



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



MÔNICA CARDOZO REBOUÇAS

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-33 E DO RESPECTIVO
RECEPTOR ST2 NAS HEPATITES CRÔNICAS POR VÍRUS
HEPATOTRÓPICOS (B E C)**

Salvador, BA
2017

MÔNICA CARDOZO REBOUÇAS

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA IL-33 E DO RESPECTIVO
RECEPTOR ST2 NAS HEPATITES CRÔNICAS POR VÍRUS
HEPATOTRÓPICOS (B E C)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da
Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta

Salvador, BA
2017

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Rebouças, Mônica Cardozo
Avaliação do Papel da IL-33 e do Respectivo Receptor ST2 nas
Hepatites Crônicas por Vírus Hepatotrópicos (B e C) / Mônica
Cardozo Rebouças. -- Salvador, 2017.
95 f.

Orientadora: Maria Luiza Brito Sousa-Atta.
Tese (Doutorado - Pós-Graduação em Imunologia) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde,
2017.

1. IL-33. 2. sST2. 3. Hepatite B. 4. Hepatite C. I. Sousa-
Atta, Maria Luiza Brito. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Gildete e Liolino,
por todo amor e apoio na minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades;

A Prof.^a Maria Luiza, por aceitar ser minha orientadora, pela paciência, ensinamentos e confiança depositada nas minhas atividades;

Ao Prof. Ajax pelas contribuições críticas que ajudaram na melhoria deste trabalho;

À Andreas pela convivência, aprendizagem, disponibilidade e colaboração, fundamentais na minha formação profissional e realização de parte deste trabalho;

Ao Dr. Raymundo Paraná e Dra. Maria Izabel Schinoni pela colaboração para realização deste trabalho;

Ao Dilda/Lapim pela ajuda prestada longo da realização desse trabalho;

Aos meus pais, Gildete e Liolino, minhas fortalezas, grandes exemplos, por tudo que renunciaram por mim e pela minha irmã, a quem eu dedico esta conquista;

À minha irmã Mona, por todo incentivo e apoio incondicional durante essa jornada;

A Anderson, muito obrigada por ser um grande companheiro, parceiro de vida, pelo amor sempre presente, pela paciência, pelo zelo, pela cumplicidade e muito mais;

As patinadoras Taiana, Milena, Mariana, Taciana e Paulinha, meus presentes nesse doutorado, pela honra de ter compartilhado momentos tão intensos de alegrias, frustrações e sucessos;

Aos pacientes do Ambulatório Magalhães Neto/HUPES que participaram desse estudo;

A todo corpo docente, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Imunologia;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento da pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida para o desenvolvimento da pesquisa;

Os mais sinceros agradecimentos a todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese.

RESUMO

A interleucina-33 (IL-33) é importante para a resposta imune mediada pelas células Th2, estando relacionada com a inflamação. Evidências sugerem uma forte associação com o desenvolvimento de fibrose hepática. Nosso objetivo foi investigar os níveis de IL-33 e sST2 em portadores de infecção crônica pelo vírus das hepatites B (VHB) e C (VHC), correlacionando seus níveis com histologia hepática, carga viral (CV) e manifestações de autoimunidade. Os níveis de IL-33 e sST2 foram determinados por ELISA em amostras de soro e sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), estimuladas com antígenos VHB e VHC, em grupos de 20 indivíduos: G1=HBV, G2=HCV e G3=controle sadio. Para a semi-quantificação de IL-33 e sST2 utilizou-se o método de PCR em tempo real. Dados de histologia hepática e CV foram obtidas a partir de prontuários. Aminotransferases e autoimunidade foram dosadas para caracterização clínica. O G1 apresentou mediana CV de 1.465 cópias; 25% tinham aumento das aminotransferases; 25% manifestações de autoimunidade. No G2, mostrou mediana de CV de 960.000 cópias; 60% tinham aumento das aminotransferases; crioglobulinemia em 25% e 30% manifestações de auto-imunidade. A maioria dos pacientes apresentavam fibrose leve. Houve diferenças significativas nos níveis séricos da IL-33 entre os grupos e uma maior expressão de mRNA de IL-33 no G1. As PBMC dos indivíduos G1 e G2, estimuladas com antígenos VHB e VHC, produziram mais sST2 em relação às células dos controles. Não houve associação entre a IL-33 e sST2 com os marcadores de autoimunidade analisados. Nossos resultados sugerem uma associação entre o aumento da IL-33 sérica e a progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite B e C.

Palavras-chave: IL-33, sST2, Hepatite B, Hepatite C.

ABSTRACT

Interleukin-33 (IL-33) is important for the immune response mediated by Th2 cells, being related to inflammation. Evidence suggests a strong association with the development of liver fibrosis. Our objective was to investigate the IL-33 and sST2 levels in patients with chronic hepatitis B (HBV) e C (HCV) virus infection, correlating their levels with liver histology, viral load (VL) and manifestations of autoimmunity. IL-33 and sST2 levels were determined by ELISA on serum samples and culture supernatants of mononuclear cells from peripheral blood (PBMC), stimulated with HBV and HCV antigens, in groups of 20 individuals: G1=HBV, G2=HCV and G3=Health Control. For the semi-quantification of IL-33 and sST2 the real-time chain polymerase reaction method was used. Data liver biopsy, Fibroscan and VL were obtained from medical records. Aminotransferases and autoimmunity were performed for clinical characterization of these patients. G1 patients had median VL of 1,465 copies; 25% of these had increased aminotransferases; 25% were manifestations of autoimmunity. In G2, the VL median was 960,000 copies. Increased aminotransferase were observed in 60%, cryoglobulinemia in 25%, 30% were manifestations of autoimmunity. Most patients had low fibrosis. There were significant differences in serum levels of IL-33 between groups and more mRNA expression in G1. PBMC of G1 and G2 patients, stimulated with HBV and HCV peptides, produced significantly more sST2 in relation to cells of healthy controls. Não houve associação entre a IL-33 e sST2 com os marcadores de autoimunidade analisados. Our results suggest an association between increased serum IL-33 and the progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B and C.

Keywords: IL-33, sST2, Hepatitis B, Hepatitis C.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1** Características clínico-demográfica e da infecção dos pacientes com hepatite C crônica (HCC) e de controles saudáveis (CS). **49**
- Tabela 2** Níveis de IL-33 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios (CS) e de pacientes com hepatite C crônica (HCC), estimuladas ex vivo com peptídeos do HCV. **53**
- Tabela 3** Níveis de sST2 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios (CS) e de pacientes com hepatite C crônica (HCC), estimuladas ex vivo com peptídeos do HCV. **54**

ARTIGO 2

- Tabela 1** Características clínico-demográfica e da infecção dos pacientes com hepatite B crônica (HBC) e de controles saudáveis (CS). **70**
- Tabela 2** Níveis de IL-33 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios (CS) e de pacientes com hepatite B crônica (HBC), estimuladas ex vivo com peptídeos do HBV. **72**
- Tabela 3** Níveis de sST2 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios (CS) e de pacientes com hepatite B crônica (HBC), estimuladas ex vivo com peptídeos do HBV. **73**

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1** Níveis séricos de IL-33 (a) e sST2 (b) em indivíduos controles sadios (CS) e pacientes com hepatite C crônica (HCC). As barras representam a mediana e intervalo interquartil. Teste de Mann-Whitney (b). **51**
- Figura 2** Relação IL-33/sST2 sérica em portadores de hepatite C crônica (HCC) e controles sadios (CS). Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$. **51**
- Figura 3** Níveis séricos de IL-33 (a, b) e sST2 (c, d) em pacientes com hepatite C crônica, distribuídos de acordo com diferentes estágios de fibrose e com ausência ou presença de atividade necroinflamatória. As barras representam as medianas; Teste de Mann-Whitney. **52**
- Figura 4** Expressão significativa de mRNA de IL-33 e sST2 em pacientes com hepatite C crônica, em relação aos seguintes parâmetros: aminotransferases (a), carga viral (b), fibrose (c) e atividade necroinflamatória (d). **56**
- Figura 5** Correlação positiva entre a expressão da IL-33 com a IL-33 sérica (a), ALT (b) e AST (c). Teste de Spearman. **57**

ARTIGO 2

- Figura 1** Níveis séricos de IL-33 (a) e sST2 (b) em indivíduos controles sadios (CS) e pacientes com hepatite B crônica (HBC). Teste de Mann-Whitney, as barras horizontais representam a mediana e os intervalos interquartis, $p < 0,05$. **71**
- Figura 2** Níveis séricos de IL-33 em pacientes com hepatite B crônica (HBC), de acordo com a ausência (F0) ou presença (F1) de fibrose. Teste de Mann-Whitney, mediana, $p < 0,05$. **72**
- Figura 3** Expressão de mRNA de IL-33 total (a) e do sST2 (b) em controles sadios (CS) e portadores de Hepatite B Crônica (HBC); (c) expressão relativa do mRNA em relação aos níveis séricos das aminotransferases, dos pacientes com HBC. As barras representam mediana e intervalo interquartil, teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$. **74**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	Lamivudina
a	Coefficiente angular
A0	Sem atividade
A1	Atividade discreta
A2	Atividade moderada
ADF	Adefovir
AgHBe	Antígeno “e” da hepatite b
AgHBs	Antígeno de superfície da hepatite b
ALT	Alanina aminotransferase
AML	Anticorpo antimúsculo liso
ANA	Anticorpo antinuclear
AP-1	Ativador proteína 1
APC	Células apresentadoras de antígenos
AST	Aspartato aminotransferase
Au	Antígeno australiano
BOC	Boceprevir
cccDNA	Dna circular covalentemente fechado
CD	Grupamento de diferenciação
CD	Células dendríticas
CEH	Células estreladas hepáticas
CMSF	Células mononucleares do sangue periférico
CS	Controle sadio
CTL	Linfócito t citotóxico
CV	Carga viral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DST	Doença sexualmente transmissível
E	Eficiência
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ETV	Entecavir
F	Foward
F0	Ausência de fibrose
F1	Fibrose leve
F2	Fibrose moderada
F3	Fibrose avançada
F4	Fibrose muito avançada ou cirrose
FR	Fator reumatoide
GATA3	Fator de transcrição da célula th2
HBC	Portadores de hepatite b crônica
HCC	Portador de hepatite c crônica
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNANB	Vírus da hepatite não-A não-B
HTLV	Vírus t-linfotrópico humano
IFN	Interferon
Ig E	Imunoglobulina E
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

IL	Interleucina
IQR	Intervalo interquartil
IRES	Sítio de entrada interna para ribossomos
JNK	Quinase c-jun n-terminal
KC	Células de kupffer
KDa	Kilodaltons
LB	Linfócito B
LT	Linfócitos T
MAP	Proteína ativadas por mitógeno
MCH	Complexo principal de histocompatibilidade
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NFAT	Fator nuclear de células t ativadas
NF-HEV	Fator nuclear de vénulas de endotélio
NFκB	Fator nuclear kappa b
NK	Células natural killer
NKT	Células t natural killer
nm	Nanômetro
NS	Proteínas não estruturais
ORF	Quadro de leitura aberto
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Peg-IFN	Interferon peguilado
PHA	Fitohemaglutinina
R	Reverse
r^2	Coefficiente de correlação
RBV	Ribavirina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT	Transcriptase reversa
RVS	Resposta viral sustentada
SN	Sobrenadante
sST2	Fração solúvel do st2
ST2	Supressão da tumorigenicidade 2
ST2L	Fração ligante do st2
ST2V	Fração variante do st2
STAT6	Transdutor e ativador de <i>signal</i> de transcrição 6
TCD4	Linfócitos T CD4
TCD8	Linfócitos T CD8
TDF	Tenofovir
Th1	Linfócito t auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito t auxiliar tipo 2
Thf	Linfócito t folicular
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito t regulatório
TRL	Receptores do tipo toll
TSLP	Linfopoietina estromal tímica
TVR	Telaprevir
UTR	Regiões não traduzidas
VHA	Vírus da hepatite a
VHB	Vírus da hepatite b

VHC	Vírus da hepatite c
VHD	Vírus da hepatite d
VR	Valor de referencia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Aspectos Históricos	16
2.2	Epidemiologia	17
2.3	História Natural Da Doença	18
2.3.1	Hepatite B	18
2.3.2	Hepatite C	20
2.4	Características Viroológicas	21
2.4.1	Vírus da Hepatite B	21
2.4.2	Vírus da Hepatite C	22
2.5	Transmissão	24
2.6	Diagnóstico da Infecção pelo VHB e VHC	25
2.6.1	Testes Sorológicos	25
2.6.2	Testes Moleculares	26
2.7	Resposta Imunológica À Infecção	26
2.7.1	Resposta Imune Inata	27
2.7.2	Resposta Imune Adaptativa	29
2.7.3	Mecanismos de Evasão à Resposta Imunológica	31
2.7.3.1	Hepatite B	31
2.7.3.2	Hepatite C	32
2.8	Manifestações Extra-Hepáticas e Marcadores de Autoimunidade	33
2.9	Tratamento	34
2.9.1	Hepatite B	35
2.9.2	Hepatite C	35
2.10	IL-33/ST2	36
2.10.1	Processamento e Liberação da IL-33	38
2.10.2	Sinalização IL-33/ST2	38
2.10.3	O Papel do Eixo IL-33/ST2	39
3	HIPÓTESES E OBJETIVOS	42
4	CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: O Papel da IL-33 e do Respeetivo Receptor ST2 na Hepatite C Crônica	43
4.1	Introdução	43
4.2	Materiais e Métodos	45
4.3	Resultados	48
4.4	Discussão	58
4.5	Referências	61
5	CAPÍTULO 2: Artigo 2: IL-33/sST2 e Associação com Fibrose em Pacientes com Hepatite B Crônica	64
5.1	Introdução	64

5.2	Materiais e Métodos	66
5.3	Resultados	69
5.4	Discussão	75
5.5	Referências 77	77
6	CONCLUSÃO GERAL	80
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8	ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

As hepatites virais são doenças causadas por diferentes agentes etiológicos, de distribuição universal. A defesa contra vírus requer a participação de múltiplos componentes do sistema imune com direcionamento para a imunidade mediada por células do tipo Th1, considerado importante mecanismo para resolução das infecções virais. As células Th2 medeiam a ativação e manutenção da resposta imune humoral, mediada por anticorpos, estando relacionado com a cronificação da doença (PAUL & ZHU, 2010).

O regulador principal da diferenciação das células Th2 é a IL-4, que induz a expressão de GATA3 por meio da ativação do fator de transcrição STAT6. No entanto, a via IL-4/STAT6 não é completamente essencial para a diferenciação das células Th2, podendo também ocorrer por citocinas, como a IL-33 (BELL et al., 2013; GOENKA & KAPLAN, 2011).

A IL-33, membro mais recentemente identificado da família da IL-1, é uma citocina de dupla função, agindo tanto como uma citocina regular como também como fator nuclear. Pode induzir células T auxiliares, mastócitos, eosinófilos e basófilos para a produção de citocinas Th2 (LOPETUSO et al. 2012; PASTORELLI et al., 2013). Neste sentido, a IL-33 potencializa a produção de moléculas pró-inflamatórias e quimiocinas dependentes de mecanismos intracelulares ativados por antígenos em mastócitos (ANDRADE et al., 2011).

Além da sua participação na indução da montagem de uma resposta imune Th2, existem evidências de uma forte associação entre a expressão da IL-33 e do ST2 na cicatrização de feridas e modulação da fibrose (MILLER, 2011). Desta forma, um maior conhecimento e manipulação da via IL-33/sST2 pode representar uma estratégia terapêutica para o tratamento ou prevenção de doenças inflamatórias, como as hepatites virais crônicas.

Neste trabalho avaliamos a produção de IL-33 e sST2 em portadores das hepatites B e C crônicas. Para isso, foi coletado sangue periférico desses portadores de hepatites virais e indivíduos sadios para controle. Foram analisados os níveis da IL-33 e do receptor sST2, tanto no soro quanto no sobrenadante de células mononucleares estimuladas com antígenos recombinantes dos vírus das hepatites B e C, pela técnica de ELISA. Foi também avaliado a expressão gênica da IL-33 e do receptor sST2, por PCR em tempo real. Além disso, todos os pacientes tiveram a caracterização da infecção (genotipagem, histopatologia e carga viral), bioquímica (enzimas ALT e AST) e marcadores de autoimunidade (fator reumatoide, crioglobulinemia, anticorpos séricos antinuclear e antimúsculo liso).

2. REVISÃO DE LITERATURA

A hepatite, em *latu sensu*, é inflamação do fígado. Essa inflamação pode ser provocada por diversos fatores, como vírus, toxicidade dos alimentos, uso de alguns fármacos, álcool e doenças autoimunes. Todas essas situações podem gerar inflamação, seja aguda ou crônica. Dentre elas, as hepatites causadas por vírus são as mais frequentes na população (MAUSS et al., 2016).

A hepatite crônica é um problema de saúde pública e de alto custo social (MINAMI et al., 2015). Portadores do vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC) possuem um risco elevado de desenvolver cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). O CHC é uma das principais causas de morte por câncer no mundo (MINAMI et al., 2015), com direcionamento para cirrose em, cerca de, 16% dos casos (MAJUMDAR; KITSON; ROBERTS, 2016).

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

O VHB foi descoberto em 1965, ao acaso, por Baruch Blumberg, que estava interessado em estudar o papel dos polimorfismos de antígeno no sangue, as diferenças entre essas proteínas específicas herdadas e em genética de suscetibilidade a doenças em populações ao redor do mundo. Blumberg relatou a descoberta do “antígeno Australiano” (Au), no soro de um aborígine australiano, que reagiu imunologicamente com soro de pacientes hemofílicos politransfundidos (BLUMBERG, 1965; ALTER, 2011; KAPER; O'BRIEN, 2014).

Em 1967, estudos de acompanhamento em indivíduo com icterícia, solicitado por Blumberg, sugeriram que o Au estava ligado a hepatite viral. Em 1968, Alfred Prince observou que esse antígeno estava associado com o desenvolvimento de hepatite pós-transfusional (PRINCE, 1968; ALTER, 2011). Em 1970, com a utilização de microscopia eletrônica, foi identificado o VHB – partículas esféricas, com cerca de 42nm (DANE; CAMERON; BRIGGS, 1970) e, em 1977, o VHB começou a ter suas estruturas e formas de transmissão estudadas, sendo caracterizado como vírus DNA (BLUMBERG, 1977).

Em relação ao VHC, em 1974, após a identificação do vírus causador da hepatite A (VHA), foi observado ainda casos de hepatite pós-transfusional, não relacionados aos VHA e VHB, chamado vírus hepatite não-A não-B (HNANB). Diversos estudos foram realizados em chimpanzés para a caracterização desse vírus. As principais características identificadas, pela

microscopia eletrônica, foram: presença de membrana dupla, estruturas tubulares do retículo endoplasmático e um tamanho de 45-60nm de diâmetro (HOUGHTON, 2009). O VHC, identificado como agente causador da HANB, em 1989, foi possível devido ao avanço da biologia molecular e desenvolvimento de ensaios sorológicos sensíveis(CHOI et al., 1989).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que um terço da população mundial teve contato com o VHB, sendo que mais de 350 milhões de pessoas são portadores de antígeno de superfície (AgHBs) do VHB (MAUSS et al., 2016). Doenças hepáticas relacionadas ao VHB continuam sendo um grave problema de saúde pública, e cerca de um milhão de pessoas morrem anualmente de doença hepática aguda ou crônica relacionadas ao VHB (CHUI et al., 2011; YAN et al., 2012).

De acordo com a prevalência do AgHBs na população, é possível uma região ser definida como baixa (< 2%), intermediária (2 a 7%) e de alta prevalência (> 8%) (PREVALENCE & SILVA, 2010). A prevalência de hepatite B é diferente no mundo, variando de 0,1 a 20%. O Sudeste Asiático, a China e a África Subsaariana são consideradas áreas de alta prevalência, onde as chances de infecção são superiores a 60% ao longo da vida. O Japão, Ásia Central, Oriente Médio e América Latina e América do Sul são áreas de média prevalência e a Europa Ocidental, Estados Unidos e Canadá, Austrália e Nova Zelândia de baixa prevalência (MAUSS et al., 2016; WHO, 2013).

O Brasil é considerado uma região de prevalência intermediária, com áreas de baixa endemicidade para a infecção pelo VHB (PEREIRA et al., 2009). As taxas de detecção de hepatite B no Brasil vem aumentando desde o início da notificação compulsória, com destaque para as regiões Sul e Norte, que apresentam áreas de baixa e média prevalência (BRASIL, 2016).

A infecção pelo VHC é, também, um grande problema de saúde no mundo, sendo a principal causa básica dos óbitos atribuídos às hepatites virais no Brasil. O desenvolvimento de hepatite C crônica (HCC) atinge mais de 130 milhões de pessoas (MAUSS et al., 2016), com possível evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular. Estima-se que, em todo o mundo, 350.000 pessoas morrem anualmente por complicações da doença (WHO, 2014). No Brasil, segundo o Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, as taxa de detecção de casos de hepatite C tem apresentado tendência de aumento ao longo dos anos, com prevalência de 1,38%,

referente ao conjunto das capitais brasileiras (BRASIL, 2016). As taxas de incidência de hepatite C também variam regionalmente. A maioria dos casos está concentrado em áreas mais povoadas, como a região Sudeste (KRETZER et al., 2014).

No mundo, as estimativas de prevalência são de, aproximadamente, 400.000 de indivíduos cronicamente infectados pelo VHC na Austrália e Oceania, 14 milhões nas Américas, 16 milhões no Oriente Médio, 17,5 milhões na Europa, 28 milhões na África e 83 milhões na Ásia. O Egito é o país com maior prevalência da hepatite C do mundo, com uma prevalência acima de 10%. O maior fator de risco, na maioria dos casos, é o uso de drogas injetáveis e pacientes em hemodiálise e/ou que receberam transfusões de sangue antes de 1991 (LAVANCHY, 2011; MAUSS et al., 2016).

A distribuição de genótipos do VHC também varia substancialmente em diferentes partes do mundo. O genótipo 1 é a mais prevalente em todo o globo, compreendendo 83,4 milhões de casos (46,2% de todas as ocorrências de infecção pelo VHC). O genótipo 3 é o segundo mais eminente, com 54,3 milhões (30,1%). Ambos os genótipos estão presentes em todos os continentes. Os genótipos 2, 4 e 6 (predominante na África Ocidental, África e Ásia, respectivamente) são responsáveis por um total de 22,8% de todos os casos; o genótipo 5, característico da África do Sul e Central, compreende o restante <1%. No Brasil, os genótipos predominantes são o 1 e 3 (MESSINA et al., 2015).

2.3 HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA

O resultado da infecção pelos vírus das hepatites pode variar muito. Algumas pessoas conseguem eliminar o vírus no início da infecção, outras desenvolverão a forma crônica que, ao longo de anos e décadas, pode permanecer benigna, progredir a gravidade ou levar à morte. Em pessoas cronicamente infectadas, a doença geralmente avança lentamente, mas em casos raros pode ser fatal em poucos anos (BLUM, 2016).

2.3.1 Hepatite B

O VHB não é citopático. As lesões do fígado são consideradas resultado da resposta imunológica do hospedeiro, que determinará o resultado da infecção. A gravidade da lesão hepatocelular será reflexo dessa resposta imune (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

Na infecção aguda, há uma fase de incubação inicial, que pode variar entre 60 e 150 dias. Mais de 90% dos infectados pelo VHB são assintomáticos. Quando existem sintomas, esses podem incluir náusea, dor abdominal, vômitos, febre, icterícia, urina escura, alterações na cor das fezes, e hepatomegalia ou esplenomegalia. Após a fase de incubação, há hepatite aguda caracterizada pela elevação das transaminases séricas. Em seguida, há a normalização dos testes de função hepática, mas o AgHBs geralmente persiste por alguns meses até que fique negativado no soro. Em pessoas que curam espontaneamente, o AgHBs é eliminado do sangue, e o anticorpo para esse antígeno de superfície (anti-HBs) persiste no organismo, que indica a imunidade à infecção. Pessoas imunossuprimidas podem reativação a infecção. Uma parte dos infectados também pode evoluir para a forma crônica da doença (CHURIN; RODERFELD; ROEB, 2015; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014; SHEPARD et al., 2006).

A infecção crônica é caracterizada pela interação entre o vírus, os hepatócitos e o sistema imunológico do paciente. Dessa forma, o curso natural da infecção crônica pode ser dividido em diferentes fases: imunotolerância, imunoeliminação, portador inativo e imunorreativa (TERRAULT et al., 2016).

A primeira fase é caracterizada pela presença de antígeno “e” (AgHBe) e elevada replicação do DNA viral. As aminotransferases (alanina aminotransferase, ALT e aspartato aminotransferase, AST) são normais ou minimamente elevadas e o fígado não apresenta alterações ou apresenta mínima atividade necroinflamatória. A fase de imunoeliminação ou “imunclearance” caracteriza-se pela atividade citopática nos hepatócitos infectados, aumento dos níveis das aminotrasferases e diminuição dos níveis de DNA do vírus. Estes eventos podem resultar no desenvolvimento da fibrose ou cirrose em alguns pacientes AgHBe positivo ou, levar a negatificação da replicação viral e soroconversão para o seu anticorpo (anti-HBe) nos pacientes. Essa soroconversão espontânea, para ocorrer, depende de fatores como idade, nível de ALT e do genótipo do vírus. Na fase de portador inativo, o paciente apresenta níveis normais de aminotransferases, baixos níveis de DNA viral, e nenhuma ou mínimas alterações histológicas necroinflamatórias, apesar de haver a possibilidade de algum paciente ter desenvolvido fibrose ou cirrose (CHURIN; RODERFELD; ROEB, 2015; MCMAHON, 2014; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014; LIAW, 2009).

A soroconversão do AgHBs pode ocorrer vários anos após a soroconversão do AgHBe. Pode haver escape viral, por depressão da atividade imunológica do hospedeiro ou mutações que resultem na evasão do vírus à resposta do hospedeiro. No caso de uma imunossupressão, há uma reversão da soroconversão do paciente, tornando-se novamente AgHBe reagente. No caso de mutação, normalmente no pré-core e/ou core-promoter, o paciente continua anti-HBe

positivo. Nessas situações, há o retorno da replicação viral e/ou reaparecimento da atividade necroinflamatória do fígado, caracterizando assim, a quarta fase, imunorreativa (CHURIN; RODERFELD; ROEB, 2015; LIAW, 2009).

2.3.2 Hepatite C

A maioria das pessoas é assintomática durante a infecção aguda pelo VHC. Cerca de 20% a 30% de adultos com infecção aguda podem desenvolver sintomas clínicos. Quando os sintomas se desenvolvem, eles aparecem cerca de 3 a 12 semanas após a exposição ao vírus, sendo semelhantes à gripe, com exceção de icterícia. Estes sintomas podem se resolver algumas semanas após seu início. Em casos muito raros, a infecção aguda pelo VHC causa hepatite fulminante (súbita e grave, muitas vezes insuficiência hepática está envolvido). Além disso, portadores do VHC também podem desenvolver manifestações extra-hepáticas que, em geral, afetam as articulações, músculos e pele (PEDROTO, 2014; VENNER; KISTIN, 2014).

Na infecção aguda do VHC, podem ser identificadas elevação das enzimas séricas associada ao fígado, ALT e AST, 2 a 8 semanas após a exposição, e muitas vezes chegam a níveis 10 vezes superiores aos limites normais. Estas enzimas não são tão elevadas nas primeiras semanas, enquanto o RNA do vírus aumenta rapidamente nesse período (PEDROTO, 2014). A eliminação espontânea do VHC da corrente sanguínea, pode ser parcialmente atribuído a uma combinação de fatores virais e do hospedeiro, tais como idade, sexo, raça, história de uma infecção anterior e coinfeções (HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013).

Após seis meses de persistência do RNA do vírus no sangue, a infecção é definida como crônica. Essa transição entre as fases, normalmente, é subclínica. A infecção aguda pelo VHC se torna crônica em torno de 70% dos pacientes, considerada elevada taxa de cronicidade. Essa fase é caracterizada pela presença do anticorpo contra o VHC (anti-VHC) e pela detecção do RNA viral, em pelo menos dois momentos ao longo de seis meses. A maioria das pessoas com infecção crônica permanecem assintomáticos durante anos, embora alguns indivíduos possam apresentar sintomas como fadiga, mal-estar e outras manifestações extra-hepáticas (MAASOUMY; WEDEMEYER, 2012; VENNER; KISTIN, 2014).

Insuficiência hepática ou estágio final da doença pode tornar-se clinicamente aparente depois de décadas em uma parte dos portadores do VHC crônicos. A expressão da doença crônica terminal pode incluir eventos clínicos, tais como ascite, sangramento de varizes, e

encefalopatia hepática ou alterações laboratoriais, tempo de protrombina prolongado, baixa contagem de plaquetas, baixo nível de albumina sérica, aumento do nível de bilirrubina, e nível de creatinina elevada (de insuficiência renal associada). A cirrose desenvolve-se em aproximadamente 10 a 15% de indivíduos com infecção crônica pelo vírus (MAASOUMY; WEDEMEYER, 2012; MESSINA et al., 2015). O desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC) está relacionado aos pacientes que apresentam cirrose estabelecida (LU et al., 2013).

2.4 CARACTERÍSTICAS VIROLÓGICAS

2.4.1 Vírus da hepatite B

O VHB, da família dos *Hepadnavirus*, é uma partícula esférica com cerca de 42nm de diâmetro, constituída por um invólucro externo (uma bicamada lipídica ligada a complexos de glicoproteínas virais, os HBs ou proteínas de superfície) e uma estrutura interna (núcleo ou core) composta por proteínas nucleares (HBc). O nucleocapsídeo é coberto por uma membrana composta por três formas proteicas do envelope viral: grande, média e pequena. No interior do nucleocapsídeo há uma única cópia de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico viral (composto de, aproximadamente, 3,2kb), parcialmente de fita dupla relaxada de DNA circular (rcDNA) e uma DNA polimerase ligada à extremidade 5' do DNA de cadeia negativa (LOPES & SCHINONI, 2011; CHURIN et al., 2015).

O genoma está organizado em quatro regiões abertas de leitura (ORFs - Open Reading Frame): Pré-S/S, Pré-C/C, P e X que são traduzidas em proteína de núcleo viral, de superfície, polimerase / transcriptase reversa (RT), e X. O genoma possui quatro promotores (Pré-S1, Pré-S2/S, core e X), que atuam regulando a atividade gênica (LUCIFORA & ZOULIM, 2011; LOPES & SCHINONI, 2011).

O VHB é diferenciado em diversos genótipos, de acordo com a sequência do genoma. Até o momento, foram definidos dez genótipos conhecidos (A-J) para o vírus. Além disso, alguns genótipos apresentam sub-genótipo, com distribuições geográficas específicas. Essa divergência genética de diversos genótipos é baseada na homogeneidade da sequência do vírus,

0,8% de diferenças de nucleotídeos para o genótipo ou 4-8% de divergência genética para a sub-genótipo (CHU & LOK, 2015).

Em relação à replicação do genoma do VHB, o vírus liga-se a receptores de superfície celular e são internalizados pela célula. O vírus perde seu envelope e o core migra para o núcleo de hepatócitos, onde o VHB rcDNA é liberado e se converte, por ação de proteínas hospedeiras, em uma forma circular covalentemente fechada (cccDNA – *covalently closed circular*). Esse cccDNA é o modelo para a transcrição do RNA mensageiro viral (mRNA). Esse mRNA é traduzido no citoplasma para produzir as proteínas de VHB (genômicas e subgenômicas). Após a tradução, o RNA pré-genômico é encapsulado dentro das partículas do core, juntamente com a polimerase viral. No interior do nucleocapsídeo ocorre a transcrição reversa do RNA pré-genômico, com a síntese da fita de DNA de polaridade negativa, e posteriormente, formação da fita de polaridade positiva, que permanece incompleta. Em seguida, partículas virais completas são produzidas e liberadas a partir das células hospedeira (REHERMANN & NASCIMBENI, 2005; LOPES & SCHINONI, 2011).

Algumas moléculas de DNA, podem voltar ao núcleo, possibilitando uma espécie de reservatório intranuclear, podendo ser convertidas em cccDNA, garantindo assim a infecção continuada (LOPES & SCHINONI, 2011).

2.4.2 Vírus da hepatite C

O VHC pertence à família *Flaviviridae*, é uma partícula esférica com cerca de 50nm de diâmetro, possui um nucleocapsídeo envelopado com genoma em fita simples de ácido ribonucleico (RNA) de polaridade positiva, composto de, aproximadamente, 9,7 kb de comprimento. Sua cadeia de RNA consiste em duas regiões, uma não traduzidas, UTRs (*untranslated region*) e uma de leitura aberta, OFR (*open reading frame*). Na região 5' UTR encontra-se o sítio de ligação do ribossomo (*Internal ribosomal entry site – IRES*), responsável pela tradução do RNA, que codifica uma única poliproteína de cerca de 3010 aminoácidos. A poliproteína é processada pela célula hospedeira e proteases virais em quatro proteínas estruturais (núcleo, Envelope1 e 2, e p7) e as seis proteínas não estruturais (NS2, 3, 4a, 4b, 5a, e 5b) necessárias para a replicação viral (BRASS et al., 2006; SHARMA, 2010).

A proteína do Core é, principalmente, responsável pela formação do capsídeo viral e montagem do vírus. As glicoproteínas do envelope, E1 e E2, são necessárias para a entrada da

célula hospedeira através de ligação ao receptor. A proteína E2 possui os locais de ligação para o CD81, que é expressa em vários tipos de células incluindo hepatócitos e linfócitos B. A p7 está envolvida na permeabilidade da membrana, funcionando como um canal iônico. A NS2 possui como função conhecida a autoclivagem, em “cis” da proteína NS3. Essa tem a função relacionada às atividades enzimáticas de RNA helicase/NTPase (na porção C-terminal) e serinoprotease (na porção N-terminal), contendo domínios enzimáticos que desempenham papel central no ciclo de vida do vírus. A serinoprotease, por meio da atuação do cofator NS4A, é responsável pela clivagem das junções NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B, resultando nas proteínas NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. A proteína NS4A, além de cofator, tem seu papel relacionado a replicação viral e na patogênese por afetar as funções celulares. A NS4B induz uma alteração específica da membrana que serve como suporte para a formação do complexo de replicação viral. A NS5A contém uma sequência conhecida como região determinante da sensibilidade ao interferon e é sítio para mutações adaptativas que facilitam a replicação viral. A NS5B possui uma região mais conservada do genoma viral, denominada 5' NC, com função de RNA polimerase e RNA dependente, sendo essencial no processo de replicação do vírus, contendo o IRES, responsável pela iniciação e controle da tradução do RNA viral. A região 3' NC está envolvida no processo de replicação viral (BUTI; HOMS, 2012; SCHEEL; RICE, 2013; SHARMA, 2010; SOLEDAD et al., 2015).

O genoma do VHC é altamente mutável, tornando-o capaz de escapar à detecção imunológica do hospedeiro. Isso se deve ao fato da RNA polimerase não ter capacidade de revisão ou correção dos nucleotídeos ao sintetizar a fita de RNA e também pela alta de replicação viral (10^{12} partículas virais por dia), resultando em uma grande variação de genótipos, sub-genótipo e quasispécies virais (BUTI; HOMS, 2012).

Existem seis genótipos principais do VHC, estruturalmente diferentes e clinicamente relevantes, com vários subtipos sendo descritos. Embora diferentes genótipos não diferem drasticamente em relação à virulência ou patogenicidade, essa variedade difere em relação à resposta quimioterápica (COOK; TAYLOR-ROBINSON, 2017).

A entrada do vírus na célula ocorre por endocitose mediada por clatrina. A partícula viral é englobada em um endossoma, com baixo pH que causa uma alteração conformacional nas glicoproteínas do vírus, conduzindo a fusão da membrana viral com a membrana do endossoma, exultando na libertação da partícula viral no citoplasma (SUZUKI et al., 2007a).

Inicialmente, a tradução da poliproteína do VHC ocorre através da formação de um complexo estável entre o IRES na região 5' NC com a subunidade 40S ribossomal - o IRES de VHC tem a capacidade de formar um complexo de pré-iniciação estável, ligando-se diretamente

à subunidade ribossômica, sem a necessidade de fatores de iniciação de tradução. A tradução do RNA viral ocorre no retículo endoplasmático rugoso e resulta na poliproteína viral, que sofre processamento co- e pós clivagem por proteases celulares e virais para produzir as proteínas (estruturais e não estruturais). As proteínas estruturais e P7 são processadas pelo retículo endoplasmático através de peptidases enquanto que as proteínas não estruturais são processadas por duas proteases virais, a serinoprotease NS3-4A e a protease NS2-3 (MORADPOUR et al., 2007; PERES & SILVA, 2014; SOLEDAD et al., 2015).

Após a tradução, as novas proteínas interagem umas com as outras para formar um complexo, utilizam o RNA de cadeia positiva como um modelo para sintetizar uma fita de RNA negativo, que, por sua vez, serve como um modelo para sintetizar mais fitas positivas que serão traduzidas (MORADPOUR et al., 2007).

2.5 TRANSMISSÃO

Existem quatro principais formas de transmissão do vírus das hepatites B e C: sexual, parenteral, vertical e horizontal (WHO, 2014).

A transmissão parenteral é a principal via de infecção pelo VHC e uma das principais pelo VHB. Até o início dos anos 90, essa via era caracterizada pela transfusão de sangue e hemoderivados e outros procedimentos médicos invasivos sem esterilização adequada dos instrumentais, devido à falta de exame capaz de diagnosticar os infectados pelas hepatites. Atualmente, essa via de contaminação é baseada na realização de tatuagens, colocação de “*piercings*” e uso de drogas injetáveis, sem atenção às normas de biossegurança. A transmissão sexual, vertical (mãe-filho) e horizontal representam formas raras de transmissão do VHC. (THOMSON et al., 2012).

Em relação à hepatite B, a transmissão sexual é uma via muito importante, sendo caracterizada uma doença sexualmente transmissível (DST), ocorrendo devido à presença do vírus no sêmen e secreções vaginais. A transmissão vertical pode acontecer antes, durante ou após o parto. A exposição do recém-nascido ao sangue e secreções genitais maternas é um modo eficiente de transmissão. Essa via é intensificada quando a mãe é AgHBe positivo. O neonato também pode se infectar com o vírus no aleitamento materno. A via de transmissão horizontal, inclui agregado familiar, intrafamiliar e, especialmente, de criança para criança, também é importante. A infecção se dá por meio de solução de continuidade da pele (ferimentos) com

secreções exsudadas por pessoa portadora do VHB (WHO, 2014; OTT et al., 2012; EL-SERAG, 2012).

2.6 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VHB E VHC

Dois tipos de ensaios laboratoriais são utilizados para o diagnóstico virológico e monitorização da infecção pelo vírus da hepatite B e C: os sorológicos (indiretos) e os de biologia molecular (diretos). Os testes de função hepática, especialmente os níveis séricos das aminotransferases (ALT e AST), apesar de serem indicadores do dano do parênquima hepático, não são específicos para hepatites (MAASOUMY; WEDEMEYER, 2012).

2.6.1 Testes Sorológicos

No Brasil, o método diagnóstico sorológico para a hepatite B e C continua sendo a sorologia pelo método ELISA (do inglês *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*), de terceira geração, usados no rastreamento da infecção; e os que utilizam o método de *immunoblot*, de maior especificidade, denominados suplementares ou confirmatórios (BRANDÃO et al., 2001).

Os marcadores sorológicos para o VHB são (BRASIL, 2016):

- AgHBs - primeiro marcador que aparece no curso da infecção pelo VHB. Sua presença por mais de 24 semanas é indicativa de hepatite crônica.
- Anti-HBc IgM - marcador de infecção recente (aguda), encontrado no soro até 32 semanas após a infecção.
- Anti-HBc Total - marcador presente nas infecções agudas pela presença de IgM e crônicas pela presença de IgG. Representa contato prévio com o vírus.
- AgHBe - marcador de replicação viral. Sua positividade indica alta infecciosidade. Na infecção crônica está presente enquanto ocorrer alta replicação viral.
- Anti-HBe - surge após o desaparecimento do AgHBe, indica o fim da fase replicativa. Na infecção crônica, sua presença sugere redução ou ausência de replicação viral, exceto nas cepas com mutação pré-core.

- Anti-HBs - é o único anticorpo que confere imunidade ao VHB. Está presente no soro após o desaparecimento do AgHBs, sendo indicador de cura e imunidade. Também está presente isoladamente em pessoas vacinadas.

Já o marcador da hepatite C é o anti-VHC, que indica contato prévio com o VHC, entretanto não define se a infecção é aguda, progressiva ou curada, ou se houve cronificação da doença (BRASIL, 2015).

2.6.2 Testes Moleculares

Os testes moleculares são utilizados para identificar a presença dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo divididos entre qualitativos (indicam a presença ou ausência do vírus na amostra pesquisada), quantitativos (indicam a carga viral presente na amostra) e de genotipagem (indicam o genótipo do vírus) (VALSAMAKIS, 2007).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) é um método de amplificação que sintetiza um grande número de cópias do genoma viral em uma reação cíclica enzimática. Em seguida, essas cópias podem ser detectadas, e a quantidade de genomas virais presentes na amostra pode ser detectada e/ou quantificada (OLSEN, 2016).

Na prática, os testes de biologia molecular são utilizados na hepatite B, para diagnóstico, em caso de suspeita de mutações no vírus e monitoramento terapêutico. Na hepatite C, para diagnóstico, tratamento (monitoramento terapêutico e avaliação de resposta virológica sustentada ao vírus) e identificação do genótipo viral (BRASIL, 2016; BRASIL, 2015; VALSAMAKIS, 2007).

2.7 RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO

O balanço entre a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro associado à replicação do vírus, contribui para a eliminação ou persistência da infecção. O “clearance” eficaz de uma infecção viral aguda tipicamente requer a função coordenada do sistema imune do indivíduo, incluindo o sistema imune inato bem como a resposta imune adaptativa específica para os vírus das hepatites. O balanço entre essas respostas do hospedeiro (sensibilidade, efetividade,

especificidade e rapidez) estão associadas à eliminação ou persistência da infecção (LISBOA et al., 2012).

2.7.1 Resposta Imune Inata

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra as infecções virais e os interferons (IFNs) são as citocinas centrais responsáveis pela indução de um estado antiviral nas células e pela ativação e regulação dos componentes celulares dessa resposta. Resposta imune inata durante as fases iniciais de infecções virais são caracterizadas pela produção de IFN-I (α / β) e pela ativação de células *Natural Killers* (NK)(REHERMANN; BERTOLETTI, 2015).

Para que haja uma resposta adequada do sistema imune inato na detecção da presença de patógeno, os receptores de reconhecimento de padrão do hospedeiro (PRR) têm de detectar os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Vários PRRs já foram descritos, como os *Toll-like* (TLRs), Helicases *RIG-like* (RLHs) ou receptores *Nod-like* (NLRs), os quais produzem IFN do tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6). O TLR-3 reconhece RNA de cadeia dupla, TLR-7 e -8 reconhecem RNA de cadeia simples, o TLR-9 reconhece DNA viral. Outros TLR (2 e 4) interagem com proteínas virais específicas e também desencadeiam a produção de IFN. A ativação dos TLRs nas células é acompanhada pela maior capacidade de expressão de moléculas coestimulatórias, apresentação de antígenos e secreção de citocinas pró-inflamatórias (AIT-GOUGHOUlte et al., 2010; FERRARI, 2015; IWASAKI et al., 2015; PARK; REHERMANN, 2014).

As principais células que expressam os TLRs são as células apresentadoras de antígenos (APCs – *Antigen-Presenting Cells*), tais como células dendríticas e macrófagos, células envolvidas na resposta imune inata. Além dessas células, outras também estão envolvidas nessa resposta na infecção pelo vírus da hepatite: as células NK, células T *Natural Killer* (NKT) e células de Kupffer (CK). Essa resposta inata é caracterizada, principalmente, pela produção de IFN-I e tipo II (IFN- γ) e pela ativação de células NK (PARK; REHERMANN, 2014). A produção de IFN-I pode ser iniciada diretamente pela replicação do vírus através de mecanismos celulares que detectam a presença de RNA ou DNA, enquanto que as células NK podem ser ativadas pelo reconhecimento de moléculas induzidas pela modulação da quantidade

de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I na superfície de células infectadas, (LAM; LANIER, 2017).

As células NK respondem rapidamente à infecção pelo vírus, polarizando grânulos em direção à célula infectada, liberando perforinas, que lisa a célula infectada. Além disso, elas produzem IFN- γ , que recrutam células inflamatórias intra-hepáticas e estimulam a resposta Th1, induzindo a necrose ou apoptose da célula infectada e inibindo a replicação viral. As células de Kupffer produzem citocinas pró-inflamatórias (IFN α/β , TNF, e IFN γ) que auxiliam na inibição da replicação do vírus e também no recrutamento de linfócito T (LT) e células NK (LOPES & SCHINONI, 2011).

As células dendríticas (CD), de origem mielóide (mCD) ou linfoide/plasmocitóide (pCD), reconhecem e apresentam o antígeno às células T, mas são distintas nos seus perfis de produção de expressão de TLR e citocinas. Estudos indicam que as mCDs estão mais envolvidas na captura do vírus e apresentação às células T específicas. A segunda subpopulação, pCDs, foi mostrado uma associação à maior produção de IFN- α/β , em resposta ao envelope do vírus (AIT-GOUGHOLTE et al., 2010).

Células dendríticas maduras têm a capacidade de ativar linfócitos T e influenciar a polarização da resposta de linfócitos T CD4 em tipo Th1, secreção de IL-2, IFN, TNF- α , que induzem uma resposta imune celular ou citotóxica, ou Th2 (ativação de linfócitos B e citocinas: IL-4, IL-5, IL-10, IL- 13) que leva à estimulação da imunidade humoral. Evidências sugerem que a polarização da resposta imune pelas CDs não se limita aos subconjuntos dessas células, mas também da dose do antígeno e dos ligantes ao receptor do tipo *Toll* sobre os agentes patogênicos, sendo que os vírus também influenciam a função das CDs infectadas. Além das principais células envolvidas na resposta imune inata, células endoteliais sinusoidais, células estreladas hepáticas e hepatócitos também podem apresentar funções imunomoduladoras na infecção, secretando citocinas e quimiocinas (DELVES et al., 2016).

Outro importante componente da resposta inata é o sistema complemento, que leva à formação do complexo de ataque à membrana e à destruição das células infectadas. A ativação do sistema do complemento desencadeia uma vasta gama de respostas celulares, variando desde apoptose até opsonização. Embora o sistema do complemento contribua para a proteção do hospedeiro contra a infecção por vírus, o envolvimento do complemento na hepatite viral não foi bem documentado. O sistema complemento pode inativar a função das células NK através da indução C3 e TGF-1 (KIM et al., 2014).

Sabe-se que a depleção do complemento prejudica a produção de anticorpos. O mecanismo envolve a ligação de C3dg ligado a antígeno (um produto da clivagem iC3b) a CR2

(CD21) expresso em células B, o que facilita a apresentação de antígeno em células B e reduz o limiar para a ativação de células B. Além disso, tem o papel de regulador da imunidade das células T (MATHERN; HEEGER, 2015).

2.7.2 Resposta Imune Adaptativa

A participação da imunidade adaptativa é fundamental no “clearance” viral ou cronificação da infecção. Essa resposta inclui dois tipos principais de mecanismos efectores: respostas celulares compreendendo células auxiliares CD4 T (Th) e linfócitos T CD8 citotóxicos (CTL); e respostas humorais consistindo de anticorpos produzidos por células B específicas para os vírus. O reconhecimento da proteína viral é necessária para ambos os mecanismos efectores imunitários adaptativos (SHUAI et al., 2016).

Até o momento, tem-se demonstrado que as células T CD4+ *naive* se diferenciam funcionalmente em três subpopulações de células efectoras: Th1, Th2 e Th17. Outras duas subpopulações de células T CD4+ são definidas como T regulatórias (Treg FoxP3+) e T folicular (Thf). Devido à plasticidade celular, as células T CD4+ podem se diferenciar em determinada subpopulação conforme definido principalmente pelos padrões de produção de citocinas e expressão de fatores transcricionais em resposta a diferentes agentes infecciosos (MAGOMBEDZE et al., 2013; MORENO-CUBERO; LARRUBIA, 2016).

As células Th1, pró-inflamatórias, secretam IL-2 e INF- γ , nas respostas imunitárias mediadas por células e estimulam a resposta antiviral do hospedeiro, promovem a estimulação de linfócitos T citolíticos CD8 positivos para o vírus, conduzindo à depuração viral. As células Th2, anti-inflamatórias, produzem IL-4 e IL-10, que medeiam a ativação e manutenção da resposta imune humoral, estimulam a ativação/diferenciação de células B, e inibem a resposta Th1. Respostas Th1 estão associadas com imunidade ou resistência a infecção, enquanto que as respostas Th2 estão associadas com a progressão ou persistência de infecção. O balanço dessas respostas pode estar associado à cronicidade da infecção e a lesão hepática em indivíduos portadores do vírus da hepatite (SAXENA; KAUR, 2015; BEHFARJAM et al., 2017).

As CKs e, principalmente as CDs, são importantes para a apresentação e maturação de LT. A infecção, tanto pelo VHB como o VHC, podem comprometer imunidade antiviral, seja pela interferência na sinalização de PAMPs e na produção de citocinas pró-inflamatórias pelas

CKs ou por aumentar a capacidade tolerogênicas dessas células, resultando na elevada expressão de mediadores anti-inflamatórios (BOLTJES et al., 2014).

As APCs apresentam o antígeno para células T CD4+ e T CD8+ e produzem citocinas, IL-12 e TNF- α , as quais induzem a produção de IFN- γ e proliferação de CD8+. As células T CD4 +, são produtores de citocinas e necessárias para o desenvolvimento eficiente da função efetora das células T CD8+ e da produção de anticorpos pelas células B diferenciadas em plasmócitos. A resposta de células T CD4+ é ativada com o reconhecimento de epítopos, principalmente das proteínas do nucleocapsídeo, apresentadas por MHC-II. As células NK e NKT podem ajudar na supressão da expressão e da replicação do vírus sem destruição do hepatócito, promovendo, um efeito antiviral mediado por INF- γ (BOLTJES et al., 2014; MANNS et al., 2017).

Tanto a interação entre as células T CD4 + e as APCs, como a interação entre a APC e as células T CD8 +, depende do reconhecimento de antígeno restrito ao MHC, o que significa que a APC deve expressar tanto o MHC-I quanto o MHC-II. Entre os potenciais APC residentes no fígado, as CD expressam ambas as classes de moléculas do MHC. Em um nível mais baixo, as CK também, mas os hepatócitos expressam apenas o MHC-I. Dessa forma, os hepatócitos não podem ser ativados por células T CD4 +. Assim, nos hepatócitos, pode ocorrer a apresentação direta de antígenos a células T CD8 + via células Kupffer (KC), células endoteliais sinusoidais hepáticas ou mCD que, podem ativar células T CD4+ (GRAKOU; CRISPE, 2016).

As células T CD8+ participam da lise de hepatócitos infectados, reduzindo os níveis de vírus em circulação, enquanto que os anticorpos neutralizam as partículas virais livres ajudando a impedir a infecção de novas células. Essa resposta contra os antígenos virais ocorre quando os linfócitos T CD4+ ativam os linfócitos T CD8+ e promovem a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos para a produção de anticorpos. As células T CD8+ vão exercer citotoxicidade, através de mecanismos citolíticos e não-citolíticos, pelo reconhecimento de antígenos virais via MHC classe I nas células alvo, e consequente liberação de granzima e de perforinas com lise das células infectadas e também dos vírus (BEHFARJAM et al., 2017).

Células Th e CTL são essenciais para o controle da infecção. As respostas das células T são geralmente fracas entre os portadores crônicos. O papel fundamental desempenhado por essas células específicas, no controle do vírus, é caracterizado pelo aparecimento de células T específicas na infecção primária, coincidindo com a diminuição da carga viral; as respostas CTL específicas contra o vírus intra-hepático correlacionam-se com a depuração do vírus e com a resposta inflamatória hepática; associação entre o HLA de classe I e II e *clearance* de infecção; e, estudos em chimpanzés demonstraram que as respostas de células T eram essenciais

para o processo de depuração ou persistência do vírus (LAMONTAGNE; BAGGA; BOUCHARD, 2016; MORENO-CUBERO; LARRUBIA, 2016).

A persistência do VHB e VHC no paciente pode induzir a formação de fibrose, que é caracterizada pelo excesso de deposição de colágeno e pelo acúmulo de matriz extracelular. Esses vírus podem induzir a fibrogênese, pela ativação das células estreladas hepáticas, induzindo a lesão celular, apoptose e necrose, desencadeando uma resposta de cicatrização de feridas. As KC podem estar envolvidas nesse processo pela liberação de fatores profibrinogênicos, como espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) e citocinas, como IL-6, TNF, IL-1, PDGF e TGF β , que induzem a ativação de células estreladas hepáticas (BOLTJES et al., 2014; GRAKOU; CRISPE, 2016).

2.7.3 Mecanismos de evasão à resposta imunológica

A depuração viral e patogênese das hepatites B e C são mediados principalmente pela resposta imune. Para que haja a persistência destes vírus, eles devem não induzir uma resposta do hospedeiro ou reprimir, evadir, ou neutralizar essa resposta. Dessa forma, os VHB e VHC podem escapar da resposta imunológica e estabelecer uma infecção persistente (GODKIN; SMITH, 2016).

2.7.3.1 Hepatite B

O tamanho do genoma do VHB e seu mecanismo de replicação contribuem para a sua capacidade de evadir da resposta imune inata e, por conseguinte, a persistir para cronicidade. O processamento, a transcrição reversa e polimerização do DNA dentro do nucleocapsídeo pode evitar o reconhecimento pelo sistema imune (THURSZ, 2014).

Além disso, a DNA polimerase do VHB é propensa a erros, levando a substituições de nucleotídeos e de aminoácidos em cópias virais. Dessa forma, há uma geração aleatória de variantes e, esse alto índice de substituições de nucleotídeos é o princípio do que tem sido demonstrado como a causa de drogas antivirais com baixa potência, bem como a resistência ao fármaco. Acredita-se que a variação da sequência, particularmente em epítomos de

reconhecimento por células B e T, permite que o vírus persista no organismo mesmo com respostas imunitárias adaptativas específicas ao vírus. Assim, se as mutações em AgHBc alteraram a sequência e a estrutura dos epítomos reconhecidos pelos linfócitos T, a ativação da resposta das células T ao AgHBc, conseqüentemente, seria influenciada (THURSZ, 2014; KIM; LEE; KIM, 2016; LAMONTAGNE; BAGGA; BOUCHARD, 2016).

Outra proteína que pode levar à persistência viral é a HBx. Essa proteína pode modificar várias vias celulares, incluindo NFkB, que pode, subsequentemente, alterar a apresentação de antígeno e da resposta imunológica. A HBx também pode reduzir a expressão de TRIF, domínio que induz o interferon- β através do receptor Toll-like 3, atenuando essa via de sinalização. Isto pode promover a replicação do VHB e sua evasão da imunidade inata. Além disso, HBx também pode regular positivamente a expressão de moléculas de HLA-I nos hepatócitos, resultando no recrutamento de células T e dano contínuo no fígado (BOWIE & UNTERHOLZNER, 2008; LIU; KOH; LEE, 2016).

2.7.3.2 *Hepatite C*

Vários mecanismos têm sido sugeridos como colaboradores para uma desordem da resposta imune, facilitando à persistência e cronificação da doença. Acredita-se que a elevada variabilidade do RNA genômico do vírus representa uma primeira estratégia de escape, também conhecido como "quasiespécie", pode permitir a evasão da resposta imunitária (HELLE; DUVERLIE; DUBUISSON, 2011).

O VHC pode interferir na resposta imunológica do hospedeiro de diversas formas, como no reconhecimento viral por receptores de reconhecimento de padrões, nas funções das CD, na imunomodulação pelas proteínas virais, por ações inibitórias de células T reguladoras e também por uma apresentação de antígeno prejudicada. Essa última poderia explicar a ausência de células T específicas para o vírus em alguns indivíduos, resultando em uma resposta demorada ou não-sustentada (BOWEN & WALKER, 2005; BURKE & COX, 2010).

Na imunidade inata, o VHC pode inibir as funções das CD derivadas de monócitos pelas proteínas estruturais e não estruturais do vírus, reduzir a capacidade de apresentação de antígenos pelas CD derivadas de monócitos, aumento da produção de IL-10 e baixa produção de IL-12 por essas células, aumento das CD no fígado, supressão da função das células NK pelas CD e baixa produção de IFN- γ por células NKT. Já na imunidade adaptativa, o VHC

pode suprimir as funções das células T, pelas proteínas estruturais e não estruturais do vírus, as células T CD4 podem apresentar falha funcional, diminuição da produção de IL-2 e aumento da produção de IL-10, aumento de células T regulatórias e anergia das células T CD8+ (QURESHI, 2007; SZABO; DOLGANIUC, 2006; MANNS et al., 2017).

A serina protease viral NS3-4A, essencial para a replicação e montagem do vírus, também é capaz de interromper uma resposta antiviral eficiente. Este complexo é capaz de clivar o adaptador de sinalização antiviral mitocondrial, na membrana das mitocôndrias, via de sinalização do hospedeiro que reagem aos padrões moleculares associados ao patógeno do VHC, bloqueio da produção de IFNs (HORNER; GALE, 2013; FERREIRA et al., 2016; MANNS et al., 2017).

2.8 MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS E MARCADORES DE AUTOIMUNIDADE

Ambos os vírus das hepatites B e C estão associados a manifestações extra-hepáticas da doença, que podem ser mediadas por lesões complexas do sistema imune. Embora as manifestações extra-hepáticas existam em ambas as hepatites virais, elas são mais comumente associadas à infecção pelo VHC (REHERMANN; NASCIMBENI, 2005).

As principais manifestações clínicas extra-hepáticas evidenciadas em pacientes com infecção crônica pelo VHB, são poliarterite nodosa (PAN) e insuficiência renal por doença glomerular, ocorrendo em 10-20% dos pacientes com hepatite B crônica (MANNS et al., 2017). A PAN costuma aparecer semanas a meses após a infecção pelo VHB. O envolvimento renal ocorre geralmente sob a forma de hipertensão, hematúria microscópica e proteinúria, entretanto, proteinúria gama nefrótica ou insuficiência renal é muito rara (DE VIRGILIO et al., 2016). A associação entre infecção pelo VHB e doença glomerular já foi explorada por vários autores, sendo que o tipo mais comum de glomerulonefrite é a nefropatia membranosa (FABRIZI; DONATO; MESSA, 2017).

Uma variedade de manifestações extra-hepáticas da hepatite C é descrita. Muitas destas síndromes associadas implicam o vírus da hepatite C como mediador da autoimunidade ou da formação de complexos imunes, ocorrendo em 30-40% dos pacientes com hepatite C crônica. Estes distúrbios incluem crioglobulinemia mista, hepatite autoimune, glomerulonefrite, tireoidite e, possivelmente, síndrome de Sjögren (CACOUB et al., 2014a; CACOUB et al., 2016). De acordo com uma meta-análise recente, a manifestação extra-hepática mais frequente

em pessoas infectadas pelo VHC é a depressão, onde pacientes com hepatite C têm um risco de desenvolver depressão de 2,30 vezes mais que pessoas sem VHC (YOUNOSSI et al., 2016).

A crioglobulinemia é mais frequentemente observada em pacientes infectados com VHC. Na crioglobulinemia, imunoglobulinas no sangue precipitam quando o soro é armazenado abaixo de 37° C, e esta precipitação é redissolvida por aquecimento a 37° C. Entre os vários tipos de crioglobulinas, o tipo II (consistindo de IgG policlonal e IgM monoclonal) é mais frequentemente observado, estando associado ao fator reumatoide (FR) (CACOUB et al., 2014b). O FR é frequentemente positivo em pacientes com hepatite C crônica, sendo necessária diferenciação entre portadores de artrite reumatoide (SAMUEL; REES, 2013).

A prevalência de auto anticorpos circulantes é alta em pacientes com infecção crônica pelo HCV. Cerca de 20% dos pacientes com hepatite C apresentam positividade para o anticorpo antinuclear (ANA) e antimúsculo liso, AML, (7%) (CACOUB et al., 2014a). A liberação de componentes celulares devido à lise das células pode ser uma das causas da produção de autoanticorpos e aumento na ativação e proliferação de linfócitos B induzida pelo VHC. A infecção pelo VHC nos linfócitos e sua proliferação dentro dos linfócitos têm sido demonstrada *in vitro*, sendo esta, uma possível forma de induzir a alteração funcional dessas células. Produção de autoanticorpos e crioglobulinas podem ser induzidas por função linfocítica anormal (CACOUB et al., 2016).

2.9 TRATAMENTO

No Brasil, existe vacina para o VHB fixados no calendário anual de vacinação do Ministério da Saúde. É indicada universalmente para recém-nascidos, crianças e adolescentes até 19 anos, adultos que apresentam um maior risco de infecção, como os profissionais da área da saúde. Contudo, mesmo após a completa vacinação, cerca de 10% a 20% dos indivíduos não alcançam os títulos protetores de anticorpos (BARROS, 2011; BRASIL, 2014).

Não há vacina contra o VHC. Após infecção pelos vírus da hepatite C, o tratamento tem como objetivo principal a resposta virológica sustentada (RVS). Esta é caracterizada pela negatificação, ou a não detecção, do RNA-VHC após o tratamento. Dessa forma, é esperado que o paciente melhore sua qualidade de vida, aumente sua expectativa de vida, diminua casos de complicações hepáticas (progressão da doença – cirrose e/ou carcinoma hepatocelular) e,

consequentemente, reduzir a transmissão do vírus (KEEFFE et al., 2006; ZOULIM & LOCARNINI, 2012).

2.9.1 Hepatite B

Na hepatite B aguda, não há indicação de tratamento com fármaco, com exceção de casos específicos, mas sim recomendação de acompanhamento ambulatorial. O uso de medicamento se restringe ao tratamento dos sintomas da hepatite aguda, devendo se basear em fatores familiares (histórico de CHC, comorbidades e gestação), quadro clínico, perfil sorológico, elevação dos níveis de ALT, níveis de carga viral e histologia hepática (BRASIL, 2016).

No Brasil, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT), para o tratamento da hepatite B crônica, recomenda o uso dos seguintes medicamentos: alfapecuinterferona 2a e 2b e os análogos de nucleotídeos: entecavir (ETV) e tenofovir (TDF) (BRASIL, 2016).

A alfapecuinterferona é uma citocina com ação antiviral e imunomoduladoras. Os genes estimulados pela ação do interferon modulam a inibição da replicação viral em células infectadas e inibição da proliferação celular. A diferença entre alfapecuinterferona 2a/b é o tamanho da cadeia adicionada, 40 e 12 kilodaltons (KDa), respectivamente, sendo equivalentes em pacientes virgens de terapia (BEZERRA & OLIVEIRA, 2007; BRASIL, 2016). O TDF inibe a replicação do vírus através do bloqueio da ação da enzima transcriptase reversa. O ETV atua no bloqueio da DNA polimerase do VHB. A 3TC é um inibidor da transcriptase reversa (KEEFFE et al., 2006; KEEFFE et al., 2008).

Quando os pacientes se encaixam nos critérios de inclusão para o tratamento, são candidatos à terapia com TDF. Caso haja contraindicação ao seu uso, deve-se indicar o tratamento com ETV. O alfapecuinterferona é um tratamento alternativo, reservado a pacientes portadores de infecção pelo vírus da hepatite B com exame AgHBe reagente (BRASIL, 2016).

2.9.2 Hepatite C

A determinação de iniciar o tratamento depende de fatores que incluem características tanto do vírus quanto do hospedeiro. O tratamento e seus esquemas dependem da história natural da doença no indivíduo, o estado clínico/patológico, os efeitos (positivos e negativos) do tratamento, do genótipo e da carga viral do vírus, bem como a evolução da replicação viral durante o tratamento.

Entre os critérios de início de tratamento estão pacientes sem histórico de tratamento prévio e que apresentem fibrose hepática avançada (METAVIR F3 ou F4), ou fibrose METAVIR F2 há mais de três anos, coinfeção com HIV, insuficiência renal crônica, entre outros. No Brasil, segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT), para o tratamento da hepatite C crônica, estão disponíveis os seguintes medicamentos: alfapecuinterferona 2a e 2b, ribavirina (RBV), sofosbuvir, simeprevir e o daclatasvir (BRASIL, 2015). Os três últimos adicionados recentemente ao protocolo clínico, que se destacam pelos resultados e custo-efetividade.

A ação dos medicamentos alfapecuinterferona 2a e 2b é semelhante ao tratamento da hepatite B. O sofosbuvir é um análogo nucleotídeo que inibe a polimerase do VHC; o simeprevir, um inibidor de protease de segunda geração; e o daclatasvir, um inibidor da NS5A (BRASIL, 2013; BRASIL, 2015). Para o tratamento da hepatite C aguda, a recomendação do Ministério da Saúde (2015) é a monoterapia com IFN convencional ou Peg-IFN alfa-2a e 2b.

A determinação do genótipo viral é crucial para a determinação do fármaco utilizado no tratamento da hepatite C crônica. No caso do tratamento com o genótipo 1, recomenda-se sofosbuvir, simeprevir, daclatasvir e RBV; para o genótipo 2, sofosbuvir e RBV; para o genótipo 3, o PEG-IFN, RBV e sofosbuvir ou sofosbuvir e daclatasvir, podendo ser adicionado ou não a RBV; para o genótipo 4, daclatasvir, PEG-IFN e RBV ou sofosbuvir com o daclatasvir. Os tempos e as escolhas da terapia também irão variar conforme o estado clínico/patológico do paciente, bem como se já houve exposição ao tratamento prévio para hepatite C (BRASIL, 2015).

2.10 IL-33/ST2

A interleucina 33 (IL-33), também conhecida como IL-1F11, foi originalmente identificada como DVS27, uma proteína nuclear em artérias cerebrais (ONDA et al., 1999), e mais tarde como fator nuclear de vênulas de endotélio (NF-HEV) (BAEKKEVOLD et al.,

2003). No entanto, em 2005, a análise por bases de dados computacionais para pesquisar proteínas com estrutura similar, revelou que esta proteína tinha estreita homologia com a IL-18, e com membros da família IL-1 (SCHMITZ et al., 2005). Atualmente, a IL-33 é o décimo primeiro membro caracterizado como pertencente à família de citocinas IL-1, que também inclui IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra (antagonista do receptor) e IL-18 (RIDER et al., 2013).

Essa citocina parece desempenhar duas funções, atuando tanto como uma citocina tradicional e como um fator nuclear. Contudo, sua função como fator nuclear não é totalmente compreendida. Alguns estudos sugerem que ela pode estar envolvida na repressão da transcrição da informação genética, regulando o crescimento e diferenciação celular (OBOKI et al., 2010; MILLER & LIEW, 2011; BERTHELOOT; LATZ, 2016). Outro estudo sugere que a IL-33 como fator nuclear pode ligar-se aos dímeros de histonas H2A-H2B na heterocromatina, regulando a expressão do gene, além de poder regular negativamente a expressão de sST2 (fração solúvel do ST2) através da ligação com histona que atua como repressor transcricional (MARTIN; MARTIN, 2016).

A IL-33 é amplamente expressa por diversos tipos celulares, como fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, nos locais de barreira, mas também está presente em células de origem hematopoiética, particularmente em macrófagos e células dendríticas (BERTHELOOT; LATZ, 2016). Estudos demonstram a expressão do seu mRNA em células dendríticas purificadas, células epiteliais, macrófagos ativados e em tecidos do estômago, pulmão, cérebro e pele (HSU et al., 2010; MILLER & LIEW, 2011).

Estudo aponta que a IL-33 não é sintetizada em condições fisiológicas, funcionando como um sinal de perigo endógeno, ou alarme, em resposta ao dano tecidual (SCHIERING et al., 2014). Na ausência de estímulos inflamatórios, a IL-33 localiza-se no núcleo, como pro-IL-33, não possuindo peptídeo sinal para secretar (HONG et al., 2011).

Seu receptor, ST2 (também chamado de T1, IL1RL1, DER4, e FIT-1), foi descrito pela primeira vez em 1989, sendo membro da família do receptor de IL-1 (TOMINAGA, 1989). O gene ST2 é conhecido por codificar pelo menos 3 isoformas de proteínas ST2 por *splicing* alternativo: ST2L, um receptor transmembranar; sST2 forma solúvel secretada; e ST2V, também transmembranar (REBL et al., 2017).

O ST2L, que é a forma mais abundante, está ligado à membrana de diversas tipos células, sendo expresso em mastócitos, células dendríticas, basófilos, eosinófilos, células linfóides inatas e células Th2 (QUEIROZ et al., 2017). É um receptor heterodimérico, na sua parte extra-celular, apresenta três domínios semelhantes à imunoglobulina (Ig) para a ligação, um domínio transmembranar e um domínio intracelular homólogo aos receptores do tipo Toll

e outras proteínas acessórias, receptores IL-1 ligada à membrana (IL-1RAcP). O IL-1RAcP é um membro do receptor, que é comum para algumas citocinas da família IL-1 (THEOHARIDES et al., 2015; REBL et al., 2017).

O ST2V também é transmembranar, mas, até o momento, não apresenta ligantes funcionais (REBL et al., 2017). O sST2 apresenta apenas os domínios extracelulares semelhantes às Ig do receptor, não possuindo o domínio transmembranar, e atua como bloqueador da sinalização da IL-33. É predominantemente expresso e secretado por fibroblastos e células epiteliais (TERRAULT et al., 2016), como também por neutrófilos, eosinófilos e basófilos ativados (OZTAS et al., 2015), sendo expresso tanto por células hematopoiéticas quanto por não hematopoiéticas (REBL et al., 2017).

2.10.1 Processamento e liberação da IL-33

No núcleo celular, a IL-33 é encontrada no tamanho 30 kDa, pró-IL-33, podendo ser hidrolisada por caspases para libertar a forma ativa de 18-kDa da IL-33 (TALABOT-AYER et al., 2009).

Em concentrações fisiológicas, a IL-33 é clivada por caspases associadas a apoptose (caspase-3 e -7), o que anula a sua atividade biológica. Isso ocorre porque durante a apoptose, a IL-33 é clivada de modo que seus domínios de ligação não são expostos, não tornando-a ativa e sem efeitos pró-inflamatórios (AFONINA et al., 2015; ZHAO & HU, 2010). No entanto, em situação de lesão tecidual e morte celular, após exposição a alérgenos ou infecção por vírus ou parasitas, a IL-33 é clivada por caspases inflamatórias (caspase-1, -4, -5), liberando extracelularmente sua forma ativa. Assim, a IL-33 pode representar um sinal endógeno de perigo quando liberada no contexto de dano celular (CAYROL; GIRARD, 2014; KWAK et al., 2016).

2.10.2 Sinalização IL-33/ST2

A transdução do sinal da IL-33 é dependente da ligação do receptor ST2L e proteína acessória, IL-1RAcP (LIEW, 2012).

Ao se ligar ao seu receptor celular, há um recrutamento da proteína de resposta primária de diferenciação mielóide – 88 (MyD88) para o domínio receptor de interleucina Toll de IL-1R3, que resulta no recrutamento da IL-1R-quinase associada-1 (IRAK1) e IRAK4 e TNF-fator associado-6 (TRAF6) ao complexo receptor na região citoplasmática do receptor. Posteriormente, ocorre a estimulação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) 1 e 2, proteína quinase ativadas por mitógeno (MAPK) p38, quinase c-Jun N-terminal (JNK) proteína ativadora 1 (AP -1), bem como a ativação de NF-kappaB (NF- κB). Livre, o NF-κB é capaz de se ligar ao DNA e atuar como um regulador da transcrição do gene. Como consequência, há a indução de mediadores inflamatórios, como IL-1β, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, TNF-α, IFN-γ, e IL-13 (ZHAO & CHEN, 2014; THEOHARIDES et al., 2015; BERTHELOOT; LATZ, 2016;).

Foi demonstrado que a IL-33 promove a ativação e migração de CD, que então apresentam o antígeno para células T CD4 *naive* e medeiam a sua diferenciação em células Th2 (HARALDSEN et al., 2009). Atua sobre células imunes inata e adaptativa e desempenha um papel central na mediação de condições inflamatórias. (MILLER, 2011; LIEW, 2012).

2.10.3 O papel do eixo IL-33/ST2

A ativação do eixo IL-33/ST2L está principalmente associada com a polarização de respostas Th2 específicas através da secreção de IL-5 e IL-13. O controle de uma infecção viral depende principalmente de uma resposta imunológica do tipo Th1. Uma vez que a IL-33 é descrita como uma citocina Th2, esta desempenha um papel patogênico durante várias infecções virais (ROSTAN et al., 2015).

As células alvo de IL-33 incluem células B, Th2, T CD8 +, macrófagos, células dendríticas, basófilos e células linfóides inatas, presente em diferentes tecidos como pulmão, intestino, fígado, baço e pele (ROSTAN et al., 2015). No entanto, tem sido demonstrado que esse eixo pode promover tanto a resposta Th1 e Th2, dependendo do tipo de célula ativado e do microambiente circundante. Estudos têm demonstrado que a IL-33 interage diretamente com as células NK, células NKT, e LTCD8+ para estimular a produção de IFN-γ (SMITHGALL et al., 2008; YANG et al., 2011).

Como citocinas da família da IL-1, desempenham papel importante em doenças inflamatórias, infecciosas e autoimunes. Estudo aborda o papel de IL-33 em modelos de doenças, com resultados por vezes contraditórias (CAYROL; GIRARD, 2014). Considera-se

que a IL-33 contribui para a patologia de doenças, especialmente as doenças inflamatórias, alérgicas e autoimunes (THEOHARIDES et al., 2015).

A IL-33 mostrou capacidade de aumentar a defesa à infecção das mucosas causada por parasitas intestinais, de protozoários como o *Toxoplasma gondii* e de bactérias, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Pseudomonas aeruginosa*, o que indica um papel de proteção na imunidade inata. Entretanto, há também um papel patogênico no desenvolvimento de doenças, como na leptospirose e infecção por vírus (OBOKI et al., 2010).

Altos níveis sST2 foram encontrados em efusões pleurais de pacientes com câncer de pulmão (OSHIKAWA et al., 2002), em doenças inflamatórias e doença cardíaca (MUELLER; JAFFE, 2015). O sST2 é considerado um novo biomarcador de insuficiência cardíaca, que integra inflamação, fibrose e estresse cardíaco. Além disso, tem sido demonstrado que em vários tipos de câncer e doenças inflamatórias, há concentrações significativamente aumentadas de sST2 (SAVIC-RADOJEVIC et al., 2016). Abdel e colaboradores (2015) consideram, que os níveis séricos mais elevados de sST2 em portadores de HCC seja um biomarcador precoce de dano hepático. Também foi demonstrado um aumento dos níveis de sST2 em doentes com insuficiência hepática aguda em comparação com doentes com insuficiência hepática crônica e com controles saudáveis (MEHRAJ; PONTE; ROUTY, 2016).

Além da sua participação na indução da montagem de uma resposta imune Th2, existem evidências de um possível papel do eixo IL-33/ST2 na cicatrização de feridas e modulação da fibrose. A fibrose geralmente representa o final do processo de reparação de lesão tecidual durante uma fase crônica e/ou recorrente de uma doença, em que a infiltração de células inflamatórias e a ativação de fibroblastos residentes persiste, embora a capacidade reparadora de células mesenquimais é diminuída (MILLER, 2011). A insuficiência cardíaca e fibrose cardíaca também têm sido associadas com a produção de IL-33 a partir de fibroblastos cardíacos (ZHU & CARVER, 2012), enquanto o ST2 e o TGF- β estão aumentados em modelo de fibrose pulmonar induzido por antineoplásicos (CHERRY et al., 2008).

Existem evidências do papel do IL-33/ST2 na promoção de cicatrização de feridas e reparação da mucosa. Quando desregulada, pode desempenhar um papel fundamental na progressão da inflamação crônica e fibrose (PASTORELLI et al., 2013).

As células endoteliais do fígado expressam constitutivamente IL-33, sendo que a IL-33 é sobre-expressa em hepatócitos durante a morte celular hepática mediada por NKT e hepatite viral. A IL-33 também é produzida pelas células estreladas hepáticas na fibrose hepática (NOEL et al., 2016). Além disso, em hepatite induzida por adenovírus em camundongos, houve um aumento da expressão hepática de IL-33 e ST2, associada à lesão hepática, com aumento de

células Tregs e com diminuição de macrófagos, DC e NK no infiltrado tecidual (MEHRAJ; PONTE; ROUTHY, 2016).

A expressão da IL-33 e o seu receptor/coreceptor, ST2/IL-1RAcP, tem sido associado tanto a fibrose hepática de murino quanto de humano, com uma correlação direta entre os níveis de IL-33 e ST2 e a gravidade da fibrose (MARVIE et al., 2010). Em um fígado normal, a principal fonte de IL-33 são as células endoteliais sinusoidais do fígado, mas em um fígado fibrótico, são as células estreladas hepáticas ativadas (CEH) (GAO et al., 2015). Evidências sugerem que em pacientes cirróticos, os níveis de IL-33 e ST2 estão elevados, sendo a expressão da IL-33 regulada positivamente em fibrose do fígado de rato induzida pela infecção de *Schistosoma mansoni* (MCHEDLIDZE et al., 2014). A IL-33 é liberada por hepatócitos danificados, que estimula a produção de IL-13 por células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) residentes no fígado. A IL-13 aumenta a sinalização do TGF- β através de IL-4Ra e STAT6 em CEHs, promovendo a síntese de fibrose no fígado (WEISKIRCHEN; TACKE, 2016).

Assim, a IL-33 parece ser uma citocina crucial para a defesa do hospedeiro mediada por Th2, sendo capaz de ativar células do sistema imune inato e adaptativo. A depender da doença e do contexto imunológico pode promover a resolução da inflamação ou conduzir patologia da doença. Considerando o papel ainda controverso da IL-33 e seu receptor, a manipulação da via IL-33 / ST2 pode representar uma nova estratégia terapêutica para o tratamento ou prevenção de fibrose.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

H1= Em portadores de hepatite crônica pelos vírus hepatotrópicos (VHB ou VHC) existe uma produção desequilibrada de IL-33 e sST2, estando associado com efeito patogênico;

H0 = Não existe associação desfavorável entre a produção de IL-33e sST2 e as hepatites crônicas pelos vírus hepatotrópicos (VHB ou VHC);

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento da Interleucina-33 e seu receptor sST2 nas hepatites crônicas pelos vírus hepatotrópicos B e C.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar quantitativamente a produção de IL-33 e sST2 em indivíduos portadores de hepatites crônicas pelos vírus hepatotrópicos VHB e VHC e em indivíduos controles sadios;
- Avaliar a relação IL-33 e sST2 dos indivíduos com as respectivas características clínicas de cada hepatite viral e fatores de autoimunidade;

4. CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: O Papel da IL-33 e do Receptor sST2 na Hepatite C Crônica

Mônica Cardozo Rebouças^a, Andreas Stocker^b, Maria Isabel Schinoni^b, Milena Santana Cabral^a, Isabela Silva de Oliveira^c, Ajax Mercês Atta^c, Maria Luiza Brito de Sousa-Atta^{c*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Brasil

^bLaboratório de Pesquisa em Infectologia, Serviço de Gastro-hepatologia, Universidade Federal da Bahia Brasil

^cLaboratório de Pesquisa em Imunologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Brasil

*Autor correspondente: Dra. Maria Luiza B. Sousa Atta. E-mail: mluiza@ufba.br

A interleucina-33 (IL-33) é importante para a resposta imune mediada por células Th2. Evidências sugerem forte associação do eixo IL-33/ST2 com o desenvolvimento de fibrose hepática. Nosso objetivo foi investigar a IL-33 e sST2 em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C (VHC), correlacionando-os com histologia do fígado, carga viral (CV), aminotransferases e manifestações de autoimunidade. Participaram do estudo 20 indivíduos com hepatite C crônica (HCC) e 20 indivíduos saudáveis. Os níveis de IL-33 e sST2 foram determinados por ELISA em amostras de soro e sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP), estimuladas com peptídeos do VHC. Expressão de mRNA da IL-33 e sST2 do sangue periférico foi realizada por RT-PCR. Dados de histopatologia hepática, genotipagem e CV foram obtidos de registros médicos. Foram determinadas as aminotransferases e marcadores de autoimunidade. A maioria dos pacientes estava infectada pelo genótipo 1 do VHC, apresentavam ausência ou baixo grau de fibrose e atividade necroinflamatória, elevada CV, elevação moderada de aminotransferases e baixa expressão de marcadores de autoimunidade. Foram detectados níveis séricos mais elevados de IL-33 nos pacientes com HCC do que os encontrados em controles sadios; e níveis séricos similares do sST2 entre os pacientes e controles. Não houve correlação entre os níveis séricos do receptor e a IL-33. Níveis séricos e expressão gênica da IL-33 foram associados com presença de fibrose e atividade necroinflamatória em estágios mais avançados; enquanto níveis séricos do sST2 estavam mais baixos nos pacientes que apresentavam CV mais elevada. Houve correlação positiva entre mRNA da IL-33 com as aminotransferases. Diferente do observado no soro, não houve produção significativa da IL-33 após estimulação das CMSP com peptídeos do VHC; porém, tanto os pacientes quanto os indivíduos sadios produziram altos níveis do sST2 *ex vivo*, sendo bem mais elevados na HCC. Não houve associação entre a IL-33 e sST2 com os marcadores de autoimunidade analisados. Nossos resultados sugerem que o eixo IL-33/sST2 pode ser um fator patogênico na hepatite C crônica e não parecem contribuir para as manifestações de autoimunidade na hepatite C.

Palavras-chave: IL-33; ST2; hepatite C crônica; fibrose hepática; autoimunidade

4.1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) ainda se constitui um grave problema de saúde mundial. Existem cerca de 150 milhões de pessoas cronicamente infectadas pelo VHC, correspondendo a 2 - 2,5% da população total do mundo (MAUSS et al., 2016). As complicações da hepatite C crônica (HCC) é a principal causa dos óbitos atribuídos às hepatites

virais no Brasil (WHO, 2014). Estudos anteriores revelam que a persistência da infecção viral e a inflamação crônica dependem da interação entre o vírus, o hepatócito e o sistema imune do hospedeiro. Após a infecção, o sistema imunológico inato é ativado, seguido pelo sistema imune adaptativo. Alterações nessas respostas ou transições inadequadas podem levar à falha da depuração viral e cronificação da doença (YOSHIO; KANTO, 2016).

A IL-33 é uma citocina da família da IL-1, e está associada a produção de citocinas pró-inflamatórias e também citocinas do perfil Th2. Produzida principalmente por tecidos epiteliais e células endoteliais vasculares, acredita-se que a IL-33 serve como um alarmina liberada por células em condições de estresse (DE LA FUENTE; MACDONALD; HERMOSO, 2015). Como alarmina, atua sobre células das respostas imunes inata e adaptativa, para detectar danos e alertar células e tecidos vizinhos após infecção ou trauma e, portanto, tem o potencial de influenciar em doenças inflamatórias, infecciosas e autoimunes (BEHFARJAM et al., 2017; DE LA FUENTE; MACDONALD; HERMOSO, 2015; THEOHARIDES et al., 2015).

O receptor específico da IL-33, ST2 (suppression of tumorigenicity 2), é uma glicoproteína da família do receptor da IL-1, apresentando-se sob três isoformas diferentes de proteínas codificadas pelo gene ST2: a forma ligada a membrana (ST2L); a forma solúvel secretada (sST2); e uma variante da proteína ancorada à membrana (ST2V). A transdução do sinal da IL-33 é dependente da ligação do receptor ST2L e proteína acessória, IL-1RAcP, e pode ser bloqueada pela ligação do sST2 (REBL et al., 2017). Altos níveis de sST2 foram encontrados nas efusões pleurais de pacientes com doenças inflamatórias e doença cardíaca, sendo considerado um marcador de prognóstico para essas condições (MUELLER; JAFFE, 2015).

A ligação IL-33/ST2 tem sido associado com uma variedade de estados de doenças, incluindo doenças autoimunes e, em particular, a processos inflamatórios (MATSUYAMA et al., 2010; MOK et al., 2010; THEOHARIDES et al., 2015). Além disso, também pode desempenhar um importante papel na progressão da inflamação crônica e fibrose (PASTORELLI et al., 2013). No entanto, pouco se sabe sobre a relação da IL-33 no processo patogênico da infecção pelo VHC, incluindo características clínicas e marcadores de autoimunidade. No presente estudo, nós investigamos a produção de IL-33/sST2 em pacientes cronicamente infectados pelo VHC e correlacionando-os com histologia do fígado, carga viral (CV), aminotransferases e manifestações de autoimunidade.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Pacientes e Controles

Foram incluídos um total de 40 indivíduos. Desses, 20 pacientes com hepatite C crônica, de ambos os sexos, previamente diagnosticados clinicamente e sorologicamente para hepatite C (ELISA de 3ª geração e demonstração de RNA viral no sangue), sem tratamento antiviral prévio, foram selecionados no Ambulatório de Hepatites do Complexo Hospitalar Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia (C-HUPES/UFBA). Os dados de genotipagem, carga viral e histopatologia hepática ou Fibroscan® foram coletados dos respectivos prontuários clínicos. Os outros 20 indivíduos, aparentemente saudáveis, pareados por gênero e idade mais próxima dos grupos alvos, foram convidados a participar do estudo, no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFBA.

Os critérios de não-inclusão adotados para os participantes foram: coinfeções virais por HIV, HTLV e coinfeção pelos vírus B/C ou presença de outras enfermidades crônicas autoimunes e/ou inflamatórias. Os controles saudáveis foram testados para infecções e doenças autoimunes e/ou inflamatórias.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Enfermagem da UFBA, número 741.170. Todos os participantes receberam esclarecimentos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2.2 Determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos

O hemograma dos pacientes foi avaliado imediatamente após a coleta das amostras, em analisador automático (Cell-Dyn Ruby). As amostras de soro foram obtidas por centrifugação do sangue periférico, e alíquotas foram imediatamente congeladas e armazenadas a -80°C até posterior análise. A metodologia Cinética-UV foi utilizada para determinação das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), utilizando conjunto comercial em analisador automático (LabMax 560, Labtest, Brasil). Os valores de referência (VR) usados foram: ≤ 41 U/L para ALT e ≤ 42 U/L para AST.

4.2.3 Determinação de marcadores de autoimunidade: Crioglobulinas e Autoanticorpos Não-Órgão-Específicos (NOSA)

Crioglobulinemia sérica foi pesquisada por precipitação a 4°C em tubos Wintrobe, por até sete dias (VERMEERSCH et al., 2008). O fator reumatoide (FR) sérico (VR <20 UI/mL)

foi determinado por nefelometria (Image, Beckman-Coulter, USA). Os anticorpos séricos antinuclear (ANA) e antimúsculo liso (AML) foram pesquisados por imunofluorescência indireta, utilizando como ponto de corte a diluição de 1/40, para ambos autoanticorpos. Para o ANA foi utilizado células Hep-2000 como substrato antigênico (Immuno Concepts, USA) e para AML, foi utilizado cortes teciduais de fígado/rim/estômago de rato (Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH, Alemanha).

4.2.4 Preparação das células e cultivo celular

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas a partir das amostras de sangue coletadas a vácuo em tubos heparinizados, utilizando o método de separação por gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Ficoll-Paque™ Premium, GE Healthcare, Suécia), segundo protocolo de Fuss e colaboradores (FUSS et al., 2009). Os *pellets* de CMSP foram lavados e suspensos com 1mL de salina. As células viáveis foram então contadas em câmara de Neubauer, utilizando o reagente Azul de Tripán 0,4% na proporção de 1:2 (STROBER, 2015). As células foram ajustadas para a concentração de $1,0 \times 10^6$ no meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 25mM de HEPES pH 7,2 antibiótico (Cultilab, Brasil) e solução de gentamicina 10mg/mL (SIGMA-ALDRICH), e distribuídas em placas de 96 poços, sendo 100µL por poço (KASVI, China).

As CMSP dos pacientes com HCC e dos controles foram então estimuladas com 10µL de soluções de peptídeos recombinantes do vírus da hepatite C, core, NS3, NS4 e NS5 (10µg/mL, ABCAM, UK). Fitohemaglutinina (PHA, 5µg/mL, SIGMA-ALDRICH) foi usada como controle positivo e as células sem estimulação foram usadas como controle negativo. As culturas foram incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C (Panasonic, USA) por cinco dias. Após esse período, a placa foi centrifugada à 403,5xg durante 10 minutos, e os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -80°C, até o momento das análises.

4.2.5 Dosagem de IL-33 e sST2

Os níveis séricos e de sobrenadante de cultura de CMSP de IL-33 e sST2 foram avaliados quantitativamente por ensaio imunoenzimático (ELISA de captura), com conjuntos comercialmente disponíveis (IL-33: eBioscience, Áustria; sST2: ABCAM, Reino Unido), seguindo as instruções dos fabricantes. Os limites inferiores de detecção para IL-33 e sST2 foram de 0,2 e 2,0 pg/ml, respectivamente.

4.2.6 Extração do mRNA e PCR em Tempo Real

Amostras de sangue periférico (2,5 mL de cada paciente) foram coletadas diretamente em tubos PAXgene™ (Qiagen, Suíça), segundo as instruções do fabricante e armazenados a -80°C para análises posteriores. O RNA celular total foi extraído das amostras utilizando PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen, Suíça), de acordo com o protocolo do fabricante.

O mRNA da IL-33 e sST2 foi detectado pela técnica de One Step-RT-q-PCR com (*Real-time polymerase chain reaction*), utilizados pares de Primers específicos, *Foward* (F) e *Reverse* (R), e sondas marcadas com o fluoróforo FAM®. A reação foi realizada com o kit comercial *SuperScript™III One-step RT-PCR with Platinum Taq™* (Invitrogen, USA), seguindo orientações do fabricante. Os *primers* foram editados manualmente pelo BIOEDIT (v 7.2.5, Ibis Biosciences), junção-éxon-éxon, usando o banco de dados NCBI (Centro Nacional de Informação Biotecnológica), para determinação das conexões exons e introns. Para a IL-33 foram, F: 5'-CAAGCTGGGAAAATCCCAACAG-3'; R: 5'-TTGTGCTTTCTACCTGTTTTTCAGTG-3'; sonda: 5'-Fam-CCCATGTACTTTATGAAGCTCCGCTCTGGCC-BHQ1-3' e, para o sST2 foram, F: 5'-CCTTCACGGTCAAGGATGAGC-3'; R: 5'-GGTTTGCGTTTTTTTCCAATTTCCAC-3'; sonda: 5'-Fam-CTCTGTTTCCAGTAATCGGAGCCCCTGCAC-BHQ1-3'.

O volume de cada reação padrão foi de 25 uL, incluindo: *ReactionMix* (dNTPs - 0,4mM, MgSO4 - 3,2mM, Buffer - 2x), H₂O livre de RNase, MgCl₂ a 2 mM, BSA a 0,04 mg/mL, 0,30 µM de cada *primer* (R e F), 0,20 µM da sonda, *mix* de enzimas, *SuperScript III/ Platinum Taq Mix* (25x) e amostra de RNA para análise. Os passos iniciais do RT-PCR foram de 15 min a 55°C, seguido de 2 minutos a 94°C, ciclos (n = 45) de 20 segundos a 94°C, seguido por 35 segundos a 59°C. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Sequence Detection Software (SDS) v1.3.1 (Applied Biosystems).

4.2.7 Análise dos dados da PCR em Tempo Real

O coeficiente angular da reta padrão foi determinado usando análise da série de diluição, para IL-33 e sST2, em logaritmo na base 10 e a regressão linear (IBM SPSS 23.0), o que permite a comparação relativa dos valores. A eficiência da PCR (E) foi obtida a partir da equação $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$, sendo o *slope* = $10^{(a*2)}$ e o a = coeficiente angular da reta de amplificação (a: IL-33 = -0,271; sST2 = -0,274). O coeficiente de correlação (r^2) foi de 1,000 para IL-33 e sST2, e a eficiência foi de 93,7% para IL-33 e 91,8% para sST2.

A normalização foi feita pela padronização do volume da amostra utilizada e quantificação dos componentes celulares (leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos típicos, monócitos).

4.2.8 Análises Estatísticas

O software Prism 7.0 de GraphPad (EUA) foi utilizado para as análises estatísticas. Os resultados foram expressos de acordo com a sua distribuição no teste D'Agostino-Pearson. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas de dois grupos, com outliers removidos usando o teste de Outlier da Grubbs. O teste de Spearman para as análises de correlação. O teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn, foi usado para comparar três ou mais grupos. As associações entre grupos categóricos foram analisadas utilizando o teste exato de Fisher. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização dos pacientes e controles

Os 20 pacientes com HCC avaliados, 11 eram mulheres e 9 homens, com média de idade de $56,6 \pm 11,4$ anos (variação 36 - 84 anos). A partir dos dados obtidos de genotipagem viral, 80% (16/20) dos pacientes apresentavam infecção com vírus do genótipo tipo 1, enquanto 20% (4/20) eram infectados pelo vírus com genótipo tipo 3. Dados de fibrose hepática, segundo a classificação METAVIR (BEDOSSA; POYNARD, 1996), foram obtidos para 18/20 pacientes avaliados, sendo que 4/18 (22%) dos pacientes não tinham fibrose, 8/18 (44%) tinham estágio F1, 5/18 (28%) tinham estágio F2 e apenas 1/18 (6%) dos pacientes tinha fibrose de estágio mais avançado (F3). Sobre os dados de atividade necroinflamatória, ainda de acordo com a classificação METAVIR (A) da histopatologia hepática, foram encontrados resultados de apenas 10 pacientes: 40% (4/10) não tinham essa alteração, sendo classificados como A0, 30% (3/10) tinham estágio de A1, e 30% (3/10) como estágio A2. Em relação aos dados de RNA viral (carga viral), 55% (11/20) dos pacientes apresentaram carga viral alta, acima de 800.000 UI/mL.

Entre os 20 indivíduos saudáveis, 9 eram mulheres e 11 homens, com média de idade de $49 \pm 6,5$ anos, variação entre 35 – 61 anos (Tabela 1).

Tabela 1 Características clínico-demográfica e da infecção dos pacientes com hepatite C crônica (HCC) e de controles saudáveis (CS).

Características	CS N (%)	HCC N (%)	P ^a
Sexo			0,527
Homem	11/20 (55%)	9/20 (45%)	
Mulher	9/20 (45%)	11/20 (55%)	
Idade (anos), média ± DP	49 ± 6,5	56,6 ± 11,5	0,007
Homem	50 ± 6,6	58,4 ± 5,1	
Mulher	47,8 ± 6,6	55 ± 14,9	
Genótipo			0,011
1	-	16 (80%)	
3	-	4 (20%)	
Histopatologia			
F0 - F2	-	17 (85%)	
F0	-	4 (20%)	
F1	-	8 (40%)	
F2	-	5 (25%)	
F3 - F4	-	1 (5%)	
F3	-	1 (5%)	
F4	-	0	
Não avaliado	-	2 (10%)	
A0	-	5 (25%)	
A1	-	2 (10%)	
A2	-	3 (15%)	
A3	-	0	
Não avaliado	-	10 (50%)	
Carga Viral (mediana, IQR)		960000 (165000-2300000)	0,823
Baixa (<800.00 UI/mL)	-	9 (45%)	
Alta (≥800.00 UI/mL)	-	11 (55%)	
ALT			<0,0001
<41 U/L	20 (100%)	13 (65%)	
>41 U/L	-	7 (35%)	
Median (IQR)	21,6 (16,5-27,7)	48,5 (34,8-89,5)	
AST			0,002
<42 U/L	20 (100%)	9 (45%)	
>42 U/L	-	11 (55%)	
Median (IQR)	24,2 (21,3-26,8)	39,5 (27-59,8)	
Fator Reumatóide			0,035
<20 U/L	20 (100%)	16 (80%)	
>20 U/L	-	4 (20%)	
ANA	1 (5%)	3 (15%)	0,071
AML	nd	6 (30%)	0,02
Crioglobulinemia	nd	4/16 (25%)	0,03

^aTeste Qui-Quadrado, p<0,05.

CS: controle sadio; HCC: hepatite C crônica; F0: sem fibrose; F1: fibrose portal sem septo; F2: fibrose portal com raros septos; F3: fibrose avançada; F4: fibrose severa ou cirrose; A0: sem atividade; A1: atividade leve; A2: atividade moderada; A3: atividade intensa; U/L: unidades por litro; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; ANA: Anticorpos antinucleares; AML: Anticorpos antimúsculo liso; nd: não detectado.

4.3.2 Caracterização laboratorial dos pacientes e controles

Nos pacientes com HCC, as enzimas ALT e AST estavam aumentadas em 13/20 (65%, mediana 48,5 U/L; IQR= 34,8 – 89,3; variação 21 – 313) e 9/20 (45%, mediana 39,5 U/L; IQR= 27 – 59,8; variação 7 - 165) dos indivíduos, respectivamente. A presença dos marcadores de autoimunidade, ANA e AML, foi observada em 15% (3/20) e 30% (6/20) dos pacientes, respectivamente. A presença de crioglobulinemia foi encontrada em 25% (4/16) dos pacientes, enquanto o fator reumatoide foi detectado em 20% (4/20) deles.

A maioria dos controles sadios tinham níveis normais para a enzima ALT (mediana 21,5 U/L; IQR= 16,5 – 25,8; variação 5 – 46) e níveis normais de AST (mediana 24 U/L; IQR= 21,3 – 26,8; variação 12 – 38). Não foram encontrados anticorpos antimúsculo liso, crioglobulinemia e fator reumatoide neste grupo. A presença de ANA foi detectada em 5% (1/20) desses indivíduos.

Foram encontradas diferenças entre os portadores de HCC e controles sadios para os seguintes parâmetros: ALT ($p < 0,0001$), AST ($p = 0,002$), AML ($p = 0,02$) e crioglobulinemia ($p = 0,03$).

4.3.3 Determinação sérica da IL-33 e do receptor sST2

Níveis séricos de IL-33 foram encontrados em 17/20 (85%) dos pacientes com hepatite C crônica (HCC: mediana= 0,471 pg/mL, IQR= 0,338 – 1,676) e em apenas 1/20 (5%) dos controles sadios (Figura 1a). Houve uma maior produção sérica de IL-33 em portadores de HCC ($p < 0,0001$, teste de Mann-Whitney). Por outro lado, níveis séricos do receptor sST2 foram encontrados em 100% dos pacientes com HCC avaliados (HCC: mediana= 107,8 pg/mL, IQR= 45,9 – 232,1) e em 19/20 (95%) dos controles sadios (CS: mediana= 55,8 pg/mL, IQR= 40,5 – 89,6). Não foram observadas diferenças nas concentrações séricas do receptor sST2 entre os pacientes com HCC e controles sadios ($p = 0,084$, teste de Mann-Whitney) (Figura 1b), nem houve correlação entre os níveis séricos da IL-33 e do receptor sST2 ($p = 0,362$; teste de Spearman). A relação IL-33/sST2 sérica foi maior nos portadores de HCC ($p < 0,0001$, Teste de Mann-Whitney (Figura 2).

Os níveis séricos de IL-33 não foram correlacionados com os níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST nos pacientes com HCC (teste de Spearman, $p = 0,214$ e $p = 0,141$, respectivamente), nem houveram diferenças em relação a essas enzimas quando os níveis de IL-33 foram separados para ALT < 41 e > 41 UI/mL e AST < 42 e > 42 UI/mL (teste de Mann-Whitney, $p = 0,48$ e $p = 0,44$, respectivamente). Em relação à carga viral, não foram encontradas

diferenças nos níveis séricos de IL-33 nos indivíduos que tinham carga viral alta (≥ 800.00 UI/mL) ou baixa (< 800.00 UI/mL), (teste de Mann-Whitney, $p=0,77$). No entanto, os níveis séricos de IL-33 foram significativamente mais elevados nos pacientes de HCC que tinham estágios de fibrose hepática mais avançados ($p= 0,027$), e também, naqueles pacientes que apresentaram atividade necroinflamatória (A1-A2) em relação aos que não apresentaram essa alteração histológica ($p=0,049$; Figura 3).

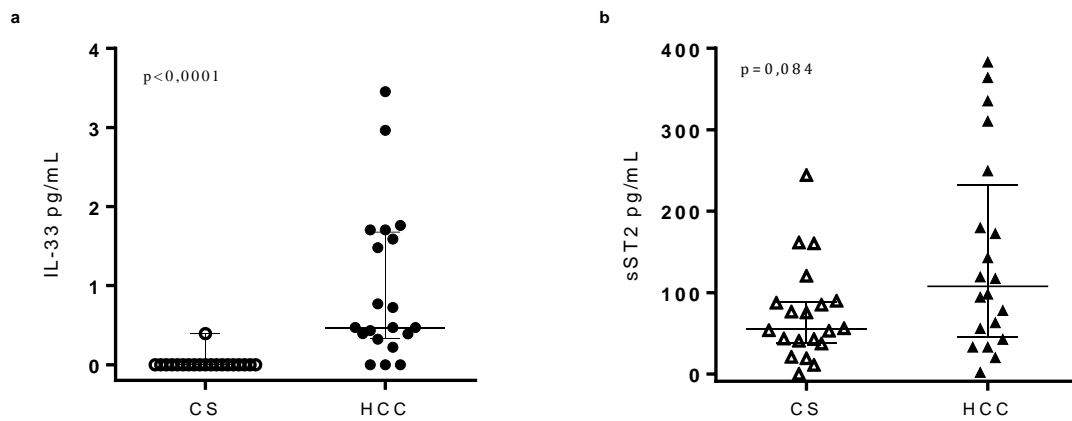


Figura 1 Níveis séricos de IL-33 (a) e sST2 (b) em indivíduos controles sadios (CS) e pacientes com hepatite C crônica (HCC). As barras representam a mediana e intervalo interquartil. Teste de Mann-Whitney (b).

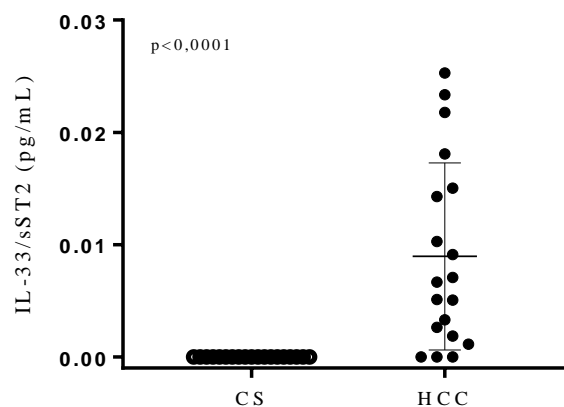


Figura 2 Relação IL-33/sST2 sérica em portadores de hepatite C crônica (HCC) e controles sadios (CS). Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Em relação aos marcadores de autoimunidade, não foram encontradas diferenças entre os níveis séricos de IL-33 e positividade para FR, ANA, AML e crioglobulinemia ($p>0,05$; teste exato de Fisher).

De modo similar à IL-33, os níveis séricos do receptor sST2 não foram associados com as enzimas hepáticas ALT e AST (Teste de Mann-Whitney, $p=0,115$ e $p=0,401$, respectivamente), nem foram associados com níveis mais elevados das mesmas (Teste de Mann-Whitney, $p=0,191$ e $p=0,494$, respectivamente). No entanto, os níveis séricos do receptor sST2 foram significativamente mais baixos nos pacientes que apresentavam carga viral alta e ausência de atividade necroinflamatória (Teste de Mann-Whitney, $p=0,019$ e $p=0,0009$, respectivamente). Além disso, os níveis séricos do sST2 não foram associados com os parâmetros histológicos de fibrose (Figura 3). Adicionalmente, os níveis séricos do receptor sST2 também não foram associados com os marcadores de autoimunidade analisados.

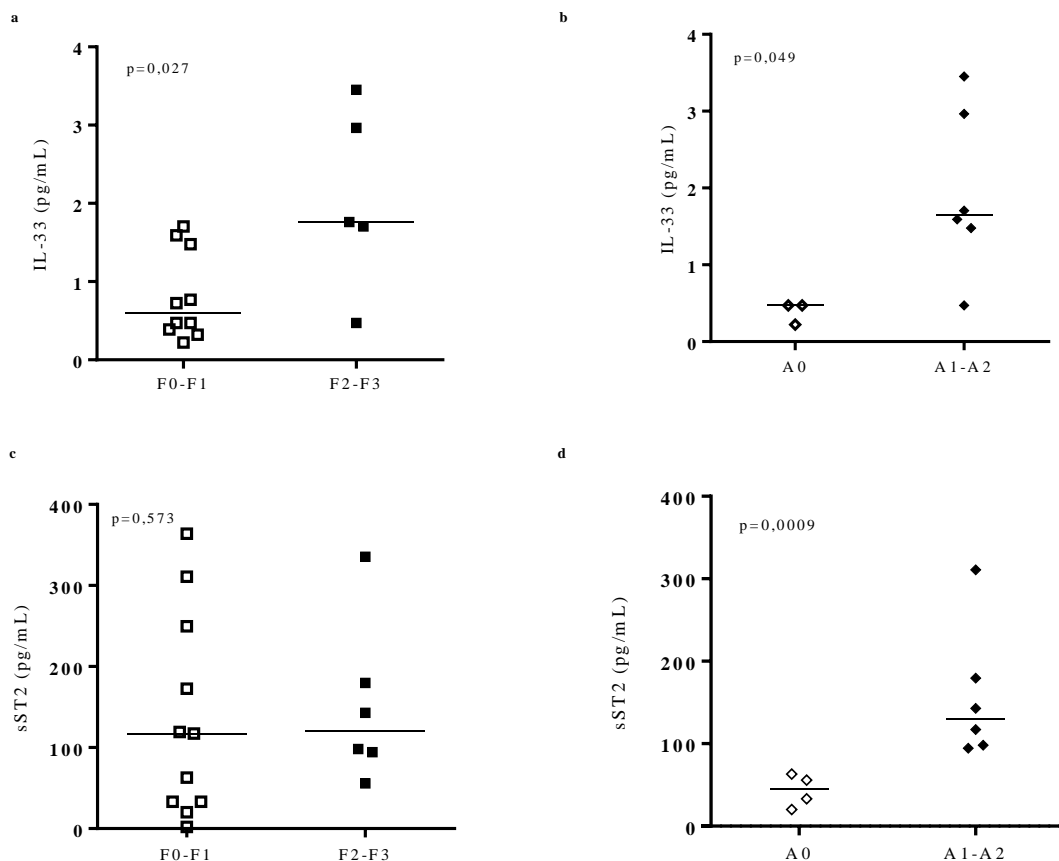


Figura 3 Níveis séricos de IL-33 (a, b) e sST2 (c, d) em pacientes com hepatite C crônica, distribuídos de acordo com diferentes estágios de fibrose e com ausência ou presença de atividade necroinflamatória. As barras representam as medianas; Teste de Mann-Whitney. F0: fígado sem fibrose; F1: fibrose leve; F2: fibrose moderada; F3: fibrose avançada; A0: sem atividade necroinflamatória; A1: atividade leve; A2: atividade moderada.

4.3.4 Determinação de IL-33 e do receptor sST2 *ex vivo* induzida por antígenos do HCV

IL-33 foi pouco detectada em CMSP estimuladas (ou não) com peptídeos recombinantes do VHC (Core, NS3, NS4 e NS5), tanto para os pacientes com HCC como para os controles saudáveis (Tabela 2). Também, não foi encontrada diferenças entre os níveis de IL-33 produzidos pelos pacientes com HCC em relação aos indivíduos sadios.

Tabela 2. Níveis de IL-33 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios (CS) e de pacientes com hepatite C crônica (HCC), estimuladas *ex vivo* com peptídeos do HCV.

Estímulos	CS (n=20)	HCC (n=20)	Significância (P)*
S/E	0 (IQR= 0 – 0; variação 0 – 0,8)	0 (IQR= 0 – 0,4; variação 0 – 1,8)	P>0,05
PHA	0 (IQR= 0 – 0,3; variação 0 – 5,7)	0 (IQR= 0 – 0,6; variação 0 – 5,4)	P>0,05
Core	0 (IQR= 0 – 0,3; variação 0 – 1,3)	0 (IQR= 0 – 0,3; variação 0 – 5,7)	P>0,05
NS3	0 (IQR= 0 – 0; variação 0 – 1,8)	0 (IQR= 0 – 0,4; variação 0 – 4,6)	P>0,05
NS4	0 (IQR= 0 – 0; variação 0 – 1,5)	0 (IQR= 0 – 0,6; variação 0 – 4,3)	P>0,05
NS5	0 (IQR= 0 – 0,2; variação 0 – 2,3)	0 (IQR= 0 – 0,4; variação 0 – 1,8)	P>0,05

*Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. S/E: sem estimulação; PHA: fitohemaglutinina. Core: peptídeo recombinante da proteína do core do vírus da hepatite C; NS3, NS4 e NS5: peptídeos recombinantes não estruturantes -3, -4 e -5 do vírus da hepatite C, respectivamente.

O receptor sST2 foi detectado em todos os sobrenadantes de CMSP dos pacientes com HCC avaliados e na maioria dos controles sadios, sendo que esses níveis foram significativamente mais elevados para os pacientes em relação aos controles (Tabela 3). O receptor sST2 produzido *ex vivo* apresentou correlação positiva com os níveis séricos de aminotransferases elevadas, apenas com estimulação das CMSP com o peptídeo NS5: ALT>41 UI/mL, p=0,01, r=0,685 e AST>42 UI/mL, p=0,037, r=0,717. Contudo, não houve associação da produção deste receptor com fibrose e carga viral.

Tabela 3. Níveis de sST2 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios (CS) e de pacientes com hepatite C crônica (HCC), estimuladas ex vivo com peptídeos do HCV.

Estímulos	CS (n=20)	HCC (n=20)	Significância (P)*
S/E	49,1 (IQR= 1,9 – 120; variação 0 – 271)	159 (IQR= 139 – 183; variação 93 – 232)	P<0,0001
PHA	79,9 (IQR= 11,4 – 131; variação 0 – 267)	180 (IQR= 153 – 233; variação 135 – 446)	P<0,0001
Core	28,9 (IQR= 4,5 – 72,6; variação 0 – 253)	160 (IQR= 139 – 167; variação 108 – 212)	P<0,0001
NS3	16 (IQR= 0 – 63; variação 0 – 279)	164 (IQR= 135 – 207; variação 93 – 245)	P<0,0001
NS4	5,5 (IQR= 0 – 70; variação 0 – 234)	159 (IQR= 134 – 185; variação 84 – 232)	P<0,0001
NS5	22,9 (IQR= 0 – 70,3; variação 0 – 285)	153 (IQR= 134 – 181; variação 97 – 295)	P<0,0001

*Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. S/E: sem estimulação; PHA: fitohemaglutinina. Core: peptídeo recombinante da proteína do core do vírus da hepatite C; NS3, NS4 e NS5: peptídeos recombinantes não estruturantes -3, -4 e -5 do vírus da hepatite C, respectivamente.

4.4.4 Expressão da IL-33 e receptor sST2

As análises das expressões de IL-33 entre os pacientes com HCC (mediana= 0,77 cópias/ μ L, IQR= 0,28 - 1,92) e os indivíduos sadios (mediana= 0,49 cópias/ μ L, IQR= 0,09 - 0,68), não indicaram diferenças na expressão (Teste de Mann-Whitney, $p=0,429$). Semelhante resultado foi encontrado para a expressão de sST2 entre os pacientes com HCC e os controles (mediana= 13.661 cópias/ μ L, IQR= 2.778 - 18.351 e mediana= 18.144 cópias/ μ L, IQR= 4.450 - 29.660, respectivamente; Teste de Mann-Whitney, $p=0,218$). Também, não houve correlação entre as expressões gênicas de mRNA entre IL-33 e o sST2, entre ambos grupos de participantes do estudo (Teste de Spearman, $r =0,291$, $p= 0,29$).

No entanto, a expressão gênica da IL-33 foi mais elevada nos indivíduos com HCC que tinham níveis de ALT >41 U/L e AST >42 U/L, em comparação com os portadores com níveis normais (mRNA IL-33: ALT<42: mediana= 0,06, IQR= 0 – 0,28; ALT>42: mediana= 0,91, IQR= 0,14 – 2,245; AST<41: mediana= 0,06 IQR= 0 – 0,28; AST>41: mediana= 0,91, IQR= 0,14 – 2,245; Teste de Mann-Whitney, $p=0,007$, para ambas as enzimas), (Figura 4a). Adicionalmente, houve correlação positiva entre mRNA da IL-33 com essas enzimas: ALT, $p= 0,017$, $r = 0,55$ e AST, $p= 0,019$, $r = 0,52$ (teste de Spearman). Não foram encontradas diferenças nas expressões de sST2 em indivíduos que apresentavam tanto ALT >41 U/L quanto AST >42

U/L (Teste de Mann-Whitney, $p=0,629$, para ambas as enzimas). Não houve diferença entre a relação IL-33/sST2 na expressão gênica entre os portadores de HCC e controles ($p=0,09$, Teste de Mann-Whitney).

A análise da carga viral mostrou uma maior expressão da IL-33 em pacientes com carga viral alta (mRNA IL-33: CV<800.000: mediana= 0,18, IQR= 0 – 0,48; CV>800.000: mediana= 1,65, IQR= 0,25 – 2,72; Teste de Mann-Whitney, $p=0,035$), (Figura 4b). No entanto, não foram encontradas associações entre carga viral e expressão do sST2 (Teste de Mann-Whitney, $p=0,423$).

Em relação à fibrose, foi encontrado maior expressão de IL-33 na presença de fibrose (F1/F2/F3; mRNA IL-33: F0: mediana= 0, IQR= 0 – 0,135; F1-F3: mediana= 0,635, IQR= 0,212 – 2,083; Teste de Mann-Whitney, $p=0,017$) (Figura 4c), mas não houve associação para a IL-33 e presença/ausência de atividade necroinflamatória. De forma contrária, foi encontrado uma maior expressão do sST2 na presença da atividade necroinflamatória (mRNA sST2: A0: mediana= 2.901, IQR= 1.824 – 8.510; A1-A2: mediana= 20.717, IQR= 8.889 – 24.357; Teste de Mann-Whitney, $p=0,038$) (Figura 4d), mas não foi encontrada associação com a expressão do sST2 e presença/ausência de fibrose (Teste de Mann-Whitney, $p=0,894$).

Em relação aos marcadores de autoimunidade na HCC, foi encontrada associação da expressão gênica da IL-33 somente para a ausência de ANA (Teste Exato de Fisher, $p=0,001$). Quando comparados a expressão do sST2 e os fatores de autoimunidade, não foram encontradas associações.

Foram encontradas correlações positivas para a expressão da IL-33 com a IL-33 sérica, e as enzimas hepáticas ALT e AST (Teste de Spearman, $r = 0,449$, $p=0,046$; $r = 0,551$, $p=0,012$; $r = 0,518$, $p=0,019$, respectivamente) (Figura 5).

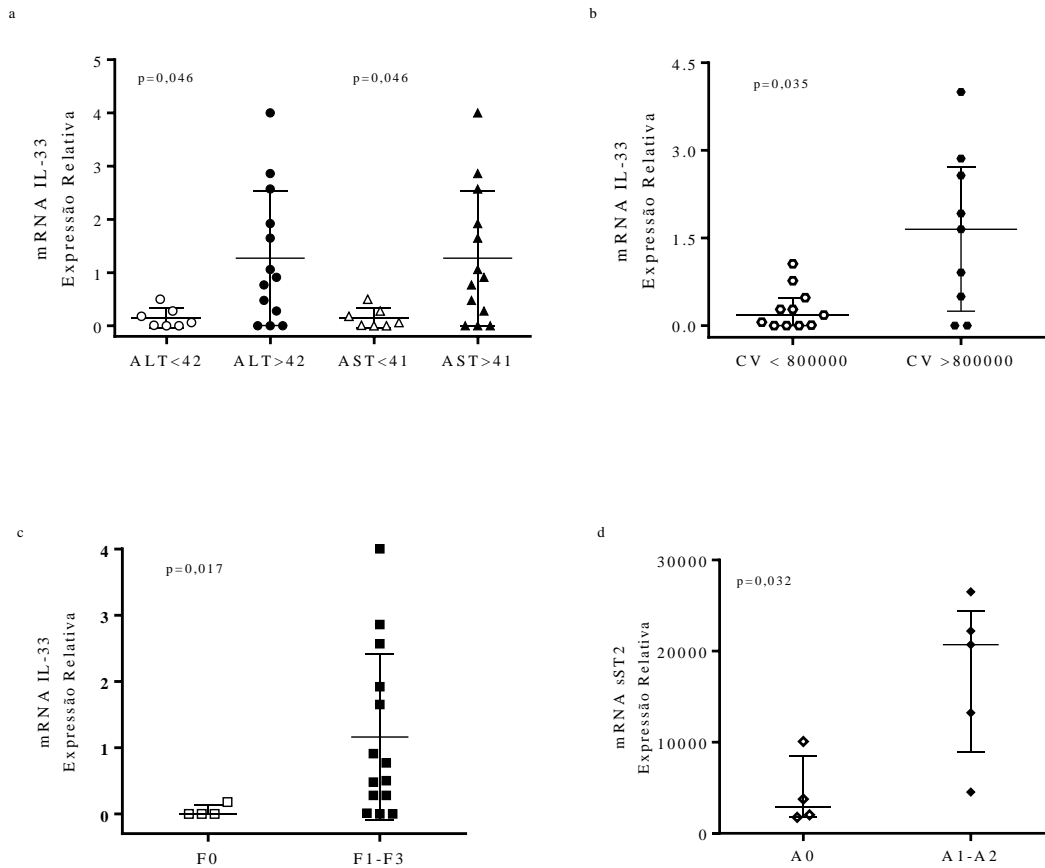


Figura 4 Expressão significativa de mRNA de IL-33 e sST2 em pacientes com hepatite C crônica, em relação aos seguintes parâmetros: aminotransferases (a), carga viral (b), fibrose (c) e atividade necroinflamatória (d).

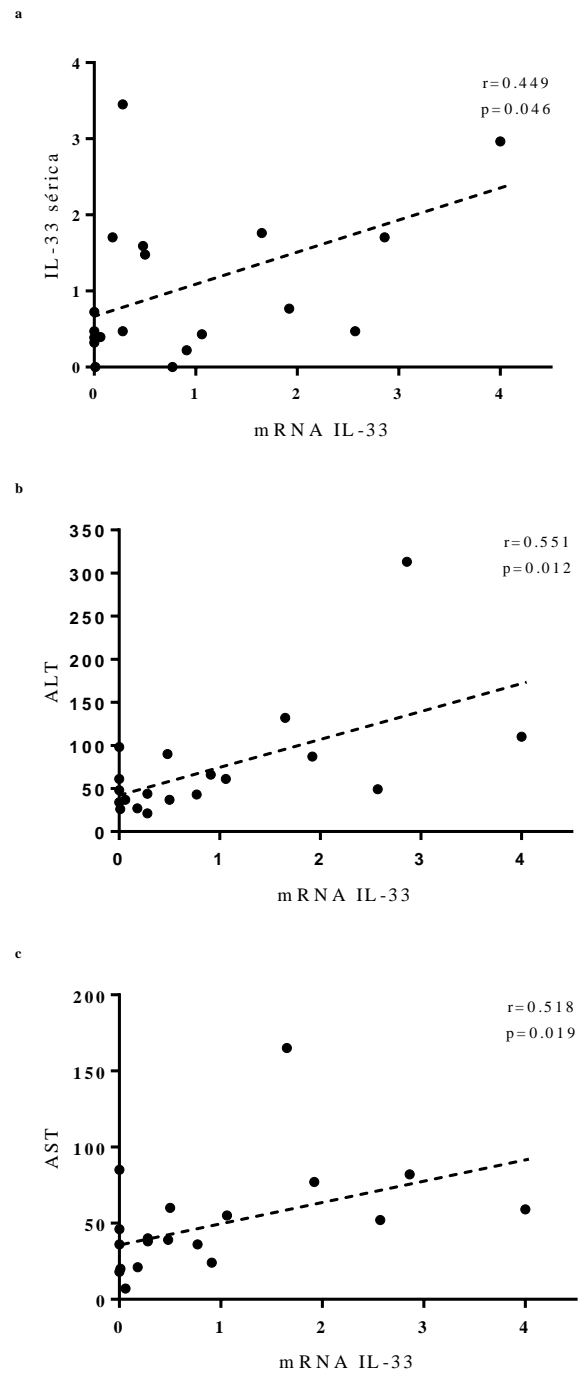


Figura 5 Correlação positiva entre a expressão da IL-33 com a IL-33 sérica (a), ALT (b) e AST (c). Teste de Spearman.

4.4 DISCUSSÃO

IL-33 é uma citocina multifuncional, capaz de ativar o NF- κ B e promover respostas imunitárias do tipo Th2. Também é considerada uma citocina “alarme”, secretada a partir de células necróticas (ARSHAD; PIQUET-PELLORCE; SAMSON, 2012; LI et al., 2015). Juntamente com seu receptor ST2 – que existe sob forma solúvel e forma transmembrana – a influência do eixo de IL-33/ST2L pode variar da proteção à patogenicidade em várias condições de doença (RANGLACK et al., 2013).

Para investigar o papel da IL-33 no processo patogênico da hepatite C, este estudo avaliou os níveis séricos e a expressão de mRNA de IL-33 e sST2 em pacientes com hepatite C crônica (sem tratamento antiviral) e em população sadia. Adicionalmente, investigamos a produção *ex vivo* da IL-33 e do sST2 a partir de células mononucleares do sangue periférico, de todos os indivíduos participantes neste estudo, estimuladas com peptídeos do VHC. A maioria dos pacientes avaliados estava infectada pelo genótipo 1 do VHC, tinham ausência ou baixo grau de fibrose e de atividade necroinflamatória hepáticas, carga viral alta, aumento moderado das aminotransferases e baixa expressão de marcadores de autoimunidade.

Detectamos níveis séricos mais elevados de IL-33 em pacientes com HCC do que os encontrados em indivíduos saudios. O mesmo não foi verificado para o sST2, cujos níveis séricos dos pacientes foram similares aos dos controles; inclusive não havendo correlação entre os níveis séricos desse receptor e os níveis séricos da IL-33. Nossos dados são corroborados por outros estudos, que demonstraram níveis elevados de IL-33 tanto em pacientes como também em camundongos cronicamente infectados pelo VHC (ARSHAD et al., 2013; MARVIE et al., 2010; MILLER, 2011; ROTH et al., 2010; WANG et al., 2012a).

Por outro lado, os níveis séricos da IL-33 não foram associados com os níveis das aminotransferases, carga viral e marcadores de autoimunidade, mas foram associados com fibrose e atividade necroinflamatória. Já os níveis séricos do sST2 não foram associados com as aminotransferases, fibrose, atividade necroinflamatória ou marcadores de autoimunidade, mas estes níveis estavam mais baixos nos pacientes com HCC que tinham carga viral mais elevada.

Neste trabalho, encontramos associação entre os níveis séricos e expressão gênica da IL-33 com presença de fibrose em estágios mais avançados, assim como outros estudos também observaram uma maior expressão de IL-33 em pacientes com fibrose hepática (MCHEDLIDZE et al., 2014; SEKI; SCHWABE, 2015). A IL-33 também tem sido associada à progressão da insuficiência hepática (WANG et al., 2012a), além de ser um ativador de mastócitos, que são

células com envolvimento na resposta fibrogênica do fígado (ARMBRUST et al., 1997). Estudos têm evidenciado níveis séricos elevados de IL-33 e sST2 em pacientes com insuficiência hepática aguda, aguda para crônica e crônica, mostrando um importante papel dessa via de ativação IL-33/ST2 (ROTH et al., 2010). Detectamos também, níveis séricos mais elevados de IL-33 em pacientes com HCC que apresentavam atividade necroinflamatória, corroborando com os achados em camundongos e seres humanos (MARVIE et al., 2010; WEISKIRCHEN; TACKE, 2016).

Os níveis séricos elevados da IL-33 encontrados em pacientes com maior comprometimento hepático são, possivelmente, causados pela sua libertação a partir de células necróticas, induzindo, assim, um aumento da produção de citocinas Th2, como IL-13. A IL-13 atua como mediador na remodelação do tecido fibrótico em modelos experimentais e naturais de fibrose, incluindo a produção de fibrose no fígado resultante da persistência viral (WYNN; RAMALINGAM, 2012).

Em relação à fibrose, tem sido mostrado que a IL-33 desempenha um papel protetor no desenvolvimento da fibrose cardíaca e aterosclerose, contudo atua na indução da fibrose pulmonar, hepática, renal e pancreática, quando liga-se ao seu receptor transmembrana ST2L (GAO; LI; LI, 2015). Quando ligada ao ST2L, a IL-33 regula positivamente a sua própria resposta no organismo, enquanto que a expressão do seu antagonista, o sST2, regula negativamente a função da IL-33, por bloquear a interação IL-33/ST2L (PASCUAL-FIGAL; JANUZZI, 2015). Diversos estudos apontam que as concentrações séricas do sST2 são aumentados em doenças inflamatórias e doença cardíaca, sendo considerado um importante marcador prognóstico negativo para ambas as condições (DIEPLINGER; MUELLER, 2015; HO et al., 2015; KAYE et al., 2014).

Embora não tenhamos encontrado associação entre os níveis séricos do receptor sST2 com a presença de fibrose e atividade necroinflamatória, verificamos que a expressão gênica desse receptor estava mais elevada nos pacientes de HCC que apresentavam atividade necroinflamatória na histopatologia hepática. Esses dados ainda são preliminares e necessitam de um tamanho amostral maior, mas são sugestivos de propriedades proinflamatórias do eixo IL-33/ST2 na hepatite C crônica.

No presente trabalho, avaliamos também a produção de IL-33 e sST2 *ex vivo*, estimulando células mononucleares do sangue periférico, dos pacientes com HCC e dos indivíduos saudáveis, com peptídeos do VHC (core, NS3, NS4 e NS5). A IL-33 é amplamente expressa em vários tipos celulares, predominantemente por células do estroma tais como as células epiteliais, endoteliais, fibroblastos, adipócitos e, em níveis mais baixos e de forma

heterogênea, em células dendríticas e macrófagos ativados (OSHIO et al., 2017). Diferente do observado no soro, não detectamos produção significativa da IL-33 após estimulação das CMSP com esses peptídeos. Então, é possível que os níveis séricos mais elevados de IL-33 sejam causados pela liberação desta citocina a partir de células hepáticas lisadas.

Contudo, quando analisamos as concentrações de sST2 produzidas pelas CMSP (células não estimuladas e estimuladas com os antígenos recombinantes do VHC), encontramos níveis significativamente mais elevados nos pacientes com HCC quando comparados a indivíduos saudáveis. Embora estes resultados sejam diferentes dos encontrados a nível sérico, os dados *ex vivo* sugerem que esses pacientes estão com maior capacidade para síntese deste receptor, o que pode contribuir para o desenvolvimento da fibrose e/ou desvio da resposta imune para o tipo Th2, na hepatite C. Segundo RANGLACK e colaboradores (2013), níveis significativamente altos de sST2 são encontrados em pacientes cirróticos com e sem HCC em comparação com indivíduos saudáveis.

As principais fontes do sST2 são fibroblastos cardíacos, cardiomiócitos (quando estão sob estresse ou lesão) e células endoteliais de estruturas vasculares (ATES et al., 2016). Porém, no nosso estudo, mostramos, *in vitro*, que foi detectada produção de sST2 por células mononucleares.

Ates e colaboradores (2016) documentaram que aumento da espessura da camada média-íntima das carótidas devido à pressão arterial elevada torna-se uma fonte significativa de sST2. Esses dados não foram objeto do nosso estudo, mas devido à faixa etária mais elevada dos participantes, essa fonte de aumento para o sST2 não pode ser descartada.

As análises da produção do sST2 *ex vivo*, induzida pelos peptídeos do VHC, não apresentaram associações com fibrose e carga viral. Porém, os níveis do sST2, induzidos apenas pelo peptídeo NS5, foram correlacionados positivamente com a elevação das aminotransferases nos pacientes com HCC.

Neste estudo, verificamos também uma baixa expressão de IL-33 e uma alta expressão gênica do receptor sST2 em células do sangue periférico nos indivíduos cronicamente infectados, embora não tenhamos encontrado diferenças entre os grupos analisados. Apesar disso, a expressão gênica da IL-33 foi associada com níveis séricos mais elevados das aminotransferases, carga viral alta (>800.000 UI/mL) e presença de fibrose. Diferentemente, a expressão do receptor sST2 não foi associada com as aminotransferases, carga viral ou fibrose, mas foi mais elevada na presença de atividade necroinflamatória. Schmieder e colaboradores (2012) mostraram que a IL-33 regula a transcrição de mRNA do ST2L e sST2, sendo que, quanto maior for a expressão da IL-33, maior será a expressão do seu receptor ligante e menor

será a expressão do receptor/bloqueador solúvel. Porém, a expressão do sST2 é amplamente induzível e quase ubíquo em células vivas (KAKKAR; LEE, 2008; PASCUAL-FIGAL; JANUZZI, 2015).

Mais importante, a expressão da IL-33 foi correlacionada positivamente com a concentração sérica da IL-33. Assim, a sequência de bases do mRNA utilizada (transcrição) foi correspondente a síntese da IL-33 (tradução). Além disso, os níveis séricos das aminotransferases apresentaram correlação positiva com a expressão da IL-33 em pacientes com HCC. Considerando que níveis anormais dessas enzimas, principalmente da ALT, estão relacionados com lesão hepática na hepatite C, nossos dados sugerem que a IL-33 pode estar sendo liberada também nesse processo, nos indivíduos cronicamente infectados. Esses achados são corroborados pelo estudo realizado por WANG e colaboradores (2012a).

Tem sido relatado a implicação do eixo IL-33/ST2 em algumas doenças autoimunes (DE LA FUENTE; MACDONALD; HERMOSO, 2015). A hepatite C crônica é caracterizada pela presença de manifestações de autoimunidade, especialmente crioglobulinemia e autoanticorpos não-órgão específicos (NOSA). Neste trabalho, não encontramos associação entre os níveis séricos e expressão gênica da IL-33 e sST2 com os marcadores de autoimunidade analisados.

Em conclusão, demonstramos que níveis séricos da IL-33 estão aumentados em pacientes com HCC, independente da presença de níveis também elevados do receptor sST2. A IL-33 foi associada com desenvolvimento de fibrose e atividade necroinflamatória hepática, elevação de aminotransferase e carga viral alta, sugerindo que a IL-33 pode ser um fator patogênico relacionada com a hepatite C crônica. Nos pacientes com carga viral elevada, é possível que a IL-33 esteja regulando negativamente a expressão do sST2. O eixo IL-33/ST2 não parece contribuir significativamente para as manifestações de autoimunidade na hepatite C. Nós reconhecemos que o presente estudo tem limitações, como número limitado de participantes e indivíduos cronicamente infectados sem presença de cirrose e/ou carcinoma hepatocelular.

4.5 REFERÊNCIAS

ARMBRUST, THOMAS; BATUSIC, DANKO; RINGE, BURKHARDT; RAMADORI, G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 26, n. 5, p. 1042–1054, 1997.

- ARSHAD, M. I.; PIQUET-PELLORCE, C.; SAMSON, M. IL-33 and HMGB1 alarmins : sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. **Liver International**, v. 32, n. 8, p. 1200–1210, 2012.
- ATES, I. et al. Elevated circulating sST2 associated with subclinical atherosclerosis in newly diagnosed primary hypertension. **Hypertension Research**, n. 2016, p. 1–6, 2016.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v. 24, p. 289–293, 1996.
- BEHFARJAM, F. et al. Role of Th1/Th2 cells and related cytokines in autoimmune hepatitis. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 110–114, 2017.
- DE LA FUENTE, M.; MACDONALD, T. T.; HERMOSO, M. A. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 6, p. 615–623, 2015.
- DIEPLINGER, B.; MUELLER, T. Soluble ST2 in heart failure. **Clinica Chimica Acta**, v. 443, p. 57–70, 2015.
- FUSS, I. J. et al. Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood, **Current Protocols in Immunology**, 2009.
- GAO, Q.; LI, Y.; LI, M. The potential role of IL-33 / ST2 signaling in fibrotic diseases. **J Leukoc Biol**, v. 98, n. July, p. 1–8, 2015.
- HO, J. E. et al. Soluble ST2 testing in the general population. **American Journal of Cardiology**, v. 115, n. 7, p. 22B–25B, 2015.
- KAKKAR, R.; LEE, R. T. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 10, p. 827–40, 1 out. 2008.
- KAYE, D. M. et al. Determinants and implications of elevated soluble ST2 levels in heart failure. **International Journal of Cardiology**, v. 176, n. 3, p. 1242–1243, 2014.
- LI, R. et al. Interleukin-33 and receptor ST2 as indicators in patients with asthma : a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med.**, v. 8, n. 9, p. 14935–14943, 2015.
- LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 2, p. 103–110, fev. 2010.
- MARVIE, P. et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 6B, p. 1726–39, 2010.
- MATSUYAMA, Y. et al. Increased Levels of Interleukin 33 in Sera and Synovial Fluid from Patients with Active Rheumatoid Arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 37, n. 1, p. 18–25, 1 jan. 2010.
- MAUSS, S. et al. **Hepatology: A Clinical Textbook**. 7th. ed. [s.l.]. Hamburg, Germany: Flying Publisher; 2016. p. 695. v. 1, n. 7, p. 197–207, 2016.
- MCHEDLIDZE, T. et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 357–371, 2014.
- MILLER, A. M. Role of IL-33 in inflammation and disease. **Journal of Inflammation**, v. 8, n. 1, p. 22, 2011.
- MOK, M. Y. et al. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 49, n. 3, p. 520–527, 2010.
- MUELLER, T.; JAFFE, A. S. Soluble ST2 — Analytical Considerations. **The American Journal of Cardiology**, v. 115, n. 7, p. 8B–21B, 2015.

- OSHIO, T. et al. Nuclear expression of IL-33 in epidermal keratinocytes promotes wound healing in mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 85, n. 2, p. 106–114, fev. 2017.
- PASCUAL-FIGAL, D. A.; JANUZZI, J. L. The biology of ST2: The international ST2 consensus panel. **American Journal of Cardiology**, v. 115, n. 7, p. 3B–7B, 2015.
- PASTORELLI, L. et al. The role of IL-33 in gut mucosal inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.
- RANGLACK, A. et al. High Serum Levels of the Interleukin-33 Receptor Soluble ST2 as a Negative Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. **Translational Oncology**, v. 6, n. 3, p. 311–318, 2013.
- REBL, A. et al. ST2 from rainbow trout quenches TLR signalling, localises at the nuclear membrane and allows the nuclear translocation of MYD88. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 67, p. 139–152, 2017.
- ROTH, G. A. et al. Up-Regulation of Interleukin 33 and Soluble ST2 Serum Levels in Liver Failure. **Journal of Surgical Research**, v. 163, n. 2, p. e79–e83, 2010.
- SCHMIEDER, A.; MULTHOFF, G.; RADONS, J. Cytokine Interleukin-33 acts as a pro-inflammatory cytokine and modulates its receptor gene expression in highly metastatic human pancreatic carcinoma cells. **Cytokine**, v. 60, n. 2, p. 514–521, 2012.
- SEKI, E.; SCHWABE, R. F. Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional Links and Key Pathways. **Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 1066–1079, 2015.
- STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, n. November, p. 1–3, 2015.
- THEOHARIDES, T. C. et al. Targeting IL-33 in autoimmunity and inflammation. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 354, n. 1, p. 24–31, 2015.
- VERMEERSCH, P. et al. A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins. **Clin Chem**, v. 54, n. 1, p. 39–43, 2008.
- WANG, J. et al. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis C. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.
- WEISKIRCHEN, R.; TACKE, F. Interleukin-33 in the pathogenesis of liver fibrosis: alarming ILC2 and hepatic stellate cells. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, n. 2, p. 143–145, 2016.
- WHO. **Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection**. World Health Organization, 2014.
- WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature medicine**, v. 18, n. 7, p. 1028–40, 2012.
- YOSHIO, S.; KANTO, T. Host – virus interactions in hepatitis B and hepatitis C infection. **Journal of Gastroenterology**, p. 1–7, 2016.

5 CAPÍTULO 2: Artigo 2: IL-33/sST2 e Associação com Fibrose em Pacientes com Hepatite B Crônica

Mônica Cardozo Rebouças^a, Andreas Stocker^b, Maria Isabel Schinoni^b, Milena Santana Cabral^a, Isabela Silva de Oliveira^c, Ajax Mercês Atta^c, Maria Luiza Brito de Sousa-Atta^{c*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Brasil

^bLaboratório de Pesquisa em Infectologia, Serviço de Gastro-hepatologia, Universidade Federal da Bahia Brasil

^cLaboratório de Pesquisa em Imunologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Brasil

*Autor correspondente: Dra. Maria Luiza B. Sousa Atta. E-mail: mluiza@ufba.br

Interleucina-33 (IL-33) tem sido associada a produção de citocinas Th2, e o aumento da expressão de IL-33 e seu respectivo receptor ST2 tem sido correlacionado com fibrose. Este trabalho investigou a IL-33 e sST2 em pacientes com hepatite B crônica (HBC), correlacionando com dados clínicos, bioquímicos e de autoimunidade. Os níveis de IL-33 e sST2 foram determinados, em indivíduos controles sadios (n=20) e em pacientes com HBC (n=20), por ELISA, em amostras de soro e em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP), estimuladas com peptídeos do vírus (AgHBs e Core). RT-PCR foi usado para quantificar a expressão do mRNA da IL-33/sST2 do sangue periférico. Foram determinadas as aminotransferases e marcadores de autoimunidade (crioglobulinemia, fator reumatoide, ASMA, ANA). Dados de fibrose hepática e carga viral (CV) foram obtidos de registros médicos. A maioria dos pacientes apresentavam ausência de fibrose, CV baixa, aminotransferases normais e baixa expressão de marcadores de autoimunidade. Detectamos níveis séricos mais elevados de IL-33 nos pacientes com HBC do que nos controles sadios; e níveis séricos similares do sST2 entre os pacientes e controles. Não houve correlação entre os níveis séricos do receptor e a IL-33. Níveis séricos e expressão gênica da IL-33 foram associados com presença de fibrose. Não houve correlação entre a expressão da IL-33 e os níveis séricos da citocina. Diferente do observado no soro, não houve produção significativa da IL-33 após estimulação das CMSP com peptídeos do VHB. Tanto os pacientes quanto os indivíduos sadios produziram altos níveis do sST2 *ex vivo*, sendo mais elevados na HBC. Foi detectado uma maior expressão de IL-33 nos pacientes com HBC que os controles, e associação com aminotransferases elevadas nos pacientes com HBC. IL-33/sST2 não apresentaram associação com marcadores de autoimunidade na hepatite B. Concluimos que a IL-33 tem papel profibrogênica na hepatite B crônica.

Palavras-chave: IL-33; sST2; hepatite B crônica; fibrose hepática; autoimunidade

5.1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite B (VHB) é causa comum de doença hepática aguda e crônica, com significativo impacto global. Estima-se que, aproximadamente, um terço da população mundial tenha tido contato com este vírus, sendo que 350-400 milhões de pessoas são portadoras do antígeno de superfície do VHB, o AgHBs (MAUSS et al., 2016).

A interleucina 33 (IL-33) é uma citocina que tem sido descrita como possuidora de dupla função, podendo atuar como uma citocina tradicional e como um fator nuclear. Localizada intracelularmente, aparece como um sinal de perigo endógeno, em resposta ao dano tecidual, capaz de atuar sobre células imunes inata e adaptativa e desempenha papel central na mediação de condições inflamatórias (HARALDSEN et al., 2009). Estudos mostram que a expressão de IL-33 pode ser induzida em células imunes, como mastócitos e células dendríticas (CDs), em condições inflamatórias, levando a polarização do perfil Th2 (YIN; YANG et al., 2011; HIROHITO, 2017). Foi demonstrado que a administração *in vivo* de IL-33 levou ao aumento no número de linfócitos circulantes no sangue e da secreção de citocinas tipo 2 (Th2) no timo, baço, fígado e pulmão (BITTENCOURT; PACZESNY, 2017). Outros estudos, no entanto, apontam evidências que a IL-33 pode amplificar respostas imunes tanto Th1 como Th2 (BLOM; POULSEN, 2012; LU et al., 2015).

O ST2, receptor da IL-33, é uma glicoproteína que pode apresentar-se sob três isoformas diferentes: ligada a membrana, ST2L, expresso em células Th2 e mastócitos; solúvel secretada, sST2, expressa por células hematopoiéticas e não hematopoiéticas (REBL et al., 2017); e uma variante da proteína ancorada à membrana, ST2V. A transdução do sinal da IL-33 é dependente da ligação do receptor ST2L e da proteína acessória, IL-1RAcP, ou pode ser bloqueada pela ligação do sST2 (SCHIERING et al., 2014).

O receptor sST2 é considerado um biomarcador de insuficiência cardíaca, sendo correlacionado ao risco de progressão da doença (PASCUAL-FIGAL et al., 2016), estando também associado ao câncer gástrico (BERGIS; KASSIS; RADEKE, 2016). Além disso, pacientes infectados com VHB, com fibrose leve e grave, apresentam diferentes níveis séricos de sST2 (OZTAS et al., 2015) e existe associação negativa entre os níveis plasmáticos de sST2 e gravidade/mortalidade da doença em pacientes com insuficiência hepática aguda e crônica relacionada ao VHB (LEI et al., 2015).

A ligação IL 33/ST2 tem sido associada com uma variedade de estados de doenças e processos inflamatórios, desempenhando um importante papel na progressão da inflamação crônica e fibrose (PASTORELLI et al., 2013). No presente estudo, investigamos a produção da IL-33 e sST2, em pacientes com hepatite B crônica (HBC) e indivíduos saudáveis, através da detecção de níveis séricos, expressão gênica e após indução *ex vivo* antígeno-específica, correlacionando com as características clínico-laboratoriais.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Pacientes e Controles

Foram incluídos 20 pacientes, de ambos os sexos, portadores de HBC, diagnosticados clinicamente e sorologicamente para hepatite B (ELISA de 3ª geração), demonstração de DNA viral no sangue, carga viral e Fibroscan®, sem tratamento prévio antiviral, no Ambulatório de Hepatites do Complexo Hospitalar HUPES. Outros 20 indivíduos, controles saudáveis, pareados por sexo e idade mais próxima do grupo alvo, foram convidados no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Farmácia (LACTFAR), Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Foram adotados os seguintes critérios de não-inclusão para os pacientes: coinfeções virais por HIV, HTLV e vírus da hepatite C ou presença de outras enfermidades crônicas autoimunes e/ou inflamatórias, assim como para os controles saudáveis que foram testados e avaliados para infecções e doenças autoimunes e/ou inflamatórias.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Enfermagem da UFBA, número 741.170. Todos os participantes receberam esclarecimentos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5.2.2 Determinação das aminotransferases e dos marcadores de autoimunidade (crioglobulinas e autoanticorpos não-órgão-específicos – NOSA)

Amostras de soro dos participantes, obtidas a partir de sangue coletado na ausência de anticoagulantes, foram usadas para avaliação bioquímica e marcadores de autoimunidade. A atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foi determinada através da metodologia Cinética-UV, utilizando conjunto comercial, em analisador automático (LabMax560, Labtest, Brasil). Foram considerados os seguintes valores de referência: ALT \leq 41 U/L e AST \leq 42 U/L.

A presença de crioglobulinemia foi determinada por precipitação em tubos Wintrobe, a 4°C (VERMEERSCH et al., 2008). O fator reumatoide (FR) sérico foi determinado por nefelometria (Image, Beckman Coulter, USA), sendo o valor de referência (VR) $<$ 20 UI/mL. Os anticorpos antinucleares (ANA) e os anticorpos antimúsculo liso (AML) foram detectados por imunofluorescência indireta, usando células Hep-2000 como substrato (Immuno Concepts, USA) e cortes teciduais de fígado/rim/estômago de rato (Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH, Alemanha), respectivamente. Foi utilizado como ponto de corte a diluição de 1/40 para ambos autoanticorpos.

5.2.3 Preparação das células e cultivo celular

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas, pelo método de separação por gradiente de densidade (Ficoll-PaqueTM Premium, GE Healthcare, Suécia) (FUSS et al., 2009), a partir da coleta de sangue em tubos heparinizados. Após os procedimentos de lavagem e contagem de células mononucleares viáveis, as mesmas foram ajustadas para a concentração de $1,0 \times 10^6$ células em meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 25mM de HEPES pH 7,2, antibiótico (Cultilab, Brasil), e solução de gentamicina 10mg/mL (SIGMA-ALDRICH).

As CMSP de todos os participantes foram distribuídas em placas de 96 poços (KASVI, China), sendo 100 μ L por poço e estimuladas com 10 μ L de soluções de peptídeos recombinantes do Core e AgHBs do vírus da hepatite B (10 μ g/mL, ABCAM, UK), 10 μ L de fitohemaglutinina (PHA, 5 μ g/ml, SIGMA) como controle positivo e células sem estimulação como controle negativo. As culturas foram incubadas em estufa contendo 5% de CO₂, a 37°C (Panasonic, USA), por 5 dias. Após esse período, as placas foram centrifugadas a 1900 rpm durante 10 minutos, e os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados sob refrigeração a -80°C, até o momento das análises.

5.2.4 Dosagem IL-33/sST2

Amostras de soro e de sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, de todos os participantes, foram avaliadas por metodologia de ELISA de captura, utilizando kits comerciais de ELISA, para quantificação da IL-33 (eBioscience, Áustria) e sST2 (ABCAM, Reino Unido), de acordo com as instruções dos fabricantes. Os limites de detecção dos kits de IL-33 e sST2 foram de 0,2 e 2,0 pg/ml, respectivamente.

5.2.5 Extração e PCR em Tempo Real

Amostras de sangue periférico (2,5 mL de cada participante) foram coletadas diretamente em tubos PAXgeneTM (Qiagen, Suíça), segundo as instruções do fabricante, e armazenados a -80°C para análises posteriores. O RNA celular total foi extraído das amostras utilizando PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen, Suíça), de acordo com o protocolo do fabricante.

5.2.5.1 PCR em Tempo Real para IL-33 e sST2

A detecção do mRNA da IL-33 e sST2 foi realizado pela técnica de One Step-RT-q-PCR (*Real-time polymerase chain reaction*), com pares de *primers* específicos, *Foward* (F) e *Reverse*

(R), e sondas marcada com o fluoróforo FAM®. Os *primers* foram desenhados pelo BIOEDIT (v 7.2.5, Ibis Biosciences), junção-éxon-éxon, usando o banco de dados NCBI (Centro Nacional de Informação Biotecnológica), para determinação das conexões exons e introns. Para a IL-33 foram, F: 5'-CAAGCTGGGAAAATCCCAACAG-3'; R: 5'-TTGTGCTTTCTACCTGTTTTTCAGTG-3'; sonda: 5'-Fam-CCCATGTACTTTATGAAGCTCCGCTCTGGCC-BHQ1-3') e, para o sST2 foram, F: 5'-CCTTCACGGTCAAGGATGAGC-3'; R: 5'-GGTTTGCGTTTTTTTCCAATTTCCAC-3'; sonda: 5'-Fam-CTCTGTTTCCAGTAATCGGAGCCCCTGCAC-BHQ1-3'. O kit comercial utilizado foi *SuperScript™III One-step RT-PCR with Platinum Taq™* (Invitrogen, USA), para reação, seguindo orientações do fabricante.

O volume de cada reação padrão foi de 25 uL, incluindo: *ReactionMix* (dNTPs - 0,4mM, MgSO4 - 3,2mM, Buffer - 2x), H₂O livre de RNase, MgCl₂ a 2 mM, BSA a 0,04 mg/mL, 0,30 µM de cada primer (*R* e *F*), 0,20 µM da sonda, *mix* de enzima, *SuperScript III/ Platinum Taq Mix* (25x) e amostra extraídas de RNA. Os ciclos térmicos utilizados foram de 15 min a 55°C, seguida de 2 minutos a 94°C, ciclos (n = 45) de 20 segundos a 94°C, seguido por 35 segundos a 59°C. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Sequence Detection Software (SDS) v1.3.1 (Applied Biosystems).

5.2.5.2 Análise dos dados da PCR em Tempo Real

Para a comparação relativa dos valores, o coeficiente angular da reta padrão foi determinado usando análise da série de diluição, para IL-33 e sST2, em logaritmo na base 10 e a regressão linear (IBM SPSS 23.0). A eficiência da PCR (*E*) foi obtida a partir da equação $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$, sendo o *slope* = $10^{(a*2)}$ e o *a* = coeficiente angular da reta de amplificação (*a*: IL-33 = -0,271; sST2 = -0,274). O coeficiente de correlação (r^2) foi de 1,000 para IL-33 e sST2, e a eficiência foi de 93,7% para IL-33 e 91,8% para sST2.

A normalização foi feita pela padronização do volume da amostra utilizada e quantificação dos componentes celulares.

5.2.6 Análises Estatísticas

O software Prism 7.0 de GraphPad (EUA) foi utilizado para as análises estatísticas. As variáveis foram expressas em média ± desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IQR), de acordo com sua distribuição no teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. O

teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas de dois grupos e as suas médias foram comparadas pelo teste t de Student não pareado. Correlação entre duas variáveis foi avaliada pelo teste de Spearman, enquanto as associações entre grupos categóricos foram analisadas utilizando o teste exato de Fisher e Qui-quadrado. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Caracterização dos pacientes e controles

O grupo dos pacientes com HBC foi composto por 8 homens e 12 mulheres, com média de idade de $45,5 \pm 10,8$ anos. Os dados de fibrose hepática, acessados a partir de resultados de exame de elastografia hepática transitória (Fibroscan®), mostraram que 60% dos pacientes estavam com ausência de fibrose e 35% deles com estágios considerados leves (F1). Em relação ao DNA viral, apenas 10% dos pacientes apresentaram carga viral alta (≥ 100.000 cópias/mL).

O grupo de indivíduos saudáveis, controles, foi composto por 9 mulheres e 11 homens, com média de idade de $49 \pm 6,5$ anos (Tabela 1).

5.3.2 Caracterização laboratorial dos pacientes e controles

Nos pacientes com HBC, níveis séricos aumentados das enzimas aminotransferases foram encontrados em apenas 25% para ALT e 20% para AST. Em relação aos marcadores de autoimunidade, a presença de ANA e AML, foi observada em 15% e 25% desses pacientes, respectivamente. O FR foi positivo em 10% deles e nenhum apresentou crioglobulinemia.

O grupo controle apresentou níveis normais para as enzimas ALT e AST. Também, não foram detectados anticorpos antimúsculo liso, crioglobulinemia e fator reumatoide. A presença de ANA foi detectada em 5% desses indivíduos.

Entre os pacientes e grupo controle, houve diferença significativa apenas quanto à presença de anticorpo antimúsculo liso para a HBC ($p=0,047$) (Tabela 1).

Tabela 1 Características clínico-demográfica e da infecção dos pacientes com hepatite B crônica (HBC) e de controles saudáveis (CS).

Características	CS N (%)	HBC N (%)	Significância p^a
Sexo			-
Homem	11/20 (55)	8/20 (40)	
Mulher	9/20 (45)	12/20 (60)	
Idade (anos), média ± dp	49 ± 6,5	45,5 ± 10,8	-
Homem	50 ± 6,6	53,7 ± 9,6	
Mulher	47,8 ± 6,6	40 ± 7,9	
Fibrose (Fibroscan®)			
F0	-	12 (60)	
F1	-	7 (35)	
F2	-	0 (0)	
F3	-	0 (0)	
F4	-	0 (0)	
Não avaliado	-	1 (5)	
Carga Viral (mediana, IQR)		1.465 (315,5 3.360)	-
Baixa (<100.000 cópias/mL)	-	18 (90)	
Alta (≥100.00 cópias/mL)	-	2 (10)	
ALT			0,231
<41 U/L	20 (100%)	17 (85)	
>41 U/L	-	3 (15)	
Mediana (IQR)	21,6 (16,5-25,6)	34,5 (16,5-37,8)	
AST			0,102
<42 U/L	20 (100%)	16 (80)	
>42 U/L	-	4 (20)	
Mediana (IQR)	24,2 (21,3-26,8)	30,1 (21,0-28,9)	
Fator Reumatoide			0,487
<20 U/L	20 (100%)	18 (90)	
>20 U/L	-	2 (10)	
ANA	1 (5%)	3 (15)	0,605
AML	nd	5 (25)	0,047
Crioglobulinemia	nd	nd	

^aTeste Qui-Quadrado, p<0,05.

F0: sem fibrose; F1: fibrose portal sem septos; F2: fibrose portal com raros septos; F3: fibrose avançada; F4: fibrose severa ou cirrose; U/L: unidades por litro; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; ANA: Anticorpos antinucleares; AML: Anticorpos antimúsculo liso; nd: não detectado.

5.3.3 Determinação sérica da IL-33 e do receptor sST2

Níveis séricos da IL-33 foram encontrados em 55% (11/20) dos pacientes com HBC (mediana= 0,39 pg/mL, IQR= 0,32 – 0,59; variação 0,2 – 1,65) e em apenas 5% (1/20) dos controles sadios. Houve maior produção de IL-33 em portadores de HBC quando comparados aos controles ($p=0,0007$, teste de Mann-Whitney) (Figura 1a, IL-33: CS: mediana = 0 pg/mL; HBC: mediana = 0,23 pg/mL, IQR= 0 - 0,45). Por outro lado, níveis séricos do receptor sST2 foram encontrados em 100% dos pacientes com HBC avaliados (mediana= 60,9 pg/mL, IQR= 34,5 – 113,9; variação 18,4 – 319,6) e em 95% (19/20) dos controles sadios (mediana= 55,8 pg/mL, IQR= 40,5 – 89,6; variação 11 – 244). Os níveis séricos do receptor sST2 não foram diferentes entre os pacientes com HBC e controles sadios ($p=0,499$, teste de Mann-Whitney), (Figura 1b, sST2: CS: mediana= 54,8 pg/mL, IQR= 38 – 89; HBC: mediana = 60,9 pg/mL, IQR=34,5 – 113,9).

Os níveis séricos de IL-33 não foram correlacionados com os níveis séricos das aminotransferases ALT e AST nos pacientes com HBC, nem associados com aqueles pacientes que apresentaram níveis anormais dessas enzimas (ALT >41 U/L, e AST >42 U/L; teste de Mann-Whitney, $p=0,41$), carga viral alta (≥ 100.000 cópias/mL), e marcadores de autoimunidade (teste exato de Fisher). No entanto, os níveis séricos da IL-33 foram mais elevados nos pacientes que tinham fibrose hepática (teste de Mann-Whitney, $p=0,005$; Figura 2).

Similarmente, os níveis séricos do sST2 não apresentaram correlação com as enzimas hepáticas ALT e AST (teste de Spearman), nem foram significativamente mais elevados nos pacientes com HBC que apresentaram níveis anormais dessas enzimas (teste de Mann-Whitney). Além disso, os níveis séricos do receptor sST2 não foram associados com carga viral alta, marcadores de autoimunidade e fibrose hepática (teste de Mann-Whitney).

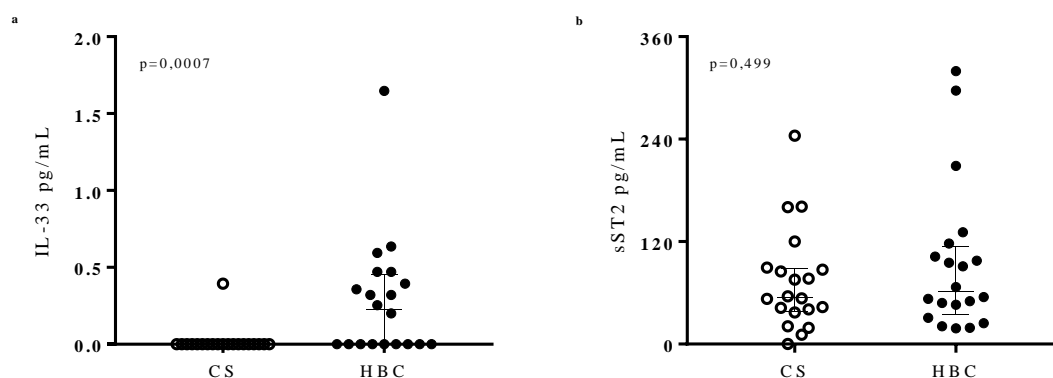


Figura 1 Níveis séricos de IL-33 (a) e sST2 (b) em indivíduos controles sadios (CS) e pacientes com hepatite B crônica (HBC). Teste de Mann-Whitney, as barras horizontais representam a mediana e os intervalos interquartis, $p < 0,05$.

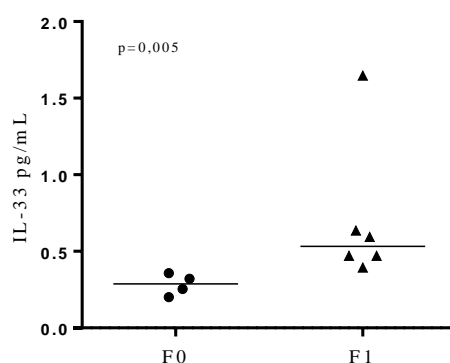


Figura 2 Níveis séricos de IL-33 em pacientes com hepatite B crônica (HBC), de acordo com a ausência (F0) ou presença (F1) de fibrose. Teste de Mann-Whitney, mediana, $p < 0,05$.

5.3.4 Determinação da IL-33 e do receptor sST2 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico

A IL-33 foi pouco detectada em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) dos pacientes com HBC, estimuladas com peptídeos do VHB, Core e AgHBs, como também para os controles saudáveis. Contudo, foram observados níveis bem mais elevados da IL-33 entre os portadores de HBC do que nos controles sadios (Tabela 2).

Tabela 2 Níveis de IL-33 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios (CS) e de pacientes com hepatite B crônica (HBC), estimuladas *ex vivo* com peptídeos do HBV.

Estímulos	CS (n=20)	HBC (n=20)	Significância (P)*
S/E	0 (IQR= 0 – 0; variação 0 – 0,5)	0,2 (IQR= 0 – 0,6; variação 0 – 0,9)	P= 0,004
PHA	0 (IQR= 0 – 0,3; variação 0 – 3)	1,2 (IQR= 0,3 – 2,7; variação 0 – 11)	P= 0,001
Core	0 (IQR= 0 – 0; variação 0 – 0,4)	0,25 (IQR= 0 – 0,7; variação 0 – 2,5)	P= 0,008
AgHBs	0 (IQR= 0 – 0; variação 0 – 0,7)	0,3 (IQR= 0 – 1,4; variação 0 – 6)	P= 0,004

*Teste de Mann-Whitney. S/E: células não estimuladas; PHA: fitohemaglutinina.

A produção *ex vivo* do receptor sST2 foi um pouco mais expressiva do que a IL-33, sendo também detectado níveis mais elevados nos sobrenadantes das CMSP dos pacientes com HBC do que nos indivíduos saudáveis (Tabela 3).

Tabela 3. Níveis de sST2 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis (CS) e de pacientes com hepatite B crônica (HBC), estimuladas *ex vivo* com peptídeos do HBV.

Estímulos	CS (n=20)	HBC (n=20)	Significância (P)*
S/E	49 (IQR= 1,9 – 120; variação 0 – 271)	166 (IQR= 9,8 – 211; variação 0 – 335)	P= 0,004
PHA	80 (IQR= 11,4 – 131; variação 0 – 267)	189 (IQR= 14,8 – 215; variação 0 – 303)	P= 0,001
Core	2,9 (IQR= 0 – 60; variação 0 – 183)	193,5 (IQR= 38 – 238; variação 0 – 303)	P=0,002
AgHBs	19,4 (IQR= 0 – 86; variação 0 – 144)	169,4 (IQR= 1,5 – 190; variação 0 – 257)	P=0,01

*Teste de Mann-Whitney. S/E: células não estimuladas; PHA: fitohemaglutinina.

5.3.5 Expressão da IL-33 e do receptor sST2

Foi detectado uma maior expressão de IL-33 nos pacientes com HBC (mediana= 2,4 cópias/ μ L, IQR= 0,4 - 4,57) quando comparados aos controles saudáveis (mediana= 0,49 cópias/ μ L, IQR=0,09 - 0,68), teste de Mann-Whitney, p=0,006 (Figura 3a, IL-33: CS: mediana= 0,49 cópias/ μ L, IQR= 0,09 – 0,68; HBC: mediana= 2,4 cópias/ μ L, IQR=0,4 – 4,57).

A expressão gênica da IL-33 foi mais elevada nos pacientes que tinham níveis mais elevados das aminotransferases (p=0,016, para ambas as enzimas) (Figura 3c). A expressão gênica da IL-33 não foi associada com fibrose, carga viral e marcadores de autoimunidade na HBC. Além disso, a expressão da IL-33 não foi correlacionada com os níveis séricos da citocina (teste de Spearman, p= 0,108).

Contrário à IL-33, a expressão do receptor sST2 não apresentou diferença entre os pacientes com HBC e os controles saudáveis (teste de Mann-Whitney, $p=0,194$, Figura 3b, sST2: CS: mediana= 18.144 cópias/ μL , IQR= 4.450 – 29.660; HBC: mediana= 10.413 cópias/ μL , IQR= 5.096 – 15.325). Também, não foram encontradas diferenças entre a expressão do sST2 com elevação de aminotransferases, fibrose, carga viral e marcadores de autoimunidade. No entanto, a expressão do sST2 apresentou uma fraca correlação negativa com os níveis séricos do receptor (teste de Spearman, $r= -0,493$, $p= 0,027$).

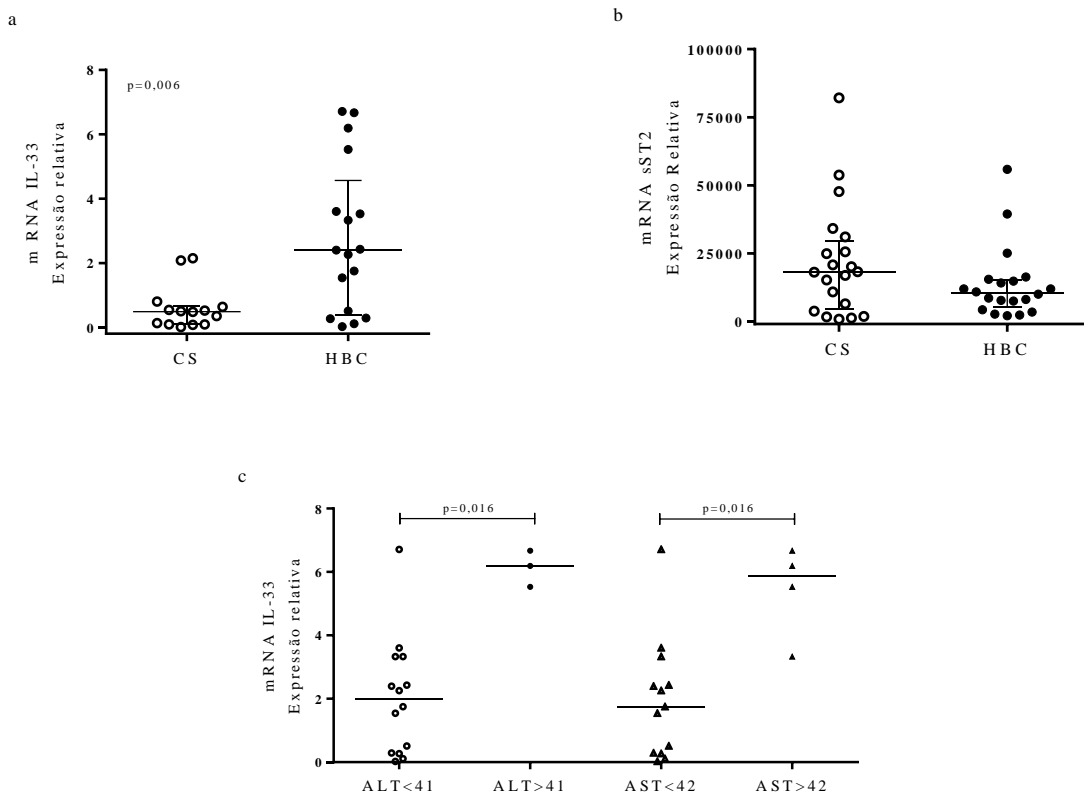


Figura 3 Expressão de mRNA de IL-33 total (a) e do sST2 (b) em controles sadios (CS) e portadores de Hepatite B Crônica (HBC); (c) expressão relativa do mRNA em relação aos níveis séricos das aminotransferases, dos pacientes com HBC. As barras representam mediana e intervalo interquartil, teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

5.4 DISCUSSÃO

A interleucina 33 (IL-33) é uma citocina que induz células T auxiliares, mastócitos, eosinófilos e basófilos para produzir citocinas Th2. A IL-33 medeia os seus efeitos biológicos através da interação com o receptor ST2L transmembrana, e esses efeitos são bloqueados quando interage com a forma solúvel do receptor, o sST2 (WEISKIRCHEN; TACKE, 2016). O ST2L possui um receptor acessório (IL1RAP), que, quando liga-se a IL-33 ativa moléculas intracelulares, via NF- κ B e da MAP quinase, que conduzem a produção de citocinas a partir de células Th2 polarizadas (ANDRADE et al., 2011).

Embora grande parte das pesquisas sobre a via da IL-33/ST2 em células T demonstrem sinalização voltada para produção de citocinas Th2, estudos recentes mostram a importância dessa via em doenças mediadas por perfil Th1, Th17 e Treg (HODZIC et al., 2017).

A evolução da hepatite B crônica é caracterizada por uma interação complexa entre a replicação do VHB e a resposta imune do hospedeiro (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014), e alguns autores têm sugerido um envolvimento da IL-33 na progressão da HBC (WANG et al., 2012b).

Neste trabalho, investigamos o envolvimento da IL-33 e do sST2 na HBC, determinando os níveis séricos da IL-33 e seu receptor sST2, sua expressão gênica e a produção *ex vivo* após estimulação de células mononucleares do sangue periférico com peptídeos recombinantes do VHB (Core e AgHBs), relacionando-os a marcadores clínico-laboratoriais e da infecção. A maioria dos pacientes com HBC incluídos no estudo apresentava carga viral baixa, aminotransferases normais, ausência de fibrose e baixa expressão de marcadores de autoimunidade.

Neste trabalho, verificamos que tanto os níveis séricos quanto a expressão gênica da IL-33 estão mais elevados nos pacientes com HBC do que em indivíduos saudáveis, corroborando com dados obtidos por outros autores (WANG et al., 2012b). Nos pacientes, a expressão gênica da IL-33 foi correlacionada com as aminotransferases mais elevadas, enquanto os níveis séricos da IL-33 foram mais elevados nos pacientes que tinham fibrose. Tanto a expressão gênica da IL-33 quanto seus níveis séricos não foram associados com a carga viral e os marcadores de autoimunidade detectados.

Outros trabalhos também demonstraram haver uma maior expressão gênica de IL-33 em pacientes com hepatite crônica (MARVIE et al., 2010; ROTH et al., 2010; WANG et al., 2012b). A IL-33 polariza as células T para o fenótipo Th2 (LIEW; PITMAN; MCINNES, 2010; LU et al., 2015), sendo uma importante resposta na insuficiência hepática e cirrose, visto que

podem promover fibrose e estar associados a um resultado clínico desfavorável e progressão da hepatite crônica (YANG et al., 2016).

Estudos relataram um papel crucial para a IL-33 na patogênese de doenças hepáticas mediadas por imunidade. Durante a hepatite imunomediada, níveis elevados de IL-33 correlacionaram-se com inflamação hepática grave e lesão tecidual (NOEL et al., 2016). O desequilíbrio da produção de citocinas desempenham um papel fundamental na formação de fibrose, no desenvolvimento de lesão hepática e necroinflamação. Como resultado, pode haver a indução do perfil Th2, que contribui para a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, sendo importantes na ativação de células do sistema imune e na lise de hepatócitos, e a IL-33, caracterizada por ser uma citocina profibrogênica (DENG et al., 2015). Esses dados podem justificar a presença de níveis mais elevados de IL-33 sérica nos pacientes com HBC portadores de fibrose hepática. Adicionalmente, encontramos expressão mais elevada de mRNA da IL-33 nos pacientes com HBC que apresentavam níveis mais elevados das aminotransferases. Isso pode ocorrer devido à correlação de níveis anormais dessas enzimas com indicativo de função anormal e/ou lesões no fígado, como resposta à infecção. Em seguimento, a resposta imune desencadeada pode ser agressiva ao organismo, como na infecção fulminante pelo vírus, como também pode levar à cronificação da doença (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

Apesar das diferenças encontradas entre os pacientes com HBC e indivíduos saudáveis, o mRNA da IL-33 detectado em células do sangue periférico mostraram níveis mais baixos, provavelmente porque essa citocina é predominantemente secretada por células do estroma (células epiteliais e endoteliais, fibroblastos e adipócitos), e em níveis ainda mais baixos e de forma heterogênea, em células dendríticas e macrófagos ativados (LU et al., 2015).

Diferentemente, verificamos níveis séricos elevados e alta expressão gênica do receptor sST2 nos portadores de HBC, mas que não apresentou diferenças quando comparados aos controles. Também, não houve correlação dos níveis séricos do sST2 com os de IL-33, nem houve correlação entre os níveis séricos deste receptor com as aminotransferases, carga viral, fibrose e marcadores de autoimunidade. Vários estudos têm mostrado níveis circulantes elevados do sST2 em diferentes patologias, porém, a principal fonte desse receptor ainda não está totalmente esclarecida (DIEPLINGER; MUELLER, 2015). Alguns autores apontam que as principais fontes secretoras do sST2 são fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos, em resposta ao estresse ou lesão, e também, células endoteliais (VILLACORTA; MAISEL, 2016). No nosso estudo, documentamos expressão gênica significativa do sST2 em células do sangue periférico.

Foi demonstrado que a IL-33 parece regular a transcrição de mRNA do ST2L e sST2; e quanto maior for a expressão da IL-33, maior será a expressão do seu receptor ligante e menor

será a expressão do receptor/bloqueador solúvel (PASCUAL-FIGAL; JANUZZI, 2015). Portanto, deduzimos que a expressão mais elevada do sST2 possa ser reflexo da menor expressão do mRNA da IL-33 que detectamos em células do sangue periférico.

Embora a produção *ex vivo* da IL-33, induzida por antígenos do VHB (Core e AgHBs), tenha sido pouco expressiva, os pacientes com HBC produziram mais desta citocina do que os controles sadios. É possível que a baixa produção de IL-33 *ex vivo* seja devido ao baixo número de células potencialmente envolvidas na liberação desta citocina, como também, às condições de cultura que preservam a integridade celular. Diferentemente, o receptor sST2 foi produzido de forma mais expressiva *ex vivo*, apresentando também níveis significativamente mais elevados nos pacientes com HBC quando comparados aos controles sadios. Neste caso, é possível que os pacientes estejam com uma tendência maior para síntese deste receptor. Nossos dados são corroborados por outros trabalhos que demonstram níveis mais elevados do sST2 na HBC e que não são correlacionados com os níveis de IL-33 (MEHRAJ; PONTE; ROUTY, 2016).

Crioglobulinemia e autoanticorpos órgão-específicos (NOSA) são achados frequentes na hepatite C crônica, porém, tais marcadores de autoimunidade são pouco relatados na infecção crônica pelo VHB (LI et al., 2016). Nos pacientes avaliados neste trabalho, não detectamos a presença de crioglobulinemia e poucos deles apresentaram NOSA, sendo mais significativo a presença de anticorpos antimúsculo liso. Embora o eixo IL-33/ST2 tenha sido relacionado a algumas doenças autoimunes (KUROIWA et al., 2001; PALMER; GABAY, 2011), não detectamos qualquer associação dos marcadores de autoimunidade investigados com a IL-33 ou com o sST2.

Concluindo, mostramos que a expressão gênica e os níveis séricos da IL-33, mas não do sST2, são mais elevados em pacientes com hepatite B crônica, havendo associação com desenvolvimento de fibrose, mas não apresenta associação com marcadores de autoimunidade.

5.5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. V et al. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. **European journal of immunology**, v. 41, n. 3, p. 760–72, mar. 2011.

BEHFARJAM, F. et al. Role of Th1/Th2 cells and related cytokines in autoimmune hepatitis. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 110–114, 2017.

BERGIS, D.; KASSIS, V.; RADEKE, H. H. High plasma sST2 levels in gastric cancer and their association with metastatic disease. **Cancer Biomarker**, v. 16, p. 117–125, 2016.

- BITTENCOURT, M. D. C.; PACZESNY, S. The ST2 / iL-33 Axis in immune Cells during inflammatory Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–17, 2017.
- BLOM, L.; POULSEN, L. K. IL-1 Family Members IL-18 and IL-33 Upregulate the Inflammatory Potential of Differentiated Human Th1 and Th2 Cultures. **The Journal of Immunology**, n. 189, p. 4331–4337, 2012.
- DENG, Y.-Q. et al. Selected Cytokines Serve as Potential Biomarkers for Predicting Liver Inflammation and Fibrosis in Chronic Hepatitis B Patients With Normal to Mildly Elevated Aminotransferases. **Medicine**, v. 94, n. 45, p. e2003, 2015.
- DIEPLINGER, B.; MUELLER, T. Soluble ST2 in heart failure. **Clinica Chimica Acta**, v. 443, p. 57–70, 2015.
- FUSS, I. J. et al. **Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord BloodCurrent Protocols in Immunology**, 2009.
- HARALDSEN, G. et al. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? **Trends in immunology**, v. 30, n. 5, p. 227–33, maio 2009.
- HODZIC, Z. et al. Cytokine IL-33 and the intestine: The good, the bad, and the inflammatory. **Cytokine**, v. 100, p. 1-10, June, 2017.
- KUROIWA, K. et al. Identification of Human ST2 Protein in the Sera of Patients with Autoimmune Diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, n. 5, p. 1104–1108, 2001.
- LEI, Z. et al. Soluble ST2 Plasma Concentrations Predict Mortality in HBV-Related Acute-on-Chronic Liver Failure. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- LI, Y. et al. 2016 Hepatocellular Carcinoma : Global view Hepatocellular carcinoma and hepatitis B surface protein. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 6, p. 1943–1952, 2016.
- LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 103–110, fev. 2010.
- LU, J. et al. The role of IL-33/ST2L signals in the immune cells. **Immunology Letters**, v. 164, n. 1, p. 11–17, 2015.
- MARVIE, P. et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6B, p. 1726–39, 2010.
- MAUSS, S. et al. **Hepatology**. v. 1, n. 7, p. 197–207, 2016.
- MEHRAJ, V.; PONTE, R.; ROUTY, J. P. The Dynamic Role of the IL-33/ST2 Axis in Chronic Viral-infections: Alarming and Adjuvanting the Immune Response. **EBioMedicine**, v. 9, p. 37–44, 2016.
- NOEL, G. et al. Ablation of interaction between IL-33 and ST2+ regulatory T cells increases immune cell-mediated hepatitis and activated NK cell liver infiltration. *American journal of physiology*. **Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 311, n. 2, p. G313-23, 2016.
- OZTAS, E. et al. Can Serum ST2 Levels Be Used as a Marker of Fibrosis in Chronic Hepatitis B Infection ? **Medicine**, v. 94, n. 47, p. 1–8, 2015.
- PALMER, G.; GABAY, C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 6, p. 321–329, 2011.

- PASCUAL-FIGAL, D. A. et al. Clinical relevance of sST2 in cardiac diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 54, n. 1, p. 29–35, 2016.
- PASCUAL-FIGAL, D. A.; JANUZZI, J. L. The biology of ST2: The international ST2 consensus panel. **American Journal of Cardiology**, v. 115, n. 7, p. 3B–7B, 2015.
- PASTORELLI, L. et al. The role of IL-33 in gut mucosal inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.
- REBL, A. et al. ST2 from rainbow trout quenches TLR signalling, localises at the nuclear membrane and allows the nuclear translocation of MYD88. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 67, p. 139–152, 2017.
- ROTH, G. A. et al. Up-Regulation of Interleukin 33 and Soluble ST2 Serum Levels in Liver Failure. **Journal of Surgical Research**, v. 163, n. 2, p. e79–e83, 2010.
- SCHIERING, C. et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 564–8, 25 set. 2014.
- TRÉPO, C.; CHAN, H. L. Y.; LOK, A. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**, v. 384, n. 9959, p. 2053–2063, 2014.
- VERMEERSCH, P. et al. A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins. **Clin Chem**, v. 54, n. 1, p. 39–43, 2008.
- VILLACORTA, H.; MAISEL, A. S. Soluble ST2 Testing: A Promising Biomarker in the Management of Heart Failure. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 106, n. 2, p. 145–52, 2016.
- WANG, J. et al. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis B. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 32, n. 6, p. 248–53, 2012.
- WEISKIRCHEN, R.; TACKE, F. Interleukin-33 in the pathogenesis of liver fibrosis: alarming ILC2 and hepatic stellate cells. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, n. 2, p. 143–145, 2016.
- YANG, Y. et al. Role of IL-33 expression in oncogenesis and development of human hepatocellular carcinoma. **Oncology Letters**, v. 12, n. 1, p. 429–436, 2016.
- YIN, L.; HIROHITO, D. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. **Immunological Reviews**, v. 278, p. 173–184, 2017.

6 CONCLUSÃO GERAL

- Níveis séricos da IL-33 estão mais elevados nas hepatites virais B e C, independente dos níveis também mais elevados do sST2.
- A expressão gênica da IL-33 está mais elevada na hepatite B crônica;
- A associação da IL-33 com fibrose hepática e elevação das aminotransferases sugerem papel profibrogênico desta citocina nessas hepatites.
- O eixo IL-33/ST2 não parece contribuir significativamente para as manifestações de autoimunidade encontradas nas hepatites B e C.
- A manipulação da via IL-33/ST2 pode representar uma nova estratégia terapêutica promissora para o tratamento ou prevenção da fibrose hepática encontrada nessas hepatites virais.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL, W.; HEGAZY, H.; HENAWY, M. A. Hepatitis C virus pathogenesis : Serum IL-33 level indicates liver damage. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 9, n. 20, p. 1386–1393, 2015.
- AFONINA, I. S. et al. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. **Immunity**, v. 42, n. 6, p. 991–1004, 2015.
- AIT-GOUGHOLTE, M. et al. Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. **Viruses**, v. 2, n. 7, p. 1394–1410, 2010.
- ANDRADE, M. V et al. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. **European journal of immunology**, v. 41, n. 3, p. 760–72, mar. 2011.
- ARMBRUST, THOMAS; BATUSIC, DANKO; RINGE, BURKHARDT; RAMADORI, G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 26, n. 5, p. 1042–1054, 1997.
- ARSHAD, M. I.; PIQUET-PELLORCE, C.; SAMSON, M. IL-33 and HMGB1 alarmins : sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. **Liver International**, v. 32, n. 8, p. 1200–1210, 2012.
- ATES, I. et al. Elevated circulating sST2 associated with subclinical atherosclerosis in newly diagnosed primary hypertension. **Hypertension Research**, n. 2016, p. 1–6, 2016.
- BAEKKEVOLD, E. S. et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. **The American journal of pathology**, v. 163, n. 1, p. 69–79, 2003.
- BARROS, S. A. G. **Implementação da vacinação contra hepatite B em indivíduos da faixa etária de 11 a 19 anos, residentes no município de São José do Belmonte – PE.** [s.l.] Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v. 24, p. 289–293, 1996.
- BEHFARJAM, F. et al. Role of Th1/Th2 cells and related cytokines in autoimmune hepatitis. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 110–114, 2017.
- BELL, B. D. et al. The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. **Nature immunology**, v. 14, n. 4, p. 364–71, abr. 2013.
- BERGIS, D.; KASSIS, V.; RADEKE, H. H. High plasma sST2 levels in gastric cancer and their association with metastatic disease. **Cancer Biomarker**, v. 16, p. 117–125, 2016.
- BERTHELOOT, D.; LATZ, E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. **Cellular & molecular immunology**, v. 14, n. February, p. 1–22, 2016.
- BEZERRA, C. A.; OLIVEIRA, J. S. DE. Comparação do interferon alfa convencional com o interferon alfa peguilado no tratamento de pacientes com hepatite C crônica. **ConScientiae Saúde**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2007.
- BITTENCOURT, M. D. C.; PACZESNY, S. The ST2 / iL-33 Axis in immune Cells during inflammatory Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–17, 2017.
- BLOM, L.; POULSEN, L. K. IL-1 Family Members IL-18 and IL-33 Upregulate the Inflammatory Potential of Differentiated Human Th1 and Th2 Cultures. **The Journal of**

Immunology, n. 189, p. 4331–4337, 2012.

BLUM, H. E. History and Global Burden of Viral Hepatitis. **Digestive diseases (Basel, Switzerland)**, v. 34, n. 4, p. 293–302, 2016.

BOLTJES, A. et al. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 660–671, 2014.

BOWEN, D. G.; WALKER, C. M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 946–952, 2005.

BOWIE, A. G.; UNTERHOLZNER, L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 911–922, 2008.

BRANDÃO, A. B. D. M. et al. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 9, n. 3, p. 161–168, 2001.

BRASIL. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação**. [s.l.: s.n.].

BRASIL. **Hepatites virais**. [s.l.: s.n.]. v. 1

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Brasília: [s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções**. 1ª ed. Brasília: [s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções**. Brasília: [s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. PROGRAMA NACIONAL PARA A PREVENÇÃO E O CONTROLE DAS HEPATITES VIRAIS. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Brasília: [s.n.].

BRASS, V.; MORADPOUR, D.; BLUM, H. E. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. v. 3, n. 2, p. 29–34, 2006.

BURKE, K. P.; COX, A. L. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1–3, p. 216–227, 2010.

BUTI, M.; HOMS, M. Nuevos agentes para el tratamiento de la hepatitis C. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 3, p. 147–150, 2012.

CACOUB, P. et al. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 3–14, p. S165–S173, 2016.

CARRIERE, V. et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 1, p. 282–287, 2007.

CAYROL, C.; GIRARD, J. P. IL-33: An alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. **Current Opinion in Immunology**, v. 31, p. 31–37, 2014.

CHACKERIAN, A. A et al. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. **Journal of immunology**, v. 179, n. 4, p. 2551–2555, 2007.

CHERRY, W. B. et al. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human

- eosinophils. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 121, n. 6, p. 1484–90, jun. 2008.
- CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 244, n. 4902, p. 359–62, 21 abr. 1989.
- CHU, C.-J.; LOK, A. S. F. Hepatitis B virus genotypes and molecular variants. p. 1–20, 2015.
- CHUI, S. H. et al. Prevalence of hepatitis B genotype and viral basic core promoter and precore mutations among teenagers in Macao: relationship with hepatocellular carcinoma development. **British journal of biomedical science**, v. 68, n. 3, p. 143–6, jan. 2011.
- CHURIN, Y.; RODERFELD, M.; ROEB, E. Hepatitis B virus large surface protein: function and fame. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 4, n. 1, p. 1–10, fev. 2015.
- COOK, N. A.; TAYLOR-ROBINSON, S. D. Hepatitis C treatment : where are we now ? **International Journal of General Medicine**, p. 39–52, 2017.
- DANE, D. S.; CAMERON, C. H.; BRIGGS, M. Virus-Like Particles in Serum of Patients With Australia-Antigen-Associated Hepatitis. **The Lancet**, v. 295, n. 7649, p. 695–698, 1970.
- DE LA FUENTE, M.; MACDONALD, T. T.; HERMOSO, M. A. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 6, p. 615–623, 2015.
- DE VIRGILIO, A. et al. Polyarteritis nodosa: A contemporary overview. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 6, p. 564–570, 2016.
- DELVES, P. J. et al. **Roitt's Essential Immunology - the textbook of choice for students and instructors of immunology worldwide**. [s.l: s.n.].
- DENG, Y.-Q. et al. Selected Cytokines Serve as Potential Biomarkers for Predicting Liver Inflammation and Fibrosis in Chronic Hepatitis B Patients With Normal to Mildly Elevated Aminotransferases. **Medicine**, v. 94, n. 45, p. e2003, 2015.
- DIEPLINGER, B.; MUELLER, T. Soluble ST2 in heart failure. **Clinica Chimica Acta**, v. 443, p. 57–70, 2015.
- EL-SERAG, H. B. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**, v. 142, n. 6, p. 1264–1273.e1, 2012.
- FABRIZI, F.; DONATO, F.; MESSA, P. Association between hepatitis B virus and chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 21–47, 2017.
- FERRARI, C. HBV and the immune response. **Liver International**, v. 35, n. s1, p. 121–128, 2015.
- FERREIRA, A. R. et al. Hepatitis C virus NS3-4A inhibits the peroxisomal MAVS-dependent antiviral signalling response. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, n. 4, p. 750–757, 2016.
- FONSECA, J. Natural history of chronic hepatitis B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 672–677, 2007.
- FUNAKOSHI-TAGO, M. et al. TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. **Cellular signalling**, v. 20, n. 9, p. 1679–86, 2008.
- FUSS, I. J. et al. **Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood Current Protocols in Immunology**, 2009.
- GAO, Q.; LI, Y.; LI, M. The potential role of IL-33 / ST2 signaling in fibrotic diseases. **J Leukoc Biol**, v. 98, n. July, p. 1–8, 2015.

- GODKIN, A.; SMITH, K. A. Chronic infections with viruses or parasites: breaking bad to make good. **Immunology**, p. 389–396, 2016.
- GOENKA, S.; KAPLAN, M. H. Transcriptional regulation by STAT6. **Immunologic research**, v. 50, n. 1, p. 87–96, maio 2011.
- GRAKOU, A.; CRISPE, I. N. Presentation of hepatocellular antigens. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. November 2015, p. 1–8, 2016.
- HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G. J. Epidemiology and natural history of HCV infection. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 9, p. 553–62, 2013.
- HARALDSEN, G. et al. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? **Trends in immunology**, v. 30, n. 5, p. 227–33, maio 2009.
- HEINTGES, T.; WANDS, J. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. **Hepatology**, p. 1–6, 1997.
- HELLE, F.; DUVERLIE, G.; DUBUISSON, J. The hepatitis C virus glycan shield and evasion of the humoral immune response. **Viruses**, v. 3, n. 10, p. 1909–1932, 2011.
- HO, J. E. et al. Soluble ST2 testing in the general population. **American Journal of Cardiology**, v. 115, n. 7, p. 22B–25B, 2015.
- HODZIC, Z. et al. Cytokine IL-33 and the intestine: The good, the bad, and the inflammatory. **Cytokine**, v. 100, n. June, p. 1–10, 2017.
- HONG, J. et al. Identification of constitutively active interleukin 33 (IL-33) splice variant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 22, p. 20078–20086, 2011.
- HORNER, S. M.; GALE, M. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 879–88, 2013.
- HSU, C.-L.; NEILSEN, C. V.; BRYCE, P. J. IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation. **PloS one**, v. 5, n. 8, p. e11944, 2010.
- HUI, C. K. et al. Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase. **Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 395–401, 2007.
- IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 5, p. 1218–22, 1 maio 2006.
- IWASAKI, A. et al. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 343–353, 2015.
- KAKKAR, R.; LEE, R. T. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 10, p. 827–40, 1 out. 2008.
- KAYE, D. M. et al. Determinants and implications of elevated soluble ST2 levels in heart failure. **International Journal of Cardiology**, v. 176, n. 3, p. 1242–1243, 2014.
- KEEFFE, E. B. et al. A Treatment Algorithm for the Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection in the United States: An Update. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 8, p. 936–962, 2006.
- KEEFFE, E. B. et al. A Treatment Algorithm for the Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection in the United States: 2008 Update. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, n. 12, p. 1315–1341, 2008.
- KIM, H. et al. Hepatitis C Virus Impairs Natural Killer Cell-Mediated Augmentation of Complement Synthesis. **Journal of Virology**, v. 88, n. 5, p. 2564–2571, 2014.
- KRETZER, I. F. et al. Hepatitis C worldwide and in Brazil: Silent epidemic - Data on disease

- including incidence, transmission, prevention, and treatment. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–10, 2014.
- KUROIWA, K. et al. Identification of Human ST2 Protein in the Sera of Patients with Autoimmune Diseases. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 284, n. 5, p. 1104–1108, 2001.
- KWAK, A. et al. Intracellular interleukin (IL)-1 family cytokine processing enzyme. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 11, p. 1556–1564, 2016.
- LAM, V. C.; LANIER, L. L. NK cells in host responses to viral infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 44, p. 43–51, 2017.
- LAMONTAGNE, J.; BAGGA, S.; BOUCHARD, M. J. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. **Hepatoma Res**, v. 33, n. 2, p. 163–186, 2016.
- LAVANCHY, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 2, p. 107–115, 2011.
- LEFRANÇAIS, E.; CAYROL, C. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: Differences and similarities between IL-1 family members. **European Cytokine Network**, v. 23, n. 4, p. 120–127, 2012.
- LEI, Z. et al. Soluble ST2 Plasma Concentrations Predict Mortality in HBV-Related Acute-on-Chronic Liver Failure. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- LI, R. et al. Interleukin-33 and receptor ST2 as indicators in patients with asthma : a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med.**, v. 8, n. 9, p. 14935–14943, 2015.
- LI, Y. et al. 2016 Hepatocellular Carcinoma : Global view Hepatocellular carcinoma and hepatitis B surface protein. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 6, p. 1943–1952, 2016.
- LIAW, Y.-F. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. **Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver**, v. 29 Suppl 1, n. 5, p. 100–107, 2009.
- LIEW, F. Y. IL-33: a Janus cytokine. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 71 Suppl 2, n. Suppl II, p. i101-4, 2012.
- LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 2, p. 103–110, fev. 2010.
- LISBOA, A. et al. Hepatites virais : B , C e D : atualização *. **Rev Bras Clin Med.**, v. 10, n. 3, 2012.
- LOK, A. S. F.; MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B: Update of recommendations. **Hepatology**, v. 39, n. 3, p. 857–861, 2004.
- LOPES, T. G. S. L.; SCHINONI, M. I. Aspectos gerais da hepatite B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, p. 337–344, 2011.
- LOPETUSO, L. R.; SCALDAFERRI, F.; PIZARRO, T. T. Emerging role of the interleukin (IL)-33/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. **Fibrogenesis & tissue repair**, v. 5, n. 1, p. 18, jan. 2012.
- LU, J. et al. The role of IL-33/ST2L signals in the immune cells. **Immunology Letters**, v. 164, n. 1, p. 11–17, 2015.
- LU, T. et al. Prevention of hepatocellular carcinoma in chronic viral hepatitis B and C infection. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 19, n. 47, p. 8887–94, 2013.

- LUCIFORA, J.; ZOULIM, F. The life cycle of hepatitis B virus and antiviral targets. p. 599–614, 2011.
- MAASOUMY, B.; WEDEMEYER, H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 26, n. 4, p. 401–12, 2012.
- MAGOMBEDZE, G. et al. Cellular and population plasticity of helper CD4+ T cell responses. **Frontiers in Physiology**, v. 4 AUG, n. August, p. 1–9, 2013.
- MAJUMDAR, A.; KITSON, M. T.; ROBERTS, S. K. Systematic review: Current concepts and challenges for the direct-acting antiviral era in hepatitis C cirrhosis. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, n. 12, p. 1276–1292, 2016.
- MANNS, M. P. et al. Hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17006, 2017.
- MARTIN, N. T.; MARTIN, M. U. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. **Nature Immunology**, v. 17, n. 2, p. 122–131, 2016.
- MARVIE, P. et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 6B, p. 1726–39, 2010.
- MATHERN, D. R.; HEEGER, P. S. Molecules great and small: The complement system. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 9, p. 1636–1650, 2015.
- MATSUYAMA, Y. et al. Increased Levels of Interleukin 33 in Sera and Synovial Fluid from Patients with Active Rheumatoid Arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 37, n. 1, p. 18–25, 1 jan. 2010.
- MAUSS, S. et al. *Hepatology*. v. 1, n. 7, p. 197–207, 2016.
- MCHEDLIDZE, T. et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 357–371, 2014.
- MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B virus infection. **Medical Clinics of North America**, v. 98, n. 1, p. 39–54, 2014.
- MEHRAJ, V.; PONTE, R.; ROUTY, J. P. The Dynamic Role of the IL-33/ST2 Axis in Chronic Viral-infections: Alarming and Adjuvanting the Immune Response. **EBioMedicine**, v. 9, p. 37–44, 2016.
- MESSINA, J. P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77–87, 2015.
- MILLER, A. M. Role of IL-33 in inflammation and disease. **Journal of Inflammation**, v. 8, n. 1, p. 22, 2011.
- MILLER, A. M.; LIEW, F. Y. The IL-33/ST2 pathway - A new therapeutic target in cardiovascular disease. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 131, n. 2, p. 179–186, 2011.
- MILOVANOVIC, M.; VOLAREVIC, V. IL-33 / ST2 axis in inflammation and immunopathology. **Immunology in Serbia**, v. 52, p. 89–99, 2012.
- MINAMI, T. et al. Comparison of improved prognosis between hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. **Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology**, 6 jan. 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Normas de Vacinação. **Manual de Normas de Vacinação**, v. 1, p. 72, 2001.
- MOK, M. Y. et al. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 49, n. 3, p.

520–527, 2010.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 453–463, 2007.

MORENO-CUBERO, E.; LARRUBIA, J.-R. Specific CD8(+) T cell response immunotherapy for hepatocellular carcinoma and viral hepatitis. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 28, p. 6469–83, 2016.

MOULIN, D. et al. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. **Cytokine**, v. 40, n. 3, p. 216–225, 2007.

MUELLER, T.; JAFFE, A. S. Soluble ST2 — Analytical Considerations. **The American Journal of Cardiology**, v. 115, n. 7, p. 8B–21B, 2015.

NOEL, G. et al. Ablation of interaction between IL-33 and ST2+ regulatory T cells increases immune cell-mediated hepatitis and activated NK cell liver infiltration. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 311, n. 2, p. G313-23, 2016.

OBOKI, K. et al. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. **Allergy international : official journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 59, n. 2, p. 143–60, jun. 2010.

OLSEN, J. L. Polymerase Chain Reaction. In: **Encyclopedia of Immunotoxicology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016. p. 715–720.

ONDA, H. et al. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, n. 11, p. 1279–88, 1999.

OSHIKAWA, K. et al. Expression of ST2 in Helper T Lymphocytes of Malignant Pleural Effusions. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, n. 23, p. 1005–1009, 2002.

OSHIO, T. et al. Nuclear expression of IL-33 in epidermal keratinocytes promotes wound healing in mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 85, n. 2, p. 106–114, fev. 2017.

OTT, J. J.; STEVENS, G. A; WIERSMA, S. T. The risk of perinatal hepatitis B virus transmission: hepatitis B e antigen (HBeAg) prevalence estimates for all world regions. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 131, jan. 2012.

OZTAS, E. et al. Can Serum ST2 Levels Be Used as a Marker of Fibrosis in Chronic Hepatitis B Infection ? **Medicine**, v. 94, n. 47, p. 1–8, 2015.

PALMER, G.; GABAY, C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 6, p. 321–329, 2011.

PAN, C. Q.; ZHANG, J. X. Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis B Virus Infection. **Int J Med Sci**, v. 2, n. 1, p. 36–40, 2005.

PARK, S.; REHERMANN, B. Review Immune Responses to HCV and Other Hepatitis Viruses. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 13–24, 2014.

PASCUAL-FIGAL, D. A. et al. Clinical relevance of sST2 in cardiac diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 54, n. 1, p. 29–35, 2016.

PASCUAL-FIGAL, D. A.; JANUZZI, J. L. The biology of ST2: The international ST2 consensus panel. **American Journal of Cardiology**, v. 115, n. 7, p. 3B–7B, 2015.

PASTORELLI, L. et al. The role of IL-33 in gut mucosal inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

- PAUL, W. E.; ZHU, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225–35, abr. 2010.
- PEDROTO, I. M. T. DE C. Hepatites víricas. In: **VIIH/sida e Hepatites Víricas**. Faculdade ed. Lisboa: [s.n.]. p. 174.
- PEREIRA, L. M. M. B. et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 2, p. 240–7, ago. 2009.
- PERES, A.; SILVA, D. A. **ALLAN PERES DA SILVA Rio de Janeiro Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz**. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, 2014.
- PREVALENCE, A.; SILVA, I. Prevalência de infecção pelos vírus das hepatites A , B , C e D na demanda de um hospital no Município de Juruti , oeste do Estado do Pará , Brasil. **Rev Pan-Amaz Saud**, v. 55, n. 91, p. 105–111, 2010.
- QUEIROZ, G. A. et al. IL33 and IL1RL1 variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population. **International journal of immunogenetics**, v. 44, n. 2, p. 51–61, 2017.
- QURESHI, S. A. Hepatitis C virus—biology, host evasion strategies, and promising new therapies on the horizon. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 3, p. 353–373, 2007.
- RANGLACK, A. et al. High Serum Levels of the Interleukin-33 Receptor Soluble ST2 as a Negative Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. **Translational Oncology**, v. 6, n. 3, p. 311–318, 2013.
- REBL, A. et al. ST2 from rainbow trout quenches TLR signalling, localises at the nuclear membrane and allows the nuclear translocation of MYD88. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 67, p. 139–152, 2017.
- REHERMANN, B.; BERTOLETTI, A. Immunological aspects of antiviral therapy of chronic hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. **Hepatology**, v. 61, n. 2, p. 712–721, 2015.
- REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 3, p. 215–229, 2005.
- RIDER, P. et al. Interleukin-1 α . **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 430–438, 2013.
- ROSTAN, O. et al. Crucial and diverse role of the interleukin-33/ST2 axis in infectious diseases. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 1738–1748, 2015.
- ROTH, G. A. et al. Up-Regulation of Interleukin 33 and Soluble ST2 Serum Levels in Liver Failure. **Journal of Surgical Research**, v. 163, n. 2, p. e79–e83, 2010.
- SAXENA, R.; KAUR, J. Th1/Th2 cytokines and their genotypes as predictors of hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 11, p. 1572–1580, 2015.
- SCHEEL, T. K. H.; RICE, C. M. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 837–49, 2013.
- SCHIERING, C. et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 564–8, 25 set. 2014.
- SCHMIEDER, A.; MÜLTHOFF, G.; RADONS, J. Cytokine Interleukin-33 acts as a pro-inflammatory cytokine and modulates its receptor gene expression in highly metastatic human pancreatic carcinoma cells. **Cytokine**, v. 60, n. 2, p. 514–521, 2012.
- SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479–90, nov. 2005.

- SEKI, E.; SCHWABE, R. F. Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional Links and Key Pathways. **Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 1066–1079, 2015.
- SHARMA, S. D. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. **The Indian journal of medical research**, v. 131, n. January, p. 17–34, 2010.
- SHEPARD, C. W. et al. Hepatitis B virus infection: Epidemiology and vaccination. **Epidemiologic Reviews**, v. 28, n. 1, p. 112–125, 2006.
- SHUAI, Z. et al. Adaptive immunity in the liver. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 13, n. 3, p. 354–368, 2016.
- SMITHGALL, M. D. et al. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th 2 cells, iNKT and NK Cells. **International Immunology**, v. 20, n. 8, p. 1019–1030, 2008.
- SOLEDAD, M. et al. Aspectos moleculares de la respuesta antiviral contra el virus de la hepatitis C importantes para el desarrollo de vacunas. v. 33, n. 4, p. 273–280, 2015.
- STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]**, v. 111, n. November, p. 1–3, 2015.
- SUZUKI, T. et al. Molecular biology of hepatitis C virus. **Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 6, p. 411–423, 2007a.
- SUZUKI, T. et al. Hepatitis C viral life cycle. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 12, p. 1200–12, 10 out. 2007b.
- SZABO, G.; DOLGANIUC, A. HCV Immunopathogenesis: Virus-Induced Strategies against Host Immunity. **Clinics in Liver Disease**, v. 10, n. 4, p. 753–771, 2006.
- TALABOT-AYER, D. et al. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 29, p. 19420–19426, 2009.
- TERRAULT, N. A. et al. PRACTICE GUIDELINE AASLD Guidelines for Treatment of Chronic Hepatitis B. **Hematology**, v. 63, n. 1, p. 261–283, 2016.
- THEOHARIDES, T. C. et al. Targeting IL-33 in autoimmunity and inflammation. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 354, n. 1, p. 24–31, 2015.
- THOMSON, B. J.; FINCH, R. G. Hepatitis C virus infection. **Medical Progress**, v. 345, n. 1, p. 41–52, 2001.
- TOMINAGA, S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/C-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. **FEBS Letters**, v. 258, n. 2, p. 301–304, 1989.
- TRÉPO, C.; CHAN, H. L. Y.; LOK, A. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**, v. 384, n. 9959, p. 2053–2063, 2014.
- VALSAMAKIS, A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 426–439, 2007.
- VENNER, A.; KISTIN, M. The clinical course of acute hepatitis C. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 59, n. 3, p. 543–545, 2014.
- VERMEERSCH, P. et al. A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins. **Clin Chem**, v. 54, n. 1, p. 39–43, 2008.
- VILLACORTA, H.; MAISEL, A. S. Soluble ST2 Testing: A Promising Biomarker in the Management of Heart Failure. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 106, n. 2, p. 145–52, 2016.

- VILLENEUVE, J.-P. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 34 Suppl 1, p. S139-42, 2005.
- WANG, J. et al. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis C. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012a.
- WANG, J. et al. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis B. **Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 32, n. 6, p. 248–53, 2012b.
- WEISKIRCHEN, R.; TACKE, F. Interleukin-33 in the pathogenesis of liver fibrosis: alarming ILC2 and hepatic stellate cells. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, n. 2, p. 143–145, 2016.
- WHO. **Global policy report on the prevention and control of viral hepatitis**. Geneva: World Health Organization, 2013.
- WHO. **Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014.
- WIELAND, S. F.; CHISARI, F. V. Stealth and Cunning: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses. **The Journal of Virology**, v. 79, n. 15, p. 9369–9380, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection. **Guidelines**, n. April, p. 124, 2014.
- WYNN, T. A; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature medicine**, v. 18, n. 7, p. 1028–40, 2012.
- YAN, H. et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. **eLife**, v. 1, p. e00049, jan. 2012.
- YANG, Q. et al. IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8 + T cells. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 11, p. 3351–3360, 2011.
- YANG, Y. et al. Role of IL-33 expression in oncogenesis and development of human hepatocellular carcinoma. **Oncology Letters**, v. 12, n. 1, p. 429–436, 2016.
- YIN, L.; HIROHITO, D. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. **Immunological Reviews**, v. 278, p. 173–184, 2017.
- YOSHIO, S.; KANTO, T. Host – virus interactions in hepatitis B and hepatitis C infection. **Journal of Gastroenterology**, p. 1–7, 2016.
- YOUNOSSI, Z. et al. Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. **Gastroenterology**, v. 150, n. 7, p. 1599–1608, jun. 2016.
- ZHAO, Q.; CHEN, G. Role of IL-33 and its receptor in T cell-mediated autoimmune diseases. **BioMed research international**, v. 2014, p. 587376, 2014.
- ZHU, J.; CARVER, W. Effects of interleukin-33 on cardiac fibroblast gene expression and activity. **Cytokine**, v. 58, n. 3, p. 368–79, jun. 2012.
- ZOULIM, F.; LOCARNINI, S. Management of treatment failure in chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v. 56, p. S112–S122, 2012.

8 ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do papel da IL-33 e do respectivo receptor ST2 nas hepatites crônicas por vírus hepatotrópicos (B e C)

Pesquisador: Maria Luiza Brito de Sousa Atta

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30906114.3.0000.5531

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 741.170

Data da Relatoria: 13/08/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo caso-controle a ser realizado com pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites do Complexo Hospitalar HUPES, e que visa avaliar o possível papel da Interleucina-33 (IL-33) e seu respectivo receptor ST2 em sangue periférico e em cultura de células mononucleares do sangue periférico, de indivíduos portadores de infecção crônica pelos vírus da hepatite B e C e sua relação com as características clínicas de cada doença. Este protocolo de pesquisa foi analisado pelo CEP e recebeu parecer Substanciado CEP n. 663.291, com pendências do TCLE, do texto do item "riscos" no protocolo de pesquisa e da definição do desenho do estudo, a fim de atender aos requisitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar o papel da Interleucina-33 e seu receptor ST2 nas hepatites crônicas pelos vírus hepatotrópicos HBV e HCV.

Objetivo Secundário:

I. Avaliar quantitativamente a produção de IL-33 e ST2 em indivíduos portadores de hepatites crônicas pelos

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar

Bairro: Canela

CEP: 41.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7615

Fax: (71)3283-7615

E-mail: cepee.ufba@ufba.br

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



Continuação do Parecer: 741.170

vírus hepatotrópicos HBV, HBV/HDV e HCV e em indivíduos curados espontaneamente para as hepatites B e C;II. Associar a relação IL-33/ST2 dos indivíduos com as respectivas características clínicas de cada hepatite viral;III. Comparar a relação IL-33/ST2 entre as hepatites virais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O item "riscos" foi ajustado com detalhadas informações sobre o procedimento da coleta de sangue prevista no estudo. O texto parece adequado para atender os requisitos da resolução 466/12 do CNS.

O item "benefícios" não necessitou ser modificado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foram atendidas todas pendências apontadas no parecer Consubstanciado do CEP n.663.291. Ressalta-se que o TCLE foi devidamente ajustado, especialmente no que diz respeito à linguagem utilizada no texto e informações sobre o procedimento de coleta de sangue.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados.

Recomendações:

não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram atendidas as pendências apontadas no parecer Consubstanciado do CEP n.663.291 e, portanto, considera-se que a pesquisa tem condições de aprovação pelo CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A plenária homologa o parecer de APROVAÇÃO emitido pelo relator.

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar

Bairro: Canela

CEP: 41.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7615

Fax: (71)3283-7615

E-mail: cepee.ufba@ufba.br

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



Continuação do Parecer: 741.170

SALVADOR, 06 de Agosto de 2014

Assinado por:
KARINA ARAUJO PINTO
(Coordenador)

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Você está sendo convidado para participar da Pesquisa “Avaliação do papel da IL-33 e do respectivo receptor ST2 nas hepatites crônicas por vírus hepatotrópicos (B e C)”, sob a responsabilidade da Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta, Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia e Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa em Imunologia (LAPIM), que tem como objetivo investigar o possível papel de uma proteína do sangue chamada de Interleucina-33 (IL-33), que foi identificada há poucos anos, e de outra proteína que serve para a sua ligação nas células conhecida como ST2, em portadores de hepatite B ou da hepatite C crônica, visando obter informações sobre a sua relação com as manifestações clínicas destas infecções (exemplos: carga viral, fibrose hepática). O estudo dessas proteínas poderá contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento ou prevenção de várias doenças, como as hepatites virais crônicas. Nesta pesquisa também serão incluídos dois grupos de indivíduos curados espontaneamente para as hepatites B ou C (grupos controles), que também doarão uma amostra de sangue possibilitando comparação dos resultados laboratoriais obtidos com os sangues dos pacientes com infecção não curada que participam da pesquisa.

A sua participação neste estudo é voluntária e se concordar em participar, acontecerá o seguinte: Você será encaminhado(a) para atendimento em caráter de PRIORIDADE na recepção do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia – LACTFAR, horário das 07:00-09:30h. A coleta do sangue será realizada por Técnico de Laboratório ou Profissional legalmente habilitado para sua realização, com a responsabilidade do LAPIM. Imediatamente antes da coleta do sangue, o(a) Técnico(a) identificará todo o material de coleta na sua presença e verificará se você está bem acomodado(a) na cadeira de coleta.

A retirada de sangue pode causar um leve desconforto, causado pela sensação dolorosa da penetração da agulha durante a punção da veia, porém, de curta duração, cerca de um minuto. Todo o processo da coleta de sangue seguirá procedimentos padrões para reduzir qualquer possibilidade de infecção para os voluntários da pesquisa, os profissionais envolvidos na coleta e as amostras. Será realizada a limpeza da pele na área da punção venosa com álcool a 70% (asepsia) e será usado material de coleta de sangue a vácuo. Após, será retirado uma pequena quantidade de sangue, equivalente a 20 mililitros, através de punção realizada em uma das veias do antebraço, para a realização de exames laboratoriais antes de ser iniciado o tratamento para a hepatite. Os grupos controles curados espontaneamente não são tratados.

Após a coleta, o Técnico realizará uma pequena pressão no local da punção com uma compressa, em geral, de 1 a 2 minutos, evitando-se, assim, a formação de hematomas e sangramentos, seguido da colocação de um curativo.

Se ocorrer a formação de um hematoma durante o procedimento, o torniquete será retirado imediatamente, assim como a agulha do antebraço. Em seguida, será aplicado uma compressa com gelo no local, por pelo menos dois minutos, para diminuir a dor e o hematoma.

Você deverá evitar dobrar o braço após a retirada da agulha e/ou carregar objetos relativamente pesados imediatamente após coleta, pois isto pode causar a formação de hematoma mesmo após uma coleta de sangue bem realizada.

Não haverá nenhum auxílio financeiro pela participação voluntária nesta pesquisa. O único benefício direto será a avaliação laboratorial acima informada, sem nenhum custo, cujos resultados cada participante o estudo terá acesso, se for da sua vontade. Os resultados poderão causar, ou não, novas medidas clínicas e/ou tratamentos pelos médicos responsáveis pelo seu acompanhamento.

Rubrica do participante

Rubrica do pesquisador

Os resultados dos seus exames de laboratório serão mantidos em total sigilo, preservando sua identidade e privacidade, sendo apenas conhecidos pela equipe que os realizou. Além disso, os resultados obtidos de todos os participantes deste estudo (de todos os pacientes juntos, sem que nenhum seja identificado individualmente) serão publicados em congressos e revistas médicas, contribuindo para o avanço do conhecimento científico das hepatites crônicas no Brasil, ajudando outros pacientes e a clínica médica. O arquivo com os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos, será mantido sob guarda da Pesquisadora Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta durante 5 anos, após o término da pesquisa. Passado esse tempo, o mesmo será mantido no banco de dados do LAPIM. Este protocolo será avaliado pelo CEP da Escola de Enfermagem da UFBA, onde você pode consultar a qualquer momento, no telefone 3283-7615, ou na Escola de Enfermagem, no endereço: Rua Augusto Viana, s/nº, 3º and., Canela, Salvador – BA, e-mail: cepee.ufba@ufba.br.

Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta

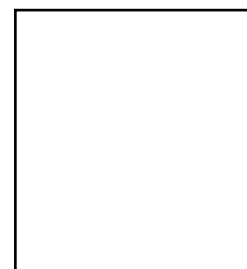
Consentimento Pós-Informação

A sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, tendo direito de recusar a participar. A recusa em participar deste estudo não causará nenhum prejuízo para sua assistência médica e terapêutica.

Considerando que compreendi claramente os riscos da coleta de sangue, dos benefícios que este estudo poderá trazer para pessoas nas mesmas condições em que eu estou, que não terei despesas, que não irei receber qualquer forma de remuneração, que não serei identificado(a) nas publicações desta pesquisa, e que concordei em aceitar o convite, assino as duas vias, ficando uma delas comigo e a outra com o pesquisador.

Salvador, / /

_____ RG: _____
Assinatura do participante ou responsável



Impressão do dedo polegar
caso não saiba assinar.

_____ RG: _____
Assinatura do pesquisador