A cadeia de polimerase, que compreende cerca de 75% da extensão do genoma, produz uma proteína multifuncional que inclui: uma proteína terminal, uma região *spacer* ou de ligação, uma região da DNA polimerase/transcriptase reversa e uma região correspondente à ribonuclease H. Assim, a polimerase viral funciona, quer como uma transcriptase reversa (para a síntese da cadeia negativa do DNA, a partir RNA genômico), quer como uma DNA polimerase endógena. A polimerase do vírus apresenta semelhança com enzimas de transcrição reversa de retrovírus, como o VIH (vírus da imunodeficiência humana), que foram exploradas para o desenvolvimento de fármacos, como a lamivudina, que inibe a atividade dessas enzimas. A proteína X é um potente transativador, parecendo ter uma função essencial na replicação e na hepatocarcinogênese. Algumas sequências reguladoras da transcrição foram mapeadas (promotores, *enhancers*). Algumas interações específicas entre essas sequências e esses fatores de transcrição, derivados da célula hepática (que podem também contribuir para o hepatotropismo do vírus), começam agora a ser esclarecidas.

³ O RC-DNA está parcialmente em duas cadeias, é circular e é indicado por linhas pretas grossas, com o P ligado covalentemente à extremidade 5' do DNA (-), e o primer do RNA (linha em zigzag) à extremidade 5' do DNA (+). A parte tracejada simboliza os comprimentos heterogêneos da cadeia positiva. DR1 e DR2 são zonas diretamente repetidas. O círculo exterior simboliza o pgRNA terminal redundante com a cauda poli-A ligada à extremidade 3'. As posições relativas a ORF para o núcleo (c), P, o pré-S/S e o X são mostradas no interior da figura. Tp, domínio terminal da proteína P.

2.3 FORMAS DE CONTÁGIO DO HBV

As formas classicamente descritas de contágio da infecção são:

- Relações sexuais desprotegidas, pois o vírus encontra-se no sêmen e nas secreções vaginais;
- Procedimentos realizados sem a esterilização adequada ou com a reutilização de dispositivo contaminado, que deveria ser descartável. Isso acontece, por exemplo, em intervenções odontológicas e cirúrgicas, hemodiálise, tatuagens, perfurações de orelha, colocação de *piercings*;
- Transfusão de sangue e hemoderivados contaminados (registrado no passado e que atualmente reduziu-se a números insignificantes devido ao avanço nos testes de triagem de bancos de sangue e regulamentos dessa prática pela ANVISA/MS desde 1978);
- Uso de drogas com compartilhamento de seringas, agulhas ou outros equipamentos ou dispositivos, como instrumentos duros, rígidos ou contundentes (canudo feito de papel, plástico);
- Transmissão vertical (mãe infectada para o filho);
- Aleitamento materno (mãe infectada) – ainda a esclarecer, visto a existência de poucas evidências dessa forma de contaminação;
- Acidentes perfurocortantes e contundentes em práticas rotineiras.

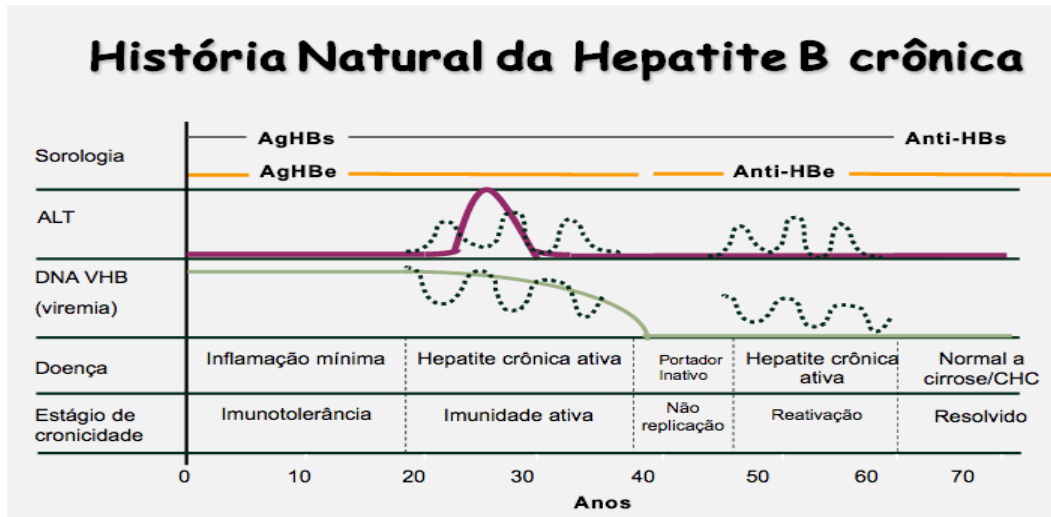
No Brasil, há um instrumento especial (Protocolo de Exposição Prévia - PEP) para atendimento aos profissionais de saúde que se acidentam com material perfurocortante e a pessoas que, de alguma forma, se expõem ao risco de contaminação com o vírus da hepatite B e outros de contágio semelhante, como o HIV. Na Bahia, nas situações descritas acima, o acidentado, ou exposto, deve procurar atendimento ambulatorial nos Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIE), da Secretaria do Estado da Saúde, em parceria com o Ministério da Saúde, ou nos centros de atendimento de clínicas e hospitais de doenças infectocontagiosas. Os profissionais que atendem pacientes nessas condições devem explicar a implicação da infecção e cadastrá-los no Sistema de Informação de Agravos e Notificações, do Ministério da Saúde (SINAN-MS).

2.4 A DOENÇA (MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA)

A infecção pelo HBV pode causar hepatite aguda ou crônica, sendo as duas situações geralmente oligossintomáticas. Apenas 30% dos indivíduos adultos infectados manifestam a forma icterícia da doença na fase aguda e essa percentagem é ainda menor em crianças. A resolução da infecção é representada, na maioria dos casos, pelo aparecimento do anti-HBs e o desaparecimento do HBsAg. Aproximadamente 5 a 10% dos adultos infectados podem evoluir para a forma crônica da doença, mesmo na presença desses dois marcadores. A cronificação da infecção é definida com a persistência do vírus, ou seja, pela presença do HBsAg por mais de seis meses, detectada por meio de testes sorológicos.

Fatores comportamentais e genéticos, características demográficas ou concomitância de algumas substâncias tóxicas, aumentam o risco de cirrose e neoplasia primária do fígado nos portadores crônicos do HBV, tais como: consumo de álcool, fumo, gênero masculino, extremos de idade, história familiar de CHC, contato com carcinógenos, tais como aflatoxinas. A replicação viral persistente, a presença de cirrose, o genótipo C do HBV, a mutação na região promotora do pré-core e a coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e do vírus da hepatite C (HCV) também são fatores que aumentam a probabilidade de evolução para formas graves. Embora a cirrose seja um fator de risco para CHC, 30 a 50% dos casos de CHC associados ao HBV ocorrem na ausência dessa enfermidade. O diagrama abaixo (figura 7) mostra o curso natural da infecção pelo HBV.

Figura 7 – Evolução da hepatite B crônica



Fonte: ANVISA (2009)

2.4.1 Fases da doença

A hepatite viral crônica B pode ser dividida em quatro fases:

1ª fase: Imunotolerância - existe elevada replicação viral, mas não há evidências de agressão hepatocelular. A denominação de fase de imunotolerância deve-se ao fato de que o sistema imunológico do hospedeiro é induzido a não responder a replicação viral, pois o material genético do patógeno ainda encontra-se no interior do núcleo da célula hospedeira, o que dificulta o acesso das células do sistema imune. Por conta disso, as aminotransferases (AST e ALT) estão normais ou próximas do normal e há pouca atividade necroinflamatória no fígado. Geralmente, essa fase é mais longa nos indivíduos infectados por transmissão vertical, não havendo indicação de tratamento com as drogas atualmente disponíveis.

2ª fase: Imunoclearance - esgota-se a tolerância imunológica, diante das tentativas do sistema imune em eliminar o vírus. Em função disso, há agressão dos hepatócitos nos quais ocorre replicação viral, gerando elevação das transaminases. Aos pacientes que apresentam o HBeAg reagente, que traduz replicação viral, há indicação de tratamento dentro dos critérios de inclusão do protocolo adotado pelo Ministério da Saúde do Brasil.

3ª fase: Portador inativo - é caracterizada por níveis muito baixos ou indetectáveis de replicação viral, normalização das transaminases e, habitualmente,

oroconversão HBeAg/anti-HBe. Nessa situação, diz-se que o sistema imunológico do hospedeiro reprimiu a replicação viral, mas a eliminação do HBV não pode ser realizada pelo fato de o DNA viral se integrar ao núcleo dos hepatócitos do hospedeiro. Clinicamente, esses pacientes têm bom prognóstico e por isso não há indicação de tratamento com as drogas atualmente disponíveis. Em situações específicas, poderá ocorrer escape viral, seja por depressão da atividade imunológica do hospedeiro, seja por mutações que confirmam ao HBV a capacidade de escapar da resposta do hospedeiro, passando-se, então, para a 4ª fase (reativação). Essa última situação é particularmente importante e requer determinações seriadas da carga viral, mesmo em pacientes anti-HBe reagentes com transaminases normais, pois esses podem ter carga viral $>10^4$ /mL ou 2.000 UI/mL. Portanto, recomendam-se determinações de HBV-DNA quantitativo - carga viral - pelo menos, a cada seis meses.

4ª fase: Reativação - em seguida à fase do portador inativo, pode haver a reativação viral, com retorno da replicação. Esse fenômeno pode ocorrer por imunossupressão no hospedeiro, em decorrência de quimioterapia, uso de imunossupressores, entre outros, ou por mutações virais, permitindo o retorno da replicação pelo escape à vigilância imunológica do hospedeiro. No primeiro caso, geralmente, o paciente reverte a soroconversão, tornando-se novamente HBeAg reagente, enquanto na segunda situação o paciente continua anti-HBe reagente, caracterizando a mutação pré-core e/ou core-promoter, que decorre da substituição de nucleotídeos nessas regiões, incapacitando a expressão do HBeAg ou levando à sua expressão em níveis muito baixos.

Entre os portadores do HBV que mantêm o HBeAg reagente, aqueles com ALT elevada (>2 vezes o limite do normal) apresentam uma taxa de soroconversão espontânea (HBeAg/anti-HBe) de 8 a 12% ao ano. Taxa bem menor verifica-se em portadores que apresentam ALT normal, ou com elevações mínimas, e nos indivíduos imunodeprimidos.

Após o desaparecimento do HBeAg, com ou sem soroconversão HBeAg/anti-HBe, pode seguir-se uma exacerbação do quadro de hepatite, manifestada pela elevação da ALT e mesmo pelo aparecimento de icterícia, quadro que pode se confundir com uma hepatite aguda.

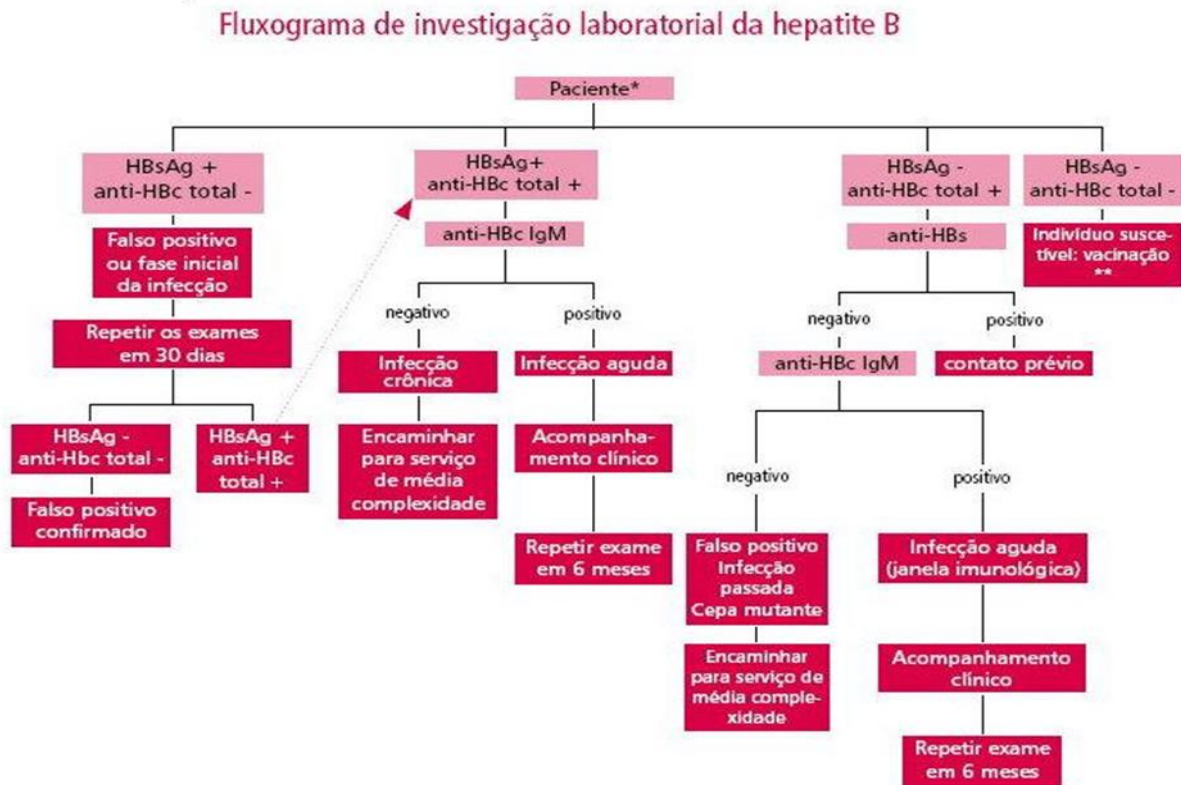
Os seguintes fatores são preditores de maior probabilidade de soroconversão HBeAg/anti-HBe espontânea: idade superior a 40 anos, ALT elevada e genótipo A ou B.

Depois da soroconversão HBeAg/anti-HBe, 67 a 80% dos portadores apresentam acentuada redução na carga viral ou mesmo a sua indetectabilidade. Habitualmente, a ALT se normaliza, pois o processo necroinflamatório no fígado é mínimo ou ausente. Tais indivíduos são chamados de portadores inativos. Aproximadamente 4 a 20% deles tornar-se-ão novamente HBeAg reagentes, com replicação viral e exacerbação do quadro de hepatite, depois de anos de aquiescência. É necessário acompanhamento desses indivíduos para verificar a manutenção da inatividade entre os que sofreram soroconversão, tendo-se tornado, portanto, HBeAg não reagentes/anti-HBe reagentes. Uma proporção mantém níveis de replicação viral, que pode ser observada por exames de biologia molecular para carga viral, ou seja, HBV-DNA e ALT elevado. Tais pacientes tornaram-se portadores de uma variante do HBV que não produz HBeAg, devido a uma mutação nas regiões pré-core ou região promotora do *core*. Nesses pacientes, o marcador HbeAg não pode ser considerado preditivo de replicação viral significativa, portanto é necessário realizar o teste de carga viral, ou seja, HBV-DNA quantitativo.

2.5 MARCADORES SOROLÓGICOS DA INFECÇÃO

No diagnóstico atual da hepatite B ainda são utilizados marcadores séricos de função/lesão hepática, virais e de resposta ao vírus (Figura 8). O estudo da concentração sérica ou plasmática de elementos bioquímicos próprios do hepatócito, ou provenientes do metabolismo hepático, fornece parâmetros valiosos na avaliação da função hepática, no que diz respeito a doenças direta ou indiretamente relacionadas com o fígado, como no caso da hepatite B. Fazem parte do protocolo da hepatite B da ANVISA/MS as dosagens das concentrações plasmáticas de bilirrubinas (total e frações), transaminases (AST e ALT), fosfatase alcalina, gama-glutamil-transferase (gama-GT ou GGT), proteínas totais, albumina e protrombina.

Figura 8 - Investigação laboratorial da hepatite B



Fonte: McPherson (2007)

O período de incubação viral na hepatite B varia de 4 a 12 semanas e o *status* imunológico do paciente é avaliado de acordo com a presença ou não de marcadores virais. A fase aguda é caracterizada pela presença do antígeno HBs (HBsAg) no soro do indivíduo, seguida pelo aparecimento de IgM anti-HBc e anti-HBc total. O antígeno HBe (HBeAg), indicativo de replicação viral e infectividade, surge no final do período de incubação e desaparece pouco antes do HBsAg, no decorrer da fase sintomática. A convalescença ocorre de 2 a 16 semanas, a partir da infecção, com declínio de IgM anti-HBc, permanência de IgG anti-HBc e desaparecimento do HBsAg. A cura é caracterizada pela soroconversão do HBsAg para anti-HBs, conferindo imunidade ao indivíduo e pela normalização das enzimas hepáticas. A presença exclusiva de anti-HBs, sem outros marcadores bioquímicos de lesão hepática e imunológicos associados à resposta viral, ou outros marcadores virais, indica vacinação (GONÇALES; GONÇALES JÚNIOR, 2006; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011).

Figura 9 – Hepatite B aguda: interpretação dos marcadores sorológicos

Hepatite B aguda: Interpretação dos marcadores sorológicos

Marcador	Significado
HBsAg	É o primeiro marcador que aparece no curso da infecção pelo HBV. Na hepatite aguda, ele declina a níveis indetectáveis em até 24 semanas.
Anti-HBc IgM	É marcador de infecção recente, encontrado no soro até 32 semanas após a infecção.
Anti-HBc Total	É marcador presente nas infecções agudas pela presença de IgM e crônicas pela presença de IgG. Representa contato prévio com o vírus.
HBeAg	É marcador de replicação viral. Sua positividade indica alta infecciosidade.
Anti-HBe	Surge após o desaparecimento do HBeAg, indica o fim da fase replicativa.
Anti-HBs	É o único anticorpo que confere imunidade ao HBV. Está presente no soro após o desaparecimento do HBsAg, sendo indicador de cura e imunidade. Está presente isoladamente em pessoas vacinadas.

Fonte: Departamento de Vigilância Epidemiológica (BRASIL, 2009).

Figura 10 – Hepatite B crônica: interpretação dos marcadores sorológicos

Hepatite B crônica: Interpretação dos marcadores sorológicos

Marcador	Significado
HBsAg	Sua presença por mais de 24 semanas é indicativa de hepatite crônica.
HBeAg	Na infecção crônica está presente enquanto ocorrer alta replicação viral.
Anti-HBe	Sua presença sugere redução ou ausência de replicação viral, exceto nas cepas com mutação pré-core (não produtoras da proteína "e").

Fonte: Departamento de Vigilância Epidemiológica (BRASIL, 2009).

2.6 RESPOSTA IMUNE AO HBV

A imunidade inata desempenha um papel crucial logo após a infecção para limitar a propagação do patógeno e iniciar o desenvolvimento eficiente de uma resposta imunológica adaptativa. Respostas imunes inatas durante as fases iniciais de infecções virais são caracterizadas principalmente pela produção de interferon tipo 1 (IFN) - α / β e pela ativação de células natural killer (NK). A produção de IFN de tipo 1 é desencadeada diretamente pela replicação do vírus através de mecanismos celulares que detectam a presença de RNA ou DNA viral (ALEXOPOULOU et al, 2001;. LUND et al, 2003;. HEIL et al, 2004), enquanto que as células NK são ativadas pelo reconhecimento de moléculas induzidas pelo stress celular e/ou pela modulação da quantidade de moléculas do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC)-classe I na superfície de células infectadas (MORETTA et al., 2005).

A comparação entre as cinéticas de replicação do HBV e do vírus da hepatite C (HCV) chamou atenção para o padrão incomum de replicação do VHB (BERTOLETTI; FERRARI, 2003; WIELAND; CHISARI, 2005). Experiências realizadas com chimpanzés mostraram que, enquanto a replicação de HCV no fígado é iniciada imediatamente após a infecção (THIMME et al., 2002), o HBV só entra numa fase exponencial de replicação após 4 ou 5 semanas da infecção (THIMME et al, 2003). A fase de latência inicial da replicação do VHB não parece ser uma consequência da inibição promovida por elementos da imunidade inata e adaptativa. Estudos realizados em mamíferos sugerem que a ativação de IFN- γ , interleucina (IL)-2 e do fator de necrose tumoral (TNF) - α , bem como o recrutamento de células inflamatórias intra-hepática, só se inicia após a expansão logarítmica do HBV (COTE et al, 2000; HODGSON; MICHALAK, 2001; NAKAMURA et al, 2001). Ainda não foi possível delinear corretamente o destino do HBV nas primeiras 4 semanas após a infecção, logo, não há informações se esse desaparecimento aparente inicial tem impacto sobre a história natural da doença.

A ação da imunidade inata do hospedeiro, durante a fase inicial da hepatite B, encontra-se prejudicada graças à dificuldade do reconhecimento das proteínas virais pelo sistema imunológico, ao fato de o processo de tradução do pgRNA realizar-se no interior do nucleocapsídeo e a não expressão de genes regulatórios pela célula hospedeira quando infectada pelo HBV (WIELAND et al., 2005). Esses fatores atuam como escapes do sistema imune que é altamente sensível à produção de mRNA virais (HUI; LAU, 2005).

O clareamento viral e o término da infecção pelo HBV dependem da ativação da imunidade adaptativa. Há uma efetiva participação dos linfócitos T CD4+ que ativam os linfócitos T CD8+ e promovem a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos para a produção de anticorpos. O reconhecimento de epítopos das proteínas do nucleocapsídeo, por apresentação via MHC-II, ativa os linfócitos t auxiliares (BERTOLETTI; GERHING, 2006).

Os LT CD8+ participam da eliminação viral por meio de mecanismos citolíticos e não citolíticos, diminuindo os níveis de vírus circulantes, enquanto os anticorpos neutralizam partículas virais livres e podem prevenir a reinfecção. Na fase aguda da hepatite B, portanto, há grande predomínio da resposta de linfócitos T citotóxicos

(LTc), inicialmente pela via não citolítica, que envolve a produção de citocinas inflamatórias, agindo na eliminação de partículas do nucleocapsídeo e do genoma viral replicante em seu interior, além de retardar a regulação pós-transcricional do mRNA viral (GUIDOTTI et al, 2006).

A ação dos LTc se inicia após o reconhecimento de epítomos específicos do HBV, relacionados com as proteínas do core, do envelope, da polimerase e da região X (WEBSTER et al., 2000). As células NK e NKT podem abolir a expressão e a replicação do HBV, sem destruição do hepatócito, promovendo, ao invés, um efeito antiviral mediado por INF- γ e TNF- α (GUIDOTTI et al, 1996; THIMME, 2003). As células infectadas remanescentes recebem ação dos LT CD8+ que, agora, pela via citolítica, promovem a apoptose dos hepatócitos e a eliminação do restante da população viral (BAUMERT; THIMME; WEIZSÄCKER, 2007). Sabe-se, também, que apesar do papel fundamental dos LTc, deverá haver uma ativação coordenada entre os LT CD4+ e LT CD8+ para o clareamento viral completo, o que está presente apenas nos sujeitos que controlam a infecção (THIMME, 2003).

Em todas as fases da resposta imune, inata ou adaptativa, o papel das citocinas é fundamental. Sua secreção surge em resposta a antígenos variados, estimulando o desenvolvimento da imunidade e da inflamação.

Cheong et al (2006) demonstraram haver relação entre o nível sérico de citocinas em pacientes contaminados com o HBV e as manifestações clínicas da hepatite B. Estudando os níveis séricos do TNF- α e sua relação com o grau de fibrose hepática e a classificação de Child-Pugh, Kiki e colaboradores (2006) encontraram uma associação positiva dessa citocina com o índice de atividade histológica nos pacientes com hepatite B crônica ativa, sem cirrose.

De acordo com o padrão das citocinas produzidas por linfócitos CD 4⁺, a resposta imune pode ser dividida em Th0, Th1, Th2 e Th17. As células Th1 produzem interferon-gama (IFN- γ) e interleucina2 (IL-2). As células Th2 produzem as interleucinas5 (IL-5), 10 (IL-10) e 4 (IL-4). As células Th0 são precursoras das células Th1 e Th2, por isso produzem um padrão misto de citocinas Th1 e Th2 (FANet al., 1998).

O IFN- γ e a IL-2 são citocinas relacionadas com funções editoras da resposta imune, responsáveis por ativação e proliferação celular. A IL-2 é uma das principais citocinas relacionadas com a indução da proliferação de linfócitos T, Tc e B e células

NK. Também é o principal fator de crescimento para células T CD4, com fenótipo Th1.

O INF- γ tem a função de ativar as células NK; os macrófagos, de exercer função microbicida, por meio da produção de óxido nítrico (NO), e de modular a resposta imune, suprimindo a atividade das células Th2. Em associação com o fator de necrose tumoral (TNF), o INF- γ induz ativação de macrófagos e granulócitos para destruir células infectadas (ABBAS et al., 2003).

A IL-10 relaciona-se com a desativação de células envolvidas na resposta imune, exercendo um papel imunomodulador típico das células Th2. Apresenta propriedade anti-inflamatória e supressora da resposta imune, induz à produção de anticorpos por linfócitos B ao mesmo tempo em que inibe a função dos macrófagos para destruir patógenos e a síntese de várias citocinas, tais como IL-1, IL-8, IL-6, TNF e IL-12 (ABBAS et al., 2003).

Durante a infecção aguda, a maioria das células que infiltram o fígado tem atividade Th1, com função de destruir o patógeno. Essas células liberam IL-2 e INF- γ , que podem ativar efeitos antivirais, mas também causam inflamação e necrose.

Citocinas do perfil Th2, como a IL-10, inibem a atividade Th1 logo após a infecção aguda, e quando a infecção é persistente, seu papel pode ser o de proteger contra os potenciais efeitos danosos das células Th1 (FAN et al., 1998).

Tem sido demonstrado que na Hepatite B, pacientes que apresentam diminuição da viremia têm uma potente resposta tipo Th1, com moderada atividade Th2.

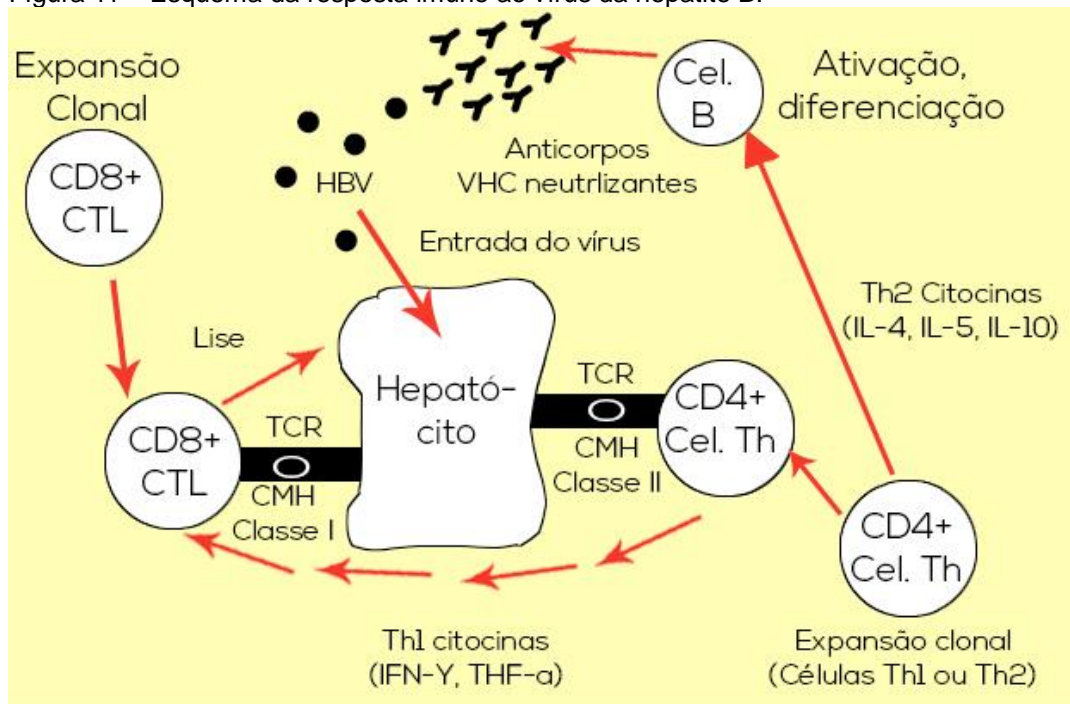
Na presença de produção excessiva de citocinas Th1, como IL-2, INF- γ e TNF, predominam os efeitos pró-inflamatórios, havendo maior lesão hepática, com grande quantidade de necrose celular e fibrose (AGUILERA; BERENGUER, 2009). A IL-10, inibindo a expressão de IL-2, INF- γ e TNF, também modula os efeitos indutores de fibrose daquelas citocinas. A IL-10, pela sua proeminente atividade antifibrótica, pode levar à diminuição de expressão do colágeno tipo I, enquanto induz aumento do colágeno intersticial (ROCKEY, 2000).

O TGF- β é a citocina responsável pela reparação e regeneração dos tecidos, depois da lesão, promovendo quimiotaxia de monócitos e linfócitos, induzindo à angiogênese e controlando a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios para o tecido lesado (KEHRL et al., 1986). Nesse sentido, estimula a síntese de componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, colágeno e

proteoglicanas, aumenta a expressão de integrinas sobre a superfície das células o que facilita a adesão para a matriz extracelular (ROBERTS et al., 1986). Entretanto, a produção excessiva de TGF - β pode ser responsável pela cicatrização de feridas, caracterizada pela exuberante formação e deposição da matriz, podendo levar à fibrose.

A figura 11 esquematiza a ação dos principais componentes da resposta imune ao vírus da hepatite B.

Figura 11 – Esquema da resposta imune ao vírus da hepatite B.



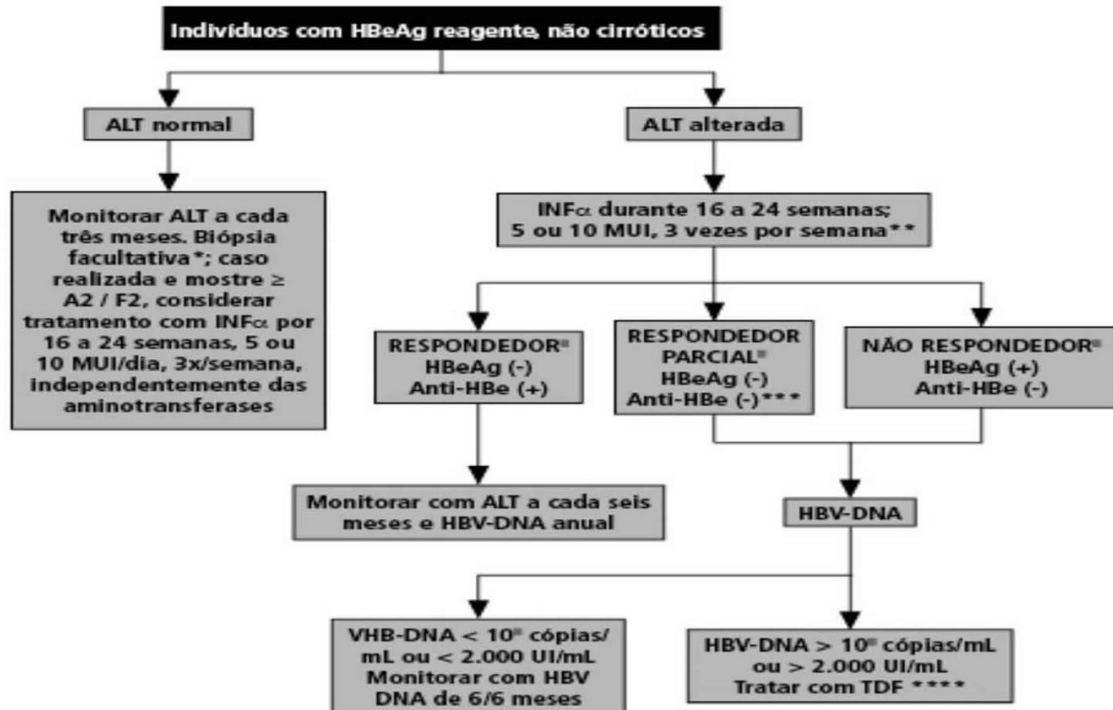
Fonte: Pesquisa do autor

2.7 TRATAMENTO DISPONIVEL PARA HBV

O principal objetivo do tratamento disponível para hepatite B é reduzir o risco de progressão da doença hepática para cirrose, hepatocarcinoma e, conseqüentemente, o óbito. Desfechos intermediários, tais como o nível de HBV/DNA, de enzimas hepáticas e marcadores sorológicos, estão validados pelo Ministério da Saúde e têm sido utilizados como parâmetros para inferir a probabilidade de benefícios da terapêutica em longo prazo, haja vista a supressão da replicação viral de maneira sustentada (MS). A seguir, apresentam-se os

algoritmos de acompanhamento para pacientes com hepatite B crônica de perfil AgHbe reagente e não reagente (Figuras 12, 13 e 14).

Algoritmo 4.1. Indivíduos virgens de tratamento com HBeAg reagente, não cirróticos



¹ Respondedor sorológico; ² Respondedor sorológico parcial; ³ Não respondedor sorológico após 3 meses do término do tratamento.

* Recomenda-se biópsia em indivíduos com > 40 anos, independentemente das aminotransferases, principalmente se de sexo masculino.

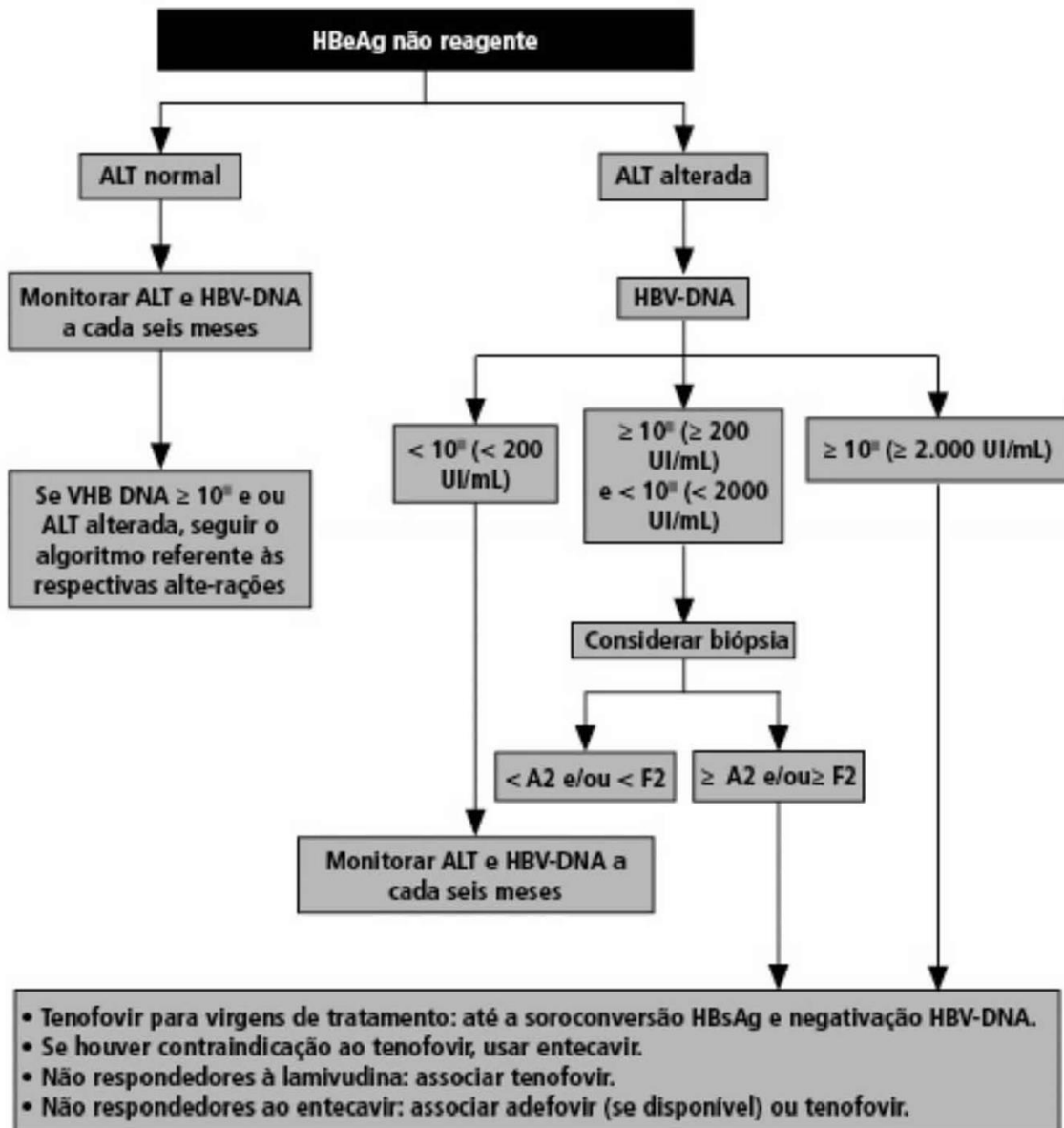
** Recomenda-se estender o tratamento até 24 semanas se o paciente não apresentar soroconversão em 16 semanas.

*** Se o paciente persistir como HBeAg não reagente e anti-HBe não reagente, repetir esses exames após três meses do término do tratamento, pois pode haver soroconversão tardia HBeAg/anti-HBe.

**** O entecavir pode ser indicado, a critério médico, quando houver restrições ao uso do tenofovir.

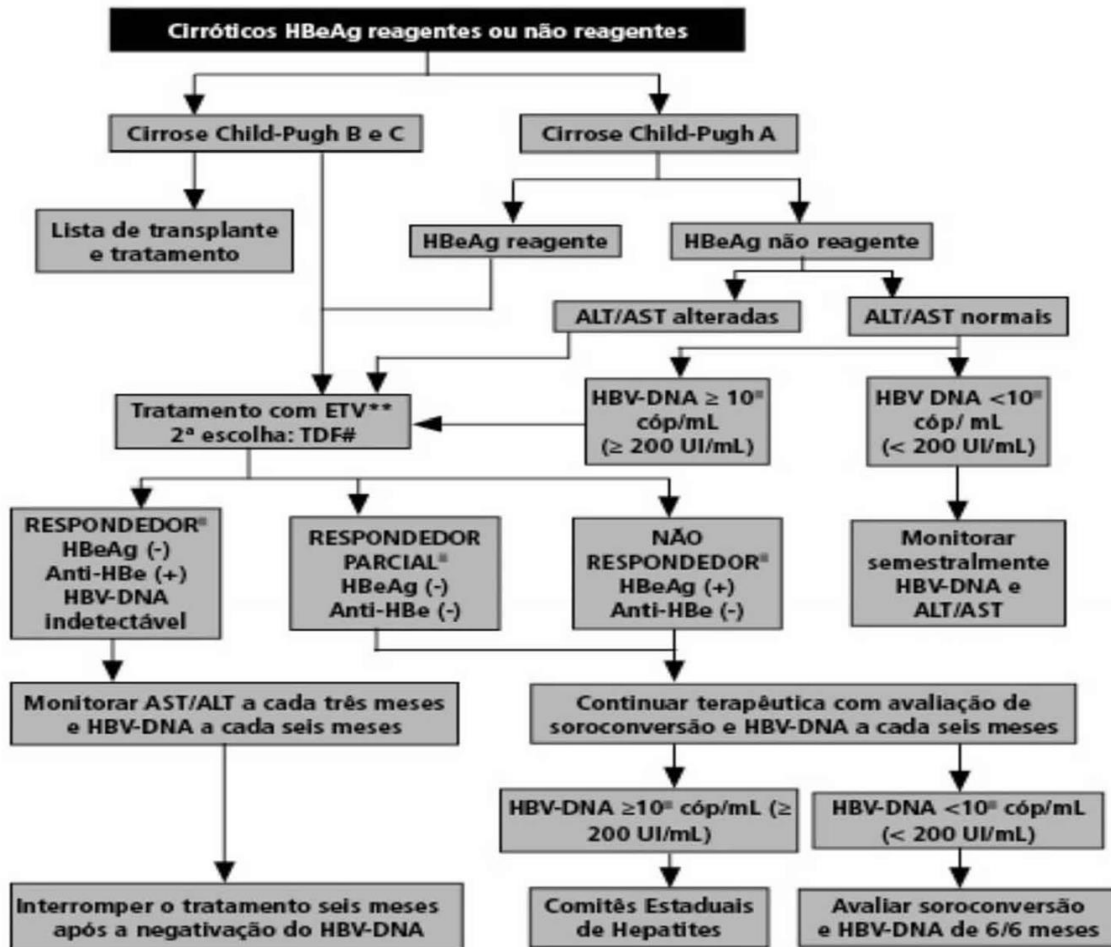
Fonte: Ministério da Saúde (2009).

Algoritmo 4.2. Indivíduos virgens de tratamento, com HBeAg não reagente, não cirróticos



Fonte: Ministério da Saúde (2009).

Algoritmo 4.3. Indivíduos virgens de tratamento, cirróticos, com HBeAg reigente ou não reigente



¹ Responder sorológico; ² Responder sorológico parcial; ³ Não responder sorológico após 12 meses de tratamento.

* Está indicado para virgens de tratamento ou expostos à lamivudina, com resistência confirmada.

** Está indicado havendo impedimento ou contraindicação clínica ao esquema proposto de primeira escolha.

Associado à lamivudina ou ao entecavir nos casos de resistência ou como monoterapia, quando do impedimento ou contraindicação clínica ao esquema proposto de primeira ou segunda escolha.

Fonte: Ministério da Saúde (2009).

Os critérios adotados no Brasil para iniciar quimioterapia em pacientes infectados com o vírus da hepatite B são:

- Idade superior a 2 anos;
- Presença de AgHBs por mais de 6 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 necroinflamatória de moderada a intensa ($\geq A2$) e/ou presença de fibrose de moderada a intensa ($\geq F2$);
- Ausência de contraindicação ao tratamento (BRASIL, 2008).

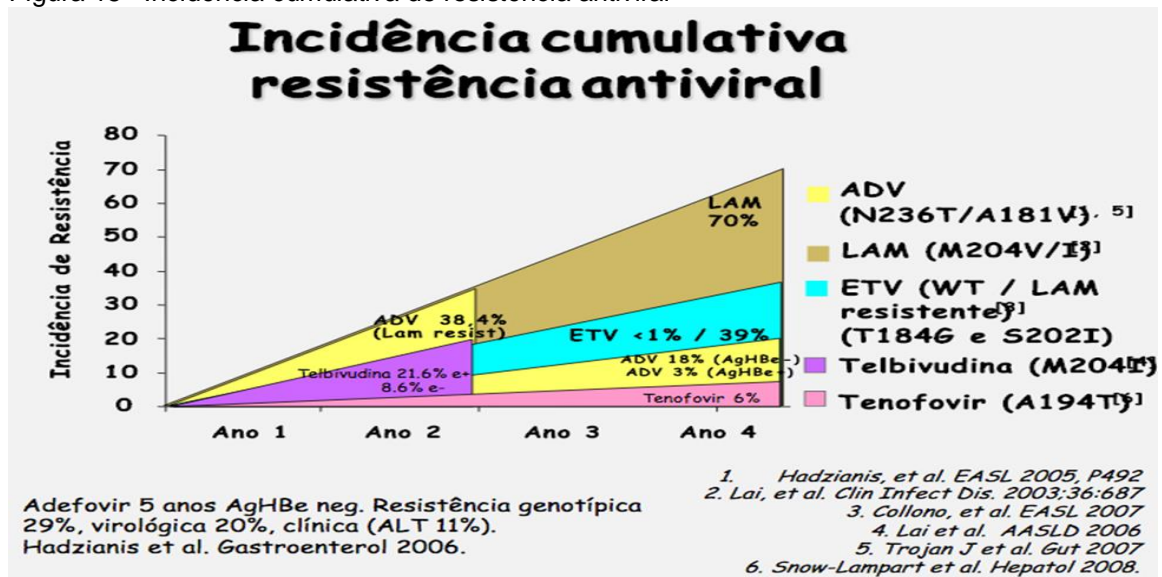
Para o tratamento da hepatite crônica pelo vírus da hepatite B, duas classes de agentes terapêuticos estão aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela Food and Drug Administration (FDA), e pela Comunidade Europeia: o interferon convencional (LAI, 1998), os interferon peguilhados $\alpha 2a3$ (LAU et al., 2005), $\alpha 2b$ (JANSSEN et al., 2005) e os análogos de nucleosídeos/nucleotídeos: lamivudina (LAI, 1998), adefovir (HADZIYANNIS et al, 2006), entecavir (LAIA et al, 2006), tenofovir (MARCELLIN et al., 2008) e telbivudina (LAIA et al, 2007). A indicação de tratamento é realizada de acordo com as duas formas de evolução da hepatite crônica, a hepatite crônica HBeAg positivo e a hepatite crônica HBeAg negativo (MARCELLIN, 2007).

Em pacientes HBV positivos, os níveis de ALT e AST devem ser monitorados para orientação do seguimento e para decisão terapêutica. Segundo protocolo do Ministério da Saúde, quando a ALT e/ou a AST estiverem normais, está indicado o seu monitoramento a cada três meses. Por outro lado, quando alteradas, indicam a necessidade de iniciar o tratamento.

Faz-se necessário destacar algumas diferenças entre os agentes terapêuticos disponíveis. A lamivudina, que provoca rápida inibição da replicação viral, produz resistência, que chega a 67% em quatro anos de tratamento (CHANG et al., 2010). Assim sendo, a lamivudina não é mais considerada medicação de primeira linha para tratamentos de longo prazo, pois dificulta a utilização posterior de outros análogos de nucleosídeos (ZOULIM, 2008). O adefovir apresenta lenta inibição da replicação e baixa indução de resistência viral. O entecavir apresenta rápida inibição da replicação viral, com baixa indução de resistência, exceto nos pacientes lamivudina-resistentes. A telbivudina com rápida e potente inibição da carga viral apresenta desenvolvimento de resistência, em porcentagens menores do que a lamivudina. Os interferons, convencional ou peguilhado, agindo também sobre o sistema imunológico, devem ser utilizados por tempo limitado, produzindo baixos índices de resposta sustentada. Atualmente, têm-se disponíveis para o tratamento da hepatite B crônica no Brasil quatro análogos de nucleostídeos (lamivudina, adefovir, entecavir, tenofovir); e duas terapias baseadas em interferon (interferon alfa convencional e interferon alfa peguilhado) (ASPINALL et al, 2011).

A figura 15 esquematiza a incidência cumulativa de resistência viral.

Figura 15– Incidência cumulativa de resistência antiviral

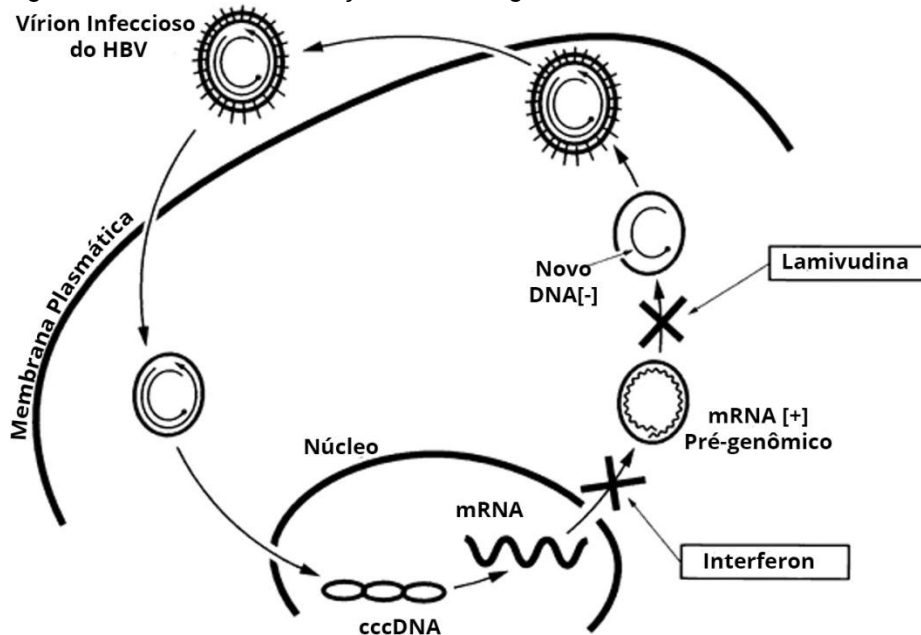


Fonte: S. K. Ono-Nita (2010)

Os análogos de nucleotídeos/nucleosídeos têm uma ação seletiva sobre a DNA polimerase (Figura 14) e, dessa forma, suprime a carga viral, normaliza as aminotransferases e, em algumas situações, auxilia na melhora da fibrose hepática. As drogas hoje disponíveis para o tratamento da infecção pelo HBV foram inicialmente sintetizadas para o tratamento de pacientes com HIV.

Estudos posteriores demonstraram que a enzima DNA polimerase do HBV tem uma atuação similar a transcriptase reversa do HIV. Essa descoberta permitiu que as drogas pudessem ser usadas para tratamento da hepatite B. O tempo de duração do tratamento é vinculado a soroconversão do AgHBe para o anti-HBe e do AgHBs para o anti-HBs (WIENS; CORRER; PONTAROLO, 2010; LAM et al., 2011).

Figura 16 – Mecanismo de ação dos análogos de nucleotídeos.



Fonte: Produção do autor.

Os interferons são glicoproteínas com diversas ações biológicas, dentre elas efeitos antivirais, imunomoduladores, antiproliferativos complexos. São produzidos por uma técnica de DNA recombinante expressa em *escherichia coli*. Grande gama de vírus RNA e DNA é sensível ao interferon, porém, o mecanismo e o grau do efeito variam com o vírus. A sua atividade antiviral está baseada no fato de se combinarem aos receptores superficiais celulares específicos e inibirem a penetração, proliferação e liberação dos vírus, sendo o principal efeito a inibição da síntese proteica viral. Formulações peguiladas (PEG-IFNa2a) também são utilizadas no tratamento da hepatite crônica B. Essas novas apresentações de IFN apresentam longa meia-vida e podem ser administradas uma vez por semana apenas, promovendo maior conforto ao paciente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de citocinas séricas em pacientes com hepatite B crônica *naive* e tratados com antivirais análogos de nucleostídeos e interferon.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever os níveis de citocinas séricas em indivíduos com hepatite B crônica *naive* e sob quimioterapia antiviral.

Correlacionar os níveis das citocinas INF γ , IL-10 e IP-10 em soro de indivíduos HBV crônicos tratados e não tratados.

Avaliar a sensibilidade da citocina IP-10 comparada com o INF γ , considerada na literatura como a citocina chave no processo inflamatório na HBV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo de corte transversal descritivo do perfil de citocinas em pacientes com hepatite B crônica em tratamento e *naïve*.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo não apresentou benefícios diretos aos participantes, mas produziu conhecimento que pode ser revertido futuramente para avaliação do prognóstico da resposta ao tratamento antiviral.

O estudo foi realizado no Serviço de Gastro-hepatologia do Ambulatório Magalhães Neto do Complexo do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos (AMN-HUPES) da UFBA. A população de pacientes com hepatite B crônica acompanhados ambulatorialmente no AMN-HUPES é de cerca de 850 indivíduos, dos quais aproximadamente 350 estão em tratamento antiviral (dados Serviço de Dispensação de Medicamentos do Hospital Manoel Victorino). Foram incluídos nesse estudo, de forma consecutiva, todos os pacientes com hepatite B crônica atendidos nessa unidade de saúde que aceitaram participar do estudo mediante assinatura do TCLE.

A fim de maximizar recursos, foram utilizadas amostra sorológicas constantes no biorrepositório do projeto intitulado “Avaliação da resistência do vírus da hepatite B (HBV) às drogas antivirais utilizadas no tratamento da hepatite B crônica”, sob coordenação do pesquisador da FIOCRUZ, Dr. Luciano Kalabric Silva, aprovado pelo CEP-FIOCRUZ, protocolo nº 346, parecer nº 238/2011 (Anexo 1), e pelo CEP-HUPES, parecer nº 71/2011 (Anexo 2). Para essa casuística, solicitamos dispensa de novo TCLE junto ao CEP – FIOCRUZ e ao CEP HUPES, que autorizou mediante parecer nº 797.194 (Anexo 3).

Todos os resultados advindos da pesquisa têm um circuito garantido de informação à equipe médica responsável e atualização dos dados nos prontuários dos participantes.

4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO E COLETA DE DADOS

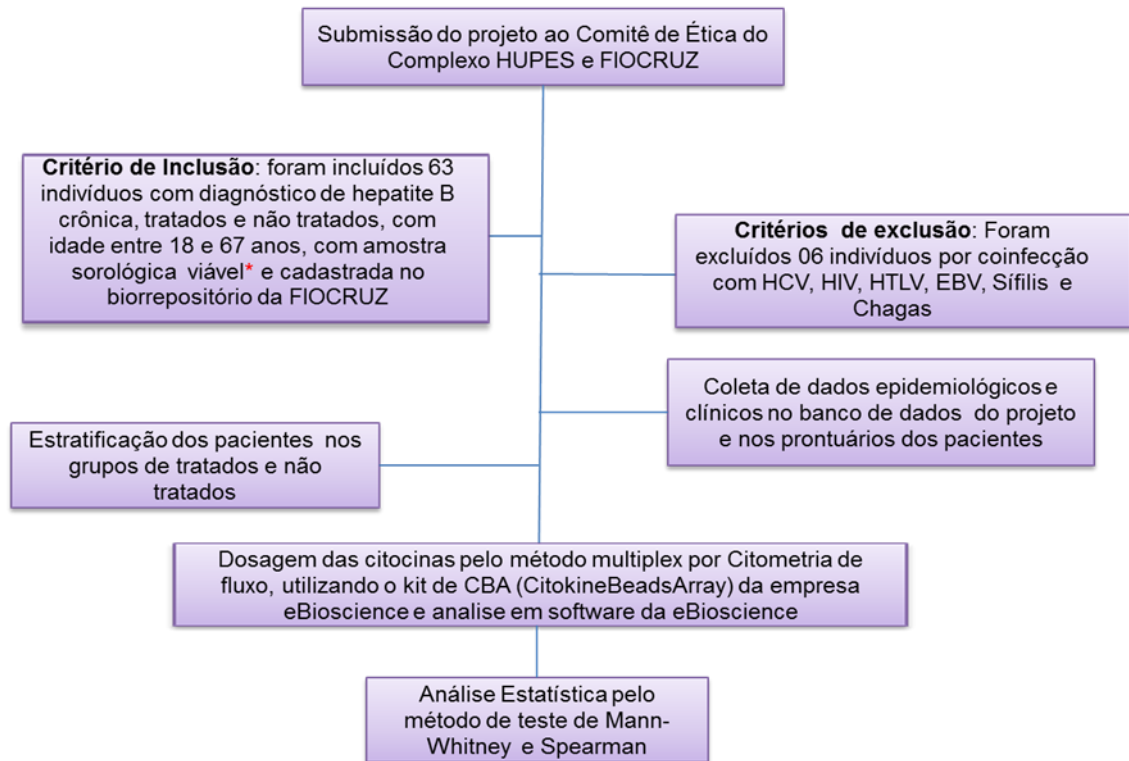
O estudo foi desenvolvido com amostra de conveniência. Foram incluídos nesse estudo descritivo de corte transversal de 57 pacientes com hepatite B crônica (24 em tratamento antiviral e 33 *naïve*) na faixa etária de 21 a 67 anos, atendidos no Ambulatório da Unidade de Gastro-Hepatologia do HUPES/UFBA. Os dados clínicos referentes à carga viral e marcadores sorológicos da infecção (AgHBs, AgHBe, Anti-HBs e Anti-Hbe) foram coletados dos prontuários médicos dos pacientes. Os dados epidemiológicos (sexo, idade, grau de escolaridade, estado civil, zona geográfica de moradia, etnia, renda familiar e motivo do diagnóstico da hepatite B) foram coletados do banco de dados REDCAP da FIOCRUZ-BAHIA, onde todos os participantes encontram-se cadastrados.

4.4 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES VOLUNTÁRIOS

Foram incluídos neste estudo indivíduos monoinfectados para HBV, com idade entre 18 e 67 anos, cadastrados e acompanhados como pacientes no ambulatório de Gastro-Hepatologia da HUPES/UFBA. As amostras sorológicas desses pacientes encontravam-se armazenadas a uma temperatura de -70 graus na FIOCRUZ-BAHIA.

Foram excluídos do presente estudo indivíduos positivos para HCV, HIV, HTLV, sífilis e doença de Chagas, pacientes menores de 18 anos e maiores que 70 anos, incapazes civis de qualquer natureza legal e pacientes que, mesmo atendido os critérios de inclusão, não possuíam amostras sorológicas viáveis cadastradas no biorrepositório utilizado.

4.5 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL



* VIÁVEL – quantidade necessária para fazer dosagens, aspectos límpidos, transparentes, sem hemólise e sem turbidez.

4.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E PROVAS BIOQUÍMICAS

As citocinas IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-8, IL-6, IL-4, IL-5, IL-1 β , TNF e Linfotoxina (TNF-beta) foram quantificadas pelo método Multiplex por Citometria de Fluxo, utilizando o kit de CBA (CitokineBeadsArray) da empresa eBioscience e análise com software da eBioscience em FACScalibur BD, conforme padronização prévia e recomendação do fabricante. A citocina IP-10 foi quantificada utilizando o kit CBA da empresa BD conforme padronização prévia e recomendação do fabricante e também analisada em FACScalibur BD. A dosagem de ALT, AST, fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase (GGT), albumina e globulina foram feitas por química seca com aquisição em aparelho Vitros 250.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise estatística descritiva. Adicionalmente uma análise estatística foi realizada utilizando-se os softwares SPSS versão 18 e GraphPad versão 6, 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%. Foi realizado o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos entre si. As correlações não paramétricas foram feitas pelo teste de Spearman adotando-se intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estudados 57 portadores do HBV, com idade média de 43,9 (21-66 anos), sendo 25 (43,85%) homens e 32 (56,14%) mulheres. Dos indivíduos estudados, 24 encontravam-se em tratamento antiviral contra hepatite B, com idade média de 47,7 anos (27-66), sendo 11 homens e 13 mulheres. O grupo controle foi composto 33 indivíduos com hepatite B crônica sem tratamento antiviral no momento da coleta de amostra sanguínea, com idade média de 41,18 (21-59 anos), sendo 14 homens e 19 mulheres (tabela 1 e 2).

Tabela 1: Características dos indivíduos infectados com Hepatite B.

Distribuição por sexo e idade entre tratados e não tratados		
Variáveis estudadas		TRATADOS n= 24
Sexo	Masculino	11
	Feminino	13
Idade	20-30	6
	31-40	8
	41-50	8
	51-60	8

Fonte: Pesquisa do autor

Tabela 2: Histórico de tratamento dos indivíduos infectados com Hepatite B.

Histórico de tratamento	
	N
EM TRATAMENTO	24
NÃO TRATADOS	33
TOTAL	57

Fonte: Pesquisa do autor

O perfil sociodemográfico dos pacientes estudados encontra-se na tabela 3.

Tabela 3: Perfil sociodemográfico dos pacientes com hepatite B estudados.

Distribuição por escolaridade, estado civil, tipo de zona e etnia entre pacientes tratados e não tratados		
Variáveis estudadas	TRATADOS n= 24	
Escolaridades		
	NA	1
	Ensino Fundamental Incompleto	5
	Ensino Fundamental Completo	2
	Ensino Médio Incompleto	3
	Ensino Médio Completo	9
	Ensino Superior Incompleto	0
	Ensino Superior Completo	3
Estado Civil		
	Casado	8
	Viúvo	13
	Divorciado	0
	Solteiro	2
Tipo de zona		
	Urbana	20
	Rural	3
Etnia		
	Branca	5
	Pardo	11
	Negro	7

Fonte: Pesquisa do autor

O resultado dos exames sorológicos de todos os 57 pacientes estudados encontra-se na tabela 4.

Tabela 4: Dados sorológicos dos pacientes com hepatite B estudados.

Dados sorológicos dos pacientes com hepatite B estudados							
Resultado encontrados	AgHBs		AgHBe		AntiHBe		AntiH Bs
	N	%	N	%	N	%	N
Positivo	55	96,5	35	61,4	36	63,2	1
Negativo	2	3,5	10	17,5	12	21	44
Indeterminado	-	-	12	21,1	9	15,8	12
Total	57	100	57	100	57	100	57

Fonte: Pesquisa do autor

Na população estudada, dos 24 pacientes em tratamento ou tratados, 6 (25%) apresentavam AgHBe positivo e todos (100%) eram AgHBs positivo. No grupo dos

não tratados, do total de 33 pacientes, 3(9%) eram AgHBe positivos e 32 (96,96%) apresentavam AgHBs positivo.

Até o momento, o tratamento da hepatite B, quando indicado, pode ser feito indistintamente com qualquer uma das opções terapêuticas aprovadas (descritas na tabela 5), devendo ser consideradas algumas preferências. Ao iniciar o tratamento deve-se ter em mente que há basicamente dois tipos de opção terapêutica. Na primeira (análogos núcleos(t)ídeos), a doença não é curada, mas controlada com a supressão da replicação viral, pode ter duração indeterminada, é sujeita ao aparecimento de mutações que induzem à resistência, a princípio menos frequentes com as novas drogas, mas que tem a vantagem de praticamente não apresentar efeitos colaterais. Na segunda (interferon convencional e pegilado), a despeito dos efeitos adversos (febre, astenia, mialgia, cefaleia, irritabilidade, depressão, plaquetopenia, neutropenia, etc.), não há indução à resistência, a duração é finita e existe maior chance de cura definitiva, inclusive com a soroconversão do HBsAg. Por essas razões, atualmente a maioria dos grupos, incluindo o consenso da SBH (Sociedade Brasileira de Hepatologia), preconiza o interferon alfa convencional ou pegilado como drogas de primeira linha para tratamento.

A tabela 5 estratifica os 24 pacientes estudados, em uso de terapia antiviral de acordo com a droga em uso.

Tabela 5: Medicamentos utilizados pelos pacientes com hepatite B estudados.

Relação dos medicamentos	
MEDICAMENTO	N
TENOFOVIR	6
LAMIVUDINA	3
ENTECAVIR	9
ADEFOVIR	1
INTERFERON	2
ENTERCAVIR + ADEFOVIR	1
LAMIVUDINA + ADEFOVIR	1
TENOFOVIR + LAMIVUDINA	1
Total	24

Fonte: Pesquisa do autor

Nesse estudo, dos 24 pacientes em tratamento, 9 (37,5%) estavam em uso de Entecavir e apenas 2 (8,36%) utilizavam interferon convencional.

Embora o protocolo da SBH preconize o interferon como droga de primeira escolha, outros fatores ligados à infecção devem ser analisados pelo médico antes

da prescrição medicamentosa, a exemplo: níveis de ALT, presença de fibrose hepática, e intolerância medicamentosa do paciente. Esses fatores individualizados podem explicar os valores encontrados no grupo estudado.

Em outros estados da federação, o análogo de nucleotídeo escolhido como droga inicial é o Adefovir. Os valores encontrados nessa casuística, indicando uma percentagem maior de pacientes em uso de Entecavir, reflete uma situação específica do estado da Bahia.

O resultado da dosagem de citocinas dos indivíduos estudados está esquematizado na tabela 6.

Tabela 6: Níveis de citocinas no soro dos indivíduos tratados e não tratados (mediana, mediana e *p*-valor) (teste de Mann-Whitney).

Níveis de citocinas no soro de indivíduos tratados e não tratados		
Citocinas	Tratados n = 24	Não tratados n = 33
IL12	303,7 (67,2-700,5)	310,8 (190,0 - 978,7)
IL10	404,6 (0,0-448,4)	258,6 (1307,5-1994,9)
IFN γ	151,2 (16,3-360,1)	199,4 (0,0-461,2)
IL8	569,6 (0,0-675,1)	511,4 (310,1-980,6)
IL2	1306 (809,9-1634,1)	1364 (121,8-1868,2)
IL6	141,4 (0,0-314,8)	174,6 (0,0-367,4)
IL4	356,4 (221,0-464,8)	443,9 (0,0-437,8)
TNF α	562,9 (199,0-877,9)	578,1 (371,6-1256,9)
IL5	436,6 (435,8-907,0)	768,9 (135,6-1115,0)
IL1 BETA	98,81 (54,2-195,2)	132,3 (13,4-249,8)
Linfotoxina	12,8 (0,0-1582,6)	1317 (0,0-2505,0)
IP10	1253 (1180,8-1658,2)	1394 (74,4-574,7)
TGF β	0 (99,9-319,1)	115,2 (0,0-141,2)

Níveis de citocinas, em pg/mL, no soro dos indivíduos tratados e não tratados por mediana , IQR (percentil 25% - percentil 75%) e valores de p (teste de Mann-Whitney)

Fonte: Pesquisa do autor

Foi encontrada diferença estatística entre as populações de indivíduos tratados e não tratados em IL-5 e na citocina IP-10 e TGF β (tabela 6). A IL-4 mostrou, nessa casuística, uma tendência à significância estatística. As demais citocinas estudadas não mostraram significância estatística. Em um estudo de prevalência realizado com pacientes cronicamente infectados com HBV, Wang (2006) e colaboradores encontraram diferença estatística nos níveis plasmáticos de IP-10 entre indivíduos com hepatite B crônica e controle saudável. Jaroszewicz (2011) e colaboradores, estudando 126 pacientes com infecção crônica pelo HBV e dosando os níveis séricos de IP-10 em 55 deles, encontraram concentrações mais elevadas em pacientes que negativaram AgHbs durante tratamento antiviral quando comparado com pacientes que persistiram com AgHbs positivo. Outros estudos conduzidos com pacientes infectados com HCV mostraram que a IP-10 é um importante componente para o desenvolvimento da inflamação lobular hepática em pacientes cronicamente infectados.

Para Wang (2010) e colaboradores, a expressão plasmática dos níveis de IP-10 em pacientes com HBV crônica encontra-se aumentado e isso parece desempenhar um importante papel no tráfego de células inflamatórias para o foco hepático e induzir ao desenvolvimento de cronicidade.

A infecção crônica pelo vírus da hepatite B resulta em uma complexa interação entre o vírus e a resposta imune do hospedeiro. A atividade das células T está relacionada com a fibrose hepática (TANG et al, 2006). A fase da doença é determinada pelas características clínicas da inflamação do fígado e a replicação do vírus no hospedeiro (KENNEDY et al, 2012).

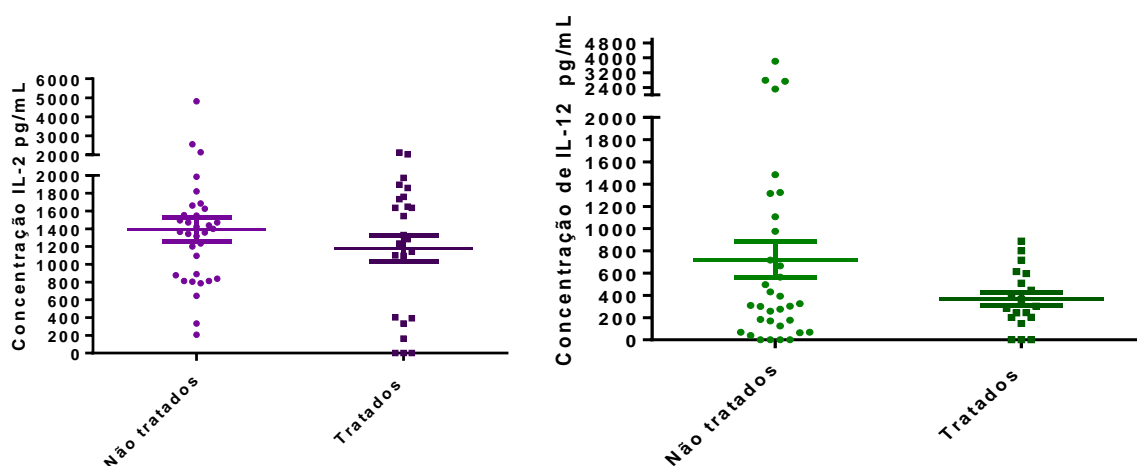
Alguns estudos têm demonstrado que o perfil de citocinas circulantes na hepatite B crônica está relacionado com o status de HBeAg, a replicação do vírus, e o estágio da doença no fígado (KHAN et al, 2011).

Poovorawan (2010) e colaboradores, estudando a relação entre o nível de citocinas circulantes em pacientes com hepatite crônica e o grau de dano hepático, encontraram valores significativamente maiores de IL-5 e IL-12 em pacientes HbeAg negativos. Esse mesmo estudo demonstrou que os níveis de IL-10 e IFN estão relacionados com o grau de necroinflamação em pacientes HbeAg negativos, e os níveis de IL-10 e TNF-alfa estão significativamente relacionados com fibrose hepática.

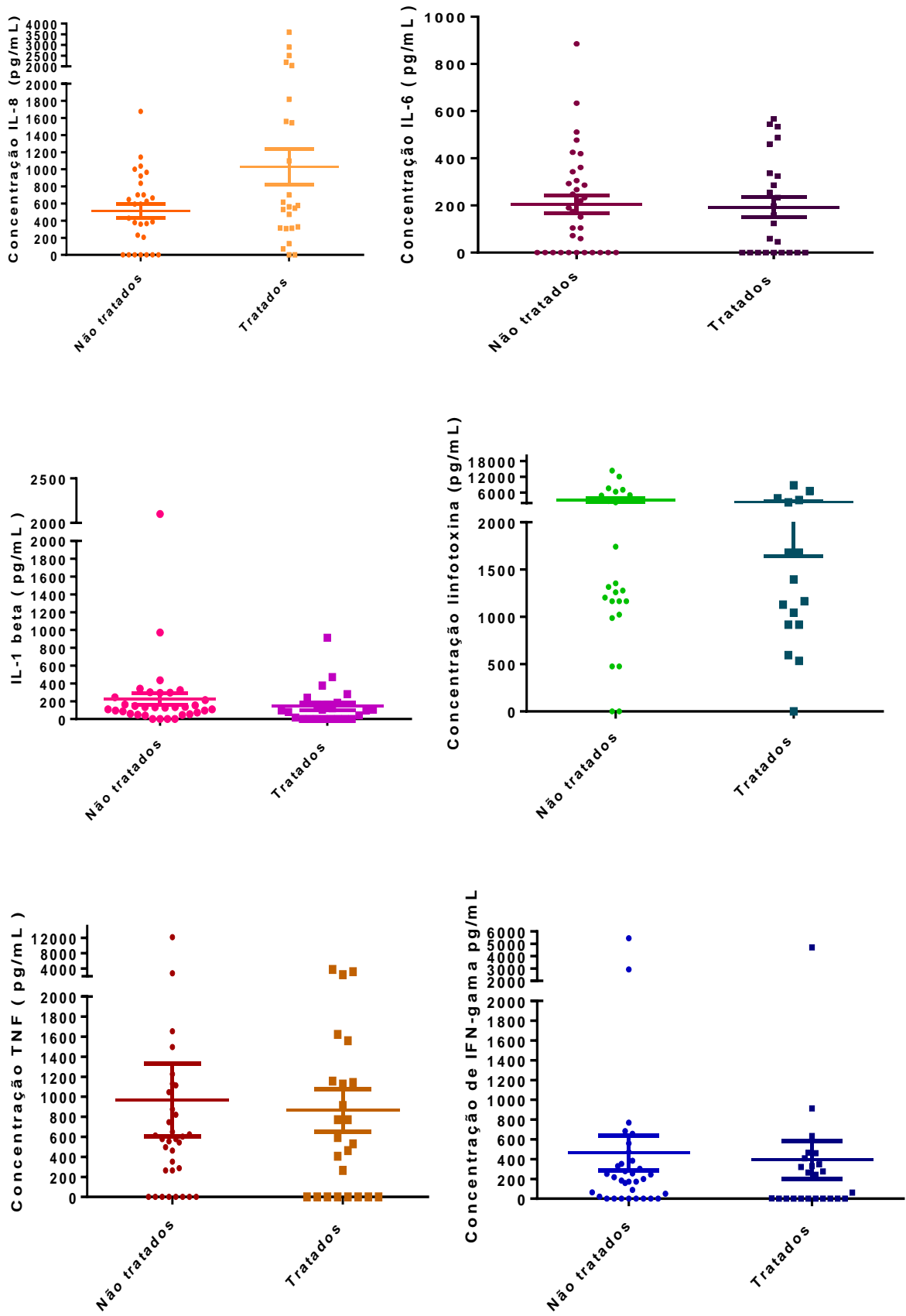
Em relação às medianas de TGF- β entre pacientes com hepatite B tratados e não tratados encontradas nessa casuística, há consonância com os descritos na literatura. O TGF- β é a citocina responsável pela reparação e regeneração dos tecidos, depois da lesão, promovendo quimiotaxia de monócitos e linfócitos, induzindo angiogênese e controlando a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios para o tecido lesado (ROBERTS, 1986). O valor da mediana mais baixo no grupo dos tratados em relação aos não tratados pode refletir uma consequência esperada do tratamento, quer seja: a redução da lesão hepática.

A figura 17⁴ mostra os níveis séricos das principais citocinas de perfil Th1 nos indivíduos estudados, estratificados por histórico de tratamento.

Figura 17: Níveis de citocinas Th1 em soro de indivíduos com HBV não tratados e em tratamento.



⁴ Níveis de citocinas Th1 em soro de indivíduos com HBV não tratados (n=33) e em tratamento (n=24), de ambos sexos, idade entre 21 e 66 anos, acompanhados em ambulatório de Gastrohepatologia de hospital público da Bahia-Brasil. Dosagem feita com o kit multiplex CBA (CitokineBeadsArray) e Bioscience por Citometria de fluxo FACScalibur BD. Teste estatístico de Mann-Whitney.



Fonte: Pesquisa do autor.

Figura 18⁵: Níveis de IP-10 em soro de indivíduos com HBV não tratados e em tratamento.

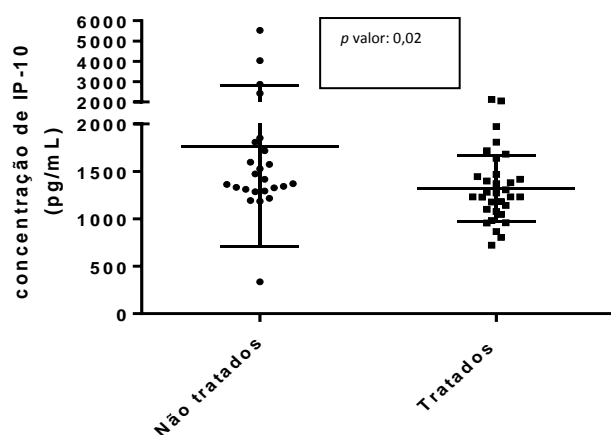


Figura 18⁶: Níveis de IP-10 em soro de indivíduos com HBV não tratados e em tratamento.

Fonte: Pesquisa do autor.

A IL-2 possui como função clássica: promover a proliferação e diferenciação de células T. A IL-2 também pode regular os fenômenos de sobrevivência e formação de memória imunológica. A respeito da formação de memória imunológica, pode-se afirmar que a IL-2 participa da fase inicial de reconhecimento do antígeno, promove a expansão dos clones, favorece a sobrevivência das células ativadas (MALEK; BAYER, 2004), assim como a morte de algumas células T antígeno-específicas (SCHLUNS; LEFRANÇOIS, 2003). As amostras séricas dos grupos de indivíduos tratados e não tratados apresentam níveis semelhantes de IL-2. A mediana dos não tratados e tratados é de 1394 e 1180 pg/mL respectivamente. Esses dados podem sugerir que o tratamento antiviral utilizado em pacientes com hepatite B crônica não interfere nos níveis séricos dessa citocina.

⁵ Níveis de IP-10 em soro de indivíduos com HBV não tratados (n=33) e em tratamento (n= 24), de ambos sexos, idade entre 21 e 66 anos, acompanhados em ambulatório de Gastrohepatologia de hospital público da Bahia-Brasil. Dosagem feita com o kit multiplex CBA (CitokineBeadsArray) BD por Citometria de fluxo FACScalibur BD. Teste estatístico de Mann-Whitney

⁶ Níveis de IP-10 em soro de indivíduos com HBV não tratados (n=33) e em tratamento (n= 24), de ambos sexos, idade entre 21 e 66 anos, acompanhados em ambulatório de Gastrohepatologia de hospital público da Bahia-Brasil. Dosagem feita com o kit multiplex CBA (CitokineBeadsArray) BD por Citometria de fluxo FACScalibur BD. Teste estatístico de Mann-Whitney

Em nível sérico não se observa diferença de concentração de IFN-gama entre os grupos tratados e não tratados. Esses dados podem sugerir que a medicação utilizada no tratamento não interfere nos níveis séricos dessa citocina. Nos dois grupos, há dois participantes que contam com níveis mais elevados que os demais, com valores superiores a 1000 pg/mL. Apesar dos altos níveis de interferon gama, os mesmos não apresentam alterações das enzimas hepáticas (AST e ALT).

O IFN-gama, citocina inflamatória, classificada como do perfil Th1, é produzido pelos Linfócitos T CD4 subpopulação Th1, Linfócitos T CD8 e células NK. É a principal citocina estimuladora de macrófagos e da imunidade celular. Suas principais funções são aumentar o poder fagocítico de macrófagos, a produção de óxido nítrico e reativos intermediários do oxigênio, estimular a expressão de MHC Classe I e II e dos coestimuladores em células infectadas, promover a diferenciação de LT CD4 em Th1 efetores e inibir Th2, induzir a produção de anticorpos fixadores do complemento IgG1 e IgG3 em humanos, ativar neutrófilos e aumentar ação citotóxica de NK.

A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina pró-inflamatória, produzida por células fagocíticas ativadas (monócitos/macrófagos) e por células dendríticas, que desempenha um papel central na estimulação da imunidade mediada por células natural Killer e linfócitos T (GATELY et al, 1998). A IL-12 estimula células natural killer e linfócitos T a produzir IFN- gama, promove diferenciação de linfócitos T-helper em Th1 e melhora a atividade de células T citotóxicas. Essas propriedades únicas da IL-12 indicam que a mesma pode ter um papel importante no controle sustentado da replicação do HBV (NAOUMOV, 1997).

No gráfico 2, observa-se nas amostras séricas do grupo de indivíduos tratados uma menor concentração de IL-12 quando comparada com as amostras séricas do grupo de indivíduos não tratados. A mediana das concentrações de IL-12 dos indivíduos não tratados é de 310.8 e a dos tratados é de 303.7. Os valores máximos e mínimos são 0 – 3815 e 0 -888.2 respectivamente.

Esses valores de níveis séricos de IL-12, menores em indivíduos tratados, podem representar uma resposta positiva da droga na diminuição da atividade inflamatória hepática. No grupo dos tratados, há maior homogeneidade da concentração sérica de IL-12, enquanto nos não tratados, há uma maior dispersão. A média entre os não tratados (721.5) é praticamente o dobro da média entre os tratados (367). Dos 24 pacientes em terapia antiviral, 6 (25%) apresentaram níveis

de IL-12 acima de 600 pg/mL, enquanto que no grupo dos 33 pacientes não tratados, 12 (36,36%) apresentaram níveis superiores a 600 pg/ml. Esses dados podem sugerir um controle positivo da resposta Th1 em indivíduos em uso de medicação antiviral. Quatro indivíduos não tratados apresentam níveis séricos superiores a 2400 pg/mL, mas não apresentam evidências de lesão hepática (níveis normais de ALT e AST). A carga viral nesses quatro indivíduos está abaixo de 2000 UI/mL.

A interleucina-8 é frequentemente associada com a inflamação tecidual. IL-8, também conhecido como *fator quimiotático de neutrófilos*, tem duas funções principais. Ela induz a quimiotaxia das células-alvo, principalmente os neutrófilos, mas também outros granulócitos, levando-os a migrar em direção ao local de infecção. A IL-8 é também conhecida por ser um potente promotor de angiogênese. Em células alvo, a IL-8 induz uma série de respostas fisiológicas necessárias para a migração e a fagocitose. No gráfico 4, pode-se observar uma maior homogeneidade nos níveis séricos dessas citocinas em indivíduos *naive* e uma maior dispersão entre os tratados. A média do nível de IL-8 dos indivíduos tratados é o dobro das médias dos indivíduos sem tratamento.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória responsável pela estimulação da síntese de proteínas de fase aguda, bem como pela indução da proliferação de neutrófilos na medula óssea.

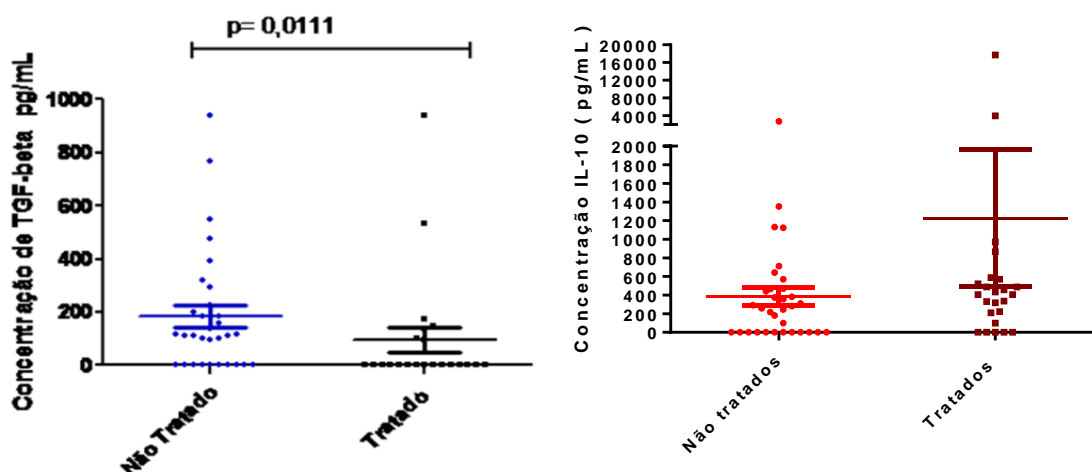
Os níveis baixos dessa citocina, com média de 205 pg/mL entre os não tratados e 192,3 pg/mL entre os tratados, pode ser explicado pela fase da doença em que os indivíduos se encontram. Essa é uma citocina de fase aguda e todos os indivíduos são portadores crônicos. Um indivíduo não tratado apresenta níveis de IL-6 acima de 800 pg/mL e carga viral acima de 2000 UI/mL, o que pode sugerir uma reagudização da doença.

Produzida pelos macrófagos ativados, a IL-1 estimula a proliferação de tímócitos, induzindo a produção de IL-2, a maturação de células B e a proliferação e atividade do fator de crescimento de fibroblastos. IL-1 são proteínas envolvidas na resposta inflamatória. A mediana entre os indivíduos não tratados e tratados é 132.3 e 96.1, respectivamente. No gráfico 6, pode-se observar níveis séricos baixos em ambos os grupos. O fator de necrose tumoral é uma citocina envolvida em inflamações sistêmicas e é um membro de um grupo de citocinas que estimulam a reação de fase aguda. O TNF causa a morte apoptótica da célula, proliferação

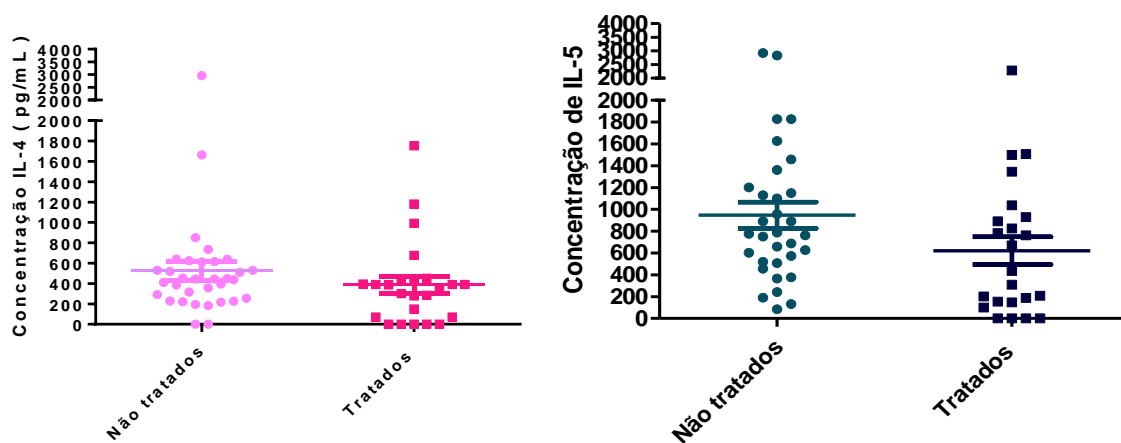
celular, diferenciação, inflamação, combate tumores e replicação viral. A linfotóxina é produzida por linfócitos T, é análoga ao TNF-a (sendo também chamada de TNF-b). Ativa células endoteliais e neutrófilos, servindo de ponte entre a resposta imunológica adquirida e a inflamação. Implicada também no desenvolvimento dos órgãos linfóides.

Harvey (2003) e colaboradores, estudando a resposta inflamatória do organismo ao HCV, encontraram correlação positiva entre o nível sérico de IP-10, a predominância de células T na inflamação lobular hepática, e a gravidade da doença. Esses achados sugerem que o IP-10 pode ser um componente importante de mecanismos efetores antivirais, através do recrutamento de células T CD8 + citotóxicas para as proximidades de hepatócitos infectados pelo HCV. Os níveis elevados de IP-10 encontrados nesse estudo tanto em indivíduos com hepatite B crônica tratados como não tratados (Figura 16) podem sugerir uma semelhança no mecanismo de ação dessa citocina com o demonstrado durante a infecção pelo HCV.

Figura 19⁷ - Níveis de citocinas Th2 em soro de indivíduos com HBV não tratados e em tratamento.



⁷ Níveis de citocinas Th2 em soro de indivíduos com HBV não tratados (n=33) e tratados (n= 24), de ambos sexos, idade entre 21 e 66 anos, acompanhados em ambulatório de Gastrohepatologia de hospital público da Bahia-Brasil. Dosagem feita com o kit multiplex CBA (CitokineBeadsArray) eBioscience por Citometria de fluxo FACScalibur BD. Teste estatístico de Mann-Whitney.



Fonte: Pesquisa do autor.

Essas citocinas regulam negativamente a expressão de citocinas Th1, antígenos do MHC de classe II, e moléculas coestimuladoras em macrófagos. A IL-4 e IL-5 são citocinas típicas de uma resposta Th2. Dos 33 pacientes não tratados, 11 encontram-se com níveis elevados de IL-5 concomitantemente com manutenção da carga viral elevada (valores acima de 2.000 UI/ml). A manutenção da carga viral elevada nesses indivíduos está de acordo com o descrito na literatura. Em um ambiente de citocinas do perfil Th2, o indivíduo tem dificuldade de responder com clareamento da infecção. A IL-10 é capaz de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF e GM-CSF produzida por células, tais como macrófagos e células T reguladoras. Também exibe uma potente capacidade para suprimir a capacidade de apresentação de antígeno de células apresentadoras de antígenos. No entanto, também é estimuladora para certas células T (Th2) e os mastócitos, e estimula a maturação de células B e produção de anticorpos.

Observa-se, nas amostras séricas dos indivíduos tratados, menor dispersão dos níveis de IL-10, IL-4 e IL-5. No contexto do nível de IL-10 sérico, apenas duas amostras de indivíduos tratados apresentam dispersão. A média do nível de IL-10 entre os tratados é três vezes maior que nos indivíduos não tratados. Trata-se de uma citocina que modula a resposta inflamatória. Assim, seria esperada uma maior concentração da mesma nos indivíduos tratados, pois um dos objetivos do tratamento é a diminuição do dano ao tecido hepático promovido pela atividade inflamatória.

O TGF- β é a citocina responsável pela reparação e regeneração dos tecidos, depois da lesão, promovendo quimiotaxia de monócitos e linfócitos, induzindo angiogênese e controlando a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios para o tecido lesado (KEHRL, 1986). Nessa casuística, a mediana dos níveis de TGF- β nos indivíduos tratados foi a metade (100 pg/ml de soro) da mediana encontrada no grupo dos não tratados (200 pg/ml). Os níveis séricos dessa citocina também são mais homogêneos entre os indivíduos tratados. Esses resultados podem sugerir que o tratamento reduz a carga viral e conseqüentemente o estímulo para produção de citocinas Th1. Esse mecanismo reduz a lesão hepática e os níveis de TGF- β , já que essa citocina atua fundamentalmente na reparação do tecido lesado.

A tabela 7 mostra a correlação dos valores de IP-10 em pacientes tratados e não tratados com os marcadores de lesão e função hepáticos.

Tabela 7 – Correlação entre os valores de IP-10 em pacientes em tratamento e não tratados com os marcadores de lesão e função hepáticos pelo método de Spearman.

VARIÁVEIS	EM TRATAMENTO		NÃO TRATADOS	
	p valor	valor de R	p valor	valor de R
Albumina	0,8123	0,05116	0,9304	-0,01581
ALT	0,4583	-0,1589	0,3117	-0,1816
AST	0,6605	0,09451	0,2392	-0,2107
Globulina	0,1309	-0,3173	0,5158	-0,1172
GamaGT	0,4244	0,171	0,6079	-0,0927
Fosfatase Alcalina	0,4591	0,1586	0,8941	-0,02411

Fonte: Pesquisa do autor.

Observou-se, nesse estudo, que os valores de albumina são diretamente proporcionais aos níveis de IP-10 no grupo de tratados. Esse resultado pode sugerir o papel protetor da IP-10 contra o dano tecidual descrito na literatura. Harvey (2003) encontrou uma relação positiva entre os níveis de IP-10 e a manutenção da função hepática em indivíduos contaminados com HCV.

Os valores de ALT nas amostras estudadas mostraram-se mais elevados em pacientes com níveis mais baixo de IP-10 no soro, reproduzindo valores encontrados na literatura e sugerindo o caráter protetor da IP-10.

O protocolo de tratamento e acompanhamento de pacientes com hepatite B disponibilizado pelo MS utiliza a dosagem dos níveis de transaminases como critério para avaliação do dano hepático produzido pela infecção. Essas enzimas também são utilizadas para avaliar os resultados do tratamento, pois um dos seus objetivos é

a normalização dos níveis de ALT e AST. A tabela 8 mostra os níveis de ALT e AST no soro dos indivíduos tratados e não tratados.

Tabela 8 – Níveis séricos de transaminases no soro de indivíduos tratados e não tratados.

Níveis de transaminases no soro de indivíduos tratados e não tratados	
	NÃO TRATADOS
	n = 24
ALT	32,5 (23,3-45,5)
AST	32,0 (24,3-44,3)

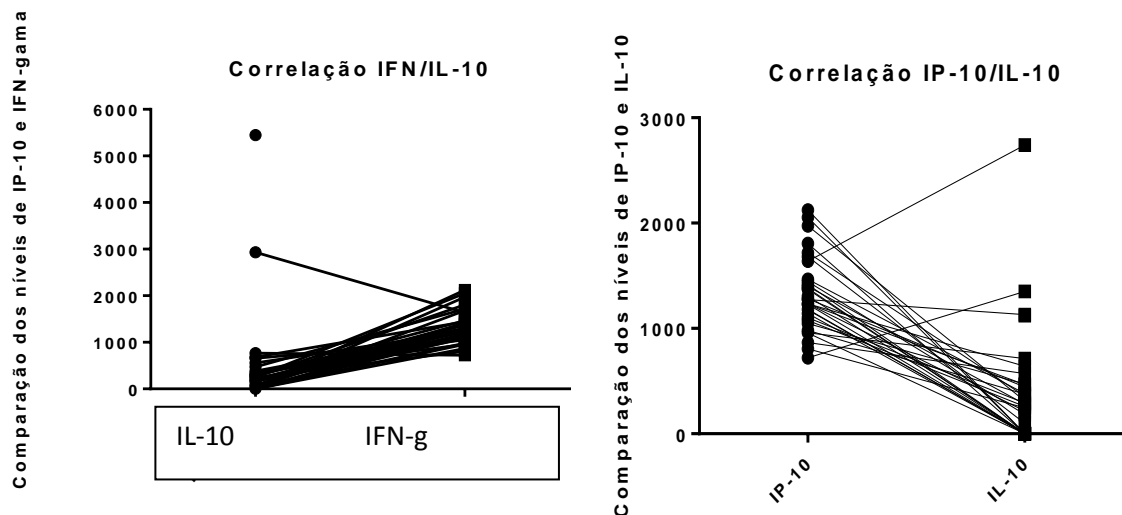
Valores em pg/mL representador por mediana e IQR (percentil 25% - percentil 75%)

Fonte: Pesquisa do autor

Os resultados, fruto dessa pesquisa, reproduzem os achados de Chang (2010) que demonstrou o papel do tratamento da hepatite B na proteção do tecido hepático. O estudo demonstrou que indivíduos com hepatite B em tratamento apresentam medianas dos valores de ALT e AST maiores que os indivíduos não tratados.

A despeito dos resultados das dosagens das citocinas terem se mostrado não estatisticamente significante, à exceção da IP-10 (tabela 6), é importante ressaltar a importância biológica da regulação promovida por esses agentes da resposta imunológica. Sabe-se, por exemplo, que a uma resposta desequilibrada, com tendência aos extremos de perfil Th1 ou Th2, podem comprometer o clareamento da infecção viral e, em última instância, a vida do infectado. Assim, fizemos correlações entre as principais citocinas envolvidas na resposta ao HBV, e os resultados encontram-se ilustrados na figura 20.

Figura 20 – Correlação entre os níveis de IFN/IL-10 e IP-10/IL-10 nos pacientes não tratados e em tratamento.



Fonte: Pesquisa do autor.

A comparação entre os níveis séricos de INF e IL-10 no mesmo indivíduo sem tratamento não foi estatisticamente significativa, mas, entre os tratados, encontramos significância estatística. Dois pacientes no grupo dos tratados apresentam níveis de IL-10 e INF muito acima da mediana do grupo e isso pode ser o responsável pela significância estatística. No contexto biológico, não encontramos resultados diferentes dos descritos na literatura. Pode-se observar que, no grupo dos não tratados, uma concentração de INF baixa corresponde a uma concentração alta de IL-10. Dos 33 indivíduos analisados, 11 (33,3%) apresentaram níveis de INF superiores aos níveis de IL-10, desses, 9 (81,81%) apresentaram carga viral elevada (2.000 U.I./mL) e 6 apresentaram níveis de ALT duas vezes maiores que o máximo valor do limite de normalidade. Esses dados podem sugerir que a IL-10 exerce um importante papel imunomodulador da resposta inflamatória ao HBV mesmo em pacientes não tratados. No grupo de tratados, os valores séricos dessas citocinas são equivalentes. O INF é considerado a citocina central na atividade inflamatória hepática durante a infecção pelo HBV e, portanto, configura-se como importante marcador do dano dos hepatócitos.

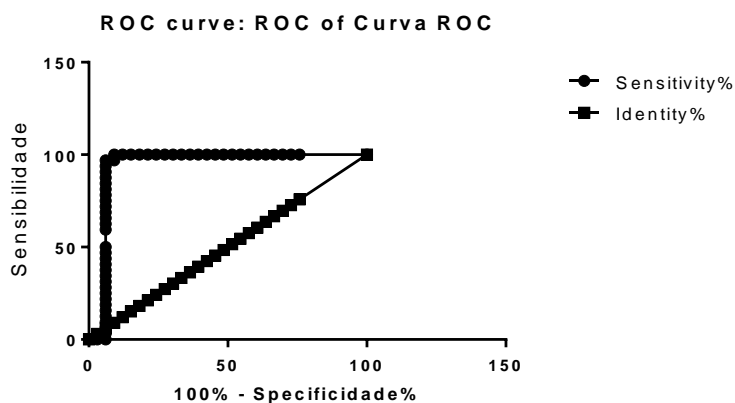
Com exceção de dois indivíduos, todos os outros apresentaram níveis de INF abaixo de 1000 pg/ml, mesmo sendo portadores crônicos da hepatite B.

Quando comparado os níveis de IP-10 com IL-10, tanto no grupo de tratados como dos não tratados, não encontramos significância estatística, mas, semelhante ao INF, os valores de IP-10 tendem a ser menores quando os níveis de IL-10 são maiores. Não se observou diferença nos valores séricos de IP-10 de indivíduos tratados e não tratados.

Observou-se ainda que os níveis séricos de IP-10 nos pacientes tratados e não tratados são mais elevados que os de INF. Existem muitos estudos mostrando a relação da IP-10 com o curso natural da hepatite C e com o dano hepático, mas pouco se sabe sobre seus mecanismos na infecção pelo vírus B. Os resultados encontrados nesse estudo podem sugerir que essa citocina possa ser um importante marcador da atividade inflamatória e, portanto, indicativa do prognóstico dos pacientes.

A figura 21 mostra a relação entre a especificidade dos níveis de INF e IP-10 nos pacientes pertencentes ao grupo dos não tratados.

Figura 21 – Curva ROC IP-10 e INF



Fonte: Pesquisa do autor

Não houve significância estatística, mas o resultado encontrado, indicando uma sensibilidade da IP-10 da ordem de 93% quando comparada com o interferon-gama, pode sugerir que a IP-10 pode ser um bom marcador prognóstico da infecção crônica pelo HBV.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os níveis séricos de citocinas inflamatórias tendem a estar mais elevados em amostras de pacientes com hepatite B crônica não tratados.

A amplitude dos níveis de interferon gama é maior nas amostras do grupo de indivíduos com hepatite B sem tratamento.

A correlação entre os níveis de INF γ e IL-10 é inversa em amostras de indivíduos não tratados.

O tratamento parece modular a produção de INF γ e IL-10 sem interferir nos níveis de IP-10.

A correlação entre os níveis de IP-10 e IL-10 é inversa em amostras de indivíduos não tratados.

A IP-10 pode ser um marcador de maior sensibilidade que o INF-gama anteriormente descrito como a citocina chave no processo inflamatório na HBV.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, AK, LICHTMAN, AH. Cytokines. In: Abbas A K; Lichtman A. H. Cytokines cellular and Molecular Immunology. 5 th ed. Philadelphia: Saunders.2003. 243-274.
- AGUILERA, V, BERENQUER, M. Hepatitis C and fibrosis. Rev Esp Enferm Dig (Madrid).2004;96(6). 402-414.
- ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. **Nature**, [S.l.], n.413, p. 732–738, 2001.
- ALMEIDA, Alessandra M. et al. Revisão sistemática da eficácia do interferon alfa (convencional, peguilado) e lamivudina para o tratamento da hepatite crônica B. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 8, p. 1667-1677, 2009.
- AMERICAN CDC. Distribuição Geográfica da Prevalência do Antígeno de Superfície da Hepatite B, [S.l.], 2005. Disponível em: <<http://www.medic8.com/travel/viral-Hepatitis-b.htm>> Acesso em: 10 jan. 2014.
- ANVISA. Portaria n. 2.561, de 28 de outubro de 2009. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas - hepatite viral crônica b e coinfeções. Brasília, 2009. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2561_28_10_2009.html>. Acesso em: 20 set. 2014.
- ASENSIO V. C. et al. Interferon-Independent, Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120-Mediated Induction of CXCL10/IP-10 Gene Expression by Astrocytes In Vivo and In Vitro. **J. Virol.** [S.l.], n.75, p.7067–7077, 2001.
- ASPINALL, E. J. et al. Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. **Occupational Medicine**, Oxford, v, 61, p. 531-540, 2011.
- BARBINI, L. et al. Molecular characterization of hepatitis B virus X gene in chronic hepatitis B patients. **Virol J.**, London, v. 9, p.131, 2012.
- BAUMERT, T.F.; THIMME, R.; VON WEIZSÄCKER, F. Pathogenesis of hepatitis B. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 13, n. 1, p. 82-90, 2007.
- BECK, J.; NASSAL, M. Hepatitis B virus replication. **World Journal of Gastroenterology**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 48-64, 2007.
- BERTOLETTI, A.; FERRARI, C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. **Hepatology**, [s.l.], n.38, p.4–13, 2003.
- _____.; GEHRING, A.J., The immune response during hepatitis B virus infection. **J. Gen. Virol.**, London, v. 87, n.6, p. 1439-1449, 2006.

BERTOLINI, D.A. et al. Genotyping of hepatitis B virus in indigenous populations from Amazon region, Brazil. **Virus – Reviews & Research**.Amsterdam, v. 5, n. 2, 2000.

BHATTACHARYA, D.; THIO, C. L. Review of hepatitis B therapeutics. **Clinical Infectious Diseases**.Oxford,v. 51, n. 10, p.1201-1208, 2010.

BLUMBERG, B. S.; ALTER H. J.; VISNICH, S.A "new" antigen in leukemia sera.**JAMA**, [S.I.], 1965.

BOWDEN, S. Serological and molecular diagnosis.**Semin Liver Dis.**,Bethesda,v. 26, n. 2, p. 97-103, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: o Brasil está atento**. 3. ed. Brasília: 2009.

BRUSS, V. Hepatitis B virus morphogenesis.**World Gastroenterology**, Hong Kong,v. 13, n. 1, p. 65-73, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases**.12. ed.Washington: 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.

CHEONG, J.Y. et al. Genetic polymorphism of interferon- γ , interferon- γ receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis B virus infection. **Biochem. Genet.**, New York, v. 44, n. 5/6, p. 246-255, 2006.

COTE, P. J. et al. Temporal pathogenesis of experimental neonatal woodchuck hepatitis virus infection: increased initial viral load and decreased severity of acute hepatitis during the development of chronic viral infection. **Hepatology**, [S.I.], n.32, p.807–817, 2000.

DANDRI, M.; LOCARNINI, S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. **GUT**,Bethesda, v. 61, Suppl.1, p. 6-17, 2012.

FAN, XG, et al. Circulating Th1 and TH2 cytokines in patients withhepatitis virus infection.**Mediator Inflamm**. 1998; 7:2957

FONSECA, J.C.F. História natural da hepatite crônica B. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 6, p. 672-677, 2007.

GATELY, M. K. et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. **Annu Rev Immunol**,Bethesda,n.16, p.495-521, 1998.

GEARHART, T.L.; BOUCHARD, M.J. The hepatitis B virus HBx protein modulates cell cycle regulatory proteins in cultured primary human hepatocytes. **V Research**, Bethesda, v. 155, p. 363-367, 2011.

GLEBE, D. Recent advances in hepatitis B virus research: a german point of view. **World J Gastroenterol**, Bethesda, v. 12, n. 1, p. 8-13, 2007.

_____; URBANS, S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. **World J Gastroenterol**, Bethesda, v. 13, n. 1, p. 22-38, 2007.

GONÇALES N.S.L.; GONÇALES JÚNIOR, F.L. Perfis sorológicos anômalos, genótipos e mutantes do VHB. **Braz J Infect Dis**, [S.l.], v.10, Suppl 1, p. 23-27, 2006.

GUIDOTTI, L. G.; CHISARI, F. V. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. **Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, Bethesda, v. 1, p. 23-61, 2006.

HADZIYANNIS, S.J.; PAPTAEODORIDIS, G.V. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B: natural history and treatment. **Semin. Liver Dis.**, Bethesda, v. 26, n. 2, p. 130-141, 2006.

HEIL, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science**, [S.l.], n.303, p.1526–1529, 2004.

HODGSON, P. D.; MICHALAK, T. I. Augmented hepatic interferon gamma expression and T-cell influx characterize acute hepatitis progressing to recovery and residual lifelong virus persistence in experimental adult woodchuck hepatitis virus infection. **Hepatology**, Bethesda, n.34, p.1049–1059, 2001.

HUI, C.; LAU, G.K.K. Immune system and hepatitis B virus infection. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 34, supl. 1, p. 44-48, 2005.

KAO, J.H. et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterology.**, Baltimore, v. 118, n. 3, p. 554- 559, 2000.

KEHRL et al. Production of transforming growth factor-beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **J Exp. Med.** 1986: 163:1037-1050.

KENNEDY, P. et al., Preserved T-cell function in children and young adults with immune-tolerant chronic hepatitis B. **Gastroenterology**, Bethesda, v. 143, n. 3, p. 637–645, 2012.

KEW, M.C. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. **J GastroenterolHepatol**, Bethesda, v. 26, n. 1, p. 144–152, 2011.

KHAN, S. et al. Circulating biomarkers and their possible role in pathogenesis of chronic hepatitis B and C viral infections. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, [S.l.], v. 26, n. 2, p.161–168, 2011.

KIKI, I. et al. Tumor necrosis factor- α levels in hepatitis B virus-related chronic active hepatitis and liver cirrhosis and its relationship to Knodell and Child-Pugh scores. **Int. J. Clin. Pract.**, Esher, v. 60, n. 9, p. 1075- 1079, 2006.

KOZIEL, MJ. Cytokines in viral hepatitis. **Semin Liver Dis.** 1999; 19:157-169.

LAPINSKI, T.W.; POGORZELSKA, J.; FLISIAK, R. HBV mutations and their clinical significance. **Advances Med Sci.**, Bethesda, v. 57, n. 1, p. 18-22, 2012.

LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **J Viral Hepat.**, Bethesda, v.11, p. 97-107, 2004.

LE GOFFIC R. et al. Production of the Chemokines Monocyte Chemotactic Protein-1, Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted Protein, Growth-Related Oncogene, and Interferon- γ -Inducible Protein-10 Is Induced by the Sendai Virus in Human and Rat Testicular Cells. **Endocrinology**. [S.I.], n.143, p.1434–1440, 2002.

LEE, W.M. Hepatitis B virus infection. **The New Engl J Med**, [S.I.], v. 337, n. 24, p. 1733-1739, 1997.

LIANG, T.J. Hepatitis B: the virus and disease. **Hepatology**, Bethesda, v. 49, n.5 Suppl. p. S13-21, 2009.

LOCARNINI, S. A. Hepatitis B vírus - antiviral treatment and resistance. Norh Melbourne, [S.I.], 2004? Disponível em: <http://www.powershow.com/view1/24c019-ZDc1Z/Hepatitis_B_Virus_powerpoint_ppt_presentation.> Acesso em: 15 mar. 2013.

LOCARNINI, S.A. Molecular virology of hepatitis B virus. **Semin L Dis.**, Bethesda, v. 24, n. 1, 2004.

_____; YUEN, L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. **AntivirTher.** [S.I.], v.15, n. 3PtB, p. 451-461, 2010.

_____; ZOULIM.F. Molecular genetics of HBV infection. **AntivirTher.**, [S.I.], v. 15, Suppl 3, p. 3-14, 2010.

LOPES, A.C. **Tratado de clínica médica**. São Paulo: Roca, 2008.

LUCIFORA, J. et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. **J. Hepatology**, Bethesda, v. 55, p. 996-1003, 2011.

LUND, J. et al. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. **J Exp Med**. [S.I.], n.198, p.513–520, 2003.

J.-T. TANG et al. T cell immune response is correlated with fibrosis and inflammatory activity in hepatitis B cirrhotics. **The World Journal of Gastroenterology**, [S.I.], v. 12, n.19,p.3015–3019, 2006.

MACCALLUM, F. O. Homologous serum jaundice. **LANCET**, London, n. 2, p. 691-692, 1947.

MCPHERSON, R.A. **Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 21. ed. Amsterdam: Saunders Elsevier, 2007.

MALEK, T. R.; BAYER, A L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. **Nature Reviews/ Immunology**, [S.I.], v. 4, p. 665 – 674, 2004.

MARTIN-VILCHESZ, S. et al. The molecular and pathophysiological implications of hepatitis b x antigen in chronic hepatitis b virus infection. **Rev. Med Virol.**, [S.I.], v. 21, n. 5, p. 315-329, 2011.

MICHEL M, TIOLLAIS P. Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential. **Pathol Biol.**, Bethesda, v. 58, p. 288-295, 2010.

MICHELSEN, P.P.; FRANCOQUE, S.M.; VAN DONGEN, J.L. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. **World J of SurgOncol.**, Bethesda, v. 3, n. 26, p. 1-18, 2005.

MORETTA, L., et al. Human natural killer cells: molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. **ImmunolLett**, [S.I.],n.100, p.7–13, 2005.

NAKAMURA, I., et al. Pathogenesis of experimental neonatal woodchuck hepatitis virus infection: chronicity as an outcome of infection is associated with a diminished acute hepatitis that is temporally deficient for the expression of interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha messenger RNAs. **Hepatology**, Bethesda, n.33, p.439–447, 2001.

NAOUMOV, N. V.; ROSSOL, S. Studies of interleukin-12 in chronic hepatitis B virus infection. **J Viral Hepat**, Bethesda,p.87-91, 1997.

NAZAR A. S. et al. J. Induction of IP-10 chemokine promoter by measles virus: comparison with interferon- γ shows the use of the same response element but with differential DNA–protein binding profiles. **Neuroimmunol**, [S.I.], n.77, p.116–127, 1997.

NEUVEUT, C.; WEI, Y.; BUENDIA, M. A. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. **Journal of Hepatology**, Paris, v. 52, n. 4, p. 594-604, Apr. 2010.

NEVILLE L. F., MATHIAK G., BAGASRA O. Cytokine Growth Factor Rev. Amsterdam,: Elsevier, n.8, p.207–219, 1997.

NGUYEN, D.H.; LUDGATE, L.; H. U, J. Hepatitis B virus: cellinteractions and pathogenesis. **J CelPhysiol.**, [S.I.], v. 216, p. 289-294, 2008.

NISHIOJI K. et al. Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. **Clinical and Experimental Immunology.** [S.I.], n.123, p.271–279, 2001.

ONO-NITA, S. K. Atualização da abordagem clínica da hepatite B. São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://slideplayer.com.br/slide/1581855/>>. Slides apresentados no VI Simpósio Estadual de Hepatites Virais B e C, HCFMUSP.

OTT, J.J. et al. Global epidemiology of hepatitis b virus infection: new estimates of age-specific HBsAgseroprevalence and endemicity. **Vaccine**, v. 30, p. 2212-2219, 2012.

PALUMBO, E. et al. Immigration and hepatitis B virus: epidemiological, clinical and therapeutic aspects.Clinic of Infectious Diseases East Mediterr Health Journal 2008;14(4):784-90

PARANÁ, R.; ALMEIDA, D. H.B.V. Epidemiology in Latin America.**Journal of Clinical Virology**, Bethesda, v. 34, supl. 1, p. 130-133, 2005.

PATIENT, R. H. C.; ROINGEARD, P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. **Cell Microbiol.**, Bethesda, v. 11, n. 11, p 1566-1570, 2009.

PEREIRA, L.M.M.B. et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil.**American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Bethesda, v. 81, p. 240-247, 2009.

PERZ, J. F.; ALTER, M. J. The coming wave of HCV-related liver disease: dilemmas and challenges. **J Hepatology**, [S.I.],n. 44, p. 441-443, 2006.

PRINCE, A.M. An antigen detected in the blood during the incubationperiod of serum hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Science USA**, Bethesda, v. 60, p.814-827, 1968.

POOVORAWAN, Y. et al. Persistence of antibodies and immune memory to hepatitis B vaccine 20 years after infant vaccination in Thailand. **Vaccine**, Bethesda, v. 28, n.3, p.730–736, 2010.

PUNGPAPONG, S.; KIM, R.W.; POTERUCHA, J.J. Natural history of hepatitis B, [S.I.], v. 82, n. 8, p. 967-975, 2007.

REHERMANN, B., NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunology.* 2005; 5: 215-29.

RIO DE JANEIRO. Secretaria Municipal de Saúde. Gerência de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Vigilância Sanitária. Boletim HIV e hepatites virais. Rio de Janeiro, 2007.

ROBERTS, AB. et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 4167-4171.

ROCKEY, DC. Hepatic fibrinogenesis and hepatitis C. *Semin Gastrointest Dis*. 2000; 11:69-83.

ROSSI D.; ZLOTNIK, A. The Biology of Chemokines and their Receptors. **Annu. Rev. Immunol.** [S.l.], v.18, p.217–242, 2000.

SAIKI M. et al. Rabies Virus-Induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and NF- κ B Signaling Pathways Regulates Expression of CXC and CC Chemokine Ligands in Microglia. **Journal of Virology**, [S.l.], n.79, p.11801–11812, 2005.

SCHLUNS, K. S.; LEFRANÇOIS, L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. **Nature Reviews/ Immunology**, Bethesda, v. 3, p. 269 -279, 2003.

SCHOENBORN, J.R.; WILSON, C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Adv. Immunol.**, New York, v. 96, p. 41-101, 2007.

SHIM, J. H. et al. Efficacy of entecavir in patients with chronic hepatitis B resistant to both lamivudine and adefovir or to lamivudine alone. **Hepatology**, Geneva, v. 50, n. 4, p. 1064-1071, 2009.

SIGNH, R. et al. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C infections across global populations. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 13, n. 12, p. 1770-1787, 2007.

SILVA, L. C. Aspectos clínicos e diagnósticos das hepatites por vírus e por outras causas. In: SILVA, L.C. **Hepatites agudas e crônicas**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 135-147.

SOUTO, F. J. D. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. **GED Gastroenterol. Endosc. Dig.**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 143-150, 1999.

TANG, J.T. et al. T cell immune response is correlated with fibrosis and inflammatory activity in hepatitis B cirrhotics. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 12, n. 19, p. 3015-3019, 2006.

THIMME, R., et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. **Proc.Natl.Acad.Sci USA**, [S.l.], n.99, p.15661–15668, 2002.

_____. CD8+ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. **J. Virol.**, Washington, v. 77, n. 1, p. 68-76, 2003. doi:10.1128/JVI.77.1.68-76.2003

TONETTO, P.A. et al. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 8, n. 9, p. 149, 2009.

VIANA, S. et al. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 73, n. 4, p. 808-814, 2005.

VIERLING, J.M. The immunology of hepatitis B. **Clin. Liver Dis.**, Philadelphia, v. 11, n. 4, p. 727- 59, 2007.

VILLENEUVE, J.P. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 34, supl. 1, p. 139-142, 2005.

VINADER-CAEROLS, C.; PARRA, A.; MONLEÓN, S. Effects of antidepressants on inhibitory avoidance in mice: a review. In: LU, R.B. (Ed.). **Effects of antidepressants**. Rijeka: Intech, 2012.

WANG, J. et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with hepatitis B virus infection or hepatocellular carcinoma in Chinese Han ethnic population. **Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.**, v. 5, n. 1, p. 60-64, 2006.

WIELAND, S. F.; Chisari, F. V. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. **J Virol**, [S.l.], n.79, p.9369–9380, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis B. **Fact Sheet**, n. 204. Jul. 2012. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>>. Acesso em: 2 set. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Who, 2007: progress towards global immunization goals 2006: summary presentation of key indicators. Geneva, 2007.

XU, C. et al. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett.** [S.l.], v.345, p.216-222, 2014.

ZHANG, L.J.; WANG, X.Z. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 12, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

ZHANG, X.; ZHANG, H.; YE LIHONG. Effects of hepatitis B virus x protein on the development of liver cancer. **J Lab Clin Med.**, [S.l.], v. 147, n. 2, p. 58-66, 2006.

ZHU, P. et al. Polymorphism analyses of hepatitis B virus x gene in hepatocellular carcinoma patients from Southern China. **Acta Biochim Biophys Sinica**, v. 39, n. 4, p. 265-272, 2007.