



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

CAMILA SOUZA COSTA

**AVALIAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B EM
PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA**

Salvador, BA

2022

CAMILA SOUZA COSTA

**AVALIAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B EM
PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA**

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.
Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Santos Cardoso

Salvador, BA

2022

C837 Costa, Camila Souza.

Avaliação de subpopulações de linfócitos B em portadores de Hepatite C crônica/Camila Souza Costa. – Salvador, 2022.

84 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta; Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Santos Cardoso.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Hepatite C. 2. Linfócitos B. 3. Citometria de fluxo. 4. Imunorregulação.
I. Atta, Maria Luiza Brito de Sousa. II. Cardoso, Luciana Santos.
III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.36-002

Dedico este trabalho ao meu querido irmão Igor Souza Costa, *in memoriam*, pelo incentivo, por ser meu exemplo de vida e caráter e por não me deixar desistir mesmo diante das dificuldades. Aos meus amados pais pelo apoio diário e amor incondicional e ao meu marido e filho por serem meus grandes companheiros.

AGRADECIMENTOS

O principal agradecimento a Deus, que sempre me deu força e saúde para continuar mesmo com tantas dificuldades e pelo conforto e paz nos momentos de grande desânimo durante essa pandemia.

Aos meus pais, Vera Lucia Costa e Antonio Costa, por me apoiarem nos momentos mais difíceis, por serem minha base e pela formação do meu caráter.

Ao meu irmão, Igor Costa, *in memoriam*, que com suas atitudes me ensinou a jamais desistir, sempre será meu grande referencial. Agradeço pelo cuidado e amor de irmão mais velho e por ser inspiração eterna para mim.

Ao meu marido, Robert Neres, por ser meu grande incentivador, por me escutar, aconselhar e estar sempre ao meu lado vibrando com meu crescimento profissional e ao meu filhinho Lorenzo Neres, por me devolver a alegria de viver.

A toda minha família e amigos, pela dedicação e apoio em todos os momentos e por sempre acompanharem meu caminhar.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta, pela confiança em minha capacidade como pesquisadora desde o Mestrado, por não desistir de mim e pela paciência diante de tantos atrasos oriundos das mais diversas adversidades.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Luciana Santos Cardoso, por aceitar me auxiliar na pesquisa e ter feito isso com tanta dedicação, carinho e empenho. Agradeço por ter compartilhado seus conhecimentos comigo, pelo tempo dedicado e por me incentivar a persistir com a pesquisa.

Ao professor Ajax Mercês Atta pelo acolhimento no laboratório e pelos ensinamentos de Imunologia que contribuíram de forma incomensurável para meu desenvolvimento acadêmico.

Aos meus mestres, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIM / UFBA) que foram fundamentais para o meu crescimento profissional.

À Isabela Oliveira por sua amizade, pelo incentivo para conclusão desta tese e por me auxiliar durante toda pesquisa dedicando seu tempo livre para me apoiar.

À Atailza Silva por sua amizade e palavras de carinho nos momentos mais complicados, também pelo auxílio técnico durante a pesquisa.

Aos amigos do laboratório DILDA/LAPIM, em especial João Paulo Cotrim e Larissa Santana, por serem meus companheiros de estudos e de realização de experimentos.

Ao Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, pelo apoio financeiro através do Projeto CNPq/MST/INCT-DT, tornando possível a realização dos experimentos com citometria de fluxo.

Aos participantes voluntários da pesquisa, pois sem eles nenhum resultado aqui descrito seria possível.

À Dra. Maria Isabel Schinoni, pelo apoio ao projeto de pesquisa orientando quanto a seleção de pacientes.

Ao colega do PPGIM, Geraldo Pedral, pelos ensinamentos em Citometria de Fluxo.

À Universidade Federal da Bahia por me acolher como aluna desde o período da graduação em Farmácia.

Ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia (LACTFAR) por nos permitir o recrutamento de participantes da pesquisa e realização dos exames de sangue.

Ao Núcleo de Ensaios Clínicos da Bahia (NECBA) / HUPES e seus colaboradores por permitir e colaborar com a seleção de pacientes com hepatite C para esta pesquisa.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa durante todo o período de realização deste doutorado.

Quero agradecer a todos que participaram dessa trajetória, pessoas tão especiais que torceram por mim e não pouparam esforços para que essa vitória fosse alcançada.

"Se fosse preciso, começaria tudo outra vez do mesmo jeito, andando pelo mesmo caminho de dificuldades, pois a fé, que nunca me abandona, me daria forças para ir sempre em frente".

Santa Dulce dos Pobres

RESUMO

Introdução: A hepatite C crônica (HCC) é uma das principais causas de doença hepática em todo o mundo e a persistência do vírus da hepatite C, pode causar cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular, além de manifestações extra-hepáticas. Há poucos trabalhos publicados sobre a caracterização das subpopulações de linfócitos B (LB) na HCC, como também não tem sido ainda bem definido um papel patogênico claro na progressão da doença hepática e na resposta terapêutica. **Objetivo principal:** Investigar o perfil imunofenotípico (virgem, memória e regulatório) de linfócitos B em indivíduos com hepatite C crônica, pré-tratamento com antivirais de ação direta, correlacionando-os com outras subpopulações de linfócitos, dados virológicos e laboratoriais. **Metodologia:** Dez pacientes com HCC e dez indivíduos saudáveis participaram desse estudo. A caracterização imunofenotípica das subpopulações de LB e outras subpopulações linfocíticas do sangue periférico foram determinadas por citometria de fluxo e os parâmetros bioquímicos pelo método cinético-UV, a crioglobulina sérica por crioprecipitação, autoanticorpos foram detectados por imunofluorescência indireta e a dosagem de fator reumatoide e alfa-fetoproteína foram realizadas através do método de microaglutinação automatizada. **Resultados:** Verificou-se frequências mais elevadas de linfócitos B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (regulatório), que foram correlacionadas positivamente com as células NK e LB CD5⁺ de memória nos participantes com HCC. Não foi encontrado diferenças entre as subpopulações de LB CD19⁺, TCD4⁺, TCD8⁺, células NK, LB memória, LB *naive* e LB CD5⁺ (*naive* e memória) entre os participantes com HCC e controles. As subpopulações de LB investigadas, nos participantes com HCC, não apresentaram associação com carga viral, marcadores de lesão hepática, tumoral e de autoimunidade. **Conclusão:** Esses dados sugerem que células Breg podem ter envolvimento direto na imunorregulação da HCC.

Palavras-chave: Hepatite C, Linfócitos B, Citometria de fluxo, Imunorregulação.

ABSTRACT

Introduction: Chronic hepatitis C (CHC) is one of the main causes of liver disease worldwide and the persistence of the hepatitis C virus can cause cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma, in addition to extrahepatic manifestations. There are few published studies on the characterization of B lymphocyte (BL) subsets in CHC, and a clear pathogenic role in liver disease progression and therapeutic response has not yet been well defined. **Aim:** To investigate the immunophenotypic profile (naive, memory and regulatory) of B lymphocytes in individuals with chronic hepatitis C, pre-treatment with direct-acting antivirals, correlating them with other lymphocyte subsets, and virological and laboratory data. **Methodology:** Ten patients with CHC and ten healthy subjects participated in this study. The immunophenotypic characterization of BL subsets and other peripheral blood lymphocytic subsets were determined by flow cytometry and biochemical parameters by the kinetic-UV method, serum cryoglobulin by cryoprecipitation, autoantibodies were detected by indirect immunofluorescence and the dosage of rheumatoid factor and alpha-fetoprotein were performed using the automated microagglutination method. **Results:** Higher frequencies of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (regulatory) B cells were found, which were positively correlated with CD5⁺ memory BL and NK cells in participants with CHC. No differences were found between subsets of CD19⁺ BL, TCD4⁺, TCD8⁺, NK cells, memory BL, naive BL, and CD5⁺ BL (naive and memory) between participants with CHC and controls. The investigated BL subpopulations, in the participants with CHC, did not present association with viral load, liver damage, tumor and autoimmunity markers. **Conclusion:** These data suggest that Breg cells may be directly involved in the immunoregulation of CHC.

Keywords: Hepatitis C, B Lymphocytes, Flow Cytometry, Immunoregulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) identificando as populações de linfócitos (A); seleção das subpopulações de linfócitos T a partir da expressão de CD3 (B); seleção da população dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ a partir da marcação de CD4 e CD8 (C); seguido pela identificação dos linfócitos NK (CD3⁻CD56⁺) (D); identificação dos linfócitos B a partir de marcações de CD19 (E); seguido pela identificação linfócitos B *naive* (CD19⁺CD27^{neg}IgM⁺) e de memória (CD19⁺CD27⁺IgM⁺) (F); linfócitos B regulatório (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) (G). 52

Figura 2. Figura 2. Distribuição de subpopulações de linfócitos T CD3⁺ (A), T CD4⁺ (B), T CD8⁺ (C), linfócitos B (D) e células NK (E) de participantes com hepatite C crônica (HCC) e de participantes saudáveis (PS). As barras representam a média e desvio padrão. Análise estatística por Teste *t* não pareado, considerando $p < 0,05$. 57

Figura 3. Frequência de células B CD19⁺CD27^{neg}IgM⁺ (B *naive*) (A) e células B CD19⁺CD27⁺IgM⁺ (B de memória) (B) no sangue periférico de participantes com hepatite C crônica (HCC) e de participantes sadios (PS). As barras representam a média e desvio padrão. Análise estatística por Teste *t* não pareado, considerando $p < 0,05$. 58

Figura 4. Frequência de células B CD19⁺CD27^{neg}IgM⁺CD5⁺ (B1 *naive*) (A) e CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD5⁺ (B1 memória) (B) em participantes com HCC e participantes sadios (PS). As barras representam a mediana e intervalo interquartil. Análise estatística por Teste de Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$. 59

Figura 5. Frequência de células B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (regulatórias) em participantes com HCC e participantes saudáveis (PS). As barras representam mediana e intervalo interquartil em HCC e a média e desvio padrão em PS. Teste *t* não pareado, $p < 0,05$. 59

Figura 6. Correlação positiva entre as frequências de células B regulatórias CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} no sangue periférico de participantes com HCC, com 60 as células NK (CD3⁻CD56⁺) e com as células B CD5⁺ de memória (CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD5⁺). Teste de Pearson.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características epidemiológicas e da infecção em participantes 54
com hepatite C crônica não tratados (HCC) e participantes controles sadios
(PS).

Tabela 2. Achados laboratoriais (parâmetros bioquímicos, hematológicos e 55
imunológicos) do grupo de participantes com hepatite C crônica (HCC),
antes do tratamento antiviral, e do grupo controle com participantes sadios
(PS).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AADs	Antivirais de ação direta
AFP	Alfa-fetoproteína
ALT	Alanina aminotransferase
AML	Anticorpo antimúsculo liso
ANA	Anticorpo antinuclear
ANCA	Anticorpo anticitoplasma de neutrófilo
Anti-dsDNA	Anticorpo anti-ácido desoxirribonucleico de fita dupla
AST	Aspartato aminotransferase
BAFF	Fator de ativação de células B
BCR	Receptor de células B
Bregs	Células B regulatórias
C-HUPES	Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
COVID-19	Doença do Novo Coronavírus
CpG	Dinucleotídeo citosina-fosfato-guanina
CTLA-4	Receptor de alta afinidade para moléculas B7, presente em células T
DlgA	Deficiência de Imunoglobulina A
E1	Glicoproteína 1 de superfície do envelope lipídico do vírus da hepatite C
E2	Glicoproteína 2 de superfície do envelope lipídico do vírus da hepatite C
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA	Espondilodiscite infecciosa aguda
EnV	Proteína de envelope viral
EUA	Estados Unidos da América
Fc	Fragmento cristalizável de imunoglobulina
FDA	Food and Drug Administration (EUA)
FR	Fator reumatoide
FSC	Medida de dispersão frontal de tamanho celular em citometria de fluxo
GGT	Gama glutamil transferase
HCC	Hepatite C crônica
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetanosulfônico (solução tampão orgânica zwitteriônica)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Complexo principal de histocompatibilidade humano
HPV	Papiloma vírus humano
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humano
HVR	Regiões hiper variáveis
ICV	Imunodeficiência comum variável
IFN- α	Interferon tipo alfa
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IQR	Intervalo Interquartil
ISDR	Região determinante de sensibilidade ao interferon
LB	Linfócitos B
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LKM-1	Antígeno microsomal de fígado e rim tipo 1
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfotoxina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NOSAs	Anticorpos não órgão específicos
NS	Proteína não estrutural do vírus
OMS	Organização Mundial da Saúde
P7	Proteína 7 de membrana, do tipo viroporina, presente no vírus da hepatite C
PBS	Solução Tampão Salina Fosfatada
PD-L1	Proteína ligante de morte programada tipo 1
PS	Participantes saudáveis
RNA	Ácido ribonucleico
SDA	Solução de diluição de anticorpos
SSC	Medida de dispersão lateral para determinação de granulosidade ou complexidade celular em citometria de fluxo
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TIM-1	Imunoglobulina de células T e proteína 1 de domínio de mucina
TLR	Receptores Semelhantes a Toll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Tregs	Células T regulatórias
UTR	Regiões não traduzidas do genoma
VHC	Vírus da hepatite C
VHB	Vírus da hepatite B
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	O VÍRUS DA HEPATITE C	15
2.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C	17
2.3	SISTEMA IMUNE E O VÍRUS DA HEPATITE C	23
2.3.1	IMUNOPATOGENESE E OS LINFÓCITOS B	25
2.4	TRANSMISSÃO E TRATAMENTO	30
2.5	DIAGNÓSTICO	33
3	HIPÓTESES E OBJETIVOS	34
3.1	HIPÓTESES	34
3.2	OBJETIVOS	34
3.2.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: Subpopulações de linfócitos B: caracterização e envolvimento em algumas patologias.	35
4.1	INTRODUÇÃO	36
4.2	METODOLOGIA	40
4.3	PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DOS LINFÓCITOS B	40
4.4	O PAPEL DOS LINFÓCITOS B EM DIFERENTES DOENÇAS	41
4.4.1	DOENÇAS INFECCIOSAS	41
4.4.2	DOENÇAS IMUNOLÓGICAS	42
4.5	CONCLUSÃO	43
4.6	REFERÊNCIAS	44
5	CAPÍTULO 2: Artigo Científico 2: Subpopulações de linfócitos B na hepatite C crônica: aumento de células B regulatória e de memória	46
5.1	INTRODUÇÃO	47
5.2	METODOLOGIA	50
5.2.1	PACIENTES E CONTROLES	50
5.2.2	ANÁLISE LABORATORIAL	50
5.2.3	OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) E CITOMETRIA DE FLUXO	51

	17
5.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5.3 RESULTADOS	53
5.3.1 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS	53
5.3.2 FREQUÊNCIAS DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B, T, E CÉLULAS NK	56
5.3.3 FREQUÊNCIAS DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B	57
5.3.4 CORRELAÇÃO DE LINFÓCITOS E CARGA VIRAL	60
5.3.5 RELAÇÃO ENTRE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B COM MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA E AUTOIMUNIDADE	60
5.4 DISCUSSÃO	61
5.5 REFERÊNCIAS	65
6 CONCLUSÃO GERAL	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8 ANEXOS	78
ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	78
ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	82

1. INTRODUÇÃO GERAL

O vírus da hepatite C (VHC) é um patógeno intracelular obrigatório e seu ciclo de vida pode ser simplesmente dividido em vários estágios, incluindo entrada viral, tradução de proteínas, replicação de RNA, montagem e liberação viral (LI; YANG; LO, 2021). As infecções pelo VHC estão emergindo como um dos principais desafios na área da saúde devido à sua cronicidade e à natureza do vírus.

Em todo o mundo, mais de 170 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo vírus, com uma mortalidade anual mundial de mais de 500.000 pessoas (MESHRAM; KATHWATE; GACCHE, 2022). O VHC é uma das causas mais comuns de doença hepática crônica, cirrose, transplante de fígado e câncer de fígado em todo o mundo, além de ser uma infecção sistêmica que afeta a qualidade de vida (MANNE et al., 2021).

Esse trabalho descreve as características gerais do vírus da hepatite C, sua epidemiologia, manifestações hepáticas e extra-hepáticas nos indivíduos infectados, a imunopatogênese, formas de transmissão, diagnóstico e tratamento. Buscamos incluir dados mais recentes da literatura.

Mais recentemente, vários estudos têm caracterizado várias subpopulações de linfócitos B e apontado envolvimento dessas células na imunorregulação e em algumas patologias. No entanto, ainda são poucos os estudos sobre a caracterização das subpopulações de linfócitos B na hepatite C crônica (HCC), como também não tem sido ainda bem definido um papel patogênico claro, para essas células, na progressão da doença hepática na HCC e na resposta terapêutica.

Dentro deste contexto, e sabendo dos transtornos causados pela infecção crônica do VHC sobre a população de linfócitos B, torna-se importante investigar o envolvimento dessas subpopulações de linfócitos B na hepatite C, buscando associações destas células com manifestações clínico-laboratoriais que possam auxiliar para tratamento mais eficaz e melhoria da qualidade de vida desses pacientes.

Assim, essa tese buscou avaliar o perfil imunofenotípico dos linfócitos B de pacientes com HCC e estabelecer relações entre as subpopulações de linfócitos B e marcadores de lesão hepática, de autoimunidade e marcador tumoral.

Para tal, elaboramos um artigo de revisão com informações atuais dos perfis imunofenotípicos dos linfócitos B (virgens, efetores e regulatórios), seus desenvolvimentos e papéis frente a outras patologias. Produzimos também um artigo experimental com a metodologia de isolamento de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com HCC e de indivíduos saudáveis e com a técnica de citometria de fluxo foi possível obter resultados das subpopulações de linfócitos e correlacionar com os dados clínicos e laboratoriais desses pacientes.

Nossos resultados foram analisados estatisticamente, apresentados em gráficos e correlacionados na discussão com os dados de outros autores. Tivemos importantes resultados quanto à frequência de linfócitos B de memória e de linfócitos B regulatórios e suas correlações com carga viral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O VÍRUS DA HEPATITE C

O vírus da hepatite C (VHC) foi identificado em 1989 por Michael Houghton e colaboradores sendo a espécie típica do gênero Hepacivirus (HARTLAGE; CULLEN; KAPOOR, 2017). Essa descoberta, que recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2020, lançou luz sobre os casos de hepatite crônica não-A e não-B transmitida pelo sangue e, por meio do advento subsequente de terapias específicas, estima-se que salvou milhões de vidas (TORRE et al., 2021). A partícula do vírus tem um diâmetro de aproximadamente 68 nm (MARTINEZ; FRANCO, 2021).

É um pequeno vírus de RNA (ácido ribonucleico) pertencente à família *Flaviviridae*, com genoma em fita simples de polaridade positiva, sendo o principal agente etiológico da doença hepática crônica. A tradução é a primeira etapa no ciclo de vida do VHC após a infecção de uma célula suscetível. Sua região 5' não traduzida (UTR) contém um elemento IRES (sítio interno de entrada do ribossomo) usado para traduzir o genoma de RNA de 9,6 kb (CHAN, 2014).

O ciclo de vida do VHC começa com a ligação de um vírion a seus receptores específicos nos hepatócitos (LI; YANG; LO, 2021). O vírus entra nas células interagindo com moléculas de membrana do hepatócito. Liga-se aos receptores de superfície CD81 encontrados nos hepatócitos e linfócitos B. Outras moléculas que

parecem ser alvos para ganhar entrada são o receptor de LDL (lipoproteína de baixa densidade), claudina-1, ocludina e receptor de eliminação B tipo 1. Ele pode se revestir com LDL e VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) usando seus receptores nos hepatócitos para ganhar entrada e evitar anticorpos neutralizantes no soro (HAGYMÁSI, 2021).

Após a ligação, o vírion é internalizado no citoplasma e seu RNA genômico é liberado. Em seguida, o RNA do vírus é usado tanto para a tradução da poliproteína quanto para a replicação viral. A replicação ocorre dentro da teia membranosa no retículo endoplasmático. Por fim, o VHC usa a via biossintética da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) para reunir e liberar as partículas virais das células (LI; YANG; LO, 2021). A poliproteína é clivada por proteases do hospedeiro e proteases virais em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (HAGYMÁSI, 2021) como descrito no parágrafo abaixo.

O genoma do VHC contém duas regiões não traduzidas curtas em cada extremidade (5'UTR e 3'UTR), juntamente com um único quadro de leitura aberto que codifica três componentes estruturais (core, E1 e E2) e sete proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (PRECIADO et al., 2014; SPITZ et al., 2019).

A proteína do core tem várias funções, incluindo a construção do capsídeo viral e a interação com outras proteínas celulares e vias de sinalizações envolvidas no ciclo de vida do VHC (EL-MOWAFY et al., 2021). E1 e E2 são proteínas altamente glicosiladas que participam da entrada na célula. E2 contém três regiões hipervariáveis (HVR), conhecidas como HVR1-3, que estão sob pressão de seleção contínua exercida pelo sistema imunológico do hospedeiro (PRECIADO et al., 2014).

P7 é um polipeptídeo hidrofóbico de 63 aminoácidos, que é essencial para a produção *in vivo* de partículas infecciosas, e NS2 foi implicado na montagem, envolvimento, maturação e liberação viral. NS3 é uma proteína multifuncional de 70 kDa contendo uma serina protease. A protease NS3 cliva proteínas virais e do hospedeiro e tem sido implicada em mecanismos virais para evasão de respostas imunes inatas. A protease do VHC interrompe as vias de sinalização do interferon (IFN) e do receptor toll-like-3 (TLR3) ao clivar proteínas do hospedeiro (PRECIADO et al., 2014; LAPA et al., 2019).

NS4A é uma proteína de 54 aminoácidos, a menor proteína não estrutural, que tem uma série de funções na replicação viral, modulação da resposta imune do

hospedeiro e montagem do vírus. A NS4B está envolvida na formação de complexos de replicação funcional, na montagem de partículas de vírions e na inibição da ativação imune inata. NS5A influencia a capacidade replicativa do vírus. Também inclui a região determinante da sensibilidade ao interferon (ISDR), onde várias substituições de aminoácidos podem influenciar a eficácia da terapia com interferon (IFN), especialmente em pacientes infectados com o genótipo 1b. Por último, NS5B é a RNA polimerase dependente de RNA do VHC (RdRp), que carece de mecanismos de revisão e correção de erros, resultando em um processo de replicação altamente sujeito a erros (PRECIADO et al., 2014; LAPA et al., 2019).

Foi demonstrado que o VHC é dividido em sete genótipos com vários sub genótipos (mais precisamente 67 subtipos) (NUTINI et al., 2020; LAPA et al., 2019). Há ainda autores que citam que o VHC é classificado em 8 genótipos com uma variabilidade de cerca de 30% nos níveis de nucleotídeos e aminoácidos e mais de 80 subtipos com uma variabilidade de cerca de 20% nos níveis de nucleotídeos (VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA et al., 2021; MARTINEZ; FRANCO, 2021).

Todavia, outros autores relatam que o vírus é classificado em pelo menos seis genótipos principais (1 a 6). Importante é a compreensão de que a heterogeneidade do VHC impede o desenvolvimento de uma vacina eficaz para proteger contra a infecção de todos os genótipos e que todos atualmente reconhecidos são patogênicos, hepatotrópicos e preservam a similaridade do ciclo de vida nas células (LI; YANG; LO, 2021).

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é a principal causa de hepatite crônica, afetando uma estimativa 70 milhões de pessoas em todo o mundo (LAPA et al., 2019) com cerca de 1,75 milhão de novos casos anualmente (HARTNELL et al., 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 150 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas com o VHC e mais de 350.000 pessoas morrem todos os anos de doenças hepáticas relacionadas com a hepatite C. Os pacientes podem permanecer sem sintomas por muito tempo; por exemplo, a doença hepática pode aparecer até 20 ou 30 anos após a infecção inicial (MAGRI et al., 2015).

A hepatite C crônica (HCC) é um problema de saúde pública global com risco de progressão para fibrose, cirrose, carcinoma hepatocelular e doença hepática terminal. Após a infecção primária, a maioria das pessoas desenvolvem doença hepática crônica que pode resultar em cirrose hepática descompensada e HCC (HARTNELL et al., 2020). Aproximadamente 400.000 pessoas morrem a cada ano de complicações da infecção pelo vírus, como cirrose e carcinoma hepatocelular (VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA et al., 2021).

A infecção aguda pelo VHC é geralmente assintomática, embora possa estar associada à icterícia e níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT). Após a fase aguda, a infecção pelo vírus é eliminada espontaneamente em 18–34% dos indivíduos infectados (MARTINEZ; FRANCO, 2021). Sintomas como náusea, astenia e perda de peso aparecem em menos de 30% dos pacientes e, na maioria dos casos, não interferem nas atividades diárias normais. A presença de icterícia também é infrequente, ocorrendo em menos de um terço dos pacientes. A insuficiência hepática aguda devido à infecção pelo VHC é incomum (TORRE et al., 2021).

Há ainda autores que relatam que a fadiga é a queixa mais frequente na infecção crônica, e outras manifestações clínicas menos comuns são anorexia, fraqueza, náusea, artralgia, mialgia e perda de peso como já descrito acima (DERESS et al., 2021).

Em 15% dos casos, a infecção pelo VHC é responsável pela hepatite aguda, enquanto aproximadamente 80% dos pacientes infectados evoluem para infecção crônica; 20% dos pacientes com infecção crônica desenvolvem cirrose em 25 anos e, entre os pacientes com cirrose, 25% desenvolvem HCC e / ou doença hepática descompensada (TORRE et al., 2021).

A incidência de desenvolvimento de cirrose em pacientes infectados pelo VHC é de até 18% após 20 anos da infecção e pode chegar a mais de 40% após 30 anos da infecção (EL-MOWAFY et al., 2021).

Por ser um vírus hepatotrópico e linfotrópico, o VHC não causa apenas manifestações hepáticas, mas também leva a um número significativo de manifestações extra-hepáticas em até 74% dos pacientes (KASSAS; HEGAZY; SALAH, 2020).

O desenvolvimento de manifestações extra-hepáticas relacionadas ao VHC provavelmente envolve mecanismos autoimunes. Esta teoria é apoiada pelo

aparecimento de características autoimunes, como púrpura e doenças de depósito de imunocomplexos que causam complicações locais e /ou sistêmicas. Os distúrbios dermatológicos são conhecidos por estarem ligados à infecção pelo VHC, incluindo crioglobulinemia mista, líquen plano, porfiria cutânea tardia e eritema necrolítico acral. O vitiligo e a psoríase também podem ser encontrados em associação com a infecção pelo VHC (KASSAS; HEGAZY; SALAH, 2020).

Essas manifestações extra-hepáticas podem estar presentes muito antes do estágio de doença hepática avançada e incluem sintomas inespecíficos como fadiga, náusea, dor abdominal ou musculoesquelética, perda de peso e sintomas neuropsiquiátricos, incluindo depressão, irritabilidade e mal-estar; e manifestações biológicas mais específicas, como vasculite, distúrbios linfoproliferativos, como linfoma não-Hodgkin de células B, doença renal, diabetes mellitus tipo II, eventos metabólicos cerebrovasculares e cardiovasculares (TANG; MARCELL; KOTTILIL, 2021; CARVALHO-LOURO et al., 2020; GOMIDE et al., 2019).

Esses pacientes apresentam vários fenômenos imunomediados, como já dito acima, principalmente devido à disfunção dos linfócitos B, como crioglobulinemia mista e produção de autoanticorpos não órgão específicos (NOSAs) (ATTA et al., 2010). Isto é provocado por um imunocomplexo crioprecipitável formado por autoanticorpos anti-IgG policlonais ou monoclonais (fator reumatoide), que são mais frequentemente anticorpos IgM que reagem com a região constante do anticorpo IgG ligado a antígeno de VHC mais complemento C1q (ATTA et al., 2009).

Embora a crioglobulinemia tenha sido associada à vasculite de vasos pequenos e médios e glomerulonefrite, o envolvimento de NOSAs na imunopatologia da hepatite C não é completamente compreendido. No entanto, foi relatado que a presença de anticorpos antimúsculo liso (AML) é maior em portadores de VHC crioglobulinêmicos, enquanto a crioglobulinemia foi associada à fibrose hepática avançada e resposta fraca à terapia antiviral com interferon- α (ANDRADE et al., 2011). Além disso, há uma associação de infecção crônica pelo VHC com doença celíaca, artrite e síndrome de Sjögren (SOUSA et al., 2011).

Os subtipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c e 3a do VHC têm distribuição mundial e representam uma grande proporção das infecções. Por outro lado, muitos dos outros subtipos de VHC são raros e circulam em áreas geográficas mais restritas, como cepas endêmicas dos genótipos 1 e 2 na África Ocidental, 3 na Ásia Meridional, 4 na

África Central e no Oriente Médio, 5 na África Austral, 6 no Sudeste Asiático, 7 no Canadá e 8 na Índia (PRECIADO et al., 2014; SPITZ et al., 2019).

A grande maioria das infecções do genótipo 1, que são as mais comuns globalmente, concentram-se em áreas de alta renda, como América do Norte e Europa, embora os genótipos 2 e 3 sejam responsáveis por 10–25% dos casos nessas regiões também. Em contraste, os genótipos 3 e 6 são mais comuns em pacientes no sul e sudeste da Ásia, e o genótipo 4 é o principal genótipo no Oriente Médio e no norte da África. O genótipo 5 é muito menos prevalente, com a maioria dos casos agrupando-se na África. O único isolado conhecido do genótipo 7 foi obtido de um imigrante centro-africano no Canadá em 2007 (HARTLAGE; CULLEN; KAPOOR, 2017).

Há autores que descrevem a prevalência de oito genótipos. O genótipo 1 é prevalente em todo o mundo, enquanto os outros foram caracterizados cada um em diferentes regiões geográficas, ou seja, genótipo 2 na África Ocidental, genótipo 3 principalmente no Sul da Ásia, genótipo 4 na África Central e do Norte, genótipo 5 na África do Sul, o genótipo 6 no Sudeste Asiático e o genótipo 7, que foi isolado de imigrantes da África Central no Canadá. Recentemente, o novo genótipo 8 foi descrito como endêmico na Índia (PISANO et al., 2021).

Os subtipos epidêmicos no mundo desenvolvido se espalharam amplamente após a Segunda Guerra Mundial, como resultado do aumento de transfusões de componentes sanguíneos, procedimentos médicos e odontológicos invasivos e uso de drogas intravenosas (NUTINI et al., 2020).

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) tem sido uma das principais causas de doenças hepáticas crônicas que afetam aproximadamente 71,1 milhões de pessoas em todo o mundo (como já citado no início desse texto), conforme estimado em 2015, o que correspondeu a 1,0% da prevalência global (YU et al., 2020) e 399.000 mortes estão associadas ao vírus anualmente em todo o mundo (HARRIS et al., 2019).

A prevalência da infecção pelo VHC é afetada por vários fatores demográficos, virológicos, clínicos e relacionados ao estilo de vida (GOMIDE et al., 2019) e varia de acordo com as diferentes regiões do Brasil entre os adultos com idade igual ou superior a 18 anos, variando de 3,2% no Norte, a 1,9 no Centro e Sul, 1,8 no Sudeste e 1,6 no Nordeste (NUTINI et al., 2020).

No Brasil, a prevalência da infecção pelo VHC aumenta em pacientes com idade > 40 anos; quase metade dos pacientes diagnosticados como positivos ao VHC tem idade entre 46 e 60 anos, com prevalência máxima entre aqueles com idade entre 50 e 60 anos (GOMIDE et al., 2020) sendo o genótipo 1 o mais prevalente em infecções crônicas.

Em 2019, as maiores taxas de detecção foram observadas, em ambos os sexos, na faixa etária de 55 a 59 anos, chegando a uma taxa de detecção de 36,3 casos por 100 mil habitantes entre homens e 21,3 entre mulheres. Em relação às pessoas mais jovens (até 34 anos de idade), as taxas de detecção observadas foram similares entre os sexos (BRASIL, 2020).

Esses estudos confirmaram o Brasil como um país com baixa endemicidade para hepatite C (CARVALHO-LOURO et al., 2020). Especificamente, o subtipo 2b de VHC (VHC-2b) foi detectado nas Américas do Caribe (Martinica) e Central (México) e Sul (Brasil, Colômbia e Venezuela).

A prevalência geral de soropositividade para anticorpos anti-VHC foi estimada em 1,6% (1,3% - 2,1%), correspondendo a 115 milhões de indivíduos infectados em todo o mundo (SANTOS et al., 2019). Essa prevalência de anticorpos entre os grupos de alto risco incluem: 57 a 92% entre as pessoas que injetam drogas, 17% entre os homens que fazem sexo com homens e 4 a 12% entre os profissionais de saúde (HARRIS et al., 2019).

De 1999 a 2020, foram notificados no Brasil 262.815 casos confirmados de hepatite C, sendo 58,9% no Sudeste, 27,5% no Sul, 6,5% no Nordeste, 3,6% no Centro-Oeste e 3,5% no Norte, com pelo menos um dos marcadores – anti-VHC ou VHC-RNA – reagente. A principal forma clínica dos casos de hepatite C notificados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) foi à crônica – 79,5% do total de casos (BRASIL, 2021).

Os estudos que avaliam a prevalência de VHC no Brasil são escassos, e a soroprevalência do VHC é estimada entre 0,69 a 1,89% (CARVALHO-LOURO et al., 2020). A primeira pesquisa nacional de hepatite em todo Brasil demonstrou soroprevalência de VHC de 1,38% em 19.503 indivíduos (GOMIDE et al., 2020).

Em 2019, o ranking das capitais brasileiras com as maiores taxas de detecção de hepatite C apresentou dez capitais com taxas superiores à nacional (10,8 casos por 100 mil habitantes). São elas: Porto Alegre (84,4 casos por 100 mil habitantes) com a maior taxa entre as capitais, seguida de São Paulo (31,5), Curitiba (22,7), Rio

Branco (18,2), Boa Vista (14,7), Florianópolis (13,2), Manaus (11,9), João Pessoa - (11,9), Maceió (11,3) e Vitória (10,9). A menor taxa entre as capitais foi observada em Salvador / Bahia, com 3,3 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2020). Em 2020, a cidade de Salvador é retirada desse ranking das capitais e a menor taxa foi observada em Macapá, com 0,8 caso para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2021).

Com relação ao sexo, dentre os 262.815 casos confirmados de hepatite C desde 1999, 151.312 (57,6%) ocorreram em indivíduos do sexo masculino e 111.398 (42,4%) em indivíduos do sexo feminino. Apesar de o número de casos entre homens ser superior, observa-se estabilidade na razão de sexos desde 2010, com média de 13 casos em homens para dez casos em mulheres em 2020 (BRASIL, 2021). Assim, conforme os boletins epidemiológicos brasileiros mais atuais o sexo com maior prevalência pela infecção no Brasil ainda é o masculino.

Sobre a variável raça / cor em 2020, 55,3% foram referidos como brancos, 33,3% como pardos, 10,2% como pretos, 0,9% como amarelos e 0,3% como indígenas (BRASIL, 2021).

Em relação à informação sobre a escolaridade dos casos notificados de hepatite C, observa-se um aumento da informação registrada como “ignorada”, que passou de 25,9% em 2009 para 37,3% em 2020. Para os casos notificados de indivíduos do sexo masculino, o maior percentual é entre aqueles que haviam cursado da 5ª à 8ª série incompleta (16,1%) e, no sexo feminino, entre aquelas que tinham o ensino médio completo (15,2%). Os indivíduos analfabetos representaram menos de 2% de todos os casos (BRASIL, 2021).

No Brasil, prevalecem em ordem decrescente de importância os genótipos 1, 3 e 2, sendo o genótipo 1 mais resistente ao tratamento. O genótipo 2 é frequente na região Centro-Oeste (11% dos casos), enquanto o genótipo 3 é mais frequentemente detectado na região Sul (43%) (BRASIL, 2018). O genótipo é importante, uma vez que a barreira genética à resistência a agentes antivirais diretos (AADs) é geralmente menor no genótipo 1A em comparação ao 1B (NUTINI et al., 2020).

As intervenções terapêuticas para reverter a imunossupressão das células imunes e iniciar a autocura em pacientes com hepatite crônica dependem de uma compreensão completa da imunopatogênese, como descrito a seguir.

2.3 SISTEMA IMUNE E O VÍRUS DA HEPATITE C

A hepatite viral crônica causada pelo VHC parece ser ocasionada por uma falha imunológica. O vírus causa danos às células do fígado, mas o mecanismo exato desse fenômeno é desconhecido. As características dessa falha incluem a persistência da viremia, o esgotamento das células T efetoras e o aumento da atividade das células T reguladoras (Tregs) (ZHAI et al., 2015). Tem-se amplamente documentado mecanismos pelos quais o VHC pode romper passos críticos de indução das respostas imune inata e celular eficiente (KAPLAN et al., 2015).

O VHC causa infecção persistente na maioria dos indivíduos infectados, no entanto, os mecanismos envolvidos nesta infecção crônica ainda precisam de um melhor conhecimento. Fatores como mutação do VHC, apresentação ineficiente de antígeno, função das células NK prejudicada, depleção de células T e supressão imunológica mediada por células T reguladoras podem contribuir para a infecção crônica pelo vírus (OLIVEIRA et al., 2016).

Também é possível que o VHC possa promover o desenvolvimento de HCC por meio de vários mecanismos, que incluem: (1) inflamação persistente do fígado e dano por estresse oxidativo imunomediado de uma infecção viral crônica; (2) reprogramação metabólica levando à esteatose que progride posteriormente para fibrose e hepatite crônica; (3) dano por estresse oxidativo intracelular induzido por proteínas virais; e (4) desregulação das vias de sinalização celular por proteínas virais (núcleo do VHC, NS3 e NS5 A / B) (PASCUT et al., 2021).

Sabe-se que o escopo da resposta das células T específicas para o VHC está fortemente associado ao resultado da infecção. Respostas de células T CD4⁺ e CD8⁺ IFN- γ ⁺ vigorosas, sustentadas e multiespecíficas são associadas com a resolução da infecção; enquanto respostas fracas, focadas ou transitórias estão associadas à persistência viral (KAPLAN et al., 2015).

Em cerca de 30% dos pacientes transplantados de fígado com VHC é observado um infiltrado linfo-mononuclear representado principalmente por células T CD8⁺ que deve desempenhar um papel importante na contenção viral, embora outros subconjuntos, como células T CD4⁺, células NK e células T reguladoras (Tregs) também estão presentes. As células T CD4⁺ e CD8⁺ intra-hepáticas podem reconhecer antígenos estruturais e não estruturais do VHC (MOROZOV; LAGAYE, 2018).

O VHC induz diversas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, mas inibe fortemente a secreção das citocinas antivirais IFN- α e IFN- β e inibe a regulação positiva do ligante indutor de apoptose associado ao receptor de TNF na célula de superfície (ZHAI et al., 2015).

Estudo mostra que as interleucinas IL-17F e IL-8 desempenham papéis protetores em casos de infecção crônica por hepatite C, que parece estar associada ao controle de lesão hepática e infecção, respectivamente (SOUSA et al., 2012).

Com relação ao perfil de citocinas séricas de portadores do VHC com crioglobulinemia e autoanticorpos não-órgão específicos, são representados principalmente por níveis aumentados de IL-2, IL-5 e BAFF (fator de ativação de linfócitos B ou estimulador de linfócitos B - BLyS) (LAULETTA et al., 2012; ATTA et al., 2010).

Tregs isoladas de pacientes infectados pelo VHC são imunossupressoras e podem inativar as células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas do vírus. A concentração de VHC no sangue de pacientes se correlaciona diretamente com a frequência de Tregs. Além disso, o vírus causa diretamente a proliferação de Tregs e secreção de citocinas imunossupressoras (ZHAI et al., 2015).

A cinética da resposta imune baseada em anticorpos consiste inicialmente em anticorpos contra epítopos da proteína não estrutural NS3 e capsídeo viral. À medida que a infecção progride, são detectados anticorpos contra epítopos NS4 e contra glicoproteínas do envelope E1 e E2. Os anticorpos IgG1 contra antígenos estruturais e não estruturais são detectados em pacientes com hepatite C crônica, enquanto os anticorpos IgG4 são estimulados seletivamente por proteínas não estruturais do VHC, como o antígeno NS3 (SANTOS et al., 2019).

Os anticorpos contra as proteínas de envelope podem estar associados à modulação dos níveis circulantes de vírus. No entanto, ainda não foi possível relacionar esses anticorpos a algum tipo de imunidade protetora, embora existam estudos indicando que os pacientes que se recuperam da infecção podem ser resistentes a novas exposições ao vírus (BRASIL, 2018).

A análise da reatividade sérica contra a principal variante de HVR1 (região HVR1 da glicoproteína 2 do envelope) em um grande grupo de pacientes infectados com VHC revelou que 43% dos pacientes desenvolveram anticorpos anti-HVR1 nos primeiros 6 meses após a infecção em comparação com 13% dos indivíduos com evolução crônica, sugerindo uma contribuição dos anticorpos neutralizantes na

eliminação do vírus (LAPA et al., 2019). Pacientes curados possuem respostas de anticorpos neutralizantes de alto título que atingiram o pico no momento da eliminação viral, enquanto todos os progressores crônicos possuem respostas de baixo título ou ausentes durante a fase aguda (LAPA et al., 2019).

Anticorpos para autoantígenos como nucleoproteínas (ANA), músculo liso (AML), antígeno microssômico de fígado-rim tipo 1 (LKM-1), imunoglobulina G, citoplasma de neutrófilos (ANCA) e fosfolípidios, que são usados rotineiramente como biomarcadores de doenças autoimunes, podem ser encontrados em portadores de VHC com prevalência variada. Sua indução parece envolver principalmente reações imunológicas cruzadas causadas por mimetismo molecular entre a poliproteína do vírus e os autoantígenos humanos. O autoanticorpo mais prevalente nesses indivíduos é o fator reumatoide IgM, que está associado com crioglobulinemia (ATTA et al., 2009).

2.3.1 IMUNOPATOGÊNESE E OS LINFÓCITOS B

As células B se originam de células-tronco hematopoiéticas e progridem de estágios de células pró-B (expressando CD45) para estágios de células pré-B (expressando CD19). Estas células B desenvolvem-se posteriormente em células B imaturas que expressam imunoglobulinas IgM e IgD. (SHEN et al., 2016; PATEL et al., 2021).

As células B de transição e as B regulatórias (descritas a seguir) são definidas como $CD19^+CD24^{+hi}CD38^{+hi}CD77^-$ e expressam IgM e IgD. Essas células migram para órgãos linfoides secundários, onde amadurecem em células B virgens, definidas por $CD19^+CD27^-IgM^+IgD^+$ ($CD24^{+low}CD38^{-/baixo}$) esperando para encontrar um antígeno. Após o reconhecimento do antígeno, as células B virgens tornam-se ativadas e diferenciam-se em células plasmáticas produtoras de IgM. As células B de memória sem mudança de isotipo expressam IgM e CD27 em sua superfície e as comutadas são células IgD^-CD27^+ e IgD^-CD27^- . As células que encontram antígeno proliferam rapidamente e montam uma resposta imune robusta. Os plasmoblastos $CD19^+CD24^{-/baixo}CD38^{+hi}IgD^-CD77^-$ são células B diferenciadas terminalmente capazes de secretar anticorpos de alta afinidade (PATEL et al., 2021).

Sabe-se que estas células participam da resposta imune antiviral produzindo anticorpos ou como células apresentadoras de antígeno ou ainda com produção de

citocinas pró-inflamatórias. A geração de células B funcionantes é precedida pela saída dos linfócitos B de transição da medula óssea. Eles migram para os órgãos linfoides periféricos e eventualmente se desenvolvem em células B virgens (KWIECIEŃ et al., 2020).

Depois de reconhecer o antígeno, as células B virgens entram nos folículos primários dos nódulos linfáticos ou outros tecidos linfoides, sofrem extensa proliferação, formam centros germinativos e mudam de classe de imunoglobulina. Nos centros germinativos, algumas das células B se diferenciam em células plasmáticas ou células B de memória, que produzem anticorpos de alta afinidade (SHEN et al., 2016; KWIECIEŃ et al., 2020).

Os linfócitos B (CD19⁺) são os precursores das células plasmáticas responsáveis pela produção de anticorpos. Após o contato com o antígeno, as células B virgens sofrem expansão / diferenciação clonal que leva à formação de células B de memória e células plasmáticas secretoras dos anticorpos. As células B do sangue periférico (CD19⁺) são compostas por subpopulações fenotípicas / funcionais distintas, incluindo células B1 inatas (CD19⁺CD5⁺), células B2 convencionais (CD19⁺CD5⁻), células B de transição recém-formadas (CD19⁺CD10⁺CD27⁻), células B *naive* (CD19⁺CD27⁻) e células B de memória (CD19⁺CD27⁺) (PAHL et al., 2010).

As células B1 derivam, durante a vida fetal e perinatal, de um precursor presente no fígado fetal e são convencionalmente divididas em células B-1a e B-1b de acordo com a expressão de CD5 presente nas células B-1a, mas não nas células B-1b. Em humanos, além do CD5, a expressão de CD27 e CD43 foi reconhecida como necessária para a identificação de células B-1a (MAGATTI et al., 2021).

Inconsistente com as células B convencionais (células B2), as células B1 são um subgrupo incomum de linfócitos B que podem secretar espontaneamente IgM e impactar criticamente a imunidade inata. Evidencia-se que as células B1 aceleram a metástase de melanomas relacionados à malignidade e induzem o desenvolvimento de leucemia linfocítica crônica (QIN et al., 2021).

Como os anticorpos naturais (IgM polirreativos com baixa afinidade) se ligam à fosforilcolina, um antígeno presente em bactérias gram-positivas, células apoptóticas e lipídios oxidados, foi levantada a hipótese de que as células B1 podem desempenhar um papel na manutenção da homeostase no sistema imunológico (ZIELIŃSKI et al., 2021).

As células B2 se originam na vida pós-natal e são produzidas a partir de um precursor hematopoiético pluripotente (pró-célula B). As células B virgens saem da medula óssea e migram para os folículos ou para a zona marginal do baço para maturação e diferenciação em plasmócitos ou células B de memória. As células B foliculares e as células B da zona marginal constituem a população de células B2. Semelhante às células B-1b e B-1a, a exposição ao antígeno e os sinais das células T auxiliares ativam e induzem a troca de classe de imunoglobulinas e diferenciação de células B para células B foliculares (MAGATTI et al., 2021).

Células B B-2 foliculares convencionais sofrem troca de isotipo e maturação no baço e nódulos linfáticos em resposta a antígenos dependentes de células T para se tornarem células plasmáticas que secretam grandes quantidades de anticorpos, ou células B de memória com a capacidade de produzir anticorpos específicos após reexposição ao mesmo antígeno. Ao contrário das células B-2, as células B da zona marginal são consideradas parte do sistema imune inato. Essas células residem no baço e estão posicionadas para responder imediatamente aos antígenos presentes no sangue que são filtrados através do baço (PERRY; BENDER; MCNAMARA, 2012).

A hipótese de que as células B podem também contribuir para a supressão da imunidade, inibição da patogênese e restauração da homeostase do tecido foi levantada em 1974, quando seu papel na supressão da resposta de hipersensibilidade tardia foi demonstrado e o termo “células B regulatórias” foi descrito por Mizoguchi et al. (2002), que caracterizou a população de células B CD1d^{hi} na doença inflamatória intestinal crônica (BOCIAN et al., 2017). Com base em estudos em modelos animais experimentais e pacientes com doenças autoimunes, uma variedade de células Bregs foi identificada como tendo diversos fenótipos e mecanismos de supressão (MAURI; MENON, 2015).

Apesar dos extensos esforços para caracterizar fenotipicamente células B regulatórias (Bregs), incluindo análises de transcriptoma e citometria de fluxo multiparamétrica, que se têm concentrado principalmente em células B secretoras de IL-10, ainda não temos um conjunto definitivo de marcadores imunofenotípicos ou um regulador transcricional de assinatura (equivalente a FoxP3 de células T regulatórias - Tregs) que permita identificar as Bregs de forma compreensível (CATALÁN et al., 2021).

As ações regulatórias dos Bregs são exercidas principalmente por meio da elaboração de citocinas imunorreguladoras, como a IL-10. No entanto, outras citocinas também podem contribuir para a função de Breg, incluindo TGF- β e IL-35, bem como outras moléculas imunomoduladoras, como granzima B e a expressão de moléculas coestimulatórias negativas, como PD-L1. Estudos que examinam a supressão de células T IL-17⁺ e IFN- γ ⁺ por células B indicam que os processos dependentes de IL-10 e TGF- β estão envolvidos (HUALI et al., 2021).

As Bregs produtoras de IL-10 mais investigadas são as células B10, caracterizadas pelo fenótipo CD1d⁺CD5⁺, que representam 1–2% dos esplenócitos em camundongos. Elas podem se desenvolver a partir de células progenitoras B10 sob estimulação de LPS (Lipopolissacarídeo), CpG (Dinucleotídeo citosina-fosfato-guanina) ou BAFF (fator de ativação de células B) (BOCIAN et al., 2017).

Existem dois tipos de Bregs, dependendo das vias de ativação: tipo “adquirido” ou “inato”. A diferenciação de Bregs do tipo adquirido requer ligação BCR (receptor de células B) / autoantígenos e interação CD40/CD40L. Para a geração de Bregs do tipo inato, uma ativação policlonal é necessária envolvendo ligantes TLR (receptor tipo Toll), como LPS e CpG, sinais apoptóticos ou estimulação de BAFF (BOCIAN et al., 2017).

Marcadores de superfície, como CD9 e TIM-1 (domínio de Ig de célula T e proteína de domínio de mucina), foram encontrados predominantemente, mas não exclusivamente, expressos em populações de células B IL-10⁺ (CATALÁN et al., 2021). A maioria das Bregs de camundongo que produzem IL-10 expressa CD5, CD1d, CD21, TIM-1 em combinação ou separadamente (BOCIAN et al., 2017). O domínio Ig das células T e a TIM-1, reconhecem as células apoptóticas e promovem a secreção de IL-10 pelas células B ativadas (HÄFNER, 2019).

Geralmente, os subconjuntos de Bregs estabelecidos em humanos incluem CD19⁺CD24⁺CD38⁺ e CD19⁺CD24⁺CD27⁺, embora os relatórios também incluam a identificação de CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ e CD19⁺TIM-1⁺ em humanos (DAI; ZHONG; XU, 2017).

Portanto, as Bregs permanecem uma população definida funcionalmente com base em sua capacidade de suprimir as respostas proinflamatórias *in vitro* ou *in vivo*, ao contrário das células B efectoras, que produzem moléculas proinflamatórias ou induzem outras células a fazê-lo (CATALÁN et al., 2021).

Até o presente momento, não tem sido ainda bem definido um papel patogênico claro, para os linfócitos B, na progressão da doença hepática na hepatite C crônica. A expansão e ativação de clones de células B mediada pelo vírus da hepatite C é um dos fatores importantes na imunopatogênese da hepatite C crônica. O vírus é capaz de modular diretamente as funções das células B e T (LAULETTA et al., 2012).

Foi demonstrado que o VHC causa desregulação nas células B em termos de ativação, funções e fenótipo. A interação da glicoproteína do envelope E2 do vírus com o CD81 resulta na mimetização do complexo correceptor de células B e, portanto, reduz o limiar necessário para a ativação de células B, levando à ativação de células B policlonais e posteriormente, a proliferação monoclonal de células produtoras de imunoglobulinas, podendo resultar em transformação maligna, distúrbios proliferativos de linfócitos e desenvolvimento de linfomas (linfoma não Hodgkin de células B) (TOMER; ARORA, 2020). A capacidade do VHC de persistir cronicamente no hospedeiro pode representar um estímulo contínuo para o sistema imunológico, resultando em expansões oligo / monoclonais de células B (LAULETTA et al., 2012).

A infecção pelo vírus também resulta na superexpressão de CD81 e expansão de linfócitos B periféricos CD5⁺, causando superprodução de fator reumatoide levando à artrite reumatoide, crioglobulinemia mista e produção de autoanticorpos que levam a outros distúrbios autoimunes (TOMER; ARORA, 2020).

A tetraspanina CD81 é expressa e encontrada nos linfócitos B, onde atua como uma molécula coestimuladora. A combinação de receptores e taxas de expressão nos hepatócitos é um elemento que explica por que o fígado constitui o principal alvo das partículas do VHC. No entanto, muitos estudos mostraram que a presença de RNA do VHC, bem como de proteínas virais estruturais ou não estruturais, foi caracterizada também em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de pacientes com infecção crônica por VHC ou nos linfonodos peri-hepáticos (DOUAM et al., 2016).

Foi demonstrado que em alguns pacientes com VHC, o receptor de células B (BCR) reconhece domínios IgG-Fc e VHC-NS3, sugerindo que sua especificidade deriva de uma reatividade cruzada entre um epítopo associado ao vírus e autoantígeno IgG (LAULETTA et al., 2012).

A eliminação do vírus parece estar intimamente relacionada com a indução de uma resposta de anticorpos neutralizantes forte e precoce, e que tem como alvo as glicoproteínas Env do VHC (YECHEZKEL; LAW; TZARUM, 2021).

O papel dos diferentes subconjuntos de células B na infecção crônica pelo VHC não é completamente compreendido (ABDELWAHAB et al., 2020).

2.4 TRANSMISSÃO E TRATAMENTO

O VHC é transmitido pelo contato com o sangue de uma pessoa infectada. Embora vários mecanismos de transmissão sejam conhecidos, como uso de drogas injetáveis, tatuagem, relação sexual, procedimentos médicos ou odontológicos invasivos e transmissão perinatal, outras vias permanecem desconhecidas (MAGRI et al., 2015; PASCUT et al., 2021).

Não há vacina para a prevenção da transmissão do VHC. No caso de sorologia positiva para o VHC, são necessários estudos adicionais, incluindo genotipagem, exame hepático e biópsia (CLAUSEN; ZAFFIRI, 2020).

Na infecção pelo vírus da hepatite C, duas resoluções podem ser observadas nos indivíduos: a eliminação do vírus, em cerca de 25% dos casos, ou a infecção evolui para a doença crônica (75%), sendo esta consequência influenciada por fatores virais ou próprios do hospedeiro (BARTH, 2015).

Apesar da gravidade, a hepatite C é uma das doenças infecciosas com grande perspectiva de cura, devido às novas drogas antivirais que agem diretamente sobre o vírus (DAA), atuando de forma eficiente, em menos tempo, e com menos eventos adversos para o paciente (DUSHEIKO, 2017). Porém, é ainda necessário um conhecimento mais aprofundado da resposta imune do hospedeiro frente ao vírus, para o sucesso da terapia medicamentosa e, conseqüentemente, para a obtenção da cura total da hepatite C.

O interferon alfa foi o primeiro medicamento aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e usado em pacientes com infecção por hepatite C em 1991, mas a taxa de sucesso do tratamento foi de apenas 10%. Em 1998, a coterapia com ribavirina, que pode inibir a síntese do vírus de RNA, aumentou o efeito terapêutico em 30–50% (HAGYMÁSI, 2021).

Até recentemente, o tratamento combinado de interferon peguilado / ribavirina era o tratamento mais amplamente utilizado com baixa tolerância clínica, com muitos

efeitos colaterais (síndrome semelhante à gripe, distúrbios neurocognitivos, mielossupressão com neutropenia, trombocitopenia e anemia hemolítica). A eficácia terapêutica foi limitada por vários fatores: fibrose extensa, excesso de peso, genótipo 1, infecção associada ao HIV ou resistência à insulina (HAGYMÁSI, 2021).

Um plano estratégico foi delineado recentemente para tratar a infecção pelo VHC no Brasil. Compreende a incorporação de medicamentos novos, eficazes e acessíveis.

O tratamento da hepatite crônica mostrou uma mudança significativa após a introdução de antivirais de ação direta (AADs), que provou ser um grande sucesso com um perfil de segurança aceitável em comparação com o tratamento padrão anterior (interferon peguilado e ribavirina) (KASSAS; HEGAZY; SALAH, 2020).

Os tratamentos com AADs são altamente eficazes e não invasivos, e são mais curtos e mais bem tolerados do que os tratamentos anteriores para VHC. Aproximadamente 90% dos pacientes podem ser curados com 8-12 semanas de terapia com AADs. O tratamento e a cura das infecções pelo VHC levarão à diminuição da transmissão, morbidade e mortalidade (SPERRING; RUIZ-MERCADO; SCHECHTER-PERKINS, 2020).

Os AADs são moléculas que têm como alvo proteínas não estruturais específicas do vírus, resultando na interrupção da replicação viral e, portanto, na infecção. Existem quatro classes desses fármacos, definidas pelo seu mecanismo de ação e alvo terapêutico: proteínas não estruturais 3 / 4A (NS3 / 4A), inibidores da protease viral, inibidores nucleosídeo da polimerase NS5B, inibidores não nucleosídeo da polimerase NS5B e inibidores NS5A (JAKOBSEN et al., 2017).

Os primeiros inibidores da protease viral, telaprevir e boceprevir, usados de 2011 a 2014, foram combinados com o tratamento padrão com interferon peguilado e ribavirina: eles permitiram ter uma duração de tratamento de 24 semanas dos genótipos 1 e 4 e curaram cerca de 70-80% dos pacientes, mas as questões de segurança permaneceram (HAGYMÁSI, 2021).

Em 2013, o inibidor da polimerase NS5B (sofosbuvir) foi aprovado pelo FDA, então a era livre de interferon foi iniciada. Desde 2014, a combinação livre de interferon de dois a três antivirais (inibidores da protease, paritaprevir, grazoprevir, glecaprevir e voxilaprevir; inibidores da polimerase, sofosbuvir e dasabuvir; inibidores NS5A, pibrentasvir, velpatasvir, ledvipasvir, ombitasvir) foram usados para curar quase todos os pacientes (resposta viral sustentada de mais de 95%) por 8–12

semanas sem efeitos colaterais. Os únicos limites que não podem ser evitados hoje são as interações medicamentosas significativas (HAGYMÁSI, 2021).

O protocolo nacional brasileiro de tratamento utiliza as combinações sofosbuvir / ledipasvir (pacientes sem tratamento prévio para genótipo 1), sofosbuvir / velpatasvir (pacientes sem tratamento prévio para cepas não-genótipo 1) e glecaprevir / pibrentasvir + sofosbuvir (retratamento) (NUTINI et al., 2020).

No entanto, o tratamento com AADs enfrenta vários desafios: (a) a infecção pelo VHC pode permanecer assintomática por anos e, durante esse tempo, muitas infecções não são diagnosticadas enquanto os pacientes sofrem danos sustentados no fígado; (b) os tratamentos com AADs não previnem reinfeções; (c) podem surgir vírus resistentes a esses fármacos; (d) os pacientes com doença hepática avançada permanecem em risco de câncer de fígado; e (e) o VHC é altamente prevalente nos países em desenvolvimento e entre as populações marginalizadas, onde o acesso ao diagnóstico e tratamento do vírus é limitado (YECHEZKEL; LAW; TZARUM, 2021).

Apesar dos recentes avanços no tratamento da hepatite C, prevê-se que o número de pessoas com doença hepática avançada e o número de mortes relacionadas à doença hepática aumentem nos próximos anos. Espera-se que cerca de 40% dos cânceres de fígado sejam causados pelo VHC até 2030 (CARVALHO-LOURO et al., 2020). O Brasil, no entanto, com uma estimativa de 670.000 indivíduos infectados com o VHC, é um dos nove países atualmente em vias de alcançar a eliminação da hepatite C (MATOS et al., 2019).

Em maio de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs a “Estratégia Global do Setor de Saúde sobre Hepatite Viral, 2016–2021”, com a intenção de eliminar a hepatite viral como um problema de saúde pública até 2030. No entanto, esse objetivo tem se mostrado difícil de atingir para o VHC sem o desenvolvimento de uma vacina profilática. Os regimes de tratamento do VHC alcançaram taxas de cura de cerca de 95% em ensaios clínicos e estudos de coorte. Porém, o tratamento não protege contra reinfeção, e o alto custo dos medicamentos continua sendo uma barreira na maioria dos países em desenvolvimento (VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA et al., 2021).

2.5 DIAGNÓSTICO

Após o aumento inicial nos níveis de viremia, segue-se um período de 4–6 semanas de crescimento, caracterizado pela ausência de linfócitos T e B específicos do vírus e ausência de inflamação do fígado. O RNA do VHC pode ser identificado no soro em duas semanas em quase todos os pacientes. As transaminases séricas começam a aumentar depois da segunda semana após a exposição e seus níveis atingem valores máximos em 8-12 semanas. Os anticorpos anti-VHC podem ocorrer em diferentes momentos, no momento do crescimento máximo das transaminases ou após, até seis meses após a infecção. Alguns pacientes podem nunca desenvolver anticorpos, se a depuração viral ocorrer antes do aparecimento dos anticorpos contra o vírus (OANCEA et al., 2021).

Durante a infecção por VHC, o aparecimento de biomarcadores é observado na seguinte sequência: RNA viral, antigenemia e anticorpos anti-VHC. Os anticorpos IgG totais são rotineiramente investigados, uma vez que os anticorpos IgM são produzidos irregularmente na infecção aguda pelo VHC e produzidos intermitentemente durante a fase crônica da hepatite (SANTOS et al., 2019). A hepatite C é comumente diagnosticada por testes sorológicos.

A triagem de amostras de sangue total, soro ou plasma é feita com a utilização de imunoenaios. Amostras com resultados reagentes nessa etapa têm seu resultado confirmado por meio de outros testes, que visam à detecção direta do vírus (BRASIL, 2018).

Os testes sorológicos são suficientes quando espera-se encontrar hepatite C crônica, com uma sensibilidade de mais de 99% se usar os ensaios de 3ª geração. Resultados sorológicos positivos requerem medições de RNA do VHC adicionais ou medições de antígeno do core do VHC para diferenciar infecção presente da que já teve eliminação viral. Quando uma hepatite C aguda é considerada, uma triagem sorológica por si só é insuficiente, porque os anticorpos anti-VHC são desenvolvidos tardiamente após a transmissão do vírus (MOROZOV; LAGAYE, 2018).

A genotipagem do vírus é obrigatória para todos os pacientes que utilizam a terapia antiviral. Os ensaios iniciais foram projetados para analisar exclusivamente o 5'UTR, que estava sobrecarregado com uma alta taxa de classificação incorreta, especialmente no nível do subtipo. Os ensaios atuais foram melhorados analisando adicionalmente as regiões codificantes, em particular os genes que codificam a

proteína central e o NS5B, ambos os quais fornecem diferenças de sequência não sobrepostas entre os genótipos e subtipos (MOROZOV; LAGAYE, 2018).

Estima-se que apenas 20% das pessoas que vivem com VHC foram diagnosticadas em grande parte devido à natureza clinicamente silenciosa do vírus e muitas só identificam quando a fibrose hepática é estabelecida (HARTNELL et al., 2020).

O prognóstico e a evolução das hepatites virais crônicas baseiam-se principalmente na quantificação do grau de fibrose hepática. Embora a biópsia hepática seja considerada o critério de referência na avaliação da fibrose hepática, sua natureza é invasiva e de baixa aceitabilidade pelo paciente. Por isso, o uso de técnicas de imagem no diagnóstico e evolução da doença hepática viral crônica tem aberto novos horizontes para a avaliação do estágio da fibrose, desde uma fibrose incipiente até o estágio de cirrose (OANCEA et al., 2021).

Em 2011, o FDA dos EUA aprovou o uso de testes rápidos (TRs) para detectar a infecção pelo vírus que conferem uma sensibilidade e especificidade semelhantes a outros métodos sorológicos para o VHC (CARVALHO-LOURO et al., 2020).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESES

H0: Portadores de hepatite C crônica apresentam frequências de células B efetoras e regulatórias semelhantes ao de indivíduos hígidos.

H1: Portadores de hepatite C crônica possuem frequências de células B efetoras e regulatórias distintas do perfil das células de indivíduos hígidos.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil imunofenotípico (virgem, memória e regulatório) de linfócitos B em indivíduos com hepatite C crônica, pré-tratamento.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a distribuição de subpopulações de linfócitos B em indivíduos com HCC, pré-tratamento com drogas de ação direta (DAA), comparar com controles sadios e correlacionar com carga viral.

2. Relacionar o perfil dos linfócitos B dos participantes do estudo com linfócitos T (CD4⁺/CD8⁺) e NK.

3. Estabelecer relações entre as subpopulações de linfócitos B e marcadores de lesão hepática (aminotransferases, fibrose), de autoimunidade (crioglobulinemia e autoanticorpos) e marcador tumoral (alfa-fetoproteína) nos participantes com hepatite C crônica.

4. CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: Subpopulações de linfócitos B: caracterização e envolvimento em algumas patologias.

Camila Souza Costa¹; Maria Luiza Brito de Sousa Atta²

¹Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

²Laboratório de Pesquisa em Imunologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

Resumo

Os linfócitos B são fundamentais para o desenvolvimento da resposta imune humoral e podem desempenhar ações efetoras e regulatórias, todavia sabe-se pouco ainda sobre o papel das subpopulações desses linfócitos (desde imaturos até células secretoras de anticorpos) em diferentes patologias. Esta revisão consiste em um estudo descritivo sobre maturação, características fenotípicas e papéis das células B diante de diferentes agravos. Para tal, utilizamos a base de dados PubMed para a busca de trabalhos atuais voltados ao envolvimento dos linfócitos B. Alguns trabalhos têm mostrado alterações significativas de subpopulações de linfócitos B em diferentes patologias, principalmente que a quantidade e o perfil imunofenotípico dos linfócitos B são fatores chave para progressão ou melhora das doenças. Uma compreensão dessas células é necessária para um diagnóstico preciso, levando ao tratamento ideal do paciente, visto que elas diferem substancialmente em termos de suas características funcionais.

Palavras-chave: Linfócitos B; Perfil Imunofenotípico; Patologias.

Abstract

B lymphocytes are essential for the development of the humoral immune response and can play effector and regulatory actions, however, little is known about the role of subpopulations of these lymphocytes (from immature to antibody-secreting cells) in different pathologies. This review consists of a descriptive study on maturation, phenotypic characteristics, and roles of B cells in different conditions. To this goal, we used the PubMed database to search for current studies focused on the involvement of B lymphocytes. Some studies have shown significant alterations of B lymphocytes subsets in different pathologies, mainly that the amount and immunophenotypic profile of B lymphocytes are key factors for the progression or improvement of the diseases. An understanding of these cells is necessary for an accurate diagnosis, leading to optimal patient care, as they differ substantially in terms of their functional characteristics.

Keywords: B lymphocytes; immunophenotypic profile; Pathologies.

4.1 INTRODUÇÃO

As células-tronco hematopoiéticas na medula óssea são responsáveis pela produção contínua de células B. Essas células são rigorosamente controladas por precursores hematopoiéticos baseados na rede de regulação gênica, remodelamento da cromatina, transdução de sinal de citocinas e seleção de afinidade via receptores de células B (BCR). As células B são guiadas pela CXCL13 à medida que migram para os tecidos linfoides secundários (como o baço, os nódulos linfáticos e os folículos nas placas de Peyer) (QIN et al., 2021).

O centro germinativo nos órgãos linfoides secundários inicia a ativação das células B após o sinal enviado pelo BCR quando encontra antígenos. Além do BCR, os antígenos mais complexos se ligam a outros receptores nas células B (por exemplo, receptores *toll-like* (TLRs) ou receptores do complemento). Depois de serem ativadas, as células B passam por troca de isotipo, alterando assim o isotipo de BCR de IgM e IgD para IgG, IgA ou IgE (QIN et al., 2021).

Os linfócitos B circulam no sangue, na linfa e nos órgãos linfoides secundários, incluindo o baço e os gânglios linfáticos. Eles se ligam e, em seguida, transmigram através de vênulas sanguíneas especializadas conhecidas como vênulas endoteliais altas para entrarem nos nódulos linfáticos (CRUZ-ZÁRATE et al., 2021).

Eles são mediadores da resposta imune humoral, com papel crucial na defesa contra infecções, imunidade antitumoral, resposta alérgica e distúrbios autoimunes (LIN et al., 2021). As células B são um componente importante do sistema imunológico, pois não só têm a função imunológica humoral específica de produzir anticorpos, mas também são células apresentadoras de antígeno que participam da regulação imunológica (LING et al., 2021).

O desenvolvimento de células B ocorre também na medula óssea e prossegue por vários estágios de desenvolvimento bem caracterizados, guiados pela ativação progressiva de programas de transcrição específicos de células B e rearranjo sequencial dos *loci* de imunoglobulina. Os programas de transcrição de diferenciação de células B são controlados por uma rede de fatores de transcrição E2A, EBF1, PAX5, IKAROS, BCL11A, FOXO1, IRF4, IRF8 e outros que trabalham em conjunto com muitas enzimas modificadoras de histonas e complexos de remodelação da cromatina (LIN et al., 2021).

Nos estágios iniciais, os linfócitos ainda imaturos que acabaram de ser liberados da medula óssea são chamados de linfócitos B (LB) de transição. Esses LB são caracterizados pela expressão de IgM e IgD, pelos marcadores de superfície $CD24^{++}CD38^{++}$ e pela ausência do marcador de memória CD27 (KWIECIENÍ et al., 2020; ALFARO et al., 2021). Em outra classificação, as células B $CD93(AA4.1)^+$ $IgM^{+hi}IgD^{+low}CD21^{+low}CD23^{-}$ são consideradas no estágio de transição 1 (T1), e $AA4.1^+ IgM^{+hi}IgD^{+hi}CD21^{+med/hi}CD23^+$ identifica as células B T2 (BOOTHBY; HODGES; THOMAS, 2019)

Já na periferia, os LB amadurecem em células com o fenótipo $CD24^+CD38^+CD27^{-}$ (células B virgens). Em resposta à estimulação com antígenos específicos, os LB se diferenciam em plasmoblastos, plasmócitos ou LB de memória (KWIECIENÍ et al., 2020; ALFARO et al., 2021).

Cinco subconjuntos principais de células B podem ser identificados no sangue periférico com base na expressão dos dois marcadores de regulação do desenvolvimento CD24 e CD38, em conjunto com o marcador de linhagem de células B CD19. Com base nesses marcadores de superfície, as populações de células B incluem as células B imaturas / transicionais ($CD19^+CD24^{+hi}CD38^{+hi}$), células B maduras virgens que não encontraram o antígeno ($CD19^+CD24^{+int}CD38^{+int}$), plasmoblastos secretores de anticorpos ($CD19^+CD24^+$

CD38⁺), células B de memória (CD19⁺CD24⁺CD38⁻) ou (CD19⁺CD24⁻CD38⁻) (ABDELWAHAB et al., 2020).

As células B maduras constituem populações B1 e B2 distintas caracterizadas pelo fenótipo, ontogenia, localização e produção de anticorpos (LAULE et al., 2019).

As células B maduras sofrem um processo conhecido como hipermutação somática, onde mutações induzidas por enzimas são introduzidas nas regiões variáveis da cadeia pesada e leve para diversificar ainda mais o repertório imunológico. A mesma enzima medeia a recombinação de troca de classe imunológica, substituindo a região constante μ por outra região da cadeia pesada para gerar IgA, IgE ou IgG (PATEL et al., 2020).

Elas são as células B1 inatas (CD19⁺CD5⁺) e células B2 convencionais (CD19⁺CD5⁻). As células B1 predominam nas cavidades peritoneais e pleurais e são consideradas elementos do sistema imune inato e representam 25–27% dos linfócitos B do sangue periférico. Elas produzem principalmente anticorpos IgM que têm alta reatividade cruzada, mas baixa afinidade (LIN et al., 2020). Os anticorpos naturais são polirreativos e são importantes para manter a homeostase do tecido, recrutando fagócitos ou ativando o complemento para limpar células com estresse oxidativo ou apoptóticas (LAULE et al., 2019).

Em contraste, as células B2 são responsáveis por 75–80% dos linfócitos B do sangue periférico. Elas se diferenciam em plasmócitos (células responsáveis pela síntese de anticorpos diversos e de alta afinidade) durante o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa (LIN et al., 2020). Os plasmócitos são células diferenciadas de longa duração cuja função é a produção de anticorpos. Os linfócitos B2 são células recirculantes de vida curta e metabolicamente quiescentes, que podem ser ativadas em órgãos linfoides secundários onde recebem a colaboração de células T auxiliares para gerar anticorpos específicos (ALFARO et al., 2021; MAHAJAN et al., 2021).

Os LB também podem secretar citocinas que são pró e anti-inflamatórias, modulando a resposta das células T. Além disso, subpopulações específicas de LB com capacidades imunossupressoras chamadas células B regulatórias (Bregs) demonstraram desempenhar um papel importante na tolerância ao inibir as respostas efetoras (ALFARO et al., 2021).

A grande maioria dos plasmócitos e seus precursores imediatos, os plasmoblastos, são caracterizados por alta expressão de CD27 e CD38, baixa ou

nenhuma expressão de CD20 e expressão variável de CD19, HLA-DR e CD138 (COSSARIZZA et al., 2019).

Foi demonstrado que os plasmócitos que expressam IgA dificultam as células T CD8⁺ durante suas atividades antitumorais em modelos de câncer de próstata e carcinoma hepatocelular. Em tempos em que a imunoterapia traz grandes esperanças para o tratamento do câncer, evitar que o sistema imunológico desenvolva uma tolerância ao tumor é de importância crucial, portanto, a caracterização e o estudo preciso desse subconjunto de células B representam informações valiosas (HÄFNER, 2019).

Células B reguladoras (Bregs) secretam interleucina-10 (IL-10) e têm atividade imunossupressora, mas não compartilham um imunofenótipo específico, pois diferentes subpopulações de linfócitos B são capazes de se diferenciar em Bregs (BABIĆ et al., 2021). A maior porcentagem de Bregs secretando IL-10 foi relatada nas células B imaturas / transicionais CD24^{hi}CD38^{hi} (ABDELWAHAB et al., 2020). Esse subconjunto foi associado à capacidade imunossupressora e funções regulatórias em doenças autoimunes. As Bregs podem exercer sua função também por meio da secreção de IL-35, TGF-β ou por contato célula-célula (BABIĆ et al., 2021).

Dados experimentais sugerem que o desenvolvimento de Bregs pode ser induzido na periferia em resposta a vários sinais, como sinalização BCR, citocinas ou sinais coestimulatórios. Outros estímulos, como o ligante indutor de proliferação (APRIL), também mostraram sua capacidade de induzir Bregs por meio de sua ligação ao seu receptor. Da mesma forma, a estimulação por CD40 demonstrou aumentar a capacidade imunossupressora de células B de transição *in vitro*. Por outro lado, a sinalização mediada por receptores *Toll-like* (TLR) induz a produção de LB produtores de IL-10. As células Bregs também são capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α (ALFARO et al., 2021).

Em 2011 um estudo propôs células de linfócitos CD19⁺CD20⁺CD43⁺CD70⁻ como o fenótipo B1 humano, e essas células produziram espontaneamente IgM e IL-10. Porém, de acordo com a presença ou ausência de CD11b na superfície dessas células, a capacidade de produção de IgM e ativação de linfócitos T CD4⁺ pode diferir (CASAROTTI et al., 2021).

As células B são capazes de sintetizar várias citocinas que exercem um efeito causador / protetor de doenças em tumores malignos, infecção e autoimunidade. As

citocinas imunossupressoras mais representativas incluem TGF- β e IL-10 como já dito acima. Além disso, as citocinas que desempenham um papel de imunorregulação positiva consistem em IL-2, IL-4, IL-12 e IFN- α capazes de promover o desenvolvimento e respostas Th1, Th2 e Th17; GM-CSF desencadeando resposta de neutrófilos; IFN- α , TNF- α e linfotóxina (LT) - α / β desencadeando a maturação das células dendríticas e processos de formação de configurações linfoides; IFN- α melhorando as células NK e a ativação de macrófagos, estimulando o seu próprio desenvolvimento e promovendo a produção de anticorpos (QIN et al., 2021).

4.2 METODOLOGIA

Esta revisão consiste em um estudo descritivo sobre as características fenotípicas dos linfócitos B em algumas patologias. A base de dados utilizada para busca dos trabalhos foi o PubMed e o período de busca foi de janeiro de 2016 a setembro de 2021. Os descritores utilizados na pesquisa, no idioma inglês, foram os seguintes: B lymphocytes, B cells, phenotypic, bookmarks, flow cytometry, immunopathogenesis, Bregs e foi utilizado como estratégia de busca a combinação dos descritores com o termo “and” e “or”. Após análise do título e do resumo, foram incluídas as publicações que se enquadravam com os objetivos da revisão.

4.3 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DOS LINFÓCITOS B

A citometria de fluxo multiparamétrica é uma ferramenta poderosa para desvendar a heterogeneidade fenotípica das células do sistema imunológico em humanos (BUREL et al., 2020). Com relação ao sistema imunológico humano saudável, as células B são identificadas como linfócitos CD3⁻CD19⁺ e encontram-se as seguintes subpopulações no painel de citometria de fluxo: *naive* (CD27⁻IgD⁺), memória não comutada (CD27⁺IgD⁺), duas populações de células de memória comutadas (CD27⁺IgD⁻ e CD27⁻IgD⁻), células B de transição (CD38^{hi}CD24⁺) e duas populações de plasmoblastos incluindo CD38^{hi}CD27^{hi} e CD38^{hi}CD20^{low} (Yi et al., 2019).

A identificação de subconjuntos imunes no sangue é uma importante ferramenta de diagnóstico e monitoramento na clínica para certas condições

imunológicas e não imunológicas (Yi et al., 2019) e esses perfis de linfócitos podem apresentar uma frequência alterada em algumas patologias.

4.4 O PAPEL DOS LINFÓCITOS B EM DIFERENTES DOENÇAS

4.4.1 DOENÇAS INFECCIOSAS

Estudos recentes indicaram uma diminuição clara nos linfócitos periféricos em pacientes com a doença do novo coronavírus (COVID-19), mas a alteração específica nas subpopulações ainda é desconhecida. Um estudo mostrou que há uma porcentagem significativamente maior de plasmoblastos em pacientes com COVID-19 do que em controles (KWIECIEŃ et al., 2020).

Em comparação com controles saudáveis, pacientes com infecção por SARS-CoV-2 apresentam níveis mais baixos de linfócitos CD19⁺, e essas células também diminuem para o nível mais baixo duas semanas após o início de sintoma (YU; YANG, 2020).

Em infecções virais crônicas como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), as funções desordenadas das células B e a distribuição das subpopulações significam doença não controlada. Os níveis de células B de transição imaturas mostraram estar relacionados a algumas condições com imunodeficiência humoral, incluindo a infecção pelo HIV (ABDELWAHAB et al., 2020).

No caso do vírus da dengue, esse interage diretamente com os linfócitos B, desencadeando vias de ativação de sinalização que medeiam a secreção de imunoglobulinas e citocinas. A estimulação de células B é dependente da ativação de MAPK e CD81. As células B cultivadas com o vírus também secretam IL-6 e apresentam expressão aumentada de CD86 e HLA-DR, o que pode contribuir para a função coestimuladora de linfócitos B (CORREA et al., 2015).

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) está associada ao aumento da ativação e proliferação de células B com aumento do risco de doenças autoimunes e linfoproliferativas de células B. Poucos estudos investigaram a alteração nas subpopulações de células B em pacientes infectados com o VHC (ABDELWAHAB et al., 2020). Por exemplo, em pacientes com hepatite C crônica (HCC) não tratados e tratados durante 12 semanas com interferon-alfa mais ribavirina há um aumento na proporção de células B (CD19⁺) (OLIVEIRA et al., 2016). Em 2005 foi publicado que

os linfócitos B da grande maioria dos pacientes com HCC são ativados e que as células virgens (CD27⁻) apresentam um nível mais alto de marcadores de ativação do que os linfócitos B de memória (CD27⁺) (ROSA et al., 2005).

Sabe-se também que a alta infiltração de células plasmáticas (CD19⁺CD38⁺) e células B de memória (MS4A1⁺CD2⁺) no microambiente de pacientes com papilomavírus humano (HPV) está relacionada a um melhor prognóstico (ZHANG et al., 2021).

Na espondilodiscite infecciosa aguda (EIA) encontra-se uma proporção menor de linfócitos B da zona marginal CD19⁺CD27⁺IgD⁺. Uma grande proporção de pacientes com EIA apresentam deficiência profunda de linfócitos B (HAUGAARD et al., 2018).

4.4.2 DOENÇAS IMUNOLÓGICAS

Em pacientes com a doença relacionada à IgG4, uma condição fibroinflamatória, um estudo mostrou que os linfócitos B são capazes de orquestrar a fibrose tecidual através de mecanismos como: (i) a secreção de fatores pró-fibróticos que induzem a produção de colágeno por fibroblastos ativados; (ii) a secreção de sinais quimiotáticos para populações pró-fibróticas de linfócitos T e macrófagos; (iii) a produção de proteínas de colágeno; e (iv) a organização da matriz extracelular. Além disso, ao traçar o perfil de subpopulações de células B nesses pacientes, identificou-se que plasmoblastos expressaram conjuntos de genes implicados na ativação e proliferação de fibroblastos e, portanto, representam células com propriedades pró-fibróticas intrínsecas (DELLA-TORRE et al., 2020).

A progressão da deficiência de IgA (DIgA) para imunodeficiência comum variável (ICV) tem sido relatada, embora não constitua regra geral. Postula-se que a associação com doenças autoimunes constitua fator de risco para tal progressão. Embora a fisiopatologia da ICV não esteja esclarecida, a redução de células B de memória *class-switched* (CD27⁺IgG⁻IgM⁺) tem sido relacionada a sua maior associação com autoimunidade. Por outro lado, na DIgA a persistência de células B imaturas IgM⁺IgD⁺ foi associada à progressão para ICV (RIVAS et al., 2010).

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) tem sido associado à hiperatividade de células B policlonais e produção de autoanticorpos. Os linfócitos B de pacientes com LES também exibem uma expressão aumentada dos marcadores CD86, CD80 e

CD38 e de níveis de IgG e IgA em sua superfície. Esses pacientes têm uma proporção elevada de linfócitos B de memória e uma proporção diminuída de linfócitos B pré-comutados. Há também uma concentração elevada de IL-10 no LES e esses níveis se correlacionam com a atividade da doença e a produção de anticorpos anti-dsDNA, uma vez que os linfócitos Bregs são os principais linfócitos B produtores de IL-10, eles provavelmente contribuem para a patogênese do LES (ZAMORA et al., 2019).

Células B imaturas / de transição $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ estão mais elevadas em pacientes diabéticos do que em não diabéticos (ABDELWAHAB et al., 2020).

Em pacientes com infarto agudo do miocárdio, estudos experimentais sugeriram que os linfócitos B podem influenciar a massa infartada embora existam poucos dados sobre o papel dessas células em humanos. Além disso, um possível papel ateroprotetor para os linfócitos B1 foi proposto com base na produção de IL-10 e anticorpos naturais, que podem mudar a resposta próinflamatória para uma cura mais adequada, promovendo a recuperação celular e a eliminação de restos celulares apoptóticos. Por outro lado, os linfócitos B clássicos ou células B2 estão ligados à progressão da aterosclerose, possivelmente por sua interação com os linfócitos T $CD4^+$ (CASAROTTI et al., 2021).

Por fim, as doenças linfoproliferativas crônicas de células B $CD5^+$ constituem o grupo de neoplasias hematológicas mais frequentes como, por exemplo, a leucemia linfocítica crônica (LLC) que é caracterizada pela expansão clonal de pequenas células B $CD19^+CD23^+CD5^+$ de aparência madura que se acumulam no sangue, medula óssea e órgãos linfoides (DARWICHE et al., 2018). Porém, as doenças linfoproliferativas de baixo grau de células B $CD5^-CD10^-$ do baço compreendem um grupo fascinante de proliferação de células B indolentes, neoplásicas e maduras, como é o caso do linfoma da zona marginal e leucemia de células pilosas (SCHMIEG et al., 2021).

4.5 CONCLUSÃO

Nesta revisão da literatura buscamos descrever as características e desenvolvimento dos linfócitos B efetores e regulatórios, os grandes responsáveis por garantir a imunidade humoral. Sabe-se pouco ainda sobre o envolvimento das subpopulações de linfócitos B nas variadas patologias. Uma compreensão dessas

células é necessária para um diagnóstico preciso, levando ao tratamento ideal do paciente, visto que elas diferem substancialmente em termos de suas características funcionais.

4.6 REFERÊNCIAS

ABDELWAHAB, Fadwa A. et al. Impact of deranged B cell subsets distribution in the development of HCV-related cirrhosis and HCC in type two diabetes mellitus. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

ALFARO, Rafael et al. Monitoring of B Cell in Kidney Transplantation: Development of a Novel Clusters Analysis and Role of Transitional B Cells in Transplant Outcome. **Diagnostics**, v. 11, n. 4, p. 641, 2021.

BABIĆ, Antonija et al. B regulatory cells and monocyte subpopulations in patients with chronic graft-vs-host disease. **Croatian Medical Journal**, v. 62, n. 2, p. 154, 2021.

BOOTHBY, Mark R.; HODGES, Emily; THOMAS, James W. Molecular regulation of peripheral B cells and their progeny in immunity. **Genes & development**, v. 33, n. 1-2, p. 26-48, 2019.

BUREL, Julie G. et al. The Challenge of Distinguishing Cell–Cell Complexes from Singlet Cells in Non-Imaging Flow Cytometry and Single-Cell Sorting. **Cytometry Part A**, v. 97, n. 11, p. 1127-1135, 2020.

CASAROTTI, Ana CA et al. Role of B lymphocytes in the infarcted mass in patients with acute myocardial infarction. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 2, p. BSR20203413, 2021.

CORREA, Arturo Ramon Vargas et al. Dengue virus directly stimulates polyclonal B cell activation. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0143391, 2015.

COSSARIZZA, Andrea et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. **Eur. J. Immunol**, v. 49, p. 1457-1973, 2019.

CRUZ-ZÁRATE, D. et al. Myo1g is required for efficient adhesion and migration of activated B lymphocytes to inguinal lymph nodes. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

DARWICHE, Walaa et al. Chronic lymphocytic leukemia B-cell normal cellular counterpart: clues from a functional perspective. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 683, 2018.

- DELLA-TORRE, Emanuel et al. B lymphocytes directly contribute to tissue fibrosis in patients with IgG4-related disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 145, n. 3, p. 968-981. e14, 2020.
- HÄFNER, Sophia Julia. The many (sur) faces of B cells. **biomedical journal**, v. 42, n. 4, p. 201-206, 2019.
- HAUGAARD, Anna K. et al. Quantitative B-lymphocyte deficiency and increased TCR $\gamma\delta$ T-lymphocytes in acute infectious spondylodiscitis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.
- KWIECIEŃ, Iwona et al. Maturation of T and B Lymphocytes in the Assessment of the Immune Status in COVID-19 Patients. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 2615, 2020.
- LAULE, Connor F. et al. Role of B1 and B2 lymphocytes in placental ischemia-induced hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 317, n. 4, p. H732-H742, 2019.
- LIN, Jieshan et al. Decreased B1 and B2 lymphocytes are associated with mortality in elderly patients with chronic kidney diseases. **Frontiers in medicine**, v. 7, p. 75, 2020.
- LIN, Yun Hsiao et al. Regulation of B lymphocyte development by histone H2A deubiquitinase BAP1. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.
- LING, Chen et al. B Lymphocyte Subsets in Children With Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome: A Longitudinal Study. **Frontiers in Pediatrics**, p. 1040, 2021.
- MAHAJAN, Vinay S. et al. B1a and B2 cells are characterized by distinct CpG modification states at DNMT3A-maintained enhancers. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2021.
- OLIVEIRA, Isabela S. et al. Peripheral lymphocyte subsets in chronic hepatitis C: Effects of 12 weeks of antiviral treatment with interferon-alpha plus ribavirin. **Microbial pathogenesis**, v. 91, p. 155-160, 2016.
- PATEL, Akshay J. et al. The role of B lymphocytes in the immuno-biology of non-small-cell lung cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 69, n. 3, p. 325-342, 2020.
- QIN, Miaomiao et al. Current Perspectives on B Lymphocytes in the Immunobiology of Hepatocellular Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.
- RIVAS, José de Jesus et al. Caracterização imunofenotípica de linfócitos B de memória na deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável. **Rev. bras. alergologia imunopatol**, p. 23-31, 2010.

ROSA, Domenico et al. Activation of naive B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18544-18549, 2005.

SCHMIEG, John J. et al. CD5-Negative, CD10-Negative Low-Grade B-Cell Lymphoproliferative Disorders of the Spleen. **Current Oncology**, v. 28, n. 6, p. 5124-5147, 2021.

YI, John S. et al. Establishment of normative ranges of the healthy human immune system with comprehensive polychromatic flow cytometry profiling. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. e0225512, 2019.

YU, Xingxia; YANG, Rongrong. Changes of peripheral lymphocyte subset in patients with SARS-CoV-2 infection during the whole course of disease. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 15, n. 4, p. 553-559, 2021.

ZAMORA, Carlos et al. Association of platelet binding to lymphocytes with B cell abnormalities and clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. **Mediators of inflammation**, v. 2019, 2019.

ZHANG, Siwei et al. Characteristics of B lymphocyte infiltration in HPV+ head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer science**, v. 112, n. 4, p. 1402, 2021

5. CAPÍTULO 2: Artigo Científico 2: Subpopulações de linfócitos B na hepatite C crônica

Camila Souza Costa¹; Luciana Santos Cardoso²; Ajax Mercês Atta²; Maria Luiza Brito de Sousa Atta²

¹Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

²Laboratório de Pesquisa em Imunologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

Resumo

O vírus da hepatite C é responsável por causar fibrose hepática, carcinoma hepatocelular e cirrose. O papel dos linfócitos B (LB) na hepatite C crônica (HCC) tem sido principalmente avaliado quanto à resposta imune mediada por anticorpos. Poucos são os dados na literatura mostrando a relação de subpopulações de LB com a HCC. O objetivo desse estudo foi analisar subpopulações de LB em indivíduos com HCC, sua relação com outras subpopulações de linfócitos, com marcadores de lesão hepática e laboratoriais. Células mononucleares do sangue

periférico foram analisadas por citometria de fluxo. Neste estudo, não foi encontrado diferenças entre as subpopulações de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, NK, LB CD19⁺, LB de memória (CD19⁺CD27⁺IgM⁺), LB *naive* (CD19⁺CD27⁺IgM⁺) e LB CD5⁺ (*naive* e memória), entre os participantes com HCC e controles. No entanto, foi encontrado aumento nas frequências da subpopulação de LB regulatório (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) nesses pacientes. Os LB regulatórios apresentaram correlação positiva com as células NK e LB CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD5⁺. As subpopulações de LB avaliadas não apresentaram correlação com a carga viral, com marcador de lesão hepática nem associação com crioglobulinemia. Esses dados sugerem que células Breg pode ter envolvimento direto na imunorregulação da HCC.

Palavras-chave: Hepatite C Crônica; Linfócitos B; Imunorregulação

Abstract

The hepatitis C virus is responsible for causing liver fibrosis, hepatocellular carcinoma, and cirrhosis. The role of B lymphocytes (BL) in chronic hepatitis C (CHC) has mainly been evaluated in terms of antibody-mediated immune response. There are few data in the literature showing the relationship of BL subpopulations with CHC. The aim of this study was to analyze BL subpopulations in individuals with CHC, their relationship with other lymphocyte subpopulations, with liver injury and laboratory markers. Peripheral blood mononuclear cells were analyzed by flow cytometry. In this study, no differences were found between subsets of TCD4⁺, TCD8⁺, NK cells, CD19⁺ B cells, memory BL (CD19⁺CD27⁺IgM⁺), naive BL (CD19⁺CD27⁺IgM⁺) and CD5⁺ BL (naive and memory) lymphocytes, between CHC participants and controls. However, an increase in the frequencies of the regulatory BL subset (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) was found in these patients. Regulatory BL showed a positive correlation with CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD5⁺ BL and NK cells. The BL subsets evaluated showed no correlation with viral load, with liver injury marker or association with cryoglobulinemia. These data suggest that Breg cells may have direct involvement in the immunoregulation of CHC.

Keywords: Chronic Hepatitis C; B cells subsets; Immunoregulation.

5.1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (VHC) é um pequeno vírus de RNA de fita simples, envelopado, da família *Flaviviridae*, com alto grau de heterogeneidade genética (SCHILLIE et al., 2020), possuindo sete genótipos principais e 67 subtipos, dos quais o genótipo 1 é o mais prevalente (SEPULVEDA-CRESPO et al., 2020; EL-MOWAFY et al., 2021). Esse vírus é responsável por uma das principais causas de doença hepática em todo o mundo, com 130-170 milhões de pessoas infectadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (CHAUDHARI et al., 2021) e 71 milhões de pessoas cronicamente infectadas em todo o mundo (BOTHEJU et al.,

2019; BINKA et al., 2020). Como tal, uma meta global para a eliminação da infecção pelo VHC até 2030 foi estabelecida pela OMS (MAHMUD et al., 2020) (redução de 80% na incidência de infecção e uma redução de 65% nas mortes associadas ao VHC) (BINKA et al., 2020).

É um vírus transmitido por via parenteral (PATRA; RAY; RAY, 2019) e a infecção crônica pelo VHC pode levar a várias morbidades, como fibrose hepática, carcinoma hepatocelular e cirrose (RIOS et al., 2021). O recente desenvolvimento de antivirais de ação direta (AAD) altamente eficazes oferece novas oportunidades promissoras no controle da transmissão do vírus (MAHMUD et al., 2020). Porém, o tratamento com AAD não previne a carcinogênese e a reinfeção continua sendo um problema nos grupos de alto risco (STRÖH; KREY, 2020).

Manifestações extra-hepáticas bem reconhecidas incluem distúrbios metabólicos lipídicos, doença aterogênica, crioglobulinemia mista, distúrbios linfoproliferativos, doença renal, resistência à insulina, diabetes tipo 2, poliartrite semelhante à artrite reumatoide, doença óssea metabólica, osteopenia e doenças autoimunes (CHAUDHARI et al., 2021).

Os anticorpos anti-VHC podem ser detectados 4–10 semanas após a infecção e estão presentes em aproximadamente 97% das pessoas seis meses após a exposição. O RNA do VHC pode ser detectado em 1–2 semanas após a exposição. A presença de RNA do VHC indica infecção atual (SCHILLIE et al., 2020).

O papel dos linfócitos B, na hepatite C, tem sido principalmente avaliado quanto à resposta imune mediada por anticorpos. Recentemente, foi demonstrado que anticorpos neutralizantes gerados nos primeiros 100 dias de infecção geralmente têm uma capacidade de neutralização estreita direcionada ao VHC. Embora esses anticorpos não consigam eliminar a infecção, eles têm sido associados à redução da fibrose hepática e os pacientes que apresentam hipogamaglobulinemia têm uma progressão da doença mais grave (DUNCAN et al., 2020).

Linfócitos B são células imunes efectoras representadas no sangue periférico por diferentes subpopulações associadas à maturação (células pré-B, células B *naive* (virgens), células B do centro germinativo, células B de memória e plasmócitos) (DÍEZ et al., 2021) que podem ser identificadas através da citometria de fluxo. As células B emergem da medula óssea como células de transição que se

diferenciam nos estágios T1, T2 e T3 para se tornarem células B virgens (PALANICHAMY et al., 2009; TULL et al., 2021).

A capacidade do VHC de persistir cronicamente no hospedeiro representa um estímulo contínuo para o sistema imunológico, resultando em expansões oligo / monoclonais de células B. A ocorrência de clonalidade intra-hepática de células B se correlaciona com as manifestações clínicas extra-hepáticas da infecção e o enriquecimento de células B pode ser o resultado da presença de alguns sinais que aumentam a sobrevivência celular como o fator de ativação de linfócitos B (BAFF) (LAULETTA et al., 2012).

A infecção crônica pelo VHC é caracterizada por vários distúrbios de células B. É uma das principais causas da crioglobulinemia mista do tipo II. Os anticorpos IgM exibem atividade de fator reumatoide e são autorreativos contra anticorpos IgG anti-VHC (LAKE-BAKAAR; JACOBSON; TALAL, 2012).

A interação entre a proteína E2 do envelope viral e a molécula CD81 dos linfócitos B leva à ativação celular, que por sua vez protege os linfócitos da morte celular e regula sua função. Portanto, o envolvimento de E2-CD81 pode contribuir para distúrbios linfoproliferativos de células B associados ao VHC e produção insuficiente de anticorpos neutralizantes (PRECIADO et al., 2014; FÉNÉANT; LEVY; COCQUEREL, 2014).

O VHC pode persistir por internalização em células B seguido por transmissão das partículas virais eclipsadas ou ocultas para o fígado (promovida pelo ligante CD40 e IL-4). Além disso, a persistência do vírus contribui para a resistência da subpopulação de células B CD5⁺ à apoptose, levando ao linfoma de células B (SHAPSHAK et al., 2009).

Até o presente momento, não tem sido ainda bem definido um papel de subpopulações de linfócitos B na hepatite C crônica. Assim, esse estudo teve como objetivo analisar subpopulações de linfócitos B (virgem, memória e regulatório) em indivíduos com hepatite C crônica (HCC), antes do tratamento com antivirais de ação direta, sua relação com outras subpopulações de linfócitos, com marcadores de lesão hepática e laboratoriais.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 PACIENTES E CONTROLES

Indivíduos portadores de hepatite C crônica, antes de tratamento com antivirais de ação direta, atendidos no Ambulatório de Hepatites do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (C-HUPES), da Universidade Federal da Bahia, foram convidados a participar deste estudo. Eles eram clinicamente diagnosticados com hepatite viral C crônica (HCC), previamente documentada por exames clínicos, soropositividade para anticorpos IgG anti-VHC e avaliação de fibrose hepática. Os dados sobre a fibrose hepática foram obtidos dos prontuários dos pacientes, sendo utilizado o sistema Fibroscan®. A genotipagem e a carga viral do VHC desses participantes também foram obtidas dos prontuários. Voluntários aparentemente saudáveis, que frequentavam o Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia para exames de rotina, foram incluídos como controles. Para ambos os grupos de participantes, foram adotados os seguintes critérios de exclusão: infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (VHB), vírus linfotrópico de células T humana (HTLV) ou outras enfermidades crônicas. Todos os participantes foram previamente informados sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, sob CAAE 80611417.8.0000.8035.

5.2.2 ANÁLISE LABORATORIAL

O equipamento Sysmex XN-1000™ (Sysmex Europe GmbH, Alemanha) foi usado para realização do exame de hemograma, nas amostras de sangue coletadas em EDTA, dos participantes do estudo. Os parâmetros bioquímicos foram analisados nas amostras de soro, pelo método cinético-UV (alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), bilirrubinas direta e total, proteínas totais, albumina e creatinina) utilizando o analisador Konelab 60i (Thermo Fisher Scientific, EUA). A crioglobulina sérica foi pesquisada por crioprecipitação. Anticorpos antinucleares (ANA) e

anticorpos antimúsculo liso (AML) séricos foram detectados por imunofluorescência indireta. Dosagem sérica de fator reumatoide (FR) e alfa-fetoproteína (AFP) foram realizadas através do método de microaglutinação automatizada, usando-se o nefelômetro IMMAGE® (Beckman Coulter, EUA).

5.2.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) E CITOMETRIA DE FLUXO

Foi realizado uma coleta de 20 mL de sangue heparinizado de todos os participantes do estudo para a obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSP) através do gradiente Ficcol-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala) e ajustadas para a concentração de 1×10^7 células/mL em meio RPMI 1640 completo (100 μ L/mL de gentamicina, L-glutamina 2 mM, 30 mM HEPES), contendo 10% de soro fetal bovino (SBF) inativado (Life Technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Posteriormente, as CMSP foram marcadas com anticorpos monoclonais para marcações de superfície celular, conjugados com fluorocromos, por 20 minutos a 4°C, previamente diluídos em solução de diluição de anticorpos (SDA). As combinações de anticorpos monoclonais marcados foram realizadas de acordo para identificar as seguintes subpopulações de linfócitos: células B (CD3⁻CD19⁺; virgem CD19⁺CD27⁻IgM⁺; memória CD19⁺CD27⁺IgM⁺; regulatório CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, B1 CD19⁺CD5⁺IgM⁺) células T (TCD3⁺; TCD3⁺CD4⁺; TCD3⁺CD8⁺) e células NK (CD3⁻CD56⁺). Foram usados os seguintes anticorpos marcados: anti-CD19-ficoeritrina cianina 7 (PE-Cy7, Ebioscience, EUA), anti-IgM-ficoeritrina (PE, Invitrogen, EUA), anti-CD27-alofocianina (APC, Invitrogen, EUA), anti-CD5-isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD Biosciences, EUA), anti-CD24-FITC (Invitrogen, EUA), anti-CD38-ficoeritrina cianina 5 (PE-Cy5, BD Biosciences, EUA), anti-CD3-PE (Invitrogen, EUA), anti-CD4-FITC (Invitrogen, EUA), anti-CD8-PE-Cy5 (BD Biosciences, EUA) e anti-CD56-APC (Invitrogen, EUA).

Em seguida à marcação das moléculas de superfície, as células foram lavadas 1x com solução salina fosfatada (PBS); fixadas com 200 μ L de formaldeído a 2% em PBS e mantidas a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da aquisição. A aquisição foi realizada utilizando-se o aparelho FACSCanto II (BD Biosciences, Becton Dickinson®, EUA), num total de 100.000 eventos.

Os linfócitos foram analisados quanto sua frequência e expressão de marcadores de superfície celular utilizando-se o programa FlowJo™ (Tree Star, EUA). As populações celulares foram definidas por fluorescência inespecífica a partir da dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) como parâmetros de tamanho e granulosidade celular, respectivamente. De acordo com as características celulares, foram feitas a seleção das populações linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, CD3⁻CD56⁺ e CD19⁺, além dos linfócitos B virgens (CD19⁺CD27^{neg}IgM⁺), de memória (CD19⁺CD27⁺IgM⁺), B1 (CD19⁺CD5⁺IgM⁺) e regulatório (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) (Figura 1).

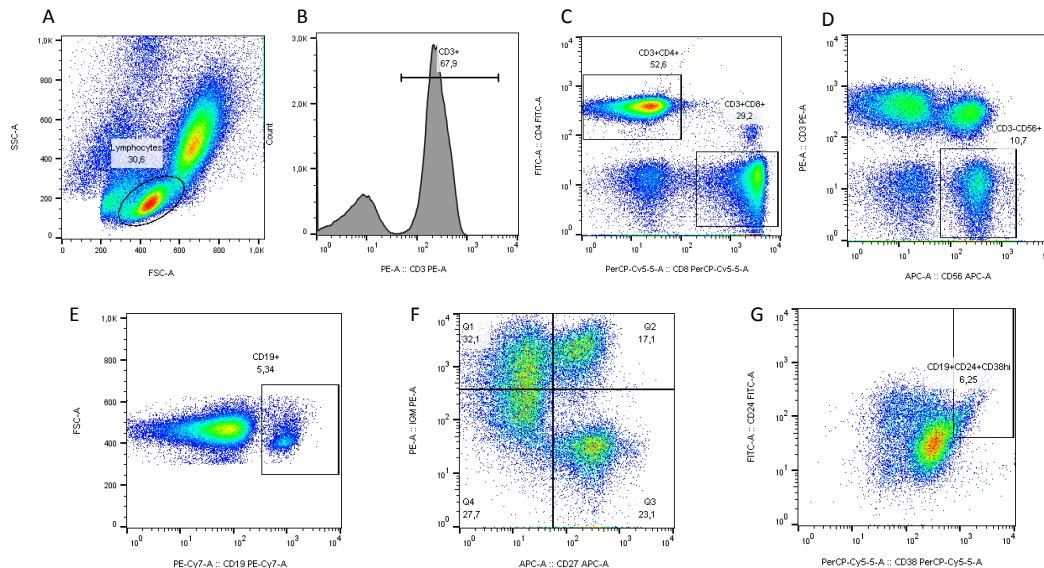


Figura 1. Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) identificando as populações de linfócitos (A); seleção das subpopulações de linfócitos T a partir da expressão de CD3 (B); seleção da população dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ a partir da marcação de CD4 e CD8 (C); seguido pela identificação dos linfócitos NK (CD3⁻CD56⁺) (D); identificação dos linfócitos B a partir de marcações de CD19 (E); seguido pela identificação linfócitos B *naive* (CD19⁺CD27^{neg}IgM⁺) e de memória (CD19⁺CD27⁺IgM⁺) (F); linfócitos B regulatório (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) (G).

5.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Prism versão 8.4.3 (GraphPad Software Inc., USA). O teste de normalidade D'Agostino-Pearson foi

utilizado para avaliar a distribuição das variáveis. As variáveis quantitativas contínuas com distribuição normal foram expressas em média \pm desvio padrão e as que não tiveram distribuição normal, em mediana com intervalo interquartil (IQR). Os intervalos de confiança 95% foram calculados para cada variável. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney e o teste t não-pareado foram utilizados para comparação entre dois grupos, a depender da distribuição das variáveis, e o teste de Spearman foi usado nas análises de correlação. O teste exato de Fisher foi usado para análise de variáveis categóricas. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de $P < 0,05$.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Neste estudo, participantes com HCC ($n=10$), média de idade $50,3 \pm 9,5$ anos (variação 35 – 60 anos), sendo sete mulheres e três homens, foram avaliados. Apenas um paciente foi infectado com o genótipo 3 e todos demais com o genótipo 1 (seis 1a e dois 1b). O Fibroscan[®] foi realizado em oito dos pacientes avaliados, conforme documentado nos prontuários médicos, sendo quatro com estágio de fibrose hepática mínima e moderada (F1 / F2) e quatro com estágios moderado e avançado (F3 / F4). Carga viral elevada (≥ 800.000 UI/mL) foi detectado em 50% (5/10) dos pacientes, e quase todos apresentavam níveis aumentados de ALT (mediana = 57 U/L, IQR 45 – 100). Dados podem ser visualizados na Tabela 1.

Dos participantes do estudo com HCC, foi detectado a presença de anticorpos antinucleares (ANA) em apenas um deles (1:80 nuclear pontilhado fino), e outro paciente foi positivo para anticorpos antimúsculo liso (AML) (1:40). Níveis séricos de fator reumatoide maiores do que o ponto de corte de 14 UI/mL foram encontrados em 30% (3/10) dos pacientes, enquanto a crioglobulinemia foi detectada em 60% (6/10) deles. O marcador tumoral alfa-fetoproteína (AFP) estava discretamente elevado em 30% (3/10) dos pacientes avaliados (valor de referência para adultos: inferior a 8,1 ng/mL).

Os participantes saudáveis (PS) formaram o grupo controle ($n=10$): média de idade $46 \pm 7,6$ anos, variação de 36 – 57 anos, sendo cinco mulheres e cinco homens, conforme Tabela 1. Não foi detectado a presença dos autoanticorpos

pesquisados ou crioglobulinemia neste grupo. Apenas um participante apresentou AFP com valor um pouco acima do valor de referência (10,45 ng/mL).

Os principais parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos dos grupos participantes deste estudo estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 1. Características epidemiológicas e da infecção em participantes com hepatite C crônica não tratados (HCC) e participantes controles sadios (PS).

Características	HCC (n=10)	PS (n=10)
Gênero		
Feminino	7/10 (70%)	5/10 (50%)
Masculino	3/10 (30%)	5/10 (50%)
Idade (anos), média ± SD	50 ± 9,5	46 ± 7,6
Genótipo		
Gen 1	9/10 (90%)	-
Gen 3	1/10 (10%)	-
Carga Viral		
Baixa (<800.000 UI/mL)	5/10 (50%)	-
Elevada (≥800.000 UI/mL)	5/10 (50%)	-
Fibrose hepática (FIBROSCAN)		
F1 - F2 (leve/moderada)	4/8 (50%)	-
F3 - F4 (avançada/cirrose)	4/8 (50%)	-

Os valores estão expressos como média e desvio padrão e analisados pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearson.

Tabela 2. Achados laboratoriais (parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos) do grupo de participantes com hepatite C crônica (HCC), antes do tratamento antiviral, e do grupo controle com participantes saudáveis (PS).

PARÂMETRO	HCC (variação)	PS (variação)	P*
Leucócitos (cel/mm ³)	6533 ± 2178 (3800 – 10100)	6650 ± 1965 (2700-9850)	ns
Linfócitos (cel/mm ³)	2223 ± 574 (990 – 2905)	2288 ± 549 (1674 - 3428)	ns
Hemoglobina (g/dL)	14,7 ± 0,8 (13,3 – 15,9)	13,8 ± 1,4 (11,1 - 15,3)	ns
Plaquetas (cel/mm ³)	225 ± 62 (75 – 288)	258 ± 38 (194 – 304)	ns
Alanina aminotransferase (ALT) (U/L)	57 (IQR 45,3 – 99,8) (23 - 228)	32 ± 25 (9 – 86)	0,011
Aspartato aminotransferase (AST) (U/L)	64 ± 27 (22 - 101)	27 ± 9 (18 – 41)	<0,001
Gama glutamil transferase (GGT) (U/L)	77 (IQR 47 – 138) (34 - 448)	26 (IQR 17 – 76) (14 – 144)	0,023
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,52 ± 0,24 (0,20 – 1,00)	0,3 ± 0,15 (0,2 – 0,6)	0,027
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,15 ± 0,13 (0,01 – 0,4)	0,08 ± 0,04 (0,01 – 0,10)	ns
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,37 ± 0,11 (0,19 – 0,60)	0,23 ± 0,15 (0,10 – 0,50)	0,037
Proteína Total (g/dL)	7,4 ± 0,7 (6,4 – 8,3)	7,0 ± 0,2 (6,6 – 7,4)	ns
Albumina (g/dL)	4,3 ± 0,3 (3,6 – 4,7)	4,3 ± 0,2 (4,0 – 4,5)	ns
Globulinas (g/dL)	3,1 ± 0,7 (2,0 – 3,8)	2,7 ± 0,2 (2,3 – 2,9)	ns
Creatinina (mg/dL)	0,85 ± 0,13 (0,7 – 1,0)	0,8 ± 0,12 (0,6 – 1,0)	ns
Alfa-fetoproteína (ng/mL)	8,3 ± 6,7 (2,9 – 20,6)	3,7 (IQR 2,05 – 4,75) (1,8 – 10,5)	0,019
Fator reumatoide (UI/mL)	3 / 10 (30%)	0 / 10	ns
Anticorpos antinucleares (ANA)	1 / 10 (10%)	0 / 10	ns
Anticorpo antimúsculo liso (AML)	1 / 10 (10%)	0 / 10	ns
Crioglobulinas	6 / 10 (60%)	0 / 10	0,011

Os valores estão expressos como média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (IQR) de acordo com a distribuição das variáveis quantitativas, analisadas pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. A significância estatística dessas variáveis foi determinada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ou teste *t* não pareado, conforme o caso. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste exato de Fisher. ns = não significativo.

5.3.2 FREQUÊNCIAS DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B, T, E CÉLULAS NK

Os dados quantitativos de leucócitos totais, obtidos do hemograma, não mostraram diferença estatística entre os dois grupos de participantes (HCC, média = $6.533/\text{mm}^3 \pm 2.178$ (variação 3.800 – 10.100); PS, média = $6.650/\text{mm}^3 \pm 1.965$ (variação 2.700 – 9.850), assim como para os valores de linfócitos totais (HCC, média = $2.223/\text{mm}^3 \pm 574$ (variação 990 – 2905); PS, média = $2.288/\text{mm}^3 \pm 549$ (variação 1674 – 3428), conforme apresentado na Tabela 2.

Quanto aos marcadores de subpopulações dos linfócitos, a frequência (em percentual) de linfócitos totais marcados com anti-CD3⁺ não apresentou diferença entre os grupos avaliados (HCC, média = $62,3 \pm 11,9$; PS, média = $54,3 \pm 8,7$; Figura 2A). Do mesmo modo, a frequência da subpopulação de linfócitos TCD4⁺ dos participantes com HCC não apresentou diferença quando comparado à dos participantes saudáveis (HCC, média = $33,9 \pm 21,9$; PS, média = $44,6 \pm 12,6$; Figura 2B). Em relação à frequência de linfócitos TCD8⁺ observou-se uma tendência para valores mais elevados na maioria dos participantes com HCC (média = $50,8 \pm 18,3$) do que o observado nos participantes saudáveis (média = $37,2 \pm 12,8$; Figura 2C).

A subpopulação de linfócitos B (CD3⁻CD19⁺) também não apresentou diferença nas frequências entre os dois grupos de participantes (HCC, média = $3,9 \pm 1,6$; PS, média = $4,6 \pm 1,4$; Figura 2D). Do modo similar, os dados obtidos para as células NK não mostraram diferença estatística entre os grupos avaliados (HCC, média = $35,7 \pm 17,2$; PS, média = $44,6 \pm 10,3$; Figura 2E).

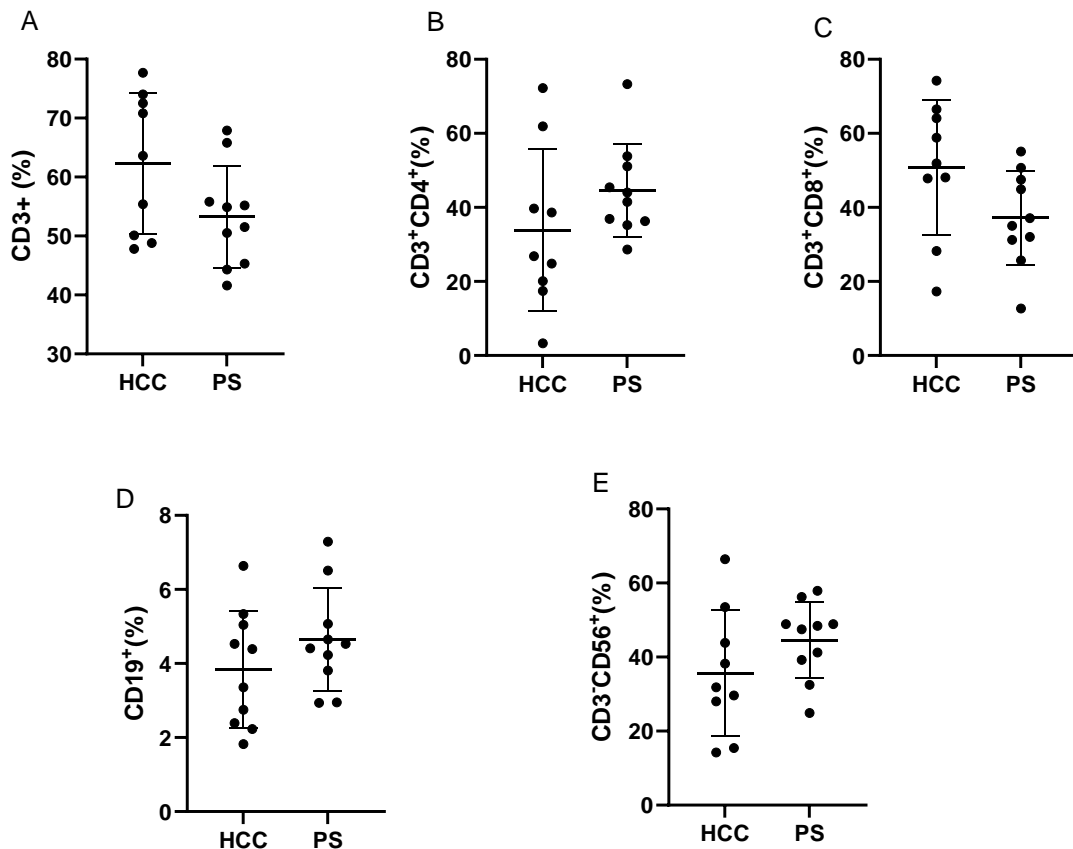


Figura 2. Distribuição de subpopulações de linfócitos T CD3⁺ (A), T CD4⁺ (B), T CD8⁺ (C), linfócitos B (D) e células NK (E) de participantes com hepatite C crônica (HCC) e de participantes saudáveis (PS). As barras representam a média e desvio padrão. Análise estatística por Teste *t* não pareado, considerando $p < 0,05$.

5.3.3 FREQUÊNCIAS DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B

As seguintes subpopulações de linfócitos B foram avaliadas nos dois grupos de participantes do estudo: células B *naive* (CD19⁺CD27^{neg}IgM⁺), células B de memória (CD19⁺CD27⁺IgM⁺), células B regulatória (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) e células B CD5⁺ (inata/regulatória).

Não observamos diferença estatística na população de linfócitos B *naive* entre os grupos (HCC, média = $43,1 \pm 14,8$; PS, média = $48,9 \pm 6,6$), como também na subpopulação de linfócitos B de memória (HCC, média = $19,7 \pm 7,4$; PS, média = $15,2 \pm 5,7$; Figura 3).

Neste estudo, não foi observada diferença estatística na expressão do marcador CD5, tanto pelos linfócitos B *naive* (HCC, mediana = 5,4 IQR 2,1 – 13,6; PS, mediana = 2,1 IQR 1,5 – 7,9), como dos LB de memória (HCC, mediana = 5,1 IQR 4,2 – 7,5; PS, média = 5,5 ± 2,1; Figura 4).

No grupo de pacientes com hepatite C houve uma maior frequência de linfócitos B regulatórios CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (mediana = 10,2 IQR 6,1 – 13,7), comparados ao grupo de participantes saudáveis (média = 6,8 ± 2,3; p = 0,046; Figura 5).

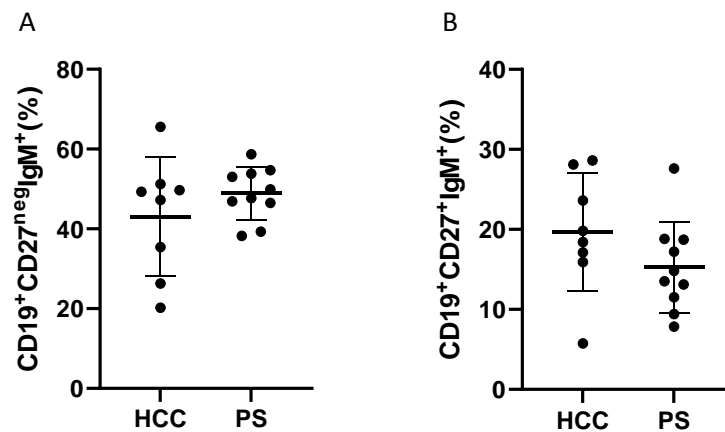


Figura 3. Frequência de células B CD19⁺CD27^{neg}IgM⁺ (B *naive*) (A) e células B CD19⁺CD27⁺IgM⁺ (B de memória) (B) no sangue periférico de participantes com hepatite C crônica (HCC) e de participantes sadios (PS). As barras representam a média e desvio padrão. Análise estatística por Teste *t* não pareado, considerando p<0,05.

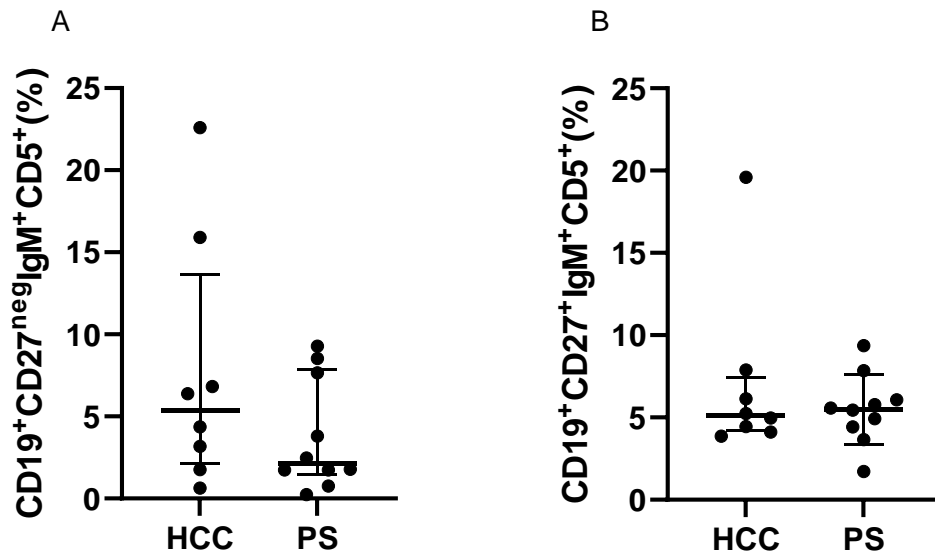


Figura 4. Frequência de células B CD19⁺CD27^{neg}IgM⁺CD5⁺ (B1 *naive*) (A) e CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD5⁺ (B1 memória) (B) em participantes com HCC e participantes saudios (PS). As barras representam a mediana e intervalo interquartil. Análise estatística por Teste de Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$.

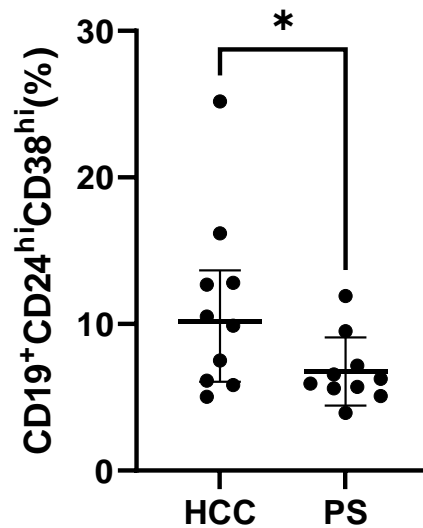


Figura 5. Frequência de células B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (regulatórias) em participantes com HCC e participantes saudáveis (PS). As barras representam mediana e intervalo interquartil em HCC e a média e desvio padrão em PS. Teste *t* não pareado, $p < 0,05$.

5.3.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS

Desde que a frequência de linfócitos B regulatório ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$) foi maior nos pacientes com HCC, avaliamos a existência de correlação dessa população com as demais subpopulações investigadas. Foi encontrada correlação positiva entre as células Breg $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ com as células NK ($CD3^-CD56^+$) e com as células B $CD5^+$ de memória ($CD19^+CD27^+IgM^+CD5^+$), conforme apresentado na Figura 6.

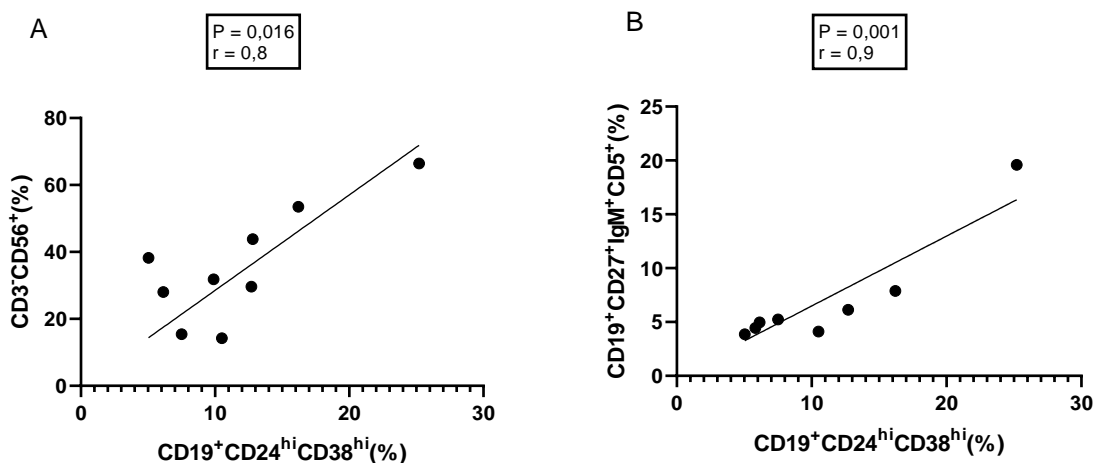


Figura 6. Correlação positiva entre as frequências de células B regulatórias $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ no sangue periférico de participantes com HCC, com as células NK ($CD3^-CD56^+$) (A) e com as células B $CD5^+$ de memória ($CD19^+CD27^+IgM^+CD5^+$) (B). Teste de Pearson.

5.3.5 RELAÇÃO ENTRE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B COM CARGA VIRAL, MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA E AUTOIMUNIDADE

A frequência dos linfócitos B regulatórios ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$) dos participantes com HCC também foi correlacionada com a carga viral. No entanto, não encontramos correlação entre essas células e a viremia.

Para estabelecer uma possível participação das subpopulações de linfócitos B com lesão hepática, realizamos teste de correlação entre os níveis séricos da enzima ALT e as subpopulações de LB avaliadas. Não foi encontrada correlação significativa com qualquer dessas células. Isso também foi verificado com os dados de fibrose hepática, não sendo encontrada associação entre os estágios de F1/F2 ou F3/F4 com as subpopulações celulares investigadas.

Quanto aos marcadores de autoimunidade, não encontramos diferenças estatística entre a presença ou ausência de crioglobulinemia e as respectivas subpopulações de LB. A detecção dos demais autoanticorpos também não apresentou número suficiente para a respectiva análise.

5.4 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo principal avaliar a frequência de subpopulações de linfócitos B (LB) em indivíduos com hepatite C crônica (HCC) em relação ao observado em indivíduos saudáveis. Adicionalmente, correlacionamos as subpopulações de LB com a carga viral dos participantes com HCC e avaliamos possíveis associações com marcador de lesão hepática (ALT), marcador tumoral (AFP) e com marcadores de autoimunidade. Ainda, para caracterizar a população estudada, verificamos a distribuição das populações de linfócitos B, linfócitos T (CD4⁺/CD8⁺) e células NK (*natural killer*) em ambos os grupos.

A infecção pelo VHC apresenta um modelo único de doença humana para definir os determinantes da infecção aguda versus crônica porque sua história natural inclui a resolução completa ou a viremia persistente (CHEN et al., 2020). O vírus pode infectar células B ou interagir com seus receptores de superfície celular e induzir linfoproliferação (INOKUCHI et al., 2009).

O VHC em células mononucleares do sangue periférico de pacientes cronicamente infectados está principalmente associado a um agrupamento de células B CD19⁺. Na infecção crônica pelo VHC, a associação preferencial do vírus com as células B é mediada pelo sistema do complemento, principalmente por meio do receptor 2 do complemento (CD21), em conjunto com o complexo CD19 e CD81 (WANG et al., 2016). Está bem descrito na literatura que o vírus infecta e pode se replicar em células B CD19⁺ de pacientes com HCC (ITO; KUSUNOKI; MIZUOCHI, 2011). Durante o curso prolongado da infecção crônica, o VHC induz ativação

policlonal de linfócitos B, podendo chegar ao desenvolvimento de distúrbios linfoproliferativos na ausência de tratamento antiviral (GRAGNANI et al., 2017).

Em trabalho anterior do nosso grupo, foi documentado frequência mais elevada de LB CD19⁺ nos pacientes com HCC do que em controles sadios (OLIVEIRA et al., 2016). No presente trabalho, não encontramos diferença estatística nas frequências dessas células entre os participantes com HCC e participantes sadios. Essa aparente discordância pode ser justificada pelo número menor de participantes no estudo atual e/ou diagnóstico mais precoce dos casos de HCC, motivado pelas várias campanhas de rastreamento da hepatite C que vem sendo realizadas há vários anos em nosso país, evitando assim a doença de longo curso como era observado anteriormente.

Indivíduos que progridem para infecção crônica geralmente desenvolvem respostas de células T CD4⁺ vigorosas e amplamente direcionadas na fase inicial da infecção por VHC. No entanto, em indivíduos incapazes de eliminar o vírus, as respostas das células T CD4⁺ são transitórias e proliferam fracamente (CHEN et al., 2020).

A insuficiência das células T CD4⁺ é uma marca registrada da infecção crônica pelo VHC. No entanto, neste trabalho, não foi encontrado diferença significativa entre os linfócitos T CD4⁺ dos participantes com HCC quando comparada aos dos participantes sadios. Apesar disso, pode ser observado que alguns portadores de HCC apresentaram frequências bem mais baixas dessas células, o que pode refletir os diferentes estágios da doença desses indivíduos. As células T CD4⁺ de pacientes com VHC são caracterizadas pela expressão de uma faixa mais estreita de receptores inibitórios de células T, em comparação com células T CD8⁺, com níveis de expressão inicialmente elevados de PD-1 e CTLA-4 que foram associados à regulação negativa da proliferação dos pacientes (CHEN et al., 2020).

A recuperação espontânea da infecção aguda por VHC está associada a respostas eficazes de células T CD8⁺. Em contraste, a progressão para infecção crônica persistente está associada à função prejudicada das células T CD8⁺ e mutações virais que evitam o sistema imunológico (SUNG; RACANELLI; SHIN, 2014). Nos pacientes de nosso estudo encontramos uma frequência de linfócitos T CD8⁺ discretamente mais elevado no grupo com HCC, em relação aos controles, mas sem significância estatística. Esses resultados diferem do demonstrado

anteriormente por OLIVEIRA e cols. (2016), em que os portadores de HCC apresentaram frequência de células T CD8⁺ mais baixa do que os indivíduos saudáveis.

Na hepatite C, a resposta imune inata é fundamental para a indução de uma imunidade adaptativa robusta e vírus específica. Neste contexto, as células NK desempenham importante papel na eliminação viral, seja direta ou indiretamente. Ainda, pacientes com HCC podem apresentar alterações na frequência e função dessas células, como também células NK intra-hepáticas podem estar sendo suprimidas tanto por contato célula-célula como por citocinas induzidas pelo VHC (PATRA; RAY; RAY, 2019). No presente trabalho, não detectamos diferenças nas frequências das células NK entre os participantes com HCC e controles saudáveis. Porém, foi encontrado uma correlação positiva entre essa população celular e as células Breg CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. Então, é possível que essa população de células B regulatória possa ter alguma participação na supressão de funções de células NK.

Kong e cols. (2017) documentaram aumento na frequência de células B de memória em indivíduos com VHC. Aqui, nós não detectamos diferenças quanto à essa população celular quando comparamos os participantes com HCC em relação ao grupo controle. Apesar disso, devido à heterogeneidade nas frequências dessas células, verifica-se uma tendência de frequências mais elevadas nos participantes com HCC. Por outro lado, esses autores não encontraram diferenças na população *naïve*, semelhante ao que observamos no nosso estudo. Segundo SUGALSKI et al. (2010), o aumento específico da subpopulação de células B de memória pode refletir o estado de ativação imune induzido pelo VHC na HCC, que altera a homeostase, o ciclo celular e resistência intrínseca a apoptose.

As células B CD19⁺CD5⁺ também fazem parte da imunidade inata e são caracterizadas pela secreção espontânea de anticorpos IgM polirreativos, de baixa afinidade, que reconhecem uma variedade de autoantígenos, e podem ter envolvimento em autoimunidade. No estudo de Kong e cols. (2017), foi verificado um aumento na população CD27^{neg}CD5⁺, o que não foi encontrado no presente trabalho.

Esses mesmos autores encontraram uma frequência mais elevada de células B CD5⁺ em células B CD27⁺IgM⁺ de pacientes com HCC em comparação com controles, enquanto não houve diferença significativa na frequência de B CD5⁺ em células B CD27⁺IgM⁺ entre os dois grupos, sugerindo que apenas as células B CD27⁺IgM⁺ estão associadas à expansão das células B CD5⁺ na infecção pelo VHC

(KONG et al., 2017). Diferentemente, com os participantes deste trabalho, não encontramos diferença estatística na expressão de CD5⁺, tanto pelos linfócitos B *naive* quanto nos de memória. Contudo, as células B CD5⁺CD27⁺IgM⁺ (memória) apresentou correlação positiva com as células Breg CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, o que pode favorecer a expansão das células B CD27⁻IgM⁺ conforme previamente documentado.

As células B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} são células B de transição imaturas que, em indivíduos normais, exercem efeitos supressores pela produção de IL-10, mas são alteradas quantitativamente e/ou funcionalmente prejudicadas em indivíduos com várias doenças (CHEN et al., 2020).

Nós identificamos no grupo de pacientes com hepatite C uma maior frequência desses linfócitos B regulatórios quando comparados ao grupo controle, assim como no estudo que teve como objetivo verificar a relação entre a distribuição das subpopulações de células B e a progressão da doença hepática em pacientes com hepatite C crônica com diabetes tipo 2. Células CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} estavam mais elevadas em pacientes diabéticos do que em não diabéticos. E nos pacientes diabéticos as células CD19⁺CD24⁺CD38⁻ estavam mais aumentadas naqueles com carcinoma hepatocelular e com boa precisão para o prognóstico (ABDELWAHAB et al., 2020).

A alfa-fetoproteína (AFP) é um marcador tumoral que pode estar elevado na presença de carcinoma hepatocelular. Neste trabalho, embora tenhamos encontrado diferença significativa entre os valores da AFP dos participantes com HCC e PS, nós não encontramos correlação desse marcador com as células B regulatórias CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} dos participantes com HCC.

A crioglobulinemia é um achado frequente em portadores de HCC e é associado com ativação policlonal de células B e doenças linfoproliferativas (INOKUCHI et al., 2009; LAULETTA et al., 2012). No presente trabalho, aproximadamente 56% dos pacientes apresentaram esse marcador de autoimunidade, mas não detectamos associação com qualquer das subpopulações de LB analisadas. Do mesmo modo, a detecção de NOSAs na HCC é um achado frequente, também relacionado com a ativação policlonal dos LB (ATTA et al., 2010). Porém, devido ao pequeno número de participantes no estudo atual, não encontramos um número de indivíduos com HCC e presença desses autoanticorpos que fosse suficiente para análise estatística.

Em conclusão, neste trabalho demonstramos que a frequência da subpopulação de linfócitos B regulatório está aumentado em portadores de HCC, que apresentou correlação positiva com as células NK e LB CD5⁺ de memória. A documentação prévia de que essas células Breg podem produzir IL-10 sugere a possibilidade de envolvimento na modulação de funções da imunidade inata mediada por células NK e LB CD5⁺.

Por outro lado, não encontramos diferenças significativas entre as demais subpopulações de células avaliadas, nem correlação com carga viral, com marcador de lesão hepática ou associação com marcador de autoimunidade. Esses dados sugerem que células Breg pode ter envolvimento direto na imunorregulação da HCC.

Este estudo apresenta as seguintes limitações: número pequeno de participantes e ausência de segmento pós-tratamento com AADs dos participantes com hepatite C crônica.

Financiamento

Esta pesquisa foi parcialmente financiada pelo projeto do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq/MST/INCT-DT (processo nº 465229/2014-0).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse associados a este estudo.

5.5 REFERÊNCIAS

ABDELWAHAB, Fadwa A. et al. Impact of deranged B cell subsets distribution in the development of HCV-related cirrhosis and HCC in type two diabetes mellitus. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

ATTA, Ajax M. et al. Serum cytokine profile in hepatitis C virus carriers presenting cryoglobulinaemia and non-organ-specific autoantibodies. **Microbial pathogenesis**, v. 48, n. 2, p. 53-56, 2010.

- BINKA, Mawuena et al. Assessment of treatment strategies to achieve hepatitis C elimination in Canada using a validated model. **JAMA network open**, v. 3, n. 5, p. e204192-e204192, 2020.
- BOTHEJU, Welathanthrige SP et al. The epidemiology of hepatitis C virus in Central Asia: Systematic review, meta-analyses, and meta-regression analyses. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.
- CHAUDHARI, Rahul et al. Metabolic complications of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 13, p. 1267, 2021.
- CHEN, Diana Y. et al. Hepatitis C virus–specific CD4+ T cell phenotype and function in different infection outcomes. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 2, p. 768-773, 2020.
- CHEN, Qubo et al. CD19+ CD24hiCD38hi B Cell Dysfunction in Primary Biliary Cholangitis. **Mediators of inflammation**, v. 2020, 2020.
- DÍEZ, Paula et al. Dynamic Intracellular Metabolic Cell Signaling Profiles During Ag-Dependent B-Cell Differentiation. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 953, 2021.
- DUNCAN, Joshua D. et al. Hepatitis C virus vaccine: Challenges and prospects. **Vaccines**, v. 8, n. 1, p. 90, 2020.
- EL-MOWAFY, Mohammed et al. Changes of gut-microbiota-liver axis in hepatitis C virus infection. **Biology**, v. 10, n. 1, p. 55, 2021.
- FÉNÉANT, Lucie; LEVY, Shoshana; COCQUEREL, Laurence. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. **Viruses**, v. 6, n. 2, p. 535-572, 2014.
- GRAGNANI, Laura et al. Notch4 and mhc class II polymorphisms are associated with hcv-related benign and malignant lymphoproliferative diseases. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 71528, 2017.
- INOKUCHI, Momoko et al. Infection of B cells with hepatitis C virus for the development of lymphoproliferative disorders in patients with chronic hepatitis C. **Journal of medical virology**, v. 81, n. 4, p. 619-627, 2009.
- ITO, Masahiko; KUSUNOKI, Hideki; MIZUOCHI, Toshiaki. Peripheral B cells as reservoirs for persistent HCV infection. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 177, 2011.
- KONG, Fanyun et al. Abnormal phenotypic features of IgM+ B cell subsets in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, n. 2, p. 1846-1852, 2017.
- LAKE-BAKAAR, G.; JACOBSON, I.; TALAL, A. B cell activating factor (BAFF) in the natural history of chronic hepatitis C virus liver disease and mixed

cryoglobulinaemia. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 170, n. 2, p. 231-237, 2012.

LAULETTA, Gianfranco et al. Hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

MAHMUD, Sarwat et al. The status of hepatitis C virus infection among people who inject drugs in the Middle East and North Africa. **Addiction**, v. 115, n. 7, p. 1244-1262, 2020.

OLIVEIRA, Isabela S. et al. Peripheral lymphocyte subsets in chronic hepatitis C: Effects of 12 weeks of antiviral treatment with interferon-alpha plus ribavirin. **Microbial pathogenesis**, v. 91, p. 155-160, 2016.

PALANICHAMY, Arumugam et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 10, p. 5982-5993, 2009.

PATRA, Tapas; RAY, Ratna B.; RAY, Ranjit. Strategies to circumvent host innate immune response by hepatitis C virus. **Cells**, v. 8, n. 3, p. 274, 2019.

PRECIADO, Maria Victoria et al. Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 43, p. 15992, 2014.

RIOS, Daniela Alejandra et al. Chronic Hepatitis C Pathogenesis: Immune Response in The Liver Microenvironment and Peripheral Compartment. 2021.

SCHILLIE, Sarah et al. CDC recommendations for hepatitis C screening among adults—United States, 2020. **MMWR Recommendations and Reports**, v. 69, n. 2, p. 1, 2020.

SEPULVEDA-CRESPO, Daniel; RESINO, Salvador; MARTINEZ, Isidoro. Hepatitis C virus vaccine design: Focus on the humoral immune response. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2020.

SHAPSHAK, Paul et al. Molecular and contextual markers of hepatitis C virus and drug abuse. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 13, n. 3, p. 153-179, 2009.

STRÖH, Luisa J.; KREY, Thomas. HCV glycoprotein structure and implications for b-cell vaccine development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6781, 2020.

SUGALSKI, Julia M. et al. Peripheral blood B cell subset skewing is associated with altered cell cycling and intrinsic resistance to apoptosis and reflects a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 5, p. 3019-3027, 2010.

SUNG, Pil Soo; RACANELLI, Vito; SHIN, Eui-Cheol. CD8+ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 266, 2014.

TULL, Thomas J. et al. Human marginal zone B cell development from early T2 progenitors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 4, 2021.

WANG, Richard Y. et al. Preferential association of hepatitis C virus with CD19+ B cells is mediated by complement system. **Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1900-1910, 2016.

6. CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho apresentou uma revisão sobre os linfócitos B e suas subpopulações, suas características fenotípicas e funcionais, além de referências sobre o possível envolvimento dessas células em patologias variadas. Complementando, apresentamos um trabalho experimental no qual avaliamos pacientes com hepatite C crônica infectados com os genótipos 1 e 3 do vírus e esses foram pareados por gênero e idade com indivíduos saudáveis para obtenção dos resultados. Tivemos como principal limitação o pequeno número de participantes. Os pacientes com HCC apresentaram frequências de subpopulações de linfócitos diferentes do observado em estudos anteriores.

Com relação às subpopulações de linfócitos B, objetivo principal deste trabalho, nos participantes com HCC, verificamos frequência mais elevada da subpopulação de linfócitos B regulatório, que apresentou correlação positiva com as células NK e LB CD5⁺ de memória. A documentação prévia de que essas células Breg podem produzir IL-10 sugere a possibilidade de envolvimento na modulação de funções da imunidade inata mediada por células NK e LB CD5⁺.

Por outro lado, não encontramos diferenças significativas entre as demais subpopulações de células avaliadas, nem correlação com carga viral, com marcador de lesão hepática ou associação com marcador de autoimunidade. Esses dados sugerem que células Breg pode ter envolvimento direto na imunorregulação da HCC.

Esta investigação sobre o comportamento das células B na hepatite C contribuiu para aportar novos conhecimentos sobre a imunopatogenia desta doença, contribuindo para uma melhor assistência clínica-laboratorial e conseqüente melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHAB, Fadwa A. et al. Impact of deranged B cell subsets distribution in the development of HCV-related cirrhosis and HCC in type two diabetes mellitus. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

ALFARO, Rafael et al. Monitoring of B Cell in Kidney Transplantation: Development of a Novel Clusters Analysis and Role of Transitional B Cells in Transplant Outcome. **Diagnostics**, v. 11, n. 4, p. 641, 2021.

ANDRADE, Luis Jesuino O. et al. Smooth muscle antibodies and cryoglobulinemia are associated with advanced liver fibrosis in Brazilian hepatitis C virus carriers. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 66-68, 2011.

ATTA, Ajax M. et al. Serum cytokine profile in hepatitis C virus carriers presenting cryoglobulinaemia and non-organ-specific autoantibodies. **Microbial pathogenesis**, v. 48, n. 2, p. 53-56, 2010.

ATTA, Ajax M.; PARANÁ, Raymundo; SOUSA-ATTA, Maria LB. AUTOIMMUNITY IN HEPATITIS C VIRUS (HCV) CARRIERS. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

BABIĆ, Antonija et al. B regulatory cells and monocyte subpopulations in patients with chronic graft-vs-host disease. **Croatian Medical Journal**, v. 62, n. 2, p. 154, 2021.

BARTH, Heidi. Hepatitis C virus: Is it time to say goodbye yet? Perspectives and challenges for the next decade. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 5, p. 725, 2015.

BINKA, Mawuena et al. Assessment of treatment strategies to achieve hepatitis C elimination in Canada using a validated model. **JAMA network open**, v. 3, n. 5, p. e204192-e204192, 2020.

BOCIAN, Katarzyna et al. Expanding diversity and common goal of regulatory T and B cells. I: Origin, phenotype, mechanisms. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 65, n. 6, p. 501-520, 2017.

BOOTHBY, Mark R.; HODGES, Emily; THOMAS, James W. Molecular regulation of peripheral B cells and their progeny in immunity. **Genes & development**, v. 33, n. 1-2, p. 26-48, 2019.

BOTHEJU, Welathanthrige SP et al. The epidemiology of hepatitis C virus in Central Asia: Systematic review, meta-analyses, and meta-regression analyses. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hepatites Virais**. Brasília, DF, 2020.

- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hepatites Virais**. Brasília, DF, 2021.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Técnico para o diagnóstico das hepatites virais**. Brasília, DF, 2018.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Brasília, DF, 2018.
- BUREL, Julie G. et al. The Challenge of Distinguishing Cell–Cell Complexes from Singlet Cells in Non-Imaging Flow Cytometry and Single-Cell Sorting. **Cytometry Part A**, v. 97, n. 11, p. 1127-1135, 2020.
- CARVALHO-LOURO, Daniela Mariano et al. Hepatitis C screening, diagnosis, and cascade of care among people aged > 40 years in Brasilia, Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.
- CASAROTTI, Ana CA et al. Role of B lymphocytes in the infarcted mass in patients with acute myocardial infarction. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 2, p. BSR20203413, 2021.
- CATALÁN, Diego et al. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.
- CHAN, Shiu-Wan. Establishment of chronic hepatitis C virus infection: Translational evasion of oxidative defence. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 11, p. 2785, 2014.
- CHAUDHARI, Rahul et al. Metabolic complications of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 13, p. 1267, 2021.
- CHEN, Diana Y. et al. Hepatitis C virus–specific CD4+ T cell phenotype and function in different infection outcomes. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 2, p. 768-773, 2020.
- CHEN, Qubo et al. CD19+ CD24hiCD38hi B Cell Dysfunction in Primary Biliary Cholangitis. **Mediators of inflammation**, v. 2020, 2020.
- CLAUSEN, Emily S.; ZAFFIRI, Lorenzo. Infection prophylaxis and management of viral infection. **Annals of translational medicine**, v. 8, n. 6, 2020.
- CORREA, Arturo Ramon Vargas et al. Dengue virus directly stimulates polyclonal B cell activation. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0143391, 2015.
- COSSARIZZA, Andrea et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. **Eur. J. Immunol**, v. 49, p. 1457-1973, 2019.
- CRUZ-ZÁRATE, D. et al. Myo1g is required for efficient adhesion and migration of activated B lymphocytes to inguinal lymph nodes. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

- DAI, You-Chao; ZHONG, Jixin; XU, Jun-Fa. Regulatory B cells in infectious disease. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 1, p. 3-10, 2017.
- DARWICHE, Walaa et al. Chronic lymphocytic leukemia B-cell normal cellular counterpart: clues from a functional perspective. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 683, 2018.
- DE MATOS, Maria Laura Mariano et al. Characteristics of a hepatitis C patient cohort at a specialized tertiary care facility: Identifying criteria to improve the allocation of public health resources. **Clinics**, v. 74, 2019.
- DELLA-TORRE, Emanuel et al. B lymphocytes directly contribute to tissue fibrosis in patients with IgG4-related disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 145, n. 3, p. 968-981. e14, 2020.
- DERESS, Teshiwal et al. Seroprevalence of Hepatitis C Viral Infection in Ethiopia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The Scientific World Journal**, v. 2021, 2021.
- DÍEZ, Paula et al. Dynamic Intracellular Metabolic Cell Signaling Profiles During Ag-Dependent B-Cell Differentiation. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 953, 2021.
- DOUAM, Florian et al. Specialization of hepatitis C virus envelope glycoproteins for B lymphocytes in chronically infected patients. **Journal of virology**, v. 90, n. 2, p. 992-1008, 2015.
- DUNCAN, Joshua D. et al. Hepatitis C virus vaccine: Challenges and prospects. **Vaccines**, v. 8, n. 1, p. 90, 2020.
- DUSHEIKO, Geoffrey. The impact of antiviral therapy for hepatitis C on the quality of life: a perspective. **Liver International**, v. 37, p. 7-12, 2017.
- EL-MOWAFY, Mohammed et al. Changes of Gut-Microbiota-Liver Axis in Hepatitis C Virus Infection. **Biology**, v. 10, n. 1, p. 55, 2021.
- FÉNÉANT, Lucie; LEVY, Shoshana; COCQUEREL, Laurence. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. **Viruses**, v. 6, n. 2, p. 535-572, 2014.
- GOMIDE, Geisa Perez Medina et al. Epidemiological survey of hepatitis C in a region considered to have high prevalence: the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.
- GRAGNANI, Laura et al. Notch4 and mhc class II polymorphisms are associated with hcv-related benign and malignant lymphoproliferative diseases. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 71528, 2017.
- HÄFNER, Sophia Julia. The many (sur) faces of B cells. **biomedical journal**, v. 42, n. 4, p. 201-206, 2019.

HAGYMÁSI, Krisztina. The Nobel Prize in Physiology or Medicine—2020. **Structural Chemistry**, p. 1-5, 2021.

HARRIS, Aaron M. et al. An evaluation of the hepatitis C testing, care and treatment program in the country of Georgia's corrections system, December 2013–April 2015. **BMC public health**, v. 19, n. 3, p. 1-7, 2019.

HARTLAGE, Alex S.; CULLEN, John M.; KAPOOR, Amit. The strange, expanding world of animal hepaciviruses. **Annual review of virology**, v. 3, p. 53-75, 2016.

HARTNELL, Felicity et al. Characterisation of HCV specific CD4+ T-cells in viral vectored vaccination, following DAA cure and after spontaneous viral clearance. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 72, n. 5, p. 1541, 2020.

HAUGAARD, Anna K. et al. Quantitative B-lymphocyte deficiency and increased TCR $\gamma\delta$ T-lymphocytes in acute infectious spondylodiscitis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

HUAI, Guoli et al. TGF- β -secreting regulatory B cells: unsung players in immune regulation. **Clinical & Translational Immunology**, v. 10, n. 4, p. e1270, 2021.

INOKUCHI, Momoko et al. Infection of B cells with hepatitis C virus for the development of lymphoproliferative disorders in patients with chronic hepatitis C. **Journal of medical virology**, v. 81, n. 4, p. 619-627, 2009.

ITO, Masahiko; KUSUNOKI, Hideki; MIZUOCHI, Toshiaki. Peripheral B cells as reservoirs for persistent HCV infection. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 177, 2011.

JAKOBSEN, Janus C. et al. Direct-acting antivirals for chronic hepatitis C. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2017.

KAPLAN, David E. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Gastroenterology Clinics**, v. 44, n. 4, p. 735-760, 2015.

KASSAS, Mohamed; HEGAZY, Osama MO; SALAH, Eman M. Effect of treating chronic hepatitis C with direct-acting antivirals on extrahepatic cutaneous manifestations. **World Journal of Hepatology**, v. 12, n. 10, p. 841, 2020.

KONG, Fanyun et al. Abnormal phenotypic features of IgM+ B cell subsets in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, n. 2, p. 1846-1852, 2017.

KWIECIEŃ, Iwona et al. Maturation of T and B Lymphocytes in the Assessment of the Immune Status in COVID-19 Patients. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 2615, 2020.

LAKE-BAKAAR, G.; JACOBSON, I.; TALAL, A. B cell activating factor (BAFF) in the natural history of chronic hepatitis C virus liver disease and mixed

cryoglobulinaemia. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 170, n. 2, p. 231-237, 2012.

LAPA, Daniele et al. Hepatitis C virus genetic variability, human immune response, and genome polymorphisms: which is the interplay?. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 305, 2019.

LAULE, Connor F. et al. Role of B1 and B2 lymphocytes in placental ischemia-induced hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 317, n. 4, p. H732-H742, 2019.

LAULETTA, Gianfranco et al. Hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

LI, Hui-Chun; YANG, Chee-Hing; LO, Shih-Yen. Cellular factors involved in the hepatitis C virus life cycle. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 28, p. 4555, 2021.

LIN, Jieshan et al. Decreased B1 and B2 lymphocytes are associated with mortality in elderly patients with chronic kidney diseases. **Frontiers in medicine**, v. 7, p. 75, 2020.

LIN, Yun Hsiao et al. Regulation of B lymphocyte development by histone H2A deubiquitinase BAP1. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.

LING, Chen et al. B Lymphocyte Subsets in Children With Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome: A Longitudinal Study. **Frontiers in Pediatrics**, p. 1040, 2021.

MAGATTI, Marta et al. The Role of B Cells in PE Pathophysiology: A Potential Target for Perinatal Cell-Based Therapy?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3405, 2021.

MAGRI, Mariana Cavalheiro et al. Prevalence of hepatitis C virus in Brazil's inmate population: a systematic review. **Revista de saude publica**, v. 49, p. 42, 2015.

MAHAJAN, Vinay S. et al. B1a and B2 cells are characterized by distinct CpG modification states at DNMT3A-maintained enhancers. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2021.

MAHMUD, Sarwat et al. The status of hepatitis C virus infection among people who inject drugs in the Middle East and North Africa. **Addiction**, v. 115, n. 7, p. 1244-1262, 2020.

MANNE, Vignan et al. Hepatitis C Vaccination: Where We Are and Where We Need to Be. **Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1619, 2021.

MARTINEZ, Miguel Angel; FRANCO, Sandra. Therapy Implications of Hepatitis C Virus Genetic Diversity. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 41, 2021.

MAURI, Claudia; MENON, Madhvi. The expanding family of regulatory B cells. **International immunology**, v. 27, n. 10, p. 479-486, 2015.

MESHARAM, Rohan Janardhan; KATHWATE, Gunderao Hanumantrao; GACCHE, Rajesh Nivarti. Progress, evolving therapeutic/diagnostic approaches, and challenges in the management of hepatitis C virus infections. **Archives of Virology**, p. 1-20, 2022.

MOROZOV, Vladimir Alexei; LAGAYE, Sylvie. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. **World journal of hepatology**, v. 10, n. 2, p. 186, 2018.

NUTINI, Mariana Fernanda Rodrigues et al. HCV genotype profile in Brazil of mono-infected and HIV co-infected individuals: A survey representative of an entire country. **PloS one**, v. 15, n. 1, p. e0227082, 2020.

OANCEA, Carmen Nicoleta et al. Global hepatitis C elimination: history, evolution, revolutionary changes and barriers to overcome. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 61, n. 3, p. 643, 2020.

OLIVEIRA, Isabela S. et al. Peripheral lymphocyte subsets in chronic hepatitis C: Effects of 12 weeks of antiviral treatment with interferon-alpha plus ribavirin. **Microbial pathogenesis**, v. 91, p. 155-160, 2016.

PAHL, Madeleine V. et al. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 1, p. 205-212, 2010.

PALANICHAMY, Arumugam et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 10, p. 5982-5993, 2009.

PASCUT, Devis et al. HCV Proteins Modulate the Host Cell miRNA Expression Contributing to Hepatitis C Pathogenesis and Hepatocellular Carcinoma Development. **Cancers**, v. 13, n. 10, p. 2485, 2021.

PATEL, Akshay J. et al. The role of B lymphocytes in the immuno-biology of non-small-cell lung cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 69, n. 3, p. 325-342, 2020.

PATEL, Arzoo M. et al. The Role of B Cells in Adult and Paediatric Liver Injury. **Frontiers in immunology**, p. 3545, 2021.

PATRA, Tapas; RAY, Ratna B.; RAY, Ranjit. Strategies to circumvent host innate immune response by hepatitis C virus. **Cells**, v. 8, n. 3, p. 274, 2019.

PERRY, Heather M.; BENDER, Timothy P.; MCNAMARA, Coleen A. B cell subsets in atherosclerosis. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 373, 2012.

PISANO, María B. et al. Viral hepatitis update: Progress and perspectives. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 26, p. 4018, 2021.

PRECIADO, Maria Victoria et al. Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 43, p. 15992, 2014.

QIN, Miaomiao et al. Current Perspectives on B Lymphocytes in the Immunobiology of Hepatocellular Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.

RIOS, Daniela Alejandra et al. Chronic Hepatitis C Pathogenesis: Immune Response in The Liver Microenvironment and Peripheral Compartment. 2021.

RIVAS, José de Jesus et al. Caracterização imunofenotípica de linfócitos B de memória na deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável. **Rev. bras. alergologia imunopatol**, p. 23-31, 2010.

ROSA, Domenico et al. Activation of naive B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18544-18549, 2005.

SANTOS, Vanessa Costa dos et al. IgG1 and IgG4 antibodies against Core and NS3 antigens of hepatitis C virus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

SCHILLIE, Sarah et al. CDC recommendations for hepatitis C screening among adults—United States, 2020. **MMWR Recommendations and Reports**, v. 69, n. 2, p. 1, 2020.

SCHMIEG, John J. et al. CD5-Negative, CD10-Negative Low-Grade B-Cell Lymphoproliferative Disorders of the Spleen. **Current Oncology**, v. 28, n. 6, p. 5124-5147, 2021.

SEPULVEDA-CRESPO, Daniel; RESINO, Salvador; MARTINEZ, Isidoro. Hepatitis C virus vaccine design: Focus on the humoral immune response. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2020.

SHAPSHAK, Paul et al. Molecular and contextual markers of hepatitis C virus and drug abuse. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 13, n. 3, p. 153-179, 2009.

SHEN, Meng et al. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55828, 2016.

SOUSA, Gabriel M. et al. Autoimmunity in hepatitis C virus carriers: involvement of ferritin and prolactin. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 4, p. 210-213, 2011.

SOUSA, Gabriel M. et al. Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection. **Cytokine**, v. 60, n. 1, p. 138-142, 2012.

SPERRING, Heather; RUIZ-MERCADO, Glorimar; SCHECHTER-PERKINS, Elissa M. Impact of the 2020 COVID-19 pandemic on ambulatory hepatitis C testing. **Journal of Primary Care & Community Health**, v. 11, 2020.

SPITZ, Natália et al. The first complete genome sequences of hepatitis C virus subtype 2B from latin america: Molecular characterization and phylogeographic analysis. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1000, 2019.

STRÖH, Luisa J.; KREY, Thomas. HCV glycoprotein structure and implications for b-cell vaccine development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6781, 2020.

SUGALSKI, Julia M. et al. Peripheral blood B cell subset skewing is associated with altered cell cycling and intrinsic resistance to apoptosis and reflects a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 5, p. 3019-3027, 2010.

SUNG, Pil Soo; RACANELLI, Vito; SHIN, Eui-Cheol. CD8+ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 266, 2014.

TOMER, Shallu; ARORA, Sunil K. A juggernaut of innate & adaptive immune cells in chronic hepatitis C. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 151, n. 4, p. 279, 2020.

TORRE, Pietro et al. Viral hepatitis: Milestones, unresolved issues, and future goals. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 28, p. 4603, 2021.

TULL, Thomas J. et al. Human marginal zone B cell development from early T2 progenitors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 4, 2021.

VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, Rodrigo et al. Mechanisms of Hepatitis C Virus Escape from Vaccine-Relevant Neutralizing Antibodies. **Vaccines**, v. 9, n. 3, p. 291, 2021.

WANG, Richard Y. et al. Preferential association of hepatitis C virus with CD19+ B cells is mediated by complement system. **Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1900-1910, 2016.

YECHEZKEL, Itai; LAW, Mansun; TZARUM, Netanel. From Structural Studies to HCV Vaccine Design. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 833, 2021.

YI, John S. et al. Establishment of normative ranges of the healthy human immune system with comprehensive polychromatic flow cytometry profiling. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. e0225512, 2019.

YU, Ming-Lung et al. Taiwan consensus statement on the management of hepatitis C: part (I) general population. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 119, n. 6, p. 1019-1040, 2020.

YU, Xingxia; YANG, Rongrong. Changes of peripheral lymphocyte subset in patients with SARS-CoV-2 infection during the whole course of disease. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 15, n. 4, p. 553-559, 2021.

ZAMORA, Carlos et al. Association of platelet binding to lymphocytes with B cell abnormalities and clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. **Mediators of inflammation**, v. 2019, 2019.

ZHAI, Naicui et al. Hepatitis C virus core protein triggers expansion and activation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. **Cellular & molecular immunology**, v. 12, n. 6, p. 743-749, 2015.

ZHANG, Siwei et al. Characteristics of B lymphocyte infiltration in HPV+ head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer science**, v. 112, n. 4, p. 1402, 2021.

ZIELIŃSKI, Maciej et al. CD5-Positive B Lymphocytes after Kidney Transplantation. **Diagnostics**, v. 11, n. 9, p. 1574, 2021.

ANEXOS

ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFBA - FACULDADE DE
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA BAHIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de subpopulações de linfócitos B na hepatite C crônica

Pesquisador: Maria Luiza Brito de Sousa Atta

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 80611417.8.0000.8035

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Universidade Federal da Bahia - UFBA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.560.236

Apresentação do Projeto:

Pesquisa aplicada, através de estudo transversal prospectivo, realizado na faculdade de farmácia, cujo objetivo é investigar o perfil fenotípico/funcional (ativação, memória e regulatórios) de linfócitos B em indivíduos com hepatite C crônica, pré e pós tratamento com drogas de ação direta (DAA).

A hipótese que instiga a pesquisa é que em pacientes com hepatite C crônica, as subpopulações de linfócitos B estão quantitativa e funcionalmente alteradas, e podem não se recuperar após o tratamento bem sucedido. Para verificar a hipótese, serão recrutados 50 participantes, sendo 25 pacientes com hepatite C crônica (HCC), de ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Hepatites do Complexo Hospitalar HUPES, com diagnóstico clínico e sorológico da hepatite. Um grupo controle será representado por outros 25 indivíduos saudáveis, com sorologia negativa para as infecções relacionadas acima, areados por sexo e idade mais próxima possível ao grupo alvo.

Os pacientes são indicados pelo Ambulatório acima para realizar os exames de rotina no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade Farmácia da UFBA. Neste ambiente, eles são convidados a participarem do estudo. A mesma abordagem é realizada com os indivíduos para formar o grupo controle.

Cada paciente com HCC terão amostras de sangue coletadas antes do início do tratamento antiviral e após a conclusão do tratamento com DAA. Os participantes do grupo controle farão apenas uma coleta de sangue. Através de punção venosa e usando sistema de coleta a vácuo,

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147

Bairro: ONDINA

CEP: 40.170-115

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-6902

Fax: (71)3283-6919

E-mail: cepfar@ufba.br

UFBA - FACULDADE DE
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA BAHIA



Continuação do Parecer: 2.560.236

serão coletados 2,0 mL de sangue em tubo com EDTA para determinação do hemograma, 5,0 mL em tubo sem anticoagulante para obtenção de soro para determinações bioquímicas e imunológicas e 10 mL em tubo com o anticoagulante heparina para a avaliação imunocelular das células mononucleares do sangue periférico

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Investigar o perfil fenotípico/funcional (ativação, memória e regulatórios) de linfócitos B em indivíduos com hepatite C crônica, pré e pós tratamento com drogas de ação direta (DAA).

Específicos:

I-Determinar a distribuição de subpopulações de linfócitos B em indivíduos com HCC, pré e pós tratamento com drogas de ação direta (DAA), e comparar com controles saudáveis; II. Relacionar o perfil dos linfócitos B dos participantes do estudo com linfócitos T (CD4+/CD8+), Th17 e NK; III. Estabelecer relações do perfil dos linfócitos B, dos indivíduos com HCC, com marcadores de lesão hepática (aminotransferases, fibrose) e de manifestações extra-hepáticas (crioglobulinemia e fator reumatoide).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: os riscos estão relacionados a coleta de sangue e de constrangimento relacionados a utilização e divulgação dados pessoais. Esta previsto que o pessoal técnico que ira realizar este procedimento estará devidamente treinado, a fim de evitar ao máximo esses problemas e assim como preparados para interromper o procedimento se o participante solicitar. Prevê também que a identidade e privacidade de todos os participantes da pesquisa serão mantidas em sigilo de acordo com a Resolução CNS466/2012. BENEFÍCIOS: Esta explicitado que o participante não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira., sendo o único benefício direto a realização da avaliação laboratorial, sem nenhum custo, a qual poderá ou não causar novas condutas clínicas e/ou tratamentos pela equipe médica responsável que o acompanha.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo apresenta-se bem estruturado e com relevância social. as inconsistências observadas na apreciação anterior foram ajustadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

sem recomendações

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147
Bairro: ONDINA CEP: 40.170-115
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-6902 Fax: (71)3283-6919 E-mail: cepfar@ufba.br

**UFBA - FACULDADE DE
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA BAHIA**



Continuação do Parecer: 2.560.236

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1023247.pdf	21/03/2018 09:00:18		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_investigador.pdf	21/03/2018 08:54:36	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Confidencialidade_Participante.pdf	20/03/2018 21:41:50	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Equipe_2.pdf	20/03/2018 21:36:20	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Dados_Prontuarios.pdf	20/03/2018 21:32:29	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito
Outros	Termo_Chefia_Ambulatorio.pdf	20/03/2018 21:30:36	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEv2.pdf	20/03/2018 21:28:36	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Anuencia_Pesquisadores.pdf	20/03/2018 21:27:46	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito
Outros	Carta_CEP.pdf	28/11/2017 17:11:41	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_CEP.pdf	28/11/2017 17:05:33	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Recursos.pdf	28/11/2017 15:33:25	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Responsabilidade.pdf	28/11/2017 15:31:13	Maria Luiza Brito de Sousa Atta	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147
 Bairro: ONDINA CEP: 40.170-115
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-6902 Fax: (71)3283-6919 E-mail: cepfar@ufba.br

UFBA - FACULDADE DE
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA BAHIA



Continuação do Parecer: 2.560.236

SALVADOR, 23 de Março de 2018

Assinado por:
Ana Leonor Pardo Campos Godoy
(Coordenador)

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147
Bairro: ONDINA **CEP:** 40.170-115
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-6902 **Fax:** (71)3283-6919 **E-mail:** cepfar@ufba.br

ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
LAPIM - LABORATÓRIO DE PESQUISA EM
IMUNOLOGIA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa "**Avaliação de subpopulações de linfócitos B na hepatite C crônica**", de responsabilidade da pesquisadora Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta, do Laboratório de Pesquisa em Imunologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, telefone (71) 3283-6972.

Este estudo irá avaliar a quantidade e função de uma variedade de células do sangue, conhecidas como linfócitos B, e seus subtipos, que podem estar alteradas durante a infecção pelo vírus da hepatite C, e verificar se ocorre recuperação após o tratamento com os medicamentos atualmente disponíveis pelo SUS e cura da infecção. Estas células são importantes para a melhora do sistema imunológico das pessoas. Nesta pesquisa também será incluído um grupo formado por indivíduos aparentemente saudáveis, que também doarão uma amostra de sangue, possibilitando comparação dos resultados laboratoriais.

Se o Sr.(a) concordar em participar deste estudo, acontecerá o seguinte:

Será coletada uma pequena quantidade de sangue, cerca de 20 mililitros, através da punção de uma das veias do antebraço, para que sejam realizados os exames laboratoriais imunológicos (pesquisa de autoanticorpos), hematológicos (hemograma e avaliação das subpopulações de linfócitos) e bioquímicos (enzimas hepáticas ALT e AST), antes de ser iniciado o tratamento para a hepatite.

Quando finalizar o tratamento da hepatite, será coletada nova amostra de sangue, e os exames acima serão repetidos.

Para os participantes do grupo controle, a amostra de sangue será coletada apenas uma única vez.

Para participar deste estudo o(a) Sr.(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. O único benefício que será a realização da avaliação laboratorial, sem nenhum custo, a qual poderá ou não causar novas condutas clínicas e/ou tratamentos pela equipe médica responsável que o acompanha.

Para participar desta pesquisa, o Sr.(a) não usará nenhum medicamento ou produto, nem suspender qualquer medicamento já em uso. A coleta do sangue não oferece nenhum risco para a sua saúde, assim como não causará nenhuma reação prejudicial ao seu organismo. Haverá apenas um leve desconforto causado pela introdução da agulha no braço durante o procedimento de coleta de sangue, que

Rubrica do participante da pesquisa

Rubrica do pesquisador



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
LAPIM - LABORATÓRIO DE PESQUISA EM
IMUNOLOGIA



não dura mais que um minuto. Muito raramente, podem ocorrer hematomas. Caso a formação do hematoma seja identificada durante a punção, será retirada imediatamente o torniquete e a agulha. É necessária uma compressão local durante pelo menos dois minutos após a coleta. O uso de compressas frias pode auxiliar no alívio da dor local, se for necessário. O hematoma desaparecerá naturalmente. O procedimento de dobrar o braço após a retirada da agulha e/ou carregar objetos relativamente pesados logo após a coleta contribui para a formação do hematoma, mesmo após uma coleta de sangue bem-sucedida.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (a) Sr. (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Pesquisa em Imunologia, na Faculdade de Farmácia da UFBA e a outra será fornecida para o(a) Sr.(a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de cinco (5) anos após o término da pesquisa.

Os resultados dos exames de sangue da rotina laboratorial realizados durante o estudo estarão disponíveis na recepção do Laboratório, conforme protocolo a ser disponibilizado. Com exceção dessa liberação dos resultados, todas as informações obtidas neste estudo serão consideradas confidenciais e usadas estritamente para fins de pesquisa, cujos resultados obtidos (de todos os pacientes juntos, sem que nenhum seja identificado individualmente) serão publicados em congressos e revistas médicas, o que permitirá avanços no conhecimento da hepatite C crônica no Brasil, ajudando outros pacientes. A identidade e privacidade serão mantidas em segredo de acordo com a Resolução CNS466/2012 que regulamenta a Pesquisa em Seres Humanos.

Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, têm direito à indenização, conforme determina a lei.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFBA, Rua Barão do Jeremoabo,

Rubrica do participante da pesquisa

Rubrica do pesquisador



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
LAPIM - LABORATÓRIO DE PESQUISA EM
IMUNOLOGIA



147, Campus de Ondina, CEP 40.170-115, Salvador, Bahia, (71) 3283-6902 ou cepfar@ufba.br.

O colaborador da pesquisa, _____, discutiu essas informações com os participantes, oferecendo-se para responder as dúvidas.

Caso tenha perguntas adicionais, poderá ligar para o telefone _____, ou para Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta, coordenadora do estudo, pelo telefone 3283-6972.

A participação no estudo é totalmente voluntária. O Sr.(a) tem o direito de recusar a participar ou abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo para o atendimento médico atual ou futuro.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____, declaro que li e entendi todas as informações presentes neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tive a oportunidade de discutir as informações deste termo. Todas as minhas perguntas foram respondidas e eu estou satisfeito(a) com as respostas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Entendo que receberei uma via assinada e datada deste documento e que outra via assinada e datada será arquivada pela pesquisadora responsável do estudo.

_____, de _____ de _____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador