



UFAM



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DOS RECEPTORES *TLR4*
E *TLR9* NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA ASSOCIADA À
INFECÇÃO PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E DELTA**

FERNANDA FROIS CANTÃO DUARTE

**MANAUS
2020**

FERNANDA FROIS CANTÃO DUARTE

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DOS RECEPTORES *TLR4*
E *TLR9* NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA ASSOCIADA À
INFECÇÃO PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E DELTA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Coorientadora: Dra. Andréa Monteiro Tarragô

**MANAUS
2020**

Ficha Catalográfica

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

D812i Duarte, Fernanda Frois Cantão
Influência dos polimorfismos nos genes dos receptores TLR4 e TLR9 no desenvolvimento da fibrose hepática associada à infecção pelos vírus das hepatites B e Delta / Fernanda Frois Cantão Duarte . 2020
107 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie
Coorientadora: Andréa Monteiro Tarragô
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. HDV - vírus da hepatite Delta. 2. HBV - vírus da hepatite B. 3. Polimorfismo. 4. Toll-like. 5. Fibrose. I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FERNANDA FROIS CANTÃO DUARTE

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DOS RECEPTORES *TLR4*
E *TLR9* NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA ASSOCIADA À
INFECÇÃO PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E DELTA**

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

22/09/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Edgar Aparecido Sanches, membro interno
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Luis André Morais Mariúba, membro externo
Fundação Oswaldo Cruz - Amazonas

Aos homens da minha vida, **Luiz Fernando** e **Helnatã**, e aos meus pais, **Zilda** e **Itamar**, por serem meu porto seguro, me transmitirem alegria, amor e força, fazendo tudo parecer mais fácil.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a **Deus**, por me guardar e guiar meus passos até aqui da melhor forma possível.

À criança mais feliz, engraçada, amorosa, pura, inteligente e cheia de energia, que saía da escola integral no fim do dia com o papai e enfrentavam o trânsito para me buscar na UFAM, querendo minha atenção e que fazia todos os meus problemas desaparecerem, **Luiz Fernando**. Mamãe brincava com você e depois que você dormia, ia estudar de madrugada; era por isso que eu cochilava quando me sentava no sofá. Muito obrigada pela compreensão, filho!

Ao meu marido **Helnatã**, meu amor e eterno namorado, quem mais me incentivou a ingressar no mestrado e que me apoiou de todas as formas possíveis: passou a ficar mais tempo com o nosso filho, me ajudava com as atividades de vida diária, vendo minhas dificuldades em pegar 5 ônibus por dia, deu um jeito de também virar meu motorista. Muitíssimo obrigada principalmente por compreender a minha ausência em alguns momentos e ajudar o nosso filho a não sentir tanto, quando mesmo em casa aos fins de semana não podia estar com vocês porque precisava estudar.

À mulher que mais admiro nesse mundo, minha mãe **Zilda**, que se tivesse sido médica seria uma das melhores; o que é publicado dizendo se faz bem ou mal, ela já me falava desde criança. Cuida de todos da família quando está doente, em qualquer lugar do Brasil. Muito sábia, animada, gosta de casa cheia com muita comida mineira e italiana. É a mulher mais forte que conheço. Obrigada por me tornar uma pessoa de princípios, de me ensinar que sempre ganhamos em fazer a coisa certa, mesmo que por ora pareça que estamos perdendo.

Ao meu amado pai **Itamar**, o homem mais honesto que já vi na vida, que tem um enorme coração e que, depois de se tornar vovô, virou o mais engraçado também. Obrigada pelos princípios ensinados, apoio e zelo!

Aos meus amados irmãos **Marcela** e **Gil** pela amizade, apoio, conselhos e “causos”. Pela alegria que trazem à família e que agora tem nome: **Davi** e **João Víctor**. Obrigada por esses bebês! Titia agora vai aproveitá-los!

À minha querida orientadora **Dra. Adriana Malheiro**, pela oportunidade, ensinamentos, por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis e ser uma solucionadora de problemas, deixando mais leve o meu caminhar. Há muito tempo não conhecia alguém tão educada, respeitosa, profissional e serena, é uma líder nata e tem a facilidade de agregar pessoas à sua volta, tratando a todos com dignidade. Obrigada por me tranquilizar, por querer saber se eu estava bem antes de apresentações e pela confiança que demonstrou ter em mim, isso me impulsionou a querer ser melhor; porque você confiava em mim. Te admiro muito como profissional e ser humano incrível que você é! Você fez diferença na minha vida e é de pessoas assim que o mundo precisa: das que são luz na vida dos outros. Toda vez que lhe contava um problema, você dizia: “Não acredito que você vai desistir do mestrado”. Eu nem pensava em desistir nesse momento, mas as vezes em que pensei, logo vinha essa sua frase na minha cabeça e já passava a ideia, pois não podia lhe decepcionar. Continue sendo luz na vida das pessoas!

À minha coorientadora, **Dra. Andréa Tarragô**, pelo auxílio nas análises e experimentos, pelo tempo a mim oferecido e por tudo o que fez para que esse projeto pudesse ser realizado.

À minha querida amiga **Diana Mota**, por todo carinho, alegria, atenção e ajuda. Por seus ensinamentos que me ajudaram a ingressar no mestrado e pelo auxílio quanto aos experimentos, mesmo com a correria fazendo a gente se ver pouco. Obrigada pelo apoio!

Ao pesquisador **Pedro Vieira**, que também me auxiliou a ingressar no mestrado com seus ensinamentos.

Às pesquisadoras **Juliana Santos** e **Priscila Sarmiento**, pela colaboração nas análises, experimentos e troca de experiências para que esse projeto pudesse ser realizado.

À pesquisadora **Keyla Sousa** pela colaboração nos experimentos, troca de experiências, parceria, carinho, conselhos e apoio durante o mestrado. Obrigada por tudo, você é outra pessoa que é luz na vida dos outros (e já lhe disse isso). Continue iluminando a vida dos outros!

Ao pesquisador **Allyson Guimarães**, pela alegria, paciência, humildade, acessibilidade e educação com que compartilha seu conhecimento com todos; por me assessorar nos experimentos; pelos cafés e biscoitos que muitas vezes levava para todos na NAEP.

A todos da **NAEP/HEMOAM**, onde dividíamos experiências, conhecimentos e anseios; ambiente muito alegre. Ainda lembro daqueles almoços às sextas-feiras!

Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada** (PPGIBA), a todos os **professores** e **colegas de mestrado** pelos ensinamentos e trocas de experiência. Agradeço também ao **Edson** e à **Ana Paula** pela prontidão, educação e alegria com que prestam informações aos alunos.

À **Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas**, por disponibilizar os laboratórios e possibilitar o recrutamento dos doadores de sangue em suas instalações para a realização desta pesquisa.

À **Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado** por possibilitar o recrutamento dos pacientes com hepatite Delta atendidos em suas instalações.

A **todos que aceitaram participar deste estudo**, pois sem vocês não teria estudo e a todos que, mesmo indiretamente, auxiliaram de alguma forma.

À **Universidade Federal do Amazonas** por oferecer o mestrado em Imunologia Básica e Aplicada e me proporcionar conhecer pessoas incríveis.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** pelo apoio à esta pesquisa.

***“Vivemos esperando
Dias melhores.
Dias de paz, dias a mais,
Dias que não deixaremos
Para trás, oh oh!***

***Vivemos esperando
O dia em que
Seremos melhores
(Melhores! Melhores!)
Melhores no amor,
Melhores na dor,
Melhores em tudo, oh oh oh!***

***Vivemos esperando
O dia em que seremos
Para sempre.
Vivemos esperando, oh oh oh!
Dias melhores pra sempre
Dias melhores pra sempre
(Pra sempre!)***

Rogério Flausino

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:13

RESUMO

Introdução: As hepatites B e Delta são doenças causadas por vírus hepatotrópicos, com alta incidência na região da bacia Amazônica, onde é típico encontrar o genótipo tido como o mais agressivo da hepatite Delta e, segundo a Organização Mundial de Saúde, é a forma mais grave de hepatite viral crônica por ter progressão mais rápida para estágios avançados de comprometimento hepático e morte. A análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que podem afetar as funções de reconhecimento dos receptores *Toll-like* da imunidade inata, e de citocinas poderiam explicar os processos de cronificação durante a infecção causada pelos vírus das hepatites B e Delta na região amazônica. **Objetivo:** Descrever a frequência dos polimorfismos nos genes dos receptores *TLR4* (*rs4986790* e *rs4986791*) e *TLR9* (*rs5743836* e *rs187084*), avaliar a influência destes polimorfismos no desenvolvimento da fibrose hepática associada à infecção pelos vírus das hepatites B e Delta, relacionando com o grau de fibrose hepática, alterações laboratoriais e clínicas, expressão de *TLR4* e *TLR9* em monócitos, bem como com os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ . **Material e métodos:** A população de estudo foi composta por 77 pacientes diagnosticados com os vírus HBV/HDV atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado e 137 doadores de sangue que se apresentaram na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, ambos na cidade de Manaus/AM. O estadiamento da fibrose foi realizado através da aplicação do índice *FIB-4* e classificação METAVIR; os níveis séricos das citocinas foram analisados pela técnica de Citometria de Fluxo CBA; a caracterização dos polimorfismos foi obtida por PCR-RFLP; e a expressão de *TLR4* e *TLR9* em monócitos por citometria de fluxo. **Resultados:** Nos pacientes HDV⁺ de fibrose >F2, ocorre aumento significativo dos níveis séricos das citocinas de perfil Th1: IL-6 quando comparados aos de fibrose \leq F2 (em vivos, $p= 0,0142$; e em óbito confirmado $p= 0,0317$); e TNF na presença do genótipo C/T em relação ao genótipo C/C de *TLR9* -1486 C/T ($p= 0,0067$). Nos pacientes HDV⁺ de fibrose \leq F2, as citocinas que obtiveram níveis séricos significativamente elevados foram: IL-6 (Th1), em portadores do genótipo A/A em relação aos de genótipo A/G de *TLR4* A299G ($p= 0,0242$); e IL-10 (regulatória), nos indivíduos de genótipos T/T e T/C em relação aos de genótipo C/C de *TLR9* -1237 T/C ($p= 0,0098$ e $p= 0,0335$, respectivamente). **Conclusão:** Estes resultados nos infere que possivelmente esteja ocorrendo um balanceamento de resposta imunológica entre o perfil Th1 (IL-6) e o perfil regulatório (IL-10) nos pacientes HDV⁺ de fibrose \leq F2 para que não haja a progressão para a fibrose avançada.

Palavras-chaves: HDV; HBV; polimorfismo; *Toll-like*; fibrose.

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis B and Delta are diseases caused by hepatotropic viruses, with a high incidence in the Amazon basin region, where it is typical to find the genotype considered the most aggressive of Delta hepatitis and, according to the World Health Organization, it is the most serious form of chronic viral hepatitis for having faster progression to advanced stages of hepatic impairment and death. The analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs), which can affect the recognition functions of Toll-like receptors of innate immunity, and cytokines could explain the chronification processes during the infection caused by the hepatitis B and Delta viruses in the Amazon region.

Objective: Describe the frequency of polymorphisms in the TLR4 (rs4986790 and rs4986791) and TLR9 (rs5743836 and rs187084) receptor genes, assess the influence of these polymorphisms on the development of liver fibrosis associated with infection by the Hepatitis B and Delta viruses, relating to the degree liver fibrosis, laboratory and clinical changes, expression of TLR4 and TLR9 in monocytes, as well as with the levels of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and IFN- γ .

Material and methods: The study population consisted of 77 patients diagnosed with HBV/HDV viruses treated at the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado and 137 blood donors who attended the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, both in the city of Manaus/AM. Fibrosis staging was performed using the FIB-4 index and METAVIR classification; serum levels of cytokines were analyzed using the CBA Flow Cytometry technique; the characterization of the polymorphisms was obtained by PCR-RFLP; and the expression of TLR4 and TLR9 in monocytes by flow cytometry.

Results: In HDV⁺ patients with >F2 fibrosis, there is a significant increase in serum levels of Th1 profile cytokines: IL-6 when compared to those of fibrosis \leq F2 (in live, $p = 0,0142$; and in confirmed death, $p = 0,0317$); and TNF in the presence of the C/T genotype in relation to the C/C genotype of TLR9 -1486 C/T ($p = 0,0067$). In HDV⁺ patients with \leq F2 fibrosis, cytokines that reached significantly elevated serum levels were: IL-6 (Th1), in carriers of the A/A genotype compared to those of the A/G genotype of TLR4 A299G ($p = 0,0242$); and IL-10 (regulatory), in individuals of T/T and T/C genotypes in relation to those of C/C genotype of TLR9 -1237 T/C genotype ($p = 0,0098$ and $p = 0,0335$, respectively).

Conclusion: These results infer that there is possibly a balancing of the immune response between the Th1 profile (IL-6) and the regulatory profile (IL-10) in HDV⁺ fibrosis patients \leq F2 so that there is no progression to advanced fibrosis.

Keywords: HDV; HBV; polymorphism; Toll-like; fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência mundial de HDV e distribuição geográfica de seus genótipos.....	25
Figura 2: Partícula viral do HBV como um vírus auxiliar para HDV.....	26
Figura 3: Genoma do HDV.....	27
Figura 4: Representação esquemática do ciclo de replicação do HDV.....	28
Figura 5: <i>TLRs</i> , células do sistema imune e ativação de respostas antivirais na infecção pelo HBV.....	32
Figura 6: Sinalização via receptores <i>TLRs</i>	33
Figura 7: Representação da resposta imunológica à infecção pelo HBV.....	36
Figura 8: Análise do Polimorfismo <i>TLR4</i> A299G em indivíduos com hepatite Delta por PCR-RFLP.....	46
Figura 9: Análise do Polimorfismo <i>TLR4</i> T399I em indivíduos com hepatite Delta por PCR-RFLP.....	46
Figura 10: Análise do Polimorfismo <i>TLR9</i> -1237 T/C em indivíduos com hepatite Delta por PCR-RFLP.....	47
Figura 11: Análise do Polimorfismo <i>TLR9</i> -1486 C/T em indivíduos com hepatite Delta por PCR-RFLP.....	47
Figura 12: Expressão dos receptores <i>TLR4</i> e <i>TLR9</i> em monócitos no programa FlowJo (v9.4).....	51
Figura 13: Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), TNF (E) e IFN- γ (F) entre os grupos controle e pacientes infectados com hepatite Delta.....	60
Figura 14: Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas em pacientes do grupo HDV+ de acordo com os genótipos dos polimorfismos <i>TLR4</i> A299G, <i>TLR4</i> T399I, <i>TLR9</i> -1237 T/C e <i>TLR9</i> -1486 C/T.....	62
Figura 15: Análise de citocinas séricas em pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta com fibrose moderada (\leq F2) de acordo com os genótipos para cada polimorfismo.....	64
Figura 16: Análise de citocinas séricas em pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta com fibrose avançada ($>$ F2) de acordo com os genótipos para cada polimorfismo.....	65
Figura 17: Média de intensidade de fluorescência (MIF) das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ em pacientes com hepatite Delta vivos (A) e que tiveram óbito confirmado (B).....	67

Figura 18: Expressão de *TLR4* e *TLR9* em monócitos de pacientes com hepatite Delta de acordo com os genótipos para cada polimorfismo.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estadiamento da cirrose e da fibrose moderada conforme valores de alto e baixo corte de APRI e <i>FIB-4</i>	44
Tabela 2: Descrição dos genes, referência dos SNPs e primers utilizados na genotipagem.....	48
Tabela 3: Descrição dos tubos e perfis celulares de acordo com os anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo.....	50
Tabela 4: Características demográficas dos pacientes com hepatite Delta e controles participantes do estudo	55
Tabela 5: Aspectos clínicos da população estudada.....	56
Tabela 6: Frequência dos polimorfismos estudados entre os grupos controle e pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAR	RNA adenosina desaminase
ALT	Alanina Aminotransferase
AP-1	Proteína ativadora-1
APC	Células apresentadoras de antígenos
APRI	Índice de razão aspartato aminotransferase para plaquetas
AST	Aspartato Aminotransferase
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
dsRNA	RNA de fita dupla
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FIB4	<i>Fibrosis-4</i>
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
G	Gravidade
HBcAg	Antígeno “c” ou core do HBV
HBeAg	Antígeno “e” do HBV
HBsAg	Antígeno de Superfície da Hepatite B
HBsAg-L	Antígeno de Superfície da Hepatite B de cadeia longa
HBsAg-M	Antígeno de Superfície da Hepatite B de cadeia média
HBsAg-S	Antígeno de Superfície da Hepatite B de cadeia menor
HBV	Vírus da hepatite B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCV	Vírus da hepatite C
HDAg	Antígeno da Hepatite Delta
HDAg-L	Antígeno da Hepatite Delta de cadeia longa
HDAg-S	Antígeno da Hepatite Delta de cadeia menor
HDV	Vírus da hepatite Delta
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA I	Antígeno Leucocitário Humano Classe I
HLA II	Antígeno Leucocitário Humano Classe II
HSCs	Células hepáticas estreladas
HSPG	Proteoglicano de sulfato de heparano
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas
IFN	Interferon

IL	Interleucina
IQR	Varição Interquartil
IRF	Fator regulador de interferon
JNK	Jun N-terminal quinase
KCs	Células de Kupffer
LAM	Lipoarabinomanana
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
mL	Mililitro
MIF	Média de intensidade de fluorescência
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MyD88	Diferenciação Mieloide 88
N	Número de indivíduos
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>T Natural killer</i>
NOD	Domínio de oligomerização nuclear
NPCs	Células não parenquimatosas
NTCP	Polipeptídeo de co-transportação de taurocolato de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
Primer	Oligonucleotídeo iniciador
PRRs	Receptores de Reconhecimento de padrão
RFLP	Restrição de fragmentos polimórficos
RIG	Gene indutível pelo ácido retinóico
RLRs	<i>RIG-like Receptors</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
Rpm	Rotações por minuto
Rs	<i>Reference string</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificações
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
ssRNA	RNA de fita simples
STAT	Transdutores de sinais e ativadores da transcrição
TIMPs	Inibidores de tecidos de metaloproteinases
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
Th	Células T <i>Helper</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>

TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Células T Regulatórias
TRIF	Adaptador indutor de interferon- β contendo o domínio TIR
UAG	Códon de parada
UGG	Códon de Triptofano
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VAS	<i>Virus Assembly Sequence</i>
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Epidemiologia.....	23
2.2 Genótipos do vírus da hepatite Delta	24
2.3 Classificação, estrutura e ciclo de replicação do vírus Delta	25
2.4 Transmissão e tratamento	29
2.5 Patogênese e resposta imune.....	31
2.6 Polimorfismos de nucleotídeo único.....	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Modelo de Estudo	42
4.2 População de estudo e critérios de inclusão e exclusão.....	42
4.3 Participantes do Estudo	43
4.4 Aspectos Éticos.....	43
4.5 Avaliação do estadiamento da doença hepática.....	43
4.6 Procedimentos	44
4.6.1 Coleta e conservação das amostras.....	44
4.6.2 Extração do DNA	45
4.6.3 Genotipagem dos genes dos receptores do tipo <i>Toll</i> por PCR-RFLP .	45
4.6.4 Dosagem de citocinas séricas por <i>Cytometric Bead Array - CBA</i>	49
4.6.5 Imunofenotipagem de monócitos e expressão de <i>TLR4</i> e <i>TLR9</i> por citometria de fluxo.....	49
4.6.6 Identificação da expressão de <i>TLR4</i> e <i>TLR9</i> em Monócitos.....	50
4.6.7 Análise dos resultados.....	51
5. RESULTADOS	54
5.1 Aspectos demográficos da população de estudo.....	54
5.2 Aspectos clínicos	55
5.3 Frequência dos polimorfismos	57
5.4 Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas entre os grupos HDV ⁺ e controle.....	60
5.5 Análise de citocinas séricas do grupo HDV ⁺ de acordo com os genótipos para cada polimorfismo	61

5.6 Análise de citocinas séricas em pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta de acordo com o grau de fibrose e genótipos para cada polimorfismo..	63
5.7 Análise de citocinas séricas em pacientes com hepatite Delta vivos e que tiveram óbito confirmado.....	66
5.8 Expressão de <i>TLR4</i> e <i>TLR9</i> em monócitos de pacientes com hepatite Delta.....	68
6. DISCUSSÃO	71
6.1 Aspectos demográficos e clínicos.....	71
6.2 Análise dos polimorfismos de nucleotídeo único <i>TLR4</i> A299G, <i>TLR4</i> T399I, <i>TLR9</i> -1237 T/C e <i>TLR9</i> -1486 C/T e suas frequências.....	72
6.3 Análise de citocinas séricas na população de estudo	76
6.4 Análise da expressão de <i>TLR4</i> e <i>TLR9</i> em monócitos de pacientes com hepatite Delta de acordo com os genótipos para cada polimorfismo.....	79
CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	102
Anexo 01: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (CAAE: 46865015.8.3001.5262).....	102
Anexo 02: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HEMOAM (CAAE:49652815.8.0000.0009).....	104
Anexo 03: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HEMOAM (CAAE:0024.0.112.000-10).....	107

Introdução
e Revisão Bibliográfica

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) é um grave problema de saúde pública, apresentando distribuição e número de casos elevados em países com baixo desenvolvimento socioeconômico (WHO, 2017). Cerca de 257 milhões de pessoas são infectadas cronicamente pelo HBV em todo o mundo (WHO, 2017; WHO, 2019) e 5% destas também apresentam o vírus da hepatite Delta (HDV). Contudo, esse número pode ser ainda maior, visto que pacientes infectados com HBV não são testados para o vírus da hepatite Delta em vários países (WHO, 2017).

Os indivíduos coinfectedados pelas hepatites B e Delta, podem apresentar quadro leve ou serem assintomáticos na fase aguda, surgindo outras manifestações clínicas em sua forma crônica, com progressão para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, porém, a hepatite Delta quando adquirida por superinfecção está associada aos casos mais graves, inclusive na fase aguda (BRASIL, 2009).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro frente a infecções causadas por patógenos. Os receptores *Toll-like* (TLRs) fazem parte de um grupo de proteínas responsáveis pelo reconhecimento de patógenos, essenciais para o funcionamento adequado do sistema imune inato (LIN et al., 2012).

A interação entre o sistema imune do hospedeiro e os vírus poderia estar associada às progressões para a cronificação da doença, visto que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em TLRs do hospedeiro poderiam promover a perda ou o ganho de função, favorável para a cura ou formas mais graves da doença (DHIMAN, et al., 2008; LIAN et al., 2009; XU et al., 2009).

Os estudos com polimorfismos ainda são escassos em relação à hepatite Delta e seu mecanismo de interação com o sistema imune do hospedeiro ainda não é bem definido, talvez por ser responsável por menores números de casos em relação a outros tipos de hepatites virais (0,7% das hepatites virais, segundo publicação em 2019 do Sistema de Informação de Agravos de Notificações).

Contudo, a hepatite Delta é considerada a mais agressiva das hepatites virais e requer atenção dos órgãos de saúde pública, pois pode progredir para

estágios mais avançados como grau avançado de fibrose e até mesmo carcinoma hepatocelular de forma mais acelerada. Também é importante salientar que o genótipo 3 da hepatite Delta, típico da Bacia Amazônica, está relacionado aos casos mais graves.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia

Estima-se que em todo o mundo, 257 milhões de pessoas (aproximadamente 3,5% da população) encontram-se como portadores crônicos da infecção pelo HBV (WHO, 2017; WHO, 2019). Dentre os portadores crônicos do HBV, cerca de 15 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo vírus da hepatite Delta (HDV) (GIERSCH & DANDRI, 2015).

Em regiões endêmicas de infecção pelo vírus da hepatite B, a infecção pelo vírus da hepatite Delta representa um agravante, pois para se tornar infectante o HDV necessita do HBV (RIZZETTO et al., 1980; WEDEMEYER & MANNS, 2010).

A hepatite Delta é caracterizada como a mais agressiva das hepatites virais, podendo ter progressão acelerada para fibrose, cirrose, descompensação hepática, carcinoma hepatocelular (HCC) e morte (WEDEMEYER & MANNS, 2010; GIERSCH & DANDRI, 2015; ALFAIATE et al., 2016).

Segundo Verme et al., 1991, o portador crônico de HBV que for infectado pelo HDV pode apresentar chances três vezes maiores de desenvolver carcinoma hepatocelular do que um mono-infectado. O estado de portador crônico do HBV constitui-se o principal fator epidemiológico para a propagação do HDV. Nos países em desenvolvimento são observadas áreas de alta endemicidade, como na África Central, Romênia, Mongólia, Paquistão, Irã, região montanhosa da Venezuela e Colômbia, bem como na Bacia Amazônica da América do Sul, com elevadas taxas de infecção, morbidades e mortalidades (RIZZETTO & CIANCIO, 2012; SANTOS et al., 2015,).

No Brasil, dados publicados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN), relataram que entre os anos de 1999 a 2018 foram 233.027 casos confirmados de hepatite B e 3.984 casos confirmados de hepatite Delta (correspondendo a 36,8% e 0,7% das hepatites virais, respectivamente) (BRASIL, 2019).

A maior incidência da hepatite Delta no território brasileiro ocorre na região Norte (74,9%), seguida das regiões Sudeste (10,3%), Sul (5,9%), Nordeste (5,5%) e Centro-Oeste (3,4%). Há uma prevalência de jovens entre 20 e 39 anos

(51,2%), autodeclarados pardos (56,4%), do gênero masculino (57,7%) e com a forma crônica da doença. O número de óbitos relacionados à hepatite Delta no Brasil entre os anos de 2000 e 2017 foi de 781 (BRASIL, 2019).

Na bacia amazônica brasileira a infecção ficou conhecida como "Febre Negra de Lábrea" onde a hepatite Delta estava relacionada a casos graves de hepatites e evolução acelerada de danos hepáticos (FONSECA, 2004; BRAGA et al., 2012).

De acordo com Crispim e colaboradores (2014, p. 2, apud Bensabath & Dias, 1983, p. 182), as regiões consideradas mais endêmicas para a infecção dos vírus das hepatites B e Delta na Amazônia brasileira são as de localizações mais remotas, dispersas na selva, como as bacias hidrográficas do Solimões, Juruá e Purus no Estado do Amazonas.

Em uma pesquisa recente de anticorpos anti-Delta em portadores de hepatite B crônica no Brasil, mais de 60% dos casos positivos pertenciam a dois estados da região norte: Acre e Amazonas (LAGO et al., 2018).

2.2 Genótipos do vírus da hepatite Delta

Atualmente existem oito genótipos do HDV descritos (HUGHES et al., 2011). O genótipo 1 é encontrado em todo o mundo, principalmente na Europa, América do Norte, norte da África e Oriente Médio. O genótipo 2 ocorre no Extremo Oriente em países como Japão, Taiwan e Rússia. Em Taiwan e Japão também ocorre o genótipo 4 (WEDEMEYER & MANNS, 2010; HUGHES et al., 2011).

O genótipo 3 é observado na Bacia Amazônica e de acordo com PARANÁ e colaboradores, 2006, na Amazônia brasileira também se observa o genótipo 1, sendo o 3 relacionado aos casos mais graves.

Já os genótipos 5-8 foram descobertos principalmente em pacientes de origem africana (HUGHES et al., 2011) (**Figura 1**).

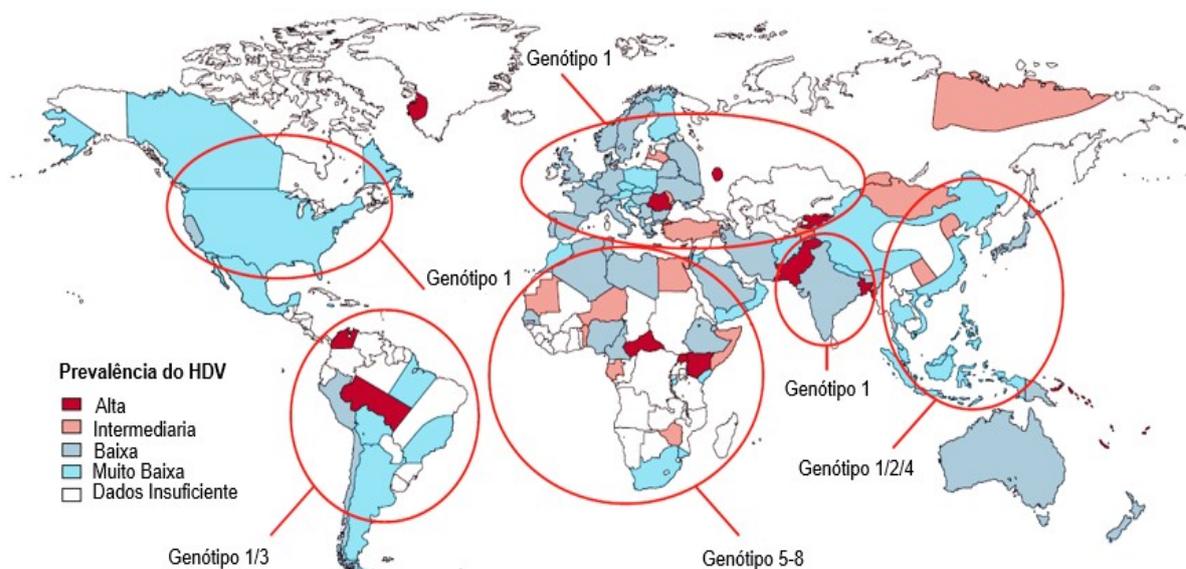


Figura 1 - Prevalência mundial de HDV e distribuição geográfica de seus genótipos
 FONTE: HUGHES et al., 2011.

2.3 Classificação, estrutura e ciclo de replicação do vírus Delta

O vírus da hepatite Delta foi descrito em 1977 por Mario Rizzetto e colaboradores, ao observarem partículas antigênicas no núcleo de hepatócitos de pacientes crônicos infectados pelo vírus da hepatite B que progrediram para fases mais graves da doença hepática (RIZZETTO et al., 1977).

O HDV é um vírus pertencente ao gênero *Deltavírus* e ainda não classificado taxonomicamente quanto à família; apresenta um RNA circular e de fita simples com polaridade negativa, 1.700 nucleotídeos, codifica cerca de 70 a 200 moléculas de antígeno de superfície da hepatite delta (HDAg), possui estrutura secundária de conformação em bastão e constitui uma pequena partícula esférica, envelopada e medindo aproximadamente 36 nm de diâmetro (RIZZETTO, 1985; BONINO et al., 1986; WANG et al., 1986; ALVARADO-MORA et al., 2013) (**Figura 2**).

O envelope do HDV é formado pelas três proteínas de envelope do HBV: a curta (HBsAg-S), a média (HBsAg-M) e a longa (HBsAg-L), necessitando das mesmas para completar seu ciclo de replicação. Desta forma, o HDV é considerado um vírus “defectivo” ou “satélite” do HBV. Seu genoma é o menor entre os vírus de RNA que infectam animais (RIZZETTO et al., 1980; HUANG & LO, 2014).

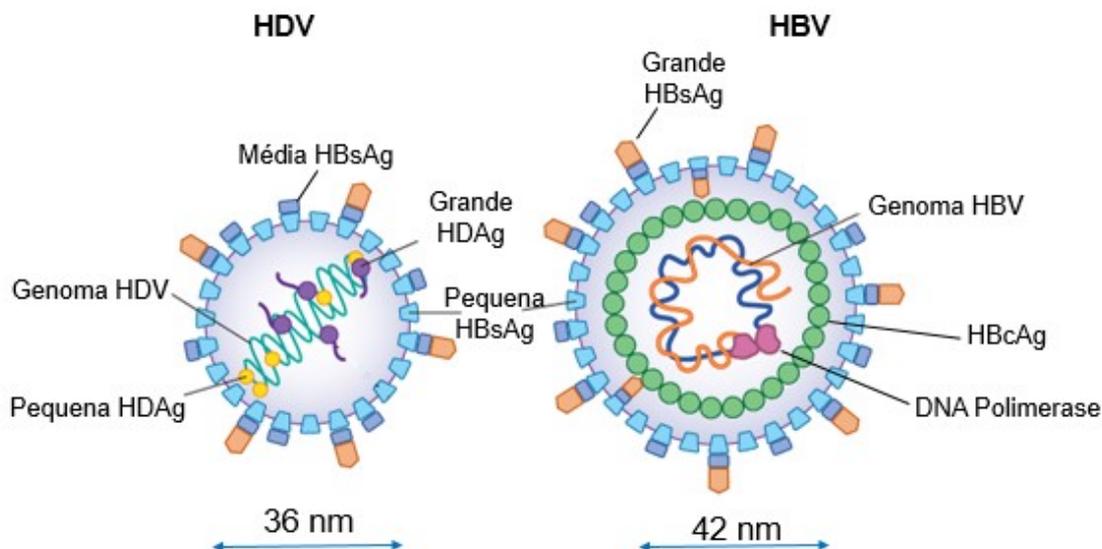


Figura 2 - Partícula viral do HBV como um vírus auxiliar para HDV
 FONTE: adaptado de <www.eigerbio.com/hepatitis-d/> Acesso em: 04 jan. 2018.

O HDV consegue produzir apenas uma proteína, a HDAg, e sua síntese proteica o diferencia de viroides, os menores fitopatógenos descritos (LAI, 1995; CASEY, 2002; EIRAS et al., 2006). O genoma do HDV apresenta apenas uma região de leitura aberta (ORF) e durante o processo de replicação são produzidas duas isoformas de HDAg (uma menor, a HDAg-S, e outra maior, a HDAg-L). A primeira possui 195 aminoácidos, é utilizada na replicação, através do alongamento de RNA Polimerase II e acumulando RNA viral durante o ciclo. A segunda, é responsável pela interrupção da replicação do RNA genômico, mas não do RNA antígeno, auxiliando desta forma na montagem viral. Além disso, possui 19 ou 20 aminoácidos adicionais na extremidade C terminal em relação à HDAg-S (CHAO et al. 1990; CHANG et al., 1991; POLSON et al., 1996; MODAHL et al., 2000; YAMAGUCHI et al., 2001).

A RNA adenosina desaminase 1 (ADAR 1) atua no RNA antígeno, catalisando adenosina em inosina para converter um códon de parada de tradução âmbar (UAG) em um códon de triptofano (UGG). Esse processo ocorre para que haja a formação da proteína de cadeia longa do HDV (HDAg-L), não parando no códon UAG devido à conversão e acrescentando os 19 a 20 aminoácidos em relação a de cadeia curta (HDAg-S) (POLSON et al., 1996; CASEY, 2012).

Após o processo de tradução, a HDAg sofre modificações que podem repercutir na replicação do HDV, são elas: metilação em R13, acetilação em K72 e fosforilação em S177. Na sequência de HDAg-L envolvida na montagem do vírus (VAS), ocorre também uma prenilação do resíduo de cisteína (C211) pela farnesiltransferase (**Figura 3**) (LAI, 2005; LEMPP et al., 2016).

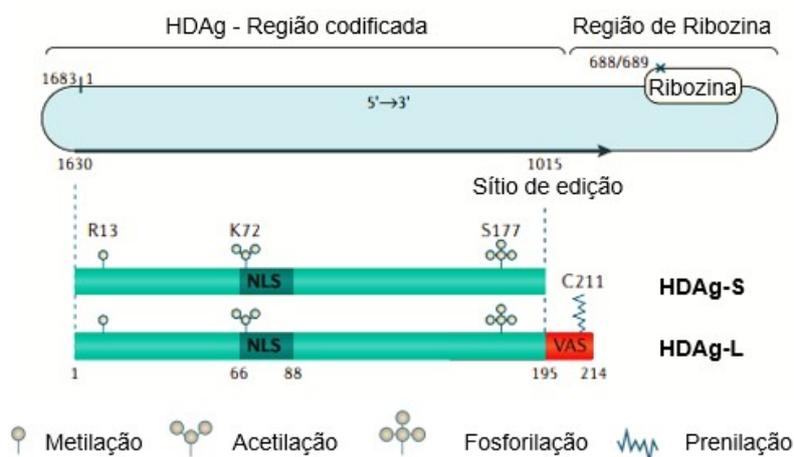


Figura 3 - Genoma do HDV
 FONTE: adaptado de LEMPP et al., 2016.

Ao entrar em contato com os hepatócitos, o HDV interage com o receptor celular proteoglicano de sulfato de heparano (HSPG), através do domínio pré-S1 da HBsAg-L e do ciclo antigênico do domínio S (LEISTNER et al., 2008; LONGARELA et al., 2013). Para Lempp et al. (2016) na fase de montagem do HDV, a HDA-L se une ao motivo rico em triptofano das proteínas presentes no envelope, por meio da fração prenilada e da sequência de montagem do vírus (VAS) abundante em prolina.

Em seguida, liga-se de forma irreversível ao polipeptídeo de co-transportação de taurocolato de sódio (NTCP) através da região N-terminal do HBsAg-L, podendo ocorrer uma fusão com a membrana plasmática ou uma endocitose, para consequentemente liberação da ribonucleoproteína no citosol e posterior encaminhamento da mesma ao núcleo para iniciar-se a replicação do RNA (SUREAU & SALISSE, 2013; NI et al., 2014) (**Figura 4**).

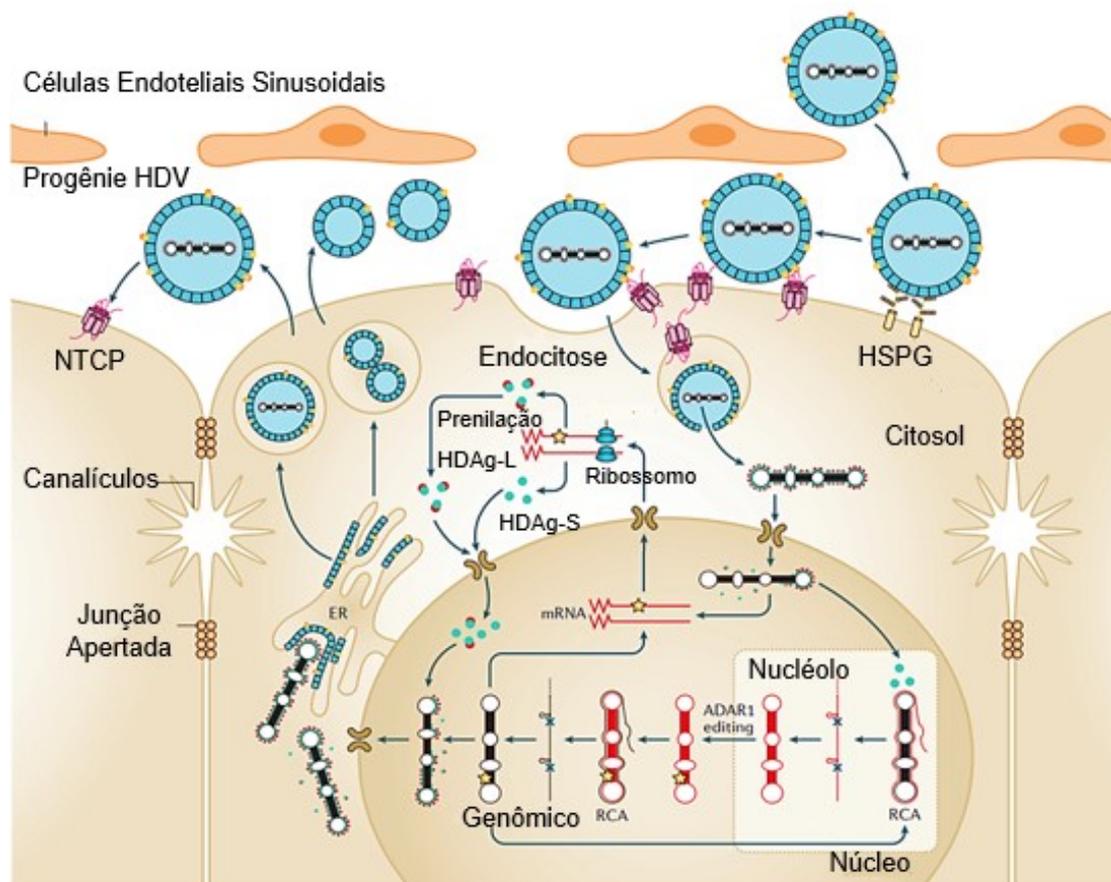


Figura 4 - Representação esquemática do ciclo de replicação do HDV
 FONTE: adaptado de LEMPP et al., 2016.

Verifica-se a replicação de RNA do HDV apenas no núcleo, através da RNA polimerase do hospedeiro, pois tal vírus não consegue sintetizar a sua própria RNA polimerase (GRECO-STEWART et al., 2007; CHANG et al., 2008). Além do RNA genômico circular do HDV, durante a replicação são produzidos outros dois tipos de RNAs virais: RNA antígenômico (complementar ao genômico) e o RNA mensageiro linear, com 800 nucleotídeos, para síntese proteica (WANG et al., 1986; KUO et al., 1988; LO et al., 1998).

O RNA genômico do HDV é convertido em RNA antígenômico e depois em novos genomas virais através da amplificação do ciclo de rolamento (HUANG & LO, 2010). Quando há a conversão do RNA genômico em RNA antígenômico, começa a amplificação do círculo contínuo. As moléculas multiméricas resultantes são clivadas pelas ribozimas existentes no próprio RNA e ligadas ao antígenômico viral circular. O HDV possui sequências bem conservadas de RNA (genômico e antígenômico) que fazem auto clivagem de moléculas multiméricas durante a transcrição, são as chamadas ribozimas. As ribozimas

encontradas no vírus da hepatite Delta são diferentes das encontradas nos viroides, quanto à função e à estrutura (KUO et al., 1988; WU et al., 1989; SERGANOV & PATEL, 2007).

Há uma segunda amplificação do círculo contínuo, porém, com os antigenomas dando origem ao RNA genômico, que também possui suas moléculas multiméricas que serão clivadas e ligadas ao RNA genômico circular. Tais RNAs genômicos são usados como molde para transcrição do RNA mensageiro. Depois disso, o RNA mensageiro migra para o citoplasma para ocorrer a tradução da proteína sintetizada pelo HDV (GRECO-STEWART et al., 2007; CHANG et al., 2008).

A associação do RNA genômico com a proteína HDAg forma a chamada ribonucleoproteína (RNP), importante para a montagem viral e movimentação do RNA do HDV entre o núcleo e o citoplasma celular (TAVANEZ et al., 2002). Após a tradução, as HDAgs retornam ao núcleo para ajustar a replicação viral ou ligar-se ao genoma viral circular, formando as ribonucleoproteínas que, posteriormente, serão enviadas ao citosol, onde chegarão ao retículo endoplasmático e encontrarão as proteínas de superfície do HBV, ocorrendo a montagem da partícula viral infectante e posterior contaminação de novos hepatócitos (LEMPP et al., 2016).

2.4 Transmissão e tratamento

A transmissão do HBV e do HDV ocorre da mesma forma, por via sexual, no contato com fluidos corpóreos do indivíduo infectado, por transmissão vertical, parenteral e percutânea, caracterizando principalmente como grupos de riscos os indivíduos que utilizam hemoderivados, drogas injetáveis ilícitas (pelo compartilhamento de seringas e agulhas), realizam hemodiálises, colocam *piercings*, fazem tatuagens e dividem utensílios pessoais de higiene (como escovas dentárias, alicates de unha, lâminas depilatórias e de barbear) (ARAÚJO & SILVA, 2014; WHO, 2017; BRASIL, 2018).

Com relação ao HDV, é observado ainda que a disseminação intrafamiliar parece ser comum nas regiões de alta prevalência do vírus (ROSENBLUM et al., 1992; NIRO et al., 1999).

Ao contrário dos vírus das hepatites B e C, o HDV não possui uma polimerase específica que possa servir como alvo terapêutico e, apesar de necessitar da glicoproteína de envelope do HBV para tornar-se infectante, sua replicação é independente do mesmo, tornando os análogos de nucleosídeos que inibem fortemente a replicação do HBV limitados frente a replicação do HDV. Por isso e pela sua gravidade, o tratamento da hepatite Delta é o mais complexo entre as hepatites virais e visa a prevenção de danos hepáticos futuros (NIRO et al., 2005; YURDAYDIN, 2012; FARCI & ANNA, 2018).

A principal forma de prevenção da hepatite Delta continua sendo através da imunização para a hepatite B (ALVARADO-MORA et al., 2013). Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) 2017 do Ministério da Saúde (MS) para o tratamento da hepatite viral crônica B e coinfeções, a Alfapecuinterferona (uma citocina imunomoduladora e antiviral) e/ou um análogo de nucleosídeo/nucleotídeo (Entecavir ou Tenofovir) estão sendo utilizados para o tratamento das hepatites B e D (BRASIL, 2017a).

Tenofovir e Entecavir são medicamentos orais recomendados pela OMS por causarem forte supressão do HBV, terem administração simples, poucos efeitos colaterais e raramente ocasionarem resistência medicamentosa (WHO, 2018).

O Tenofovir é a primeira opção no tratamento da hepatite B crônica, porém é contraindicado a pessoas com osteoporose e doença renal crônica (GARA et al., 2011; BUTI et al., 2015). Para esses casos, utiliza-se o Entecavir, que também é indicado para pacientes em tratamento de quimioterapia e imunossupressão (YE & SU, 2013). Todavia, não é aconselhado a pacientes já experimentados com Lamivudina e Telbivudina, pois estes medicamentos induzem mutações nos vírus presentes, o que diminui a eficácia do Entecavir (BRASIL, 2017a).

O Plano de Enfrentamento das Hepatites Virais na Região Amazônica de 2015, recomenda como tratamento terapêutico adequado para hepatite Delta o uso por 48 semanas de alfapecuinterferona 2a simultaneamente com um análogo de nucleosídeo/nucleotídeo, sendo repetido por mais 48 semanas se os índices de AST e ALT estiverem elevados (BRASIL, 2017a).

2.5 Patogênese e resposta imune

A hepatite B é uma doença com manifestações variadas, podendo apresentar fase aguda assintomática ou quadro leve semelhante a um estado gripal, como também pode apresentar sintomas típicos de hipertermia, náuseas, colúria, dores musculares e hipocolia fecal (BRASIL, 2010).

O HDV é altamente patogênico e adquirido por coinfeção (quando os dois vírus, HBV e HDV, infectam um indivíduo simultaneamente) ou por superinfecção (quando um indivíduo já infectado cronicamente pelo HBV se torna infectado pelo HDV). A superinfecção está relacionada aos casos mais graves, pois a pré-existência de HBsAg ativa a replicação acentuada do HDV, aumentando ainda mais o dano hepático (FONSECA, 2002; JEULIN et al., 2013).

Quando ocorre a superinfecção, o HDV promove uma diminuição ou desaparecimento do HBcAg no tecido hepático e uma diminuição dos níveis de HBsAg (RIZZETTO et al., 1980; ALVARADO-MORA et al., 2013).

O fígado é composto por hepatócitos e células não parenquimatosas (NPCs) como células endoteliais (LESC), células de Kupffer (KCs) e células hepáticas estreladas (HSCs). As células imunes incluindo células dendríticas (DCs), células assassinas naturais (NK), células NKT, linfócitos, monócitos e neutrófilos circulam neste órgão para garantir a resposta imune contra patógenos (CRISPE, 2009) (**Figura 5**).

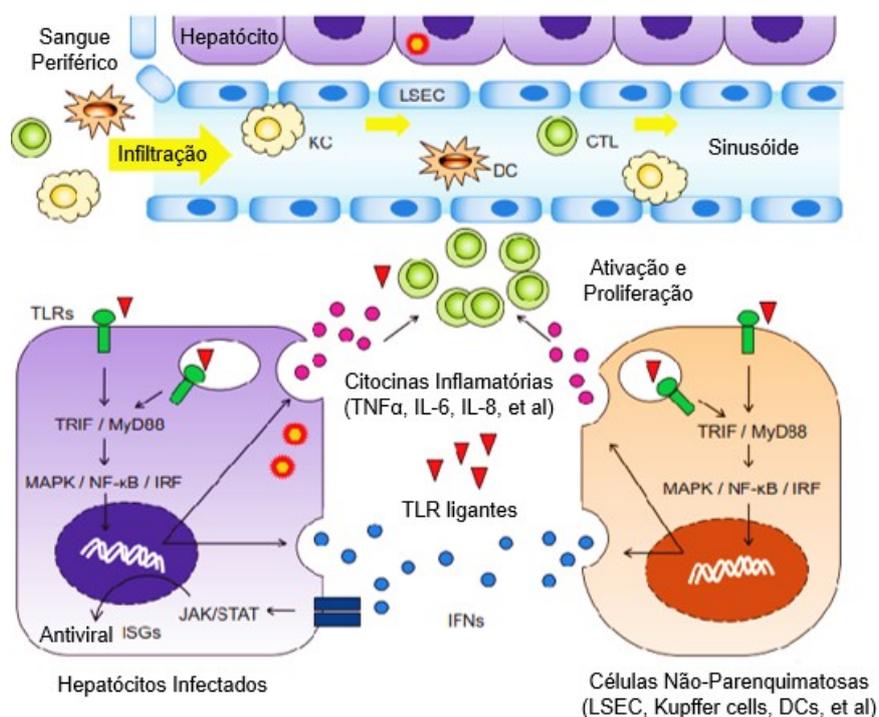


Figura 5 - TLRs, células do sistema imune e ativação de respostas antivirais na infecção pelo HBV
 FONTE: adaptado de MA et al., 2014.

Células do sistema imune inato apresentam uma gama de receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), tais como receptores do tipo *Toll-like* (como por exemplo, *TLR3* reconhecendo dsRNA, *TLR7* e *TLR8* ssRNA, e *TLR9* DNA de fita simples ou dupla e CpG não metilado), receptores tipo RIG-I (*RLRs*) e receptores semelhantes a NOD, reconhecendo estruturas específicas apresentadas nos patógenos invasores, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (TAKEUCHI & AKIRA, 2010; ABBAS et al., 2015).

Os *TLRs* de superfície celular (*TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5* e *TLR6*) geralmente reconhecem proteínas expressas na superfície de agentes patogênicos, enquanto os *TLRs* intracelulares (*TLR3*, *TLR7*, *TLR8* e *TLR9*), localizam-se na membrana endossomal e detectam material genético de patógenos (KOBE & DEISENHOFER, 1995; CHOE et al., 2005). Estes estimulam proteínas adaptadoras; várias proteínas quinases, incluindo ERK, JNK, p38 MAPK e PI3K; fatores de transcrição IRF3 / 5 / 7; e fator nuclear kappa B (NF-κB) e AP-1, objetivando disparar uma sinalização intracelular para ativar uma cascata de produção de citocinas, quimiocinas e interferons (IFNs), que por

sua vez, induzem genes de resposta antivirais visando a erradicação do patógeno (SEKI et al., 2008; ZHANG & LU, 2014) (**Figura 6**).

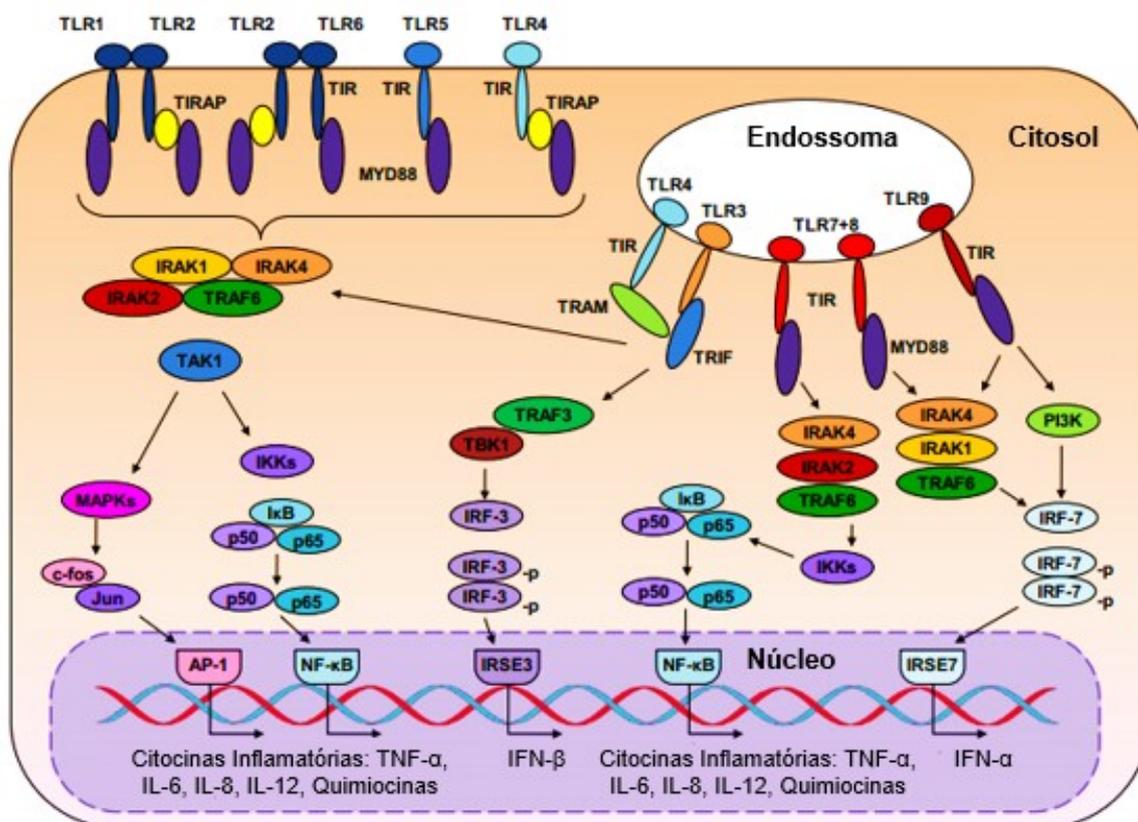


Figura 6 - Sinalização via receptores TLRs
 FONTE: adaptado de ZHANG & LU, 2014.

A ativação destes receptores no fígado, induz citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-18 e TNF- α , bem como IFN tipo I, através das vias MyD88 e TRIF dependentes e obtendo papel significativo na inibição da replicação do HBV. Essa ativação também modula respostas imunes específicas (ISOGAWA et al., 2005; WU et al., 2007; MA et al., 2014).

O IFN- α é capaz de promover um estado antiviral nas células vizinhas sendo a primeira linha de defesa para eliminação viral (ABBAS & AFZAL, 2013). No entanto, o HBV/HDV é capaz de promover a inibição da sinalização do IFN- α , do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (PUGNALE et al., 2009).

O fígado é frequentemente exposto a toxinas alimentares e bacterianas por estar localizado entre a circulação sistêmica e o intestino (TAIMR et al., 2003). A translocação da microbiota é um problema crescente na hepatite crônica, pois o

fígado já vem sendo lesionado pelo sistema imunológico na busca de eliminar o vírus e, quando aparecem bactérias vindas do intestino, esse quadro inflamatório crônico se eleva ainda mais, pois várias células do fígado, inclusive as células estreladas, possuem receptores *TLR4*, que reconhecem lipopolissacarídeo (LPS), padrões moleculares associados a patógenos de bactérias, ativando conseqüentemente, muitos sinais inflamatórios em vários tipos de células e induzindo quimiocinas e moléculas de adesão, gerando exacerbação inflamatória hepática (SEKI et al., 2007; ZHU et al., 2012).

A translocação bacteriana ocorre pelo aumento bacteriano no intestino, bem como pela alteração da permeabilidade intestinal, permitindo a migração de microrganismos do lúmen intestinal para a circulação portal. Pode ocorrer também a endotoxemia, endotoxinas na circulação sistêmica, causada por distúrbios reticuloendoteliais e desvio portossistêmico (KURATSUNE et al., 1983; GARCIA-TSAO & WIEST, 2004; KALAMBOKIS & TSIANOS, 2011).

A presença de endotoxinas pode intensificar a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 e a translocação bacteriana pode exacerbar o consumo de plaquetas, ocasionando trombocitopenia, redução do número de plaquetas no sangue (LUMSDEN et al., 1988; DEVIERE et al., 1990).

A sinalização de *TLR4* também pode contribuir para que ocorra hipertensão portal e angiogênese na fibrose hepática (JAGAVELU et al., 2010; ZHU et al., 2012).

A trombocitopenia em pacientes com quadro evolutivo para cirrose, deve-se à reunião de plaquetas no baço aumentado (esplenomegalia) por sequestro, sendo inversamente proporcional a relação entre a contagem de plaquetas e o tamanho do baço (ASTER, 1966; KAWASAKI et al., 1999).

A esplenomegalia congestiva é resultante da hipertensão portal, com desvio do fluxo sanguíneo e plaquetário circulantes para o baço (MORRIS et al., 1962).

Contrastando com o *TLR4*, o *TLR2*, por meio de células residentes no fígado e agindo em macrófagos do intestino, controla a síntese proteica de junção intestinal estreita, combatendo assim, a translocação bacteriana e a ativação das células estreladas (HARTMANN et al., 2012).

Em um estudo realizado, Muzio et al. (2000) observaram um aumento da expressão de *TLR4* em monócitos e em leucócitos polimorfonucleares quando

expostos a produtos bacterianos, como Lipopolissacarídeo (LPS) e Lipoarabinomanana (LAM), ou às citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IFN- γ . Porém, quando desafiadas com IL-10, a expressão de *TLR4* foi inibida. O que torna a IL-10 estudada como terapia antifibrótica hepática (XU et al., 2012).

Como o *TLR9* é um receptor que reconhece CpG-DNA não metilado e DNA de fita simples ou dupla, é encontrado em endossomas de células estreladas e em macrófagos residentes do fígado, em um indivíduo portador de hepatite crônica, com comprometimento hepático e destruição celular, pode ocorrer a ativação do *TLR9* por reconhecimento de DNA advindo de células destruídas, o que aumentará a gravidade da fibrose (WATANABE et al., 2007; ABBAS et al., 2015).

Durante a entrada viral nos hepatócitos, seu antígeno é processado no retículo endoplasmático e é apresentado na superfície celular através do antígeno leucocitário humano de classe I (HLA-I) das células apresentadoras de antígenos (APCs - como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas) aos linfócitos T citotóxicos CD8⁺ que reconhecem o antígeno e eliminam as células infectadas por dois mecanismos: liberação de granzimas e interação entre o receptor FAS e FAS ligante, causando a morte de hepatócitos infectados através de mecanismos citolíticos e não citolíticos (WANG et al., 2015).

Quanto aos antígenos exógenos e as partículas virais não infecciosas, os mesmos são endocitados pelas APCs e apresentados na sua superfície em associação ao HLA de classe II. Por sua vez, as células T auxiliares CD4⁺ reconhecem antígenos apresentados e assim promovem a ativação e proliferação de células T auxiliares específicas para a eliminação da infecção viral (YOU et al., 2014). (**Figura 7**).

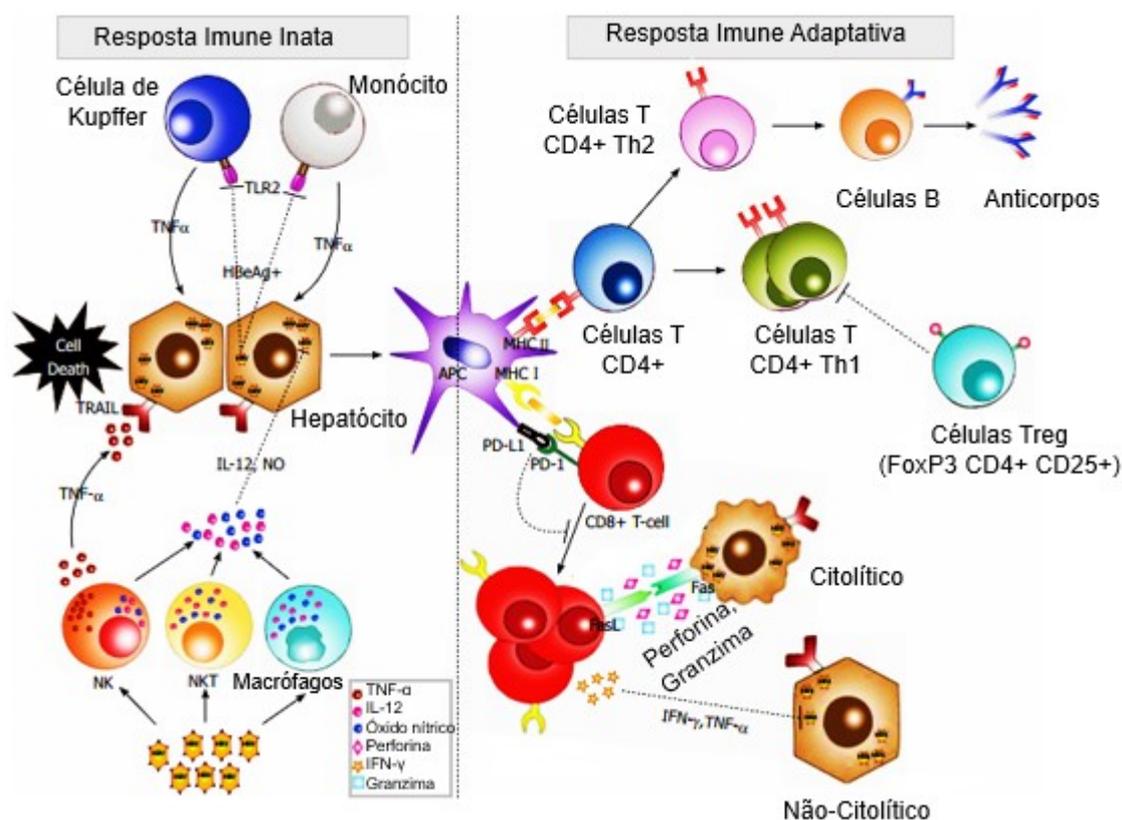


Figura 7 - Representação da resposta imunológica à infecção pelo HBV
 FONTE: adaptado de YOU et al., 2014.

Esse ambiente inflamatório, incluindo a apoptose de hepatócitos, estimula a ativação e diferenciação de células estreladas hepáticas (HSCs) em miofibroblastos fibrogênicos, bem como a produção de citocinas por parte destas células para manutenção do seu perfil de diferenciação. Se a lesão hepática se perpetuar, ocorre grande produção de proteínas da matriz extra celular e inibição de sua degradação por inibidores de tecidos de metaloproteinases (TIMPs), originando a fibrose tecidual. Se a causa da lesão hepática desaparecer a fibrose pode ser resolvida, através da apoptose de HSCs ativadas, regeneração de hepatócitos e degradação do colágeno pelas metaloproteinases (BATALLER & BRENNER, 2005).

Diante da perpetuação da infecção pelo HDV, o proteoma celular é alterado e o sistema imunológico passa a ter respostas exacerbadas de fatores pró-inflamatórios, de crescimento e antiapoptóticos; causando graves danos no fígado juntamente com maior sobrevivência celular, o que pode favorecer ao surgimento precoce do carcinoma hepatocelular (ABBAS & AFZAL, 2013).

2.6 Polimorfismos de nucleotídeo único

Polimorfismos são variações na sequência de DNA, em regiões específicas do cromossomo, que ocorrem em mais de 1% da população em geral (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

A grande maioria dos polimorfismos estão entre genes ou dentro de íntrons e não interferem na função gênica. Outros podem estar em regiões gênicas codificantes ou reguladoras, podendo ocasionar uma variação proteica ou interferir na transcrição e estabilidade do RNA (NUSSBAUM et al., 2016).

Nos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) ocorre a substituição de apenas um par de bases, podendo induzir conversões de aminoácidos e, assim, modificar a atividade do gene promotor (BALASUBRAMANIAN et al., 2004; GENG et al., 2016).

Quando o SNP não altera o aminoácido da proteína codificada é chamado de sinônimo e quando ocorre a alteração do aminoácido, é chamado de não sinônimo (NUSSBAUM et al., 2016).

Os polimorfismos de nucleotídeo único que localizam-se em uma mesma região no gene ou em regiões de grande proximidade no cromossomo, normalmente, estão em desequilíbrio de ligação; pois seus alelos não foram herdados aleatoriamente durante o acontecimento de quiasmas (durante a meiose I, prófase-diplóteno), mas sim herdados em bloco, conjuntamente (CALABRESE et al., 2009; FRAZER et al., 2009).

A infecção e a eliminação do HBV dependem das respostas imunes do hospedeiro. No entanto, pacientes crônicos infectados pelo HBV apresentam variações, polimorfismos, na imunidade celular associadas à expressão reduzida dos *TLR2*, *TLR3*, *TLR4* e *TLR9*. As proteínas e moléculas virais são reconhecidas por suprimirem e prejudicarem as vias de sinalizações através da interação com as proteínas adaptadoras, induzindo a inibição da atividade promotora dos receptores (VINCENT et al., 2011; ZHANG & LU, 2014; YI et al., 2015).

Esta pesquisa aborda SNPs que ocorrem nos receptores *TLR4* e *TLR9*.

No receptor *TLR4*, localizado no cromossomo 9, região 9q33.1, ocorre dois SNPs que vem sendo analisados e frequentemente co-estudados. Um deles é o *rs4986790*, em que há uma glicina ao invés de um ácido aspártico no

aminoácido de posição 299 (*TLR4* A299G); o outro é o *rs4986791* com uma isoleucina no lugar de uma treonina no 399º aminoácido (*TLR4* T399I) (ARBOUR et al., 2000; OMIM, 2018).

Com relação ao *rs4986790*, há estudos consensos em citar que o mesmo pode interferir na relação do *TLR4* com o LPS, podendo alterar, portanto, a resposta de células em indivíduos com esse polimorfismo. Isso porque este SNP ocorre no domínio extracelular do receptor com perda de carga negativa nesta área, o que pode gerar maior liberdade rotacional da ligação proteica (RALLABHANDI et al., 2006; FERWERDA et al., 2008). Já o *rs4986791* foi relacionado como hiporresponsivo à sinalização de LPS (ARBOUR et al., 2000).

Os SNPs *TLR9* -1237 T/C (*rs5743836*) e o *TLR9* -1486 C/T (*rs187084*) ocorrem na região promotora do gene *TLR9*, localizado no cromossomo 3, região 3p21.3; também estudados com frequência em conjunto (ENSEMBL, 2018; PANDEY et al., 2019).

A respeito do *TLR9* -1237 T/C, estudos mostram que, por sua localização na região promotora do gene *TLR9* (responsável pela regulação transcricional do RNA mensageiro gênico), quando na presença do alelo variante C, ocorre um aumento em seus níveis de expressão por maior atividade de seu promotor (NG et al., 2010; LANGE et al., 2011).

Em uma pesquisa *in-silico*, Alipoor et al. (2016) encontraram o *TLR9* -1486 C/T como provável modificador de predição a doenças, devido a uma possível interferência na ligação dos fatores transcricionais. Porém, com relação à hepatite C crônica na China Central, por exemplo, Wei et al. (2014) concluiu que esse polimorfismo não era crucial para a infecção crônica em questão.

Investigações acerca da associação entre os SNPs em diferentes *TLRs* e os resultados de suscetibilidade à progressão clínica da infecção pelo HBV vem sendo realizadas (SAWHNEY & VISVANATHAN, 2011; SÁ et al., 2015), porém, ainda necessitam ser realizadas pesquisas a respeito da associação entre os SNPs em diferentes *TLRs* e a infecção pelo HDV.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência dos polimorfismos nos genes dos receptores *TLR4* e *TLR9* no desenvolvimento da fibrose hepática causada pela pelos vírus das Hepatites B e Delta associado ao perfil de resposta imune.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever a frequência dos polimorfismos encontrados, através da genotipagem, nos genes dos receptores *TLR4* (*rs4986790* e *rs4986791*) e *TLR9* (*rs5743836* e *rs187084*);
- Investigar os polimorfismos nos genes dos receptores do tipo *Toll* de interesse deste estudo, relacionando-os com: grau de fibrose hepática, expressão de *TLR4* e *TLR9* em monócitos e alterações laboratoriais e clínicas;
- Relacionar os polimorfismos encontrados com os níveis das citocinas séricas de perfil Th1 (IL-2, IL-6, TNF e IFN- γ), Th2 (IL-4) e regulatória (IL-10).

Material e

Métodos —

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

Para os estudos de genotipagem das amostras de indivíduos infectados pelos vírus das Hepatites B e Delta em diferentes estágios de doença hepática e indivíduos saudáveis foi realizado um estudo de caso-controle.

Para a associação dos polimorfismos com comprometimento hepático grave ($>F2$) e não grave ($\leq F2$), foi realizado um estudo transversal. O presente estudo constitui subprojeto de um projeto maior, da linha de pesquisa sobre hepatites do Grupo de Pesquisa “Imunologia Básica e Aplicada”, realizado em pacientes com as Hepatites B e Delta atendidos no ambulatório de hepatites virais da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) em Manaus, Amazonas.

4.2 População de estudo e critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico das hepatites B e Delta, confirmados por testes sorológicos e moleculares de detecção do DNA viral (HBV DNA+), de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, com e sem a presença de fibrose (F1-F2 e F3-F4) que procuraram atendimento na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus/Amazonas e aceitaram participar do projeto, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

Não foram incluídos indígenas, pacientes grávidas, com distúrbios psiquiátricos, renais crônicos e pacientes com síndrome plurimetabólica.

Foram excluídos pacientes que apresentaram coinfeção com o vírus da Hepatite C (anti-HCV), vírus da Imunodeficiência Adquirida - HIV (anti-HIV-1 e 2), vírus Linfotrófico da Célula T Humana - HTLV (anti-HTLV I e II), doença de Chagas (teste Elisa) e sífilis (VDRL) confirmados por qPCR.

Para o grupo controle, foram selecionados doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), de ambos os sexos, com idade mínima de 18 anos e residentes em Manaus, que não apresentaram reatividade para Hepatite B (anti HBc, HBsAg), HCV (anti-

HCV), HIV (anti-HIV-1 e 2), HTLV (anti-HTLV I e II), confirmados por NAT HCV/HBV/HIV, doença de Chagas (teste ELISA) e sífilis (VDRL).

4.3 Participantes do Estudo

A população de estudo foi composta por 77 pacientes diagnosticados com os vírus HBV/HDV atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), localizada na cidade de Manaus, Estado do Amazonas e 137 doadores de sangue que se apresentaram na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

4.4 Aspectos Éticos

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas a partir dos projetos intitulados: “Estadiamento da fibrose hepática de pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta por métodos não invasivos na região norte do Brasil” (CAAE 46865015.8.3001.5262); “Identificação e Seleção de Peptídeos Miméticos Reativos aos soros de pacientes HCV⁺ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro” (CAAE 49652815.8.0000.0009); e “Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da Hepatite B (HBV) na cidade de Manaus” (CAAE 0024.112.000-10). Tais projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e coordenados pelo Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, Dra. Adriana Malheiro Alle Marie e Dra. Laura Patrícia Viana Chaves, respectivamente. Vale ressaltar que do segundo e do terceiro projetos utilizamos apenas as amostras controles.

4.5 Avaliação do estadiamento da doença hepática

O grau de acometimento hepático pode ser calculado de forma matemática simples através da aplicação de índices como *APRI* (*AST to Platelet Ratio Index*) e *FIB-4* (*Fibrosis-4*), por meio de resultados de exames laboratoriais. São métodos não invasivos indicados pela Organização Mundial de Saúde desde 2014 (WHO, 2014; BRASIL, 2017b).

A fórmula de APRI está descrita abaixo:

$$\text{APRI} = \frac{\frac{\text{Valor de AST (UI/L)}}{\text{Limite Superior Normal de AST (UI/L)}}}{\text{Contagem de Plaquetas (10}^9\text{)}} \times 100$$

A fórmula de FIB-4 é a seguinte:

$$\text{FIB4} = \frac{\text{Idade (anos)} \times \text{AST (UI/L)}}{\text{Contagem de Plaquetas (10}^9\text{)} \times \sqrt{\text{ALT (UI/L)}}}$$

Após o cálculo, os resultados de fibrose ausente/inicial ou avançada, são obtidos por meio de pontos de corte preestabelecidos conforme observados na **tabela 01**.

Tabela 01 – Estadiamento da cirrose e da fibrose moderada conforme valores de alto e baixo corte de APRI e FIB-4.

METAVIR	APRI (Baixo corte)	APRI (Alto corte)	FIB-4 (Baixo corte)	FIB-4 (Alto corte)
Fibrose moderada (METAVIR F2)	0,5	1,5	1,45	3,25
Cirrose (METAVIR F4)	1,0	2,0	-	-

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017b

Apesar de haver outros sistemas de classificação para estadiamento e graduação das hepatites crônicas, por levar em conta fibrose, atividade periportal e lobular (histologia básica das hepatites crônicas), é aconselhado a utilização da classificação METAVIR (BRASIL, 2011; BRASIL, 2017b).

Para classificar os pacientes acometidos pela hepatite Delta quanto ao grau de fibrose, foi aplicado neste estudo o índice *FIB-4* e classificação METAVIR, subdividindo-os em outros dois grupos: fibrose moderada (\leq F2, n= 39) e fibrose avançada ($>$ F2, n= 38).

4.6 Procedimentos

4.6.1 Coleta e conservação das amostras

As amostras analisadas neste estudo foram coletadas através de punção venosa. O volume total de 15 mL de sangue periférico foi distribuído em três

tubos: 2 tubos de 5 mL com o anticoagulante EDTA (*BD Vacutainer® EDTA K2*) para procedimentos referentes à determinação dos polimorfismos dos receptores propostos, imunofenotipagem de monócitos e expressão de *TLR4* e *TLR9*; e um tubo de 5 mL sem anticoagulante, no qual foi reservado para dosagem de citocinas previstas pelo projeto.

As amostras foram transportadas ao Laboratório Multidisciplinar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), onde o soro/plasma foram separados por centrifugação a 3.000 rotações por 5 minutos (rpm), e, assim como a fração celular, congelados à -80 °C até o momento de uso.

4.6.2 Extração do DNA

A extração de DNA genômico foi realizada com o kit comercial *QIAmp DNA kit* (*QIAGEN, Chatsworth, CA, USA*). O protocolo de extração seguiu as recomendações descritas no protocolo do fabricante. Após a extração as amostras foram congeladas a -20°C.

4.6.3 Genotipagem dos genes dos receptores do tipo *Toll* por PCR-RFLP

Os polimorfismos nos genes dos receptores *TLR4* (*rs4986790, rs4986791*) e *TLR9* (*rs5743836* e *rs187084*) foram genotipados pela técnica de PCR-RFLP descrita por Leoratti et al., (2008) e Ramasawmy et al., (2009) (**figuras 8 – 11**).

Resumidamente, a reação de PCR para cada SNP consistiu em 1 µL de DNA genômico (~20ng) adicionado a 24 µL de mix de PCR contendo 0,2 µL (2U) Platinum™ Taq polimerase (*Thermo Fisher Scientific*), 2,5 µL de tampão 10x (100 40 mmol/L Tris-HCl [pH 8,3] e 500 mmol/L de KCl), 1 µL de MgCl₂ (1,5 mmol/L), 1 µL de dNTPs (40 mmol/L), 0,5 µL de *primers forward* e *reverse* (0,25 pmol/L) e 18,3 µL de dH₂O ultrapura. O processo de amplificação foi realizado no termociclador *Veriti® 96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, Carlsbad, USA*). Em seguida, foi utilizado 10 µL de produto de PCR para a reação de restrição, adicionado de 5U da respectiva enzima de restrição (*New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA*) diluída em tampão enzimático de acordo com as

instruções do fabricante. Os *primers*, as condições de ciclagem para PCR e as endonucleases de restrição estão descritos na **tabela 02**. Os fragmentos gerados pela reação de PCR-RFLP foram separados por eletroforese em um gel de agarose a 3% corado com *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Hayward, CA, EUA) e visualizados em luz Ultravioleta (UV) no aparelho de fotodocumentação *Molecular Imager Gel Doc™ XR* (Bio-Rad Corporation, Hercules, CA, EUA). Descrição dos genes, referência dos SNPs e *primers* utilizados na genotipagem do trabalho proposto estão demonstrados na **tabela 02**.

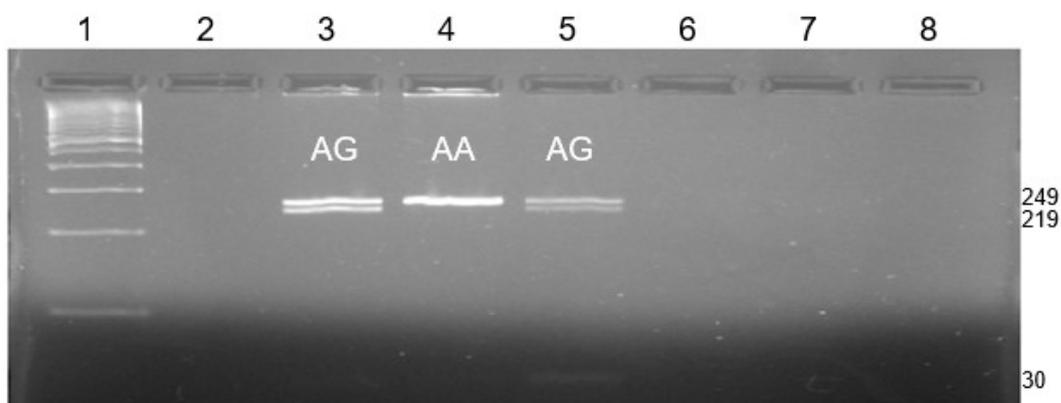


Figura 8 - Análise do Polimorfismo *TLR4* A299G em indivíduos com hepatite Delta por PCR-RFLP. Alelo selvagem do gene *TLR4* A299G (249 pb) e alelo variante (219 e 30 pb). Poço 1: Ladder de 100 pb; Poço 2: controle negativo; Poço 4: homocigoto selvagem (A/A); Poços 3 e 5: heterocigoto (A/G).

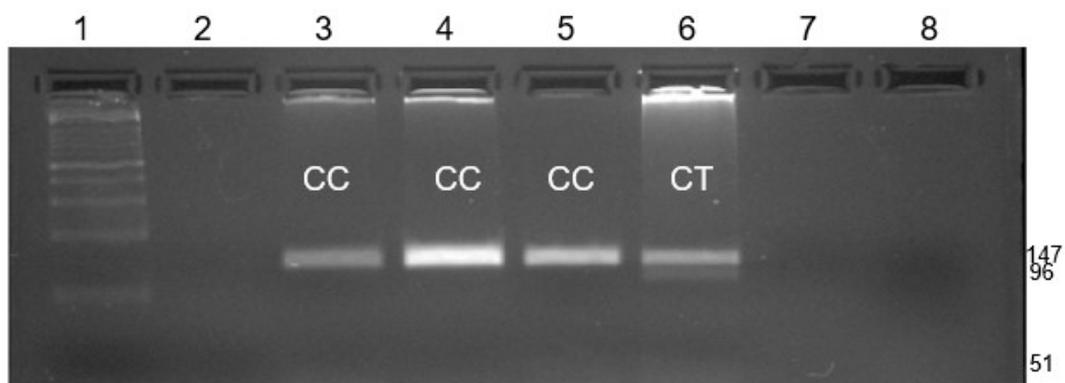


Figura 9 - Análise do Polimorfismo *TLR4* T399I em indivíduos com hepatite Delta por PCR-RFLP. Alelo selvagem do gene *TLR4* T399I (147 pb) e alelo variante (96 e 51 pb). Poço 1: Ladder de 100 pb; Poço 2: controle negativo; Poços 3 – 5: homocigoto selvagem (C/C); Poço 6: heterocigoto (C/T).

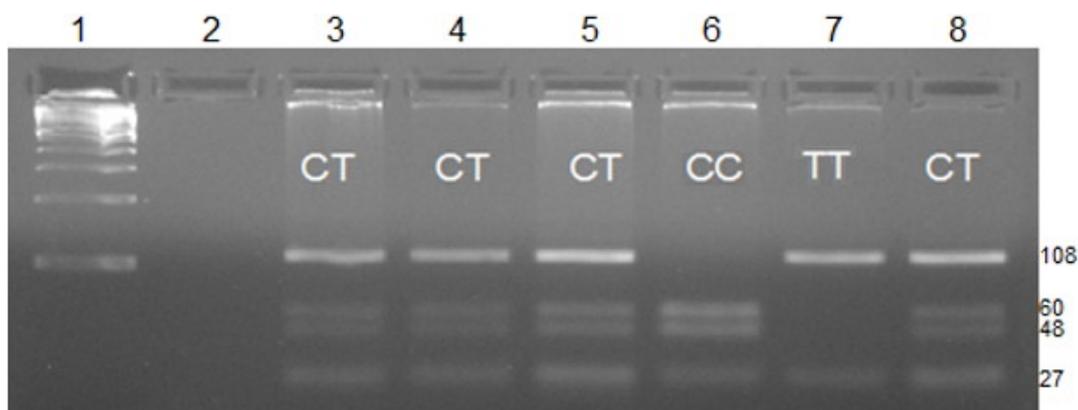


Figura 10 - Análise do Polimorfismo *TLR9* -1237 T/C em indivíduos com hepatite Delta por PCR-RFLP. Alelo selvagem do gene *TLR9* -1237 T/C (108 e 27 pb) e alelo variante (60, 48 e 27 pb). Poço 1: Ladder de 100 pb; Poço 2: controle negativo; Poços 3 – 5 e 8: heterozigoto (T/C); Poço 6: homozigoto variante (C/C); Poço 7: homozigoto selvagem (T/T).

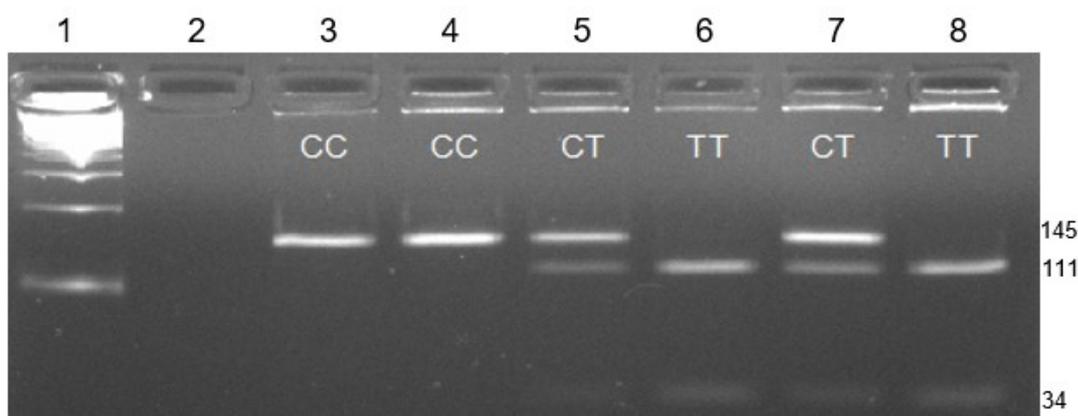


Figura 11 - Análise do Polimorfismo *TLR9* -1486 C/T em indivíduos com hepatite Delta por PCR-RFLP. Alelo selvagem do gene *TLR9* -1486 C/T (145 pb) e alelo variante (111 e 34 pb). Poço 1: Ladder de 100 pb; Poço 2: controle negativo; Poços 3 e 4: homozigoto selvagem (C/C); Poços 5 e 7: heterozigoto (C/T); Poços 6 e 8: homozigoto variante (T/T).

Tabela 02 - Descrição dos genes, referência dos SNPs e primers utilizados na genotipagem.

Polimorfismos	Iniciadores	Protocolo de PCR	Enzimas de Restrição	Alelos e Fragmentos (bp)
<i>TLR4</i> A299G (rs4986790)	F: 5'-ATACTTAGACTACTACCTCCATG-3' R: 5'-AAACTCAAGGCTTGGTAGATC-3'	95°C for 5min, 35x (95°C for 30s, 56°C for 30s, 72°C for 30s), 72°C for 7min	<i>NcoI</i>	A: 249 G: 219+30
<i>TLR4</i> T399I (rs4986791)	F: 5'-GCTGTTTTCAAAGTGATTTTGGGAGAA-3' R: 5'-CACTCATTGTTTCAAATTGGAATG-3'	95°C for 5min, 35x (95°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 45s), 72°C for 5min	<i>Hinf-I</i>	C: 147 T: 96+51
<i>TLR9</i> -1237 T/C (rs5743836)	F: 5'-ATGGGAGCAGAGACATAATGGA-3' R: 5'-CTGCTTGCAGTTGACTGTGT-3'	95°C for 5min, 40x (95°C for 30s, 59°C for 30s, 72°C for 45s), 72°C for 7min	<i>BstNI</i>	T: 108+27 C: 60+48+27
<i>TLR9</i> -1486 C/T (rs187084)	F: 5'- TATCGTCTTATCCCTGCTGGAATGT-3' R: 5'- TGCCCAGAGCTGACTGCTGG-3'	95°C for 5min, 40x (95°C for 30s, 59°C for 30s, 72°C for 30s), 72°C for 7min	<i>AfIII</i>	C: 145 T: 111+34

4.6.4 Dosagem de citocinas séricas por *Cytometric Bead Array* - CBA

A dosagem de citocinas das amostras de plasma dos pacientes e controles foram realizadas pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (*Cytometric Bead Array*) com o Kit BDTM *Human TH1/TH2 Cytokine* (marca BD® *Biosciences, San Diego, CA, USA*), seguindo as orientações descritas pelo fabricante.

As citocinas quantificadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ . O Kit BDTM CBA utiliza uma série de partículas (microesferas ou *beads*) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada *bead* de captura está conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra é realizada através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a *bead*. Os complexos formados de *bead* de captura + citocina da amostra + anticorpo de detecção são quantificados através da Citometria de Fluxo. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo *FACSCanto II* (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

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

4.6.5 Imunofenotipagem de monócitos e expressão de *TLR4* e *TLR9* por citometria de fluxo

Para caracterização imunofenotípica, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos (**tabela 03**). Para esta marcação foi adicionado 100 μ L de sangue total.

O sangue total foi incubado com 1 μ L de cada anticorpo nos seus respectivos tubos. Estes, foram homogeneizados e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a marcação, as hemácias foram lisadas com o uso de 2 mL da solução de lise (*BD FACSTTM Lysing Solution, BD® Biosciences, San Diego, CA, USA*).

Os tubos foram novamente homogeneizados e incubados por 10 minutos nas mesmas condições. Passado a fase de incubação, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 2 mL de PBS-W (solução fisiológica tamponada com fosfato) para lavagem do botão de células formado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados novamente a 1500 rpm por 5min. Ao final do procedimento, o sobrenadante foi descartado por inversão e as células foram colocadas em 300 µL de PBS-W.

A aquisição das amostras foi realizada no laboratório de Citometria de Fluxo do HEMOAM, no citômetro de fluxo *FACScalibur®* (*Becton, Dickinson and Company*, San Jose, CA, USA). A identificação morfológica e imunofenotípica das populações celulares de interesse foram realizadas pelo programa FlowJo (v9.4), com o auxílio de “gates” para a seleção das populações de interesse, em gráficos que combinam características morfológicas (tamanho e granulosidade, FSC e SSC respectivamente) com características imunofenotípicas através das fluorescências dos anticorpos monoclonais utilizados para identificar as células alvos. Após a definição das regiões, a determinação do percentual de células positivas foi realizada através um histograma simples de análise da região.

Tabela 03 - Descrição dos tubos e perfis celulares de acordo com os anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo.

Tubo	Anticorpo	Marca	Perfil celular
01	<i>Human Anti-CD14</i>	<i>BD@ Biosciences</i>	Monócitos e <i>TLR4+</i>
	<i>Human Anti-CD284</i>	<i>Biolegend</i>	
02	<i>Human Anti-CD14</i>	<i>BD@ Biosciences</i>	Monócitos e <i>TLR9+</i>
	<i>Human Anti- CD289</i>	<i>BD@ Biosciences</i>	

4.6.6 Identificação da expressão de *TLR4* e *TLR9* em Monócitos

Para a análise da expressão dos receptores *TLR4* e *TLR9* em monócitos foi feito um gráfico de SSC x CD14 e uma “gate” foi feita na região positiva para monócitos (CD14+). Em seguida foi analisado a expressão por Intensidade Média de Fluorescência (MFI) do *TLR4* (CD284+) e *TLR9* (CD289+).

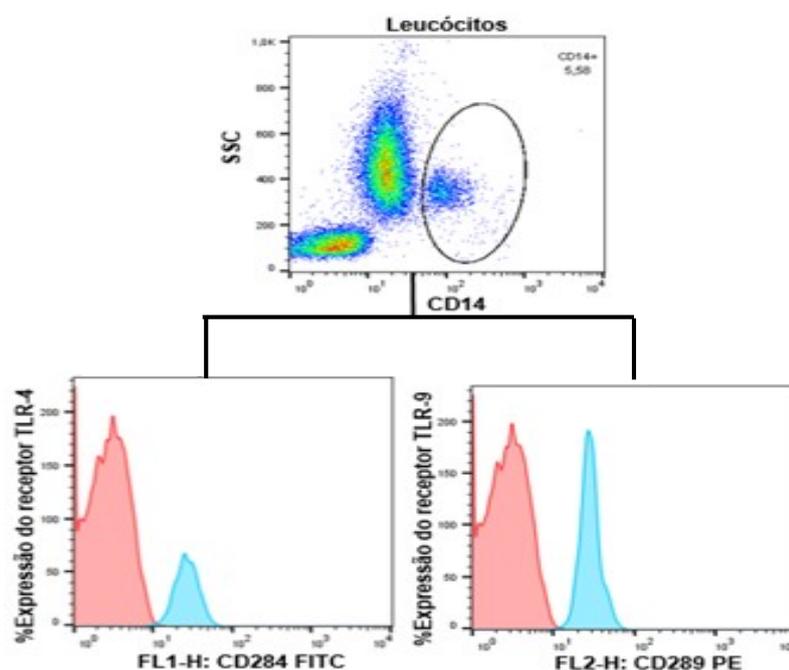


Figura 12 - Expressão dos receptores *TLR4* e *TLR9* em monócitos no programa *FlowJo* (v9.4).

4.6.7 Análise dos resultados

Os resultados variáveis foram organizados por meio do *software Microsoft Excel®* (versão 2016 para *Windows*) para que as análises estatísticas dos dados e as confecções dos gráficos fossem realizadas através do *software GraphPad Prism®* (versão 7.0). Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas.

As análises das características clínicas, demográficas e os níveis de citocinas séricas entre os grupos controle e pacientes com hepatite Delta foram realizadas com o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Assim como a análise de citocinas séricas em pacientes com hepatite Delta vivos e que tiveram óbito confirmado.

As frequências alélicas e genóticas foram calculadas com a contagem direta dos genes. Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%).

O cálculo do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi obtido por meio de aplicação online (<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>), comparando a frequência do número de genótipos observados e esperados.

Nos indivíduos positivos para o vírus da hepatite Delta, as análises das associações entre: genótipos e níveis de citocinas; genótipos, níveis de citocinas e

grau de fibrose; e expressão dos receptores *TLR4* e *TLR9* em monócitos de acordo com os genótipos, foram efetuadas pelo teste de *Kruskal-Wallis* bem como, pelo teste não paramétrico *Mann-Whitney*.

Regressão logística foi realizada para identificação dos fatores de risco associado ao desfecho específico (fibrose), bem como descrição do seu "*odds ratio*" e intervalo de confiança a 95%. As diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Aspectos demográficos da população de estudo

Este estudo foi realizado no Estado do Amazonas e abrangeu 214 indivíduos, sendo 137 doadores de sangue da cidade de Manaus e 77 pacientes HDV⁺ atendidos na FMT-HVD.

Os pacientes com hepatite Delta foram analisados de acordo com a naturalidade, em observância ao Demonstrativo de Espaço Territorial realizado pela Secretaria de Estado da Fazenda/AM em 2019 (AMAZONAS, 2019), que mostra dez sub-regiões administrativas no Estado do Amazonas, as regiões: Alto Solimões, Triângulo Juruá-Solimões-Juruá, Purus, Juruá, Madeira, Alto Rio Negro, Rio Negro-Solimões, Médio Amazonas, Baixo Amazonas e Metropolitana.

A grande maioria destes pacientes, 31%, está na região do Juruá, mais precisamente nos municípios de Envira, Carauari, Itamarati e Eirunepé.

Com 21% dos casos, o Triângulo Juruá-Solimões-Juruá, é a segunda região mais incidente da hepatite Delta dentre os participantes deste estudo, presente em Juruá, Fonte Boa, Japurá, Juruá, Marã e Tefé.

Observa-se também a ocorrência nos municípios de Pauini, Boca do Acre, Canutama, Tapauá e Lábrea, representando a região do Purus com 19%; Anamá, Anori, Coari e Codajás, no Rio Negro-Solimões (6,5%); Autazes, Comunidades Autaz-Mirim e Janauacá, Itacoatiara e Manacapuru na região Metropolitana (6,5%); Santo Antônio do Içá e Tabatinga, no Alto Solimões (3%) e Novo Aripuanã no Madeira com apenas 1%.

Outros 12% são originários de ponto inespecífico na margem do rio Purus e de municípios de outros estados como: Caracaraí em Roraima; Fortaleza do Acre, Cruzeiro do Sul e Feijó no Acre; Óbidos e Santarém no Pará e São Luís no Maranhão.

Vale ressaltar que neste estudo não houve indivíduos originários das regiões: Alto Rio Negro, Médio Amazonas e Baixo Amazonas.

O município com maior incidência foi Eirunepé, seguido por Itamarati e Lábrea, todos localizados no estado do Amazonas.

A faixa etária mediana dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta (45 anos) foi significativamente maior ($p < 0,0001$) que a dos indivíduos do grupo

controle (30 anos) e houve uma predominância do gênero masculino em ambos os grupos.

Dos pacientes HVD⁺, 17% não receberam medicação e 83% foram medicados com Entecavir (n= 58), Interferon (n= 2), Lamivudina (n= 2) e Tenofovir (n= 2).

No decorrer deste estudo, 14,3% (n= 11) dos pacientes com hepatite Delta vieram a falecer. Os dados demográficos da população estudada estão resumidos na **tabela 04**.

Tabela 04 - Características demográficas dos pacientes com hepatite Delta e controles participantes do estudo.

Dados Demográficos	Grupo controle (n= 137)	Grupo HDV ⁺ (n= 77)
Idade (Mediana e [IQR])	30 [22 - 39]	45 [38 - 53]
Gênero (masculino/feminino)	95 (69%)/42 (31%)	41 (53%)/36 (47%)
Naives/Experimentados	-	13 (17%)/64 (83%)

N - número de indivíduos; HDV⁺ - vírus da hepatite Delta positivo; IQR - variação interquartil; Naives – indivíduos que não receberam tratamento medicamentoso; Experimentados – indivíduos que receberam tratamento medicamentoso.

5.2 Aspectos clínicos

Para estudar os marcadores hepáticos, os pacientes HDV⁺ foram subdivididos quanto ao grau de fibrose em dois subgrupos: fibrose moderada ($\leq F2$, n= 39) e fibrose avançada ($>F2$, n= 38), como mostrado na **tabela 05**.

Ao analisar as plaquetas, houve uma diminuição significativa ($p < 0,0001$) nos pacientes infectados ($102,1 \pm 69,49$), quando comparados ao grupo controle ($325,1 \pm 99,91$), bem como nos pacientes em estágio avançado da fibrose ($50,99 \pm 30,32$) quando comparados aos de estágio moderado ($151,8 \pm 60,12$).

O oposto das plaquetas ocorre com as transaminases (AST e ALT, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase respectivamente), que indicam danos hepáticos e estão significativamente ($p < 0,0001$) aumentadas no grupo HDV⁺ em relação ao controle e no grupo fibrose $>F2$ em relação ao grupo fibrose $\leq F2$.

Tabela 05 - Aspectos clínicos da população estudada.

Variáveis	Controle (n= 137) [M ± DP]	HDV ⁺ (n= 77) [M ± DP]	p valor	Score FIB-4 HDV ⁺		p valor
				≤F2 (n=39)	>F2 (n=38)	
Plaquetas (%/mm³)	325,1 ± 99,91	102,1 ± 69,49	< 0,0001	151,8 ± 60,12	50,99 ± 30,32	< 0,0001
AST (IU/L)	24,1 ± 23,81	54,16 ± 34,63	< 0,0001	32,87 ± 16,4	76 ± 34,92	< 0,0001
ALT (IU/L)	25,2 ± 22,85	47,68 ± 31,79	< 0,0001	36,36 ± 27,94	59,29 ± 31,64	< 0,0001

N - número de indivíduos; M – média; DP – desvio padrão; HDV⁺ - vírus da hepatite Delta positivo; AST - aspartato aminotransferase; ALT - alanina aminotransferase; FIB-4 - *Fibrosis-4*.

5.3 Frequência dos polimorfismos

Para esta análise foi utilizado o teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* nos indivíduos controle e infectados pelo vírus da hepatite Delta, com o intuito de examinar seus desvios entre as proporções de alelos e genótipos para cada polimorfismo de nucleotídeo único.

Todos os polimorfismos estavam no equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, com exceção do *TLR9* -1486 C/T, em que houve um pequeno desvio, tanto nos pacientes com HDV⁺ ($p = 0,0477$), quanto no grupo controle ($p = 0,02$).

A frequência genotípica de *TLR4* A299G encontrada nos pacientes com hepatite Delta mostrou que 96,1% são homozigotos com genótipo A/A e 3,9% são heterozigotos com genótipo A/G. No grupo controle são 95,6% homozigotos com genótipo A/A e 4,4% heterozigotos com genótipo A/G. Para este marcador, não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados, bem como não foi encontrado o genótipo homozigoto G/G.

A análise de *TLR4* T399I, mostrou que a frequência do genótipo C/C foi de 97,4% no grupo HDV⁺ e de 96,4% no grupo controle, enquanto o genótipo heterozigoto C/T apresentou 2,6% no grupo HDV⁺ e 3,6% no controle.

Assim como em *TLR4* A299G, no marcador *TLR4* T399I não há diferença estatística significativa das frequências genotípicas e alélicas entre os grupos analisados, como também não está presente nesta população o genótipo homozigoto variante; no caso do *TLR4* T399I, T/T. Ambos marcadores do receptor *TLR4* possuem maior frequência: do genótipo homozigoto selvagem no grupo HDV⁺ em relação ao grupo controle e do genótipo heterozigoto no grupo controle em relação ao grupo HDV⁺.

Em *TLR9* -1237 T/C, a frequência do genótipo homozigoto T/T foi maior no grupo de pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta (72,7%), ao serem comparados ao grupo controle (62,8%), assim como o genótipo homozigoto CC (com 5,2% no grupo HDV⁺ e 1,4% no grupo controle). Porém, quanto ao genótipo T/C, o grupo controle obteve frequência genotípica superior (35,8%) ao grupo de pacientes com hepatite Delta (22,1%). Assim como nos marcadores anteriormente analisados, essas diferenças observadas no *TLR9* -1237 T/C não foram estatisticamente significativas.

Para *TLR9* -1486 C/T, as frequências genótípicas maiores no grupo HDV⁺ em relação ao controle foram do homozigoto C/C (19,5% e 9,5%, respectivamente) e do homozigoto T/T (41,1% e 34,3%, consecutivamente), com significância estatística somente na relação do genótipo C/C ($p= 0,0375$). Já o genótipo C/T foi significativamente maior ($p= 0,0068$) no grupo controle (56,2%) que no grupo de pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta (36,4%).

Quando as frequências alélicas e genótípicas de cada marcador foram observadas de acordo com o estadiamento da fibrose, somente o marcador *TLR9* -1237 T/C obteve significância estatística ($p= 0,0384$), com maior frequência do genótipo C/C no grupo de fibrose $\leq F2$ (10,2%) quando comparado à ausência desse genótipo no grupo de fibrose avançada ($>F2$).

Dos 11 pacientes deste estudo que vieram a falecer: 10 possuíam genótipo A/A e 1 possuía genótipo A/G para o polimorfismo *TLR4* A299G; todos possuíam o genótipo C/C para *TLR4* T399I; 10 possuíam genótipo T/T e 1 possuía genótipo C/C para *TLR9* -1237 T/C; e para *TLR9* -1486 C/T, 5 possuíam genótipo T/T, 2 o genótipo C/C e 4 o genótipo C/T.

O número amostral pode ter sido uma limitação e ter tido influência nos resultados encontrados.

Todas as frequências dos polimorfismos estudados estão resumidos na **tabela 06**.

Tabela 06 - Frequência dos polimorfismos estudados entre os grupos controle e pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta.

Genótipos e alelos	Controle (n=137)	HDV ⁺ (n=77)	OR (CI 95%)	p valor	HDV ⁺ ≤F2 (n=39)	HDV ⁺ >F2 (n=38)	OR (CI 95%)	p valor			
TLR4 A299G (rs4986790)											
A/A	131 (95,6%)	74 (96,1%)	0,885 (0,215-3,643)	0,865	37 (94,9%)	37 (97,4%)	0,5 (0,043-5,756)	0,571	AA vs. AG		
A/G	6 (4,4%)	3 (3,9%)			2 (5,1%)	1 (2,6%)					
G/G	-	-			-	-					
A	268 (97,8%)	151 (98%)	0,887 (0,219-3,599)	0,867	76 (97,4%)	75 (98,7%)	0,507 (0,045-5,707)	0,575	A vs. G		
G	6 (2,2%)	3 (2%)			2 (2,6%)	1 (1,3%)					
TLR4 T399I (rs4986791)											
C/C	132 (96,4%)	75 (97,4%)	0,704 (0,133-3,718)	0,677	38 (97,4%)	37 (97,4%)	1,027 (0,062-17,034)	0,985	CC vs. CT		
C/T	5 (3,6%)	2 (2,6%)			1 (2,6%)	1 (2,6%)					
T/T	-	-			-	-					
C	269 (98,2%)	152 (98,7%)	0,708 (0,136-3,693)	0,68	77 (98,7%)	75 (98,7%)	1,027 (0,063-16,715)	0,985	C vs. T		
T	5 (1,8%)	2 (1,3%)			1 (1,3%)	1 (1,3%)					
TLR9 -1237 T/C (rs5743836)											
T/T	86 (62,8%)	56 (72,7%)	0,632 (0,344-1,163)	0,139	26 (66,7%)	30 (78,9%)	0,533 (0,191-1,487)	0,226	TT vs. CT+CC		
T/C	49 (35,8%)	17 (22,1%)			9 (23,1%)	8 (21,1%)			0,77 (0,26-2,286)	0,637	TT vs. CT
C/C	2 (1,4%)	4 (5,2%)			4 (10,2%)	-					
T	221 (80,7%)	129 (83,8%)	0,808 (0,479-1,363)	0,423	61 (78,2%)	68 (89,5%)	0,422 (0,170-1,047)	0,580	T vs. C		
C	53 (19,3%)	25 (16,2%)			17 (21,8%)	8 (10,5%)					
TLR9 -1486 C/T (rs187084)											
C/C	13 (9,5%)	15 (19,5%)	0,433 (0,194-0,967)	0,0375	8 (21%)	7 (18,4%)	1,143 (0,369-3,538)	0,816	CC vs. CT+TT		
C/T	77 (56,2%)	28 (36,4%)			13 (33%)	15 (39,5%)			1,319 (0,375-4,636)	0,666	CC vs. CT
T/T	47 (34,3%)	34 (44,1%)			18 (46%)	16 (42,1%)					
C	103 (37,6%)	58 (37,7%)	0,997 (0,663-1,498)	0,988	29 (37,2%)	29 (38,2%)	0,959 (0,5-1,841)	0,9	C vs. T		
T	171 (62,4%)	96 (62,3%)			49 (62,8%)	47 (61,8%)					

5.4 Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas entre os grupos HDV⁺ e controle

As citocinas de perfil Th1 (IL-2, IL-6, TNF e IFN- γ), Th2 (IL-4) e regulatória (IL-10) dos grupos controle e HDV⁺ foram dosadas por meio da técnica de Citometria de Fluxo CBA (*Cytometric Bead Array*) e representadas pela média de intensidade de fluorescência (MIF).

Conforme mostrado na **figura 13**, o grupo de pacientes com hepatite Delta possui níveis séricos das citocinas de perfil Th1 IL-2 (**A**) e IL-6 (**C**), de perfil Th2 IL-4 (**B**) e regulatória IL-10 (**D**) superiores ao grupo controle, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p = 0,0048$, respectivamente). Quanto às citocinas de perfil Th1 TNF (**E**) e IFN- γ (**F**), os indivíduos do grupo controle tiveram níveis séricos maiores que o grupo HDV⁺ ($p < 0,0001$ e $p = 0,0529$, consecutivamente), porém essa diferença é estatisticamente significativa apenas para o TNF (**E**).

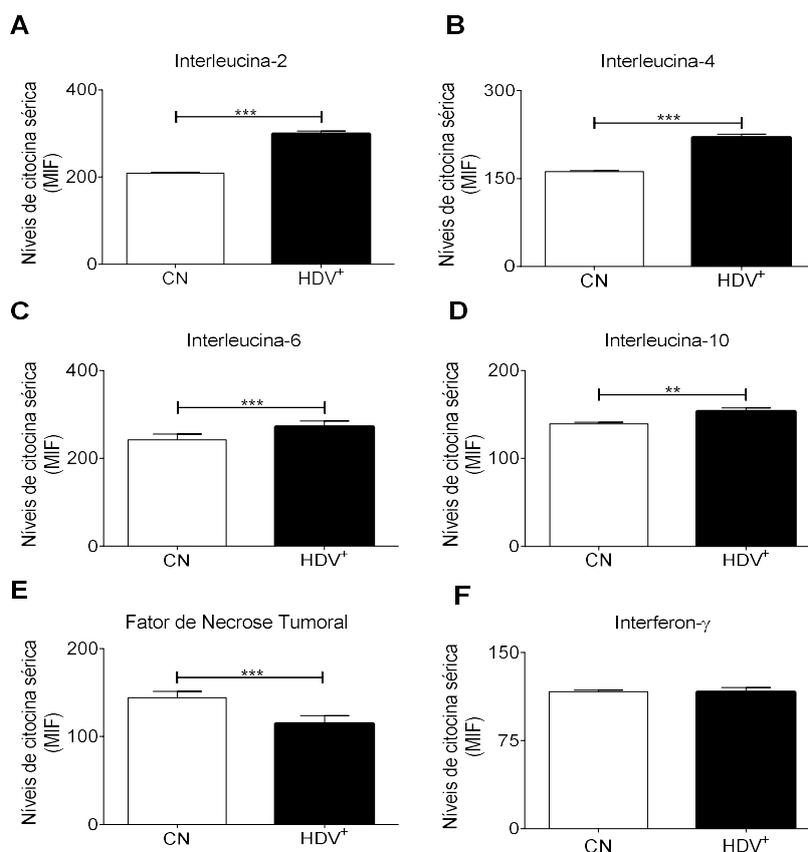


Figura 13 - Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas IL-2 (**A**), IL-4 (**B**), IL-6 (**C**), IL-10 (**D**), TNF (**E**) e IFN- γ (**F**) entre os grupos controle e pacientes infectados com hepatite Delta. Os resultados estão expressos através da média e desvio padrão. As diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$; representadas por asterisco (*).

5.5 Análise de citocinas séricas do grupo HDV⁺ de acordo com os genótipos para cada polimorfismo

Como observado anteriormente na frequência dos polimorfismos, não há indivíduos neste estudo com genótipo homocigoto variante para os SNPs *TLR4* A299G (G/G) e *TLR4* T399I (T/T).

Relacionando os níveis séricos das citocinas de perfil Th1 (IL-2, IL-6, TNF e IFN- γ), Th2 (IL-4) e regulatória (IL-10) com os genótipos dos polimorfismos *TLR4* A299G, *TLR4* T399I, *TLR9* -1237 T/C e *TLR9* -1486 C/T do grupo HDV⁺ (**figura 14**), as únicas diferenças estatísticas significativas foram encontradas nos polimorfismos do receptor *TLR9*: *TLR9* -1237 T/C (nas citocinas IL-10 e TNF) e *TLR9* -1486 C/T (nas citocinas IL-6 e TNF).

Em *TLR9* -1237 T/C, os níveis séricos da citocina IL-10 (**figura 14D**) encontram-se significativamente elevados: em indivíduos portadores do genótipo T/C em relação aos de genótipo C/C ($p= 0,0084$); e em indivíduos portadores do genótipo T/T em relação aos de genótipo C/C ($p= 0,0152$). No marcador *TLR9* -1486 C/T, a citocina IL-6 (**figura 14C**) apresenta níveis séricos maiores, de forma estatisticamente significativa, nos indivíduos com genótipo T/T quando comparados aos de genótipo C/C ($p= 0,0364$).

Somente para o TNF (**figura 14E**) foi observado diferença estatística para os dois marcadores acima citados, com maior média de intensidade de fluorescência: nos indivíduos de genótipo T/C em relação aos de genótipo T/T ($p= 0,0219$) para *TLR9* -1237 T/C; e nos indivíduos de genótipos T/T e C/T quando comparados aos de genótipo C/C ($p= 0,0073$, $p= 0,0061$, respectivamente) para *TLR9* -1486 C/T.

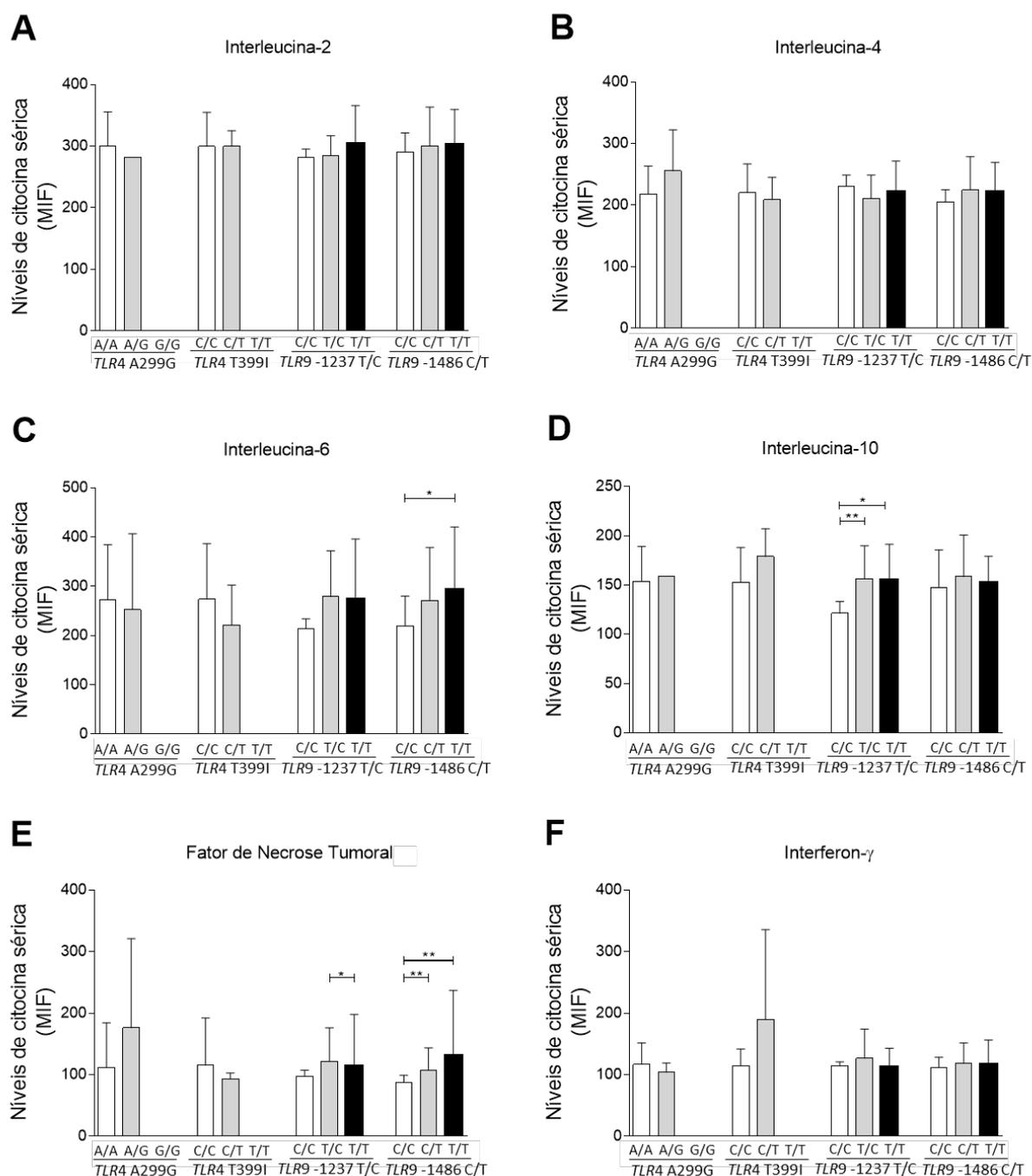


Figura 14 - Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas em pacientes do grupo HDV⁺ de acordo com os genótipos dos polimorfismos *TLR4* A299G, *TLR4* T399I, *TLR9* -1237 T/C e *TLR9* -1486 C/T. São representadas as citocinas IL-2 (A), IL-6 (C), TNF (E) e IFN- γ (F) do perfil Th1; IL-4 (B) do perfil Th2; e IL-10 (D) regulatória. Os resultados estão expressos através da média e desvio padrão e as diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$, representadas por asterisco (*).

5.6 Análise de citocinas séricas em pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta de acordo com o grau de fibrose e genótipos para cada polimorfismo

Assim como descrito anteriormente no estudo dos marcadores hepáticos, os pacientes HDV⁺ foram subdivididos quanto ao grau de acometimento hepático em dois subgrupos: fibrose moderada ($\leq F2$, n= 39, **figura 15**) e fibrose avançada ($>F2$, n= 38, **figura 16**).

No que diz respeito à fibrose moderada (**figura 15**), apenas as citocinas IL-6 (**figura 15C**) e IL-10 (**figura 15D**) mostraram diferenças estatísticas significativas. A IL-6 (**figura 15C**) apresentou níveis significativamente elevados em pacientes com genótipo A/A em relação aos de genótipo A/G para o polimorfismo *TLR4* A299G ($p= 0,0242$). Enquanto para IL-10 (**figura 15D**) observou-se níveis séricos significativamente maiores em pacientes de genótipo T/C, seguido de pacientes com genótipo T/T ao serem comparados aos de genótipo C/C para o polimorfismo *TLR9* - 1237 T/C ($p= 0,0098$ e $p= 0,0335$, respectivamente).

Quanto aos pacientes que apresentaram fibrose avançada (**figura 16**), houve significância estatística apenas para o TNF (**figura 16E**), para o marcador *TLR9* - 1486 C/T, com níveis séricos significativamente maiores em indivíduos portadores do genótipo C/T, quando comparados aos de genótipo C/C ($p= 0,0067$).

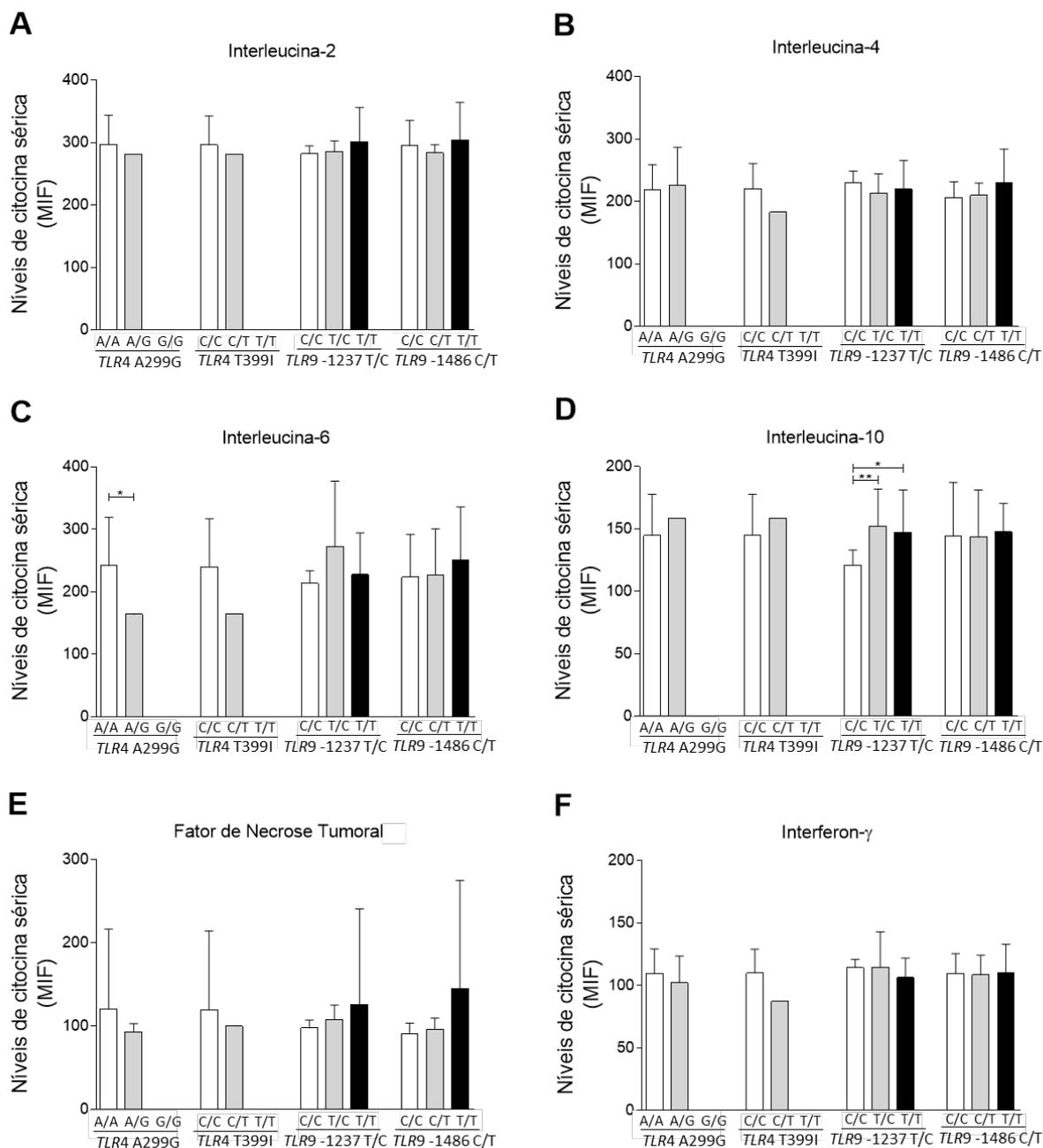
FIB-4 \leq F2

Figura 15 - Análise de citocinas séricas em pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta com fibrose moderada (\leq F2) de acordo com os genótipos para cada polimorfismo. As citocinas analisadas são IL-2 (A), IL-6 (C), TNF (E) e IFN- γ (F) de perfil Th1, IL-4 (B) de perfil Th2 e IL-10 (D) regulatória. São representados os polimorfismos *TLR4* A299G, *TLR4* T399I, *TLR9* -1237 T/C e *TLR9* -1486 C/T. Os resultados estão expressos através da média e desvio padrão e as diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$, representadas por asterisco (*).

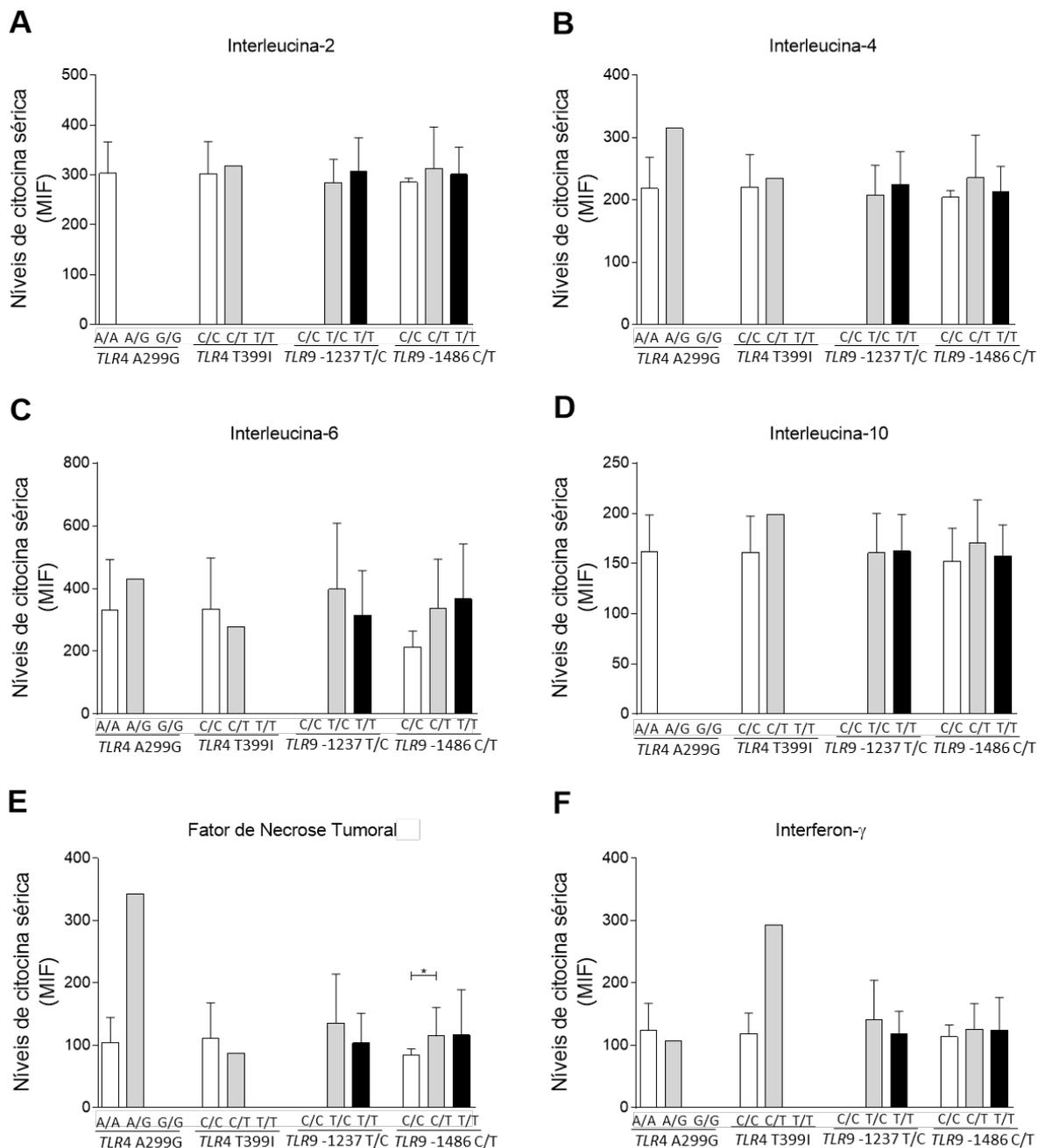
FIB-4 >F2

Figura 16 - Análise de citocinas séricas em pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta com fibrose avançada (>F2) de acordo com os genótipos para cada polimorfismo. As citocinas analisadas são IL-2 (A), IL-6 (C), TNF (E) e IFN-γ (F) de perfil Th1, IL-4 (B) de perfil Th2 e IL-10 (D) regulatória. São representados os polimorfismos *TLR4* A299G, *TLR4* T399I, *TLR9* -1237 T/C e *TLR9* -1486 C/T. Os resultados estão expressos através da média e desvio padrão e as diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$, representadas por asterisco (*).

5.7 Análise de citocinas séricas em pacientes com hepatite Delta vivos e que tiveram óbito confirmado

Os pacientes com hepatite Delta vivos (**figura 17A**) e os que tiveram óbito confirmado (**figura 17B**) foram segregados de acordo com o grau de fibrose (também através da aplicação do índice *FIB-4* e classificação METAVIR) para uma análise mais detalhada.

Vale ressaltar que 54,5% (n= 6) dos pacientes que vieram a falecer possuíam fibrose em seu estágio avançado (>F2).

As únicas diferenças estatísticas significativas foram encontradas para a IL-6. Os níveis séricos desta citocina foram significativamente maiores no grupo de fibrose avançada (>F2) quando comparado ao grupo de fibrose moderada (\leq F2), tanto em pacientes vivos quanto em pacientes que foram a óbito ($p= 0,0142$ e $p= 0,0317$, respectivamente).

O grupo de pacientes vivos com fibrose avançada (n= 32) obteve maiores níveis séricos, porém sem significância estatística, das citocinas IL-2 ($p= 0,3317$), IL-4 ($p= 0,7353$), IL-10 ($p= 0,0980$) e IFN- γ ($p= 0,0531$), comparados ao grupo de pacientes vivos com fibrose moderada (n= 34), em que apenas a citocina TNF ($p= 0,7661$), obteve níveis mais elevados que o grupo de fibrose avançada.

As citocinas IL-4, IL-10 e TNF apresentaram níveis séricos maiores, também sem significância estatística, no grupo de pacientes que foram a óbito com fibrose avançada quando comparados ao grupo de pacientes que foram a óbito com fibrose moderada ($p > 0,9999$; $p= 0,5159$; e $p= 0,7302$, consecutivamente). Ainda sobre os pacientes que vieram a falecer, somente as citocinas IL-2 e IFN- γ apresentaram maiores níveis no grupo de fibrose moderada em relação ao de fibrose avançada ($p= 0,7381$ e $p= 0,5794$, respectivamente).

Analisando os indivíduos com fibrose avançada, os pacientes que foram a óbito apresentam média de intensidade de fluorescência das citocinas IL-4 ($228,8 \pm 34,32$), IL-6 ($383,24 \pm 82,94$) e TNF ($143 \pm 80,08$) maior que no grupo de pacientes vivos, que apresentam média de intensidade de fluorescência maior das citocinas IL-2 ($305,88 \pm 35,67$), IL-10 ($163,91 \pm 30,03$) e IFN- γ ($125,92 \pm 29,61$).

Em relação aos indivíduos com fibrose moderada, as citocinas com maior média de intensidade de fluorescência nos pacientes que foram a óbito são IL-4 ($219,07 \pm 13,49$) e IFN- γ ($111,25 \pm 7,2$), em comparação aos pacientes vivos, que

obtiveram maiores médias das citocinas IL-2 ($297,9 \pm 29,43$), IL-6 ($242,36 \pm 61,37$), IL-10 ($148,27 \pm 22,85$) e TNF ($123,4 \pm 48,12$).

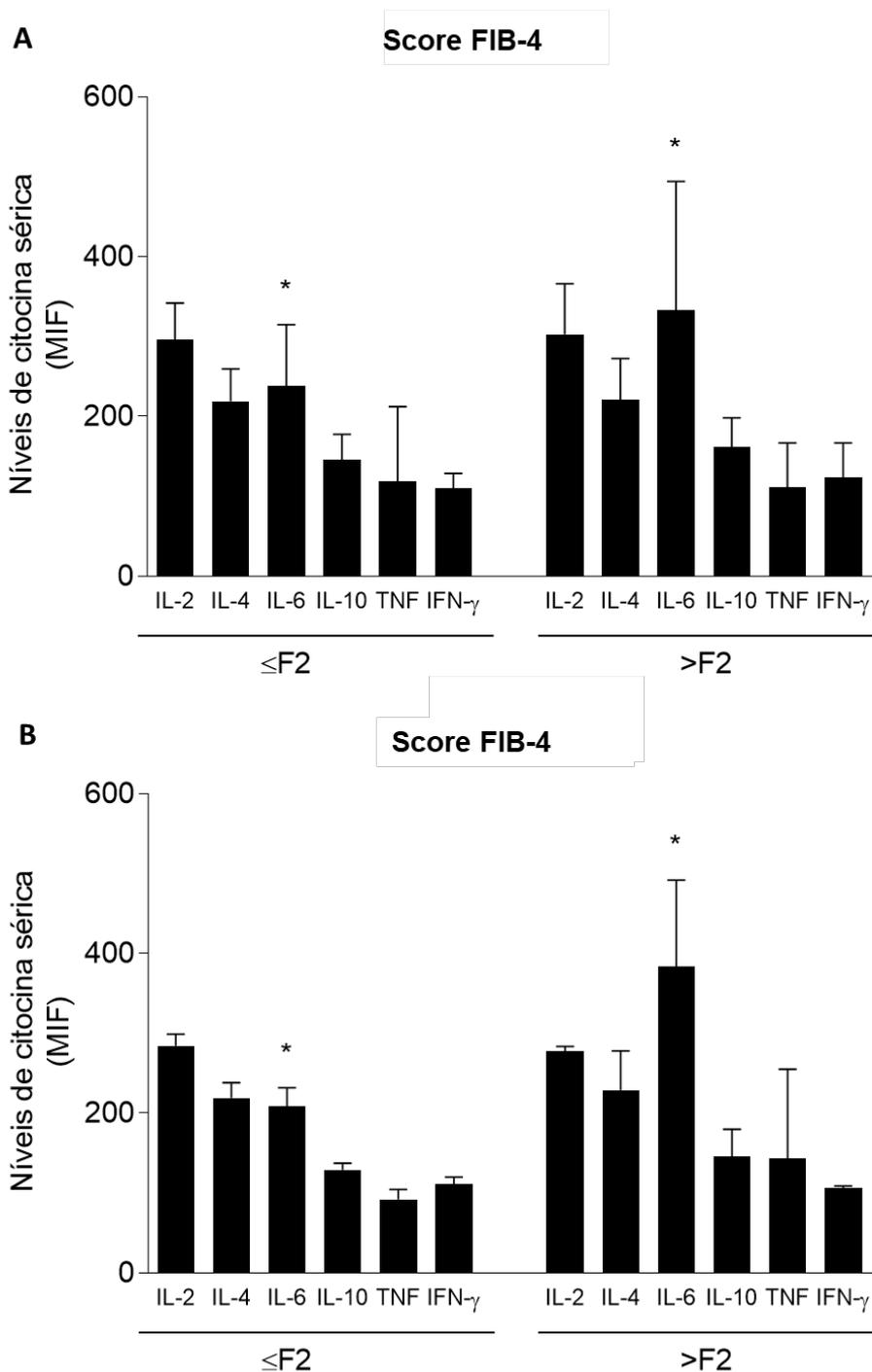


Figura 17 - Média de intensidade de fluorescência (MIF) das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ em pacientes com hepatite Delta vivos (**A**) e que tiveram óbito confirmado (**B**). Os pacientes com hepatite Delta vivos e em óbito foram subdivididos em fibrose moderada ($\leq F2$) e fibrose avançada ($>F2$) de acordo com índice *FIB-4* e classificação METAVIR. Os resultados estão expressos através da média e desvio padrão. As diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$; representadas por asterisco (*).

5.8 Expressão de *TLR4* e *TLR9* em monócitos de pacientes com hepatite Delta

A expressão do receptor *TLR4* em monócitos de pacientes com hepatite Delta é mostrada na **figura 18A**. Observa-se uma maior expressão do *TLR4* em monócitos de pacientes portadores do genótipo A/A quando comparados aos de genótipo heterozigoto A/G para o polimorfismo *TLR4* A299G, porém sem significância estatística ($p= 0,798$). Já no marcador *TLR4* T399I ocorre o inverso, com maior expressão de *TLR4* em indivíduos do grupo HDV⁺ com genótipo heterozigoto em relação aos de genótipo homozigoto selvagem ($p= 0,276$), também sem significância estatística.

Ao relacionar os dois polimorfismos do *TLR4* acima citados, este receptor foi mais expresso em monócitos de indivíduos HDV⁺ com genótipo C/T de *TLR4* T399I ($17,5 \pm 2,1$), seguido dos genótipos A/A de *TLR4* A299G ($14,8 \pm 3,59$), C/C de *TLR4* T399I ($14,68 \pm 3,53$) e A/G de *TLR4* A299G ($13,73 \pm 2,28$). Nenhuma diferença de expressão do receptor *TLR4* em monócitos apresentada na **figura 18A** foi estatisticamente significativa.

A expressão de *TLR9* em monócitos dos indivíduos HDV⁺ (**figura 18B**) também não obteve nenhuma diferença estatística significativa.

Indivíduos com genótipo T/T obtiveram maior expressão de *TLR9* em monócitos em relação aos de genótipos T/C ($p= 0,427$) e C/C ($p= 0,225$) para o marcador *TLR9* -1237 T/C.

Em *TLR9* -1486 C/T, houve uma maior expressão do receptor *TLR9* em monócitos de indivíduos com genótipo heterozigoto em comparação aos de genótipos C/C ($p= 0,654$) e T/T ($p= 0,837$).

Analisando de forma conjunta esses dois polimorfismos de *TLR9*, temos uma maior expressão deste receptor em monócitos de pacientes HDV⁺ com genótipo C/T de *TLR9* -1486 C/T ($41,87 \pm 7,87$), seguido dos genótipos T/T de *TLR9* -1237 T/C ($41,35 \pm 6,42$), C/C de *TLR9* -1486 C/T ($40,16 \pm 4,57$), T/T de *TLR9* -1486 C/T ($39,08 \pm 4,99$), T/C de *TLR9* -1237 T/C ($38,31 \pm 4,17$) e C/C de *TLR9* -1237 T/C ($35,82 \pm 4,11$).

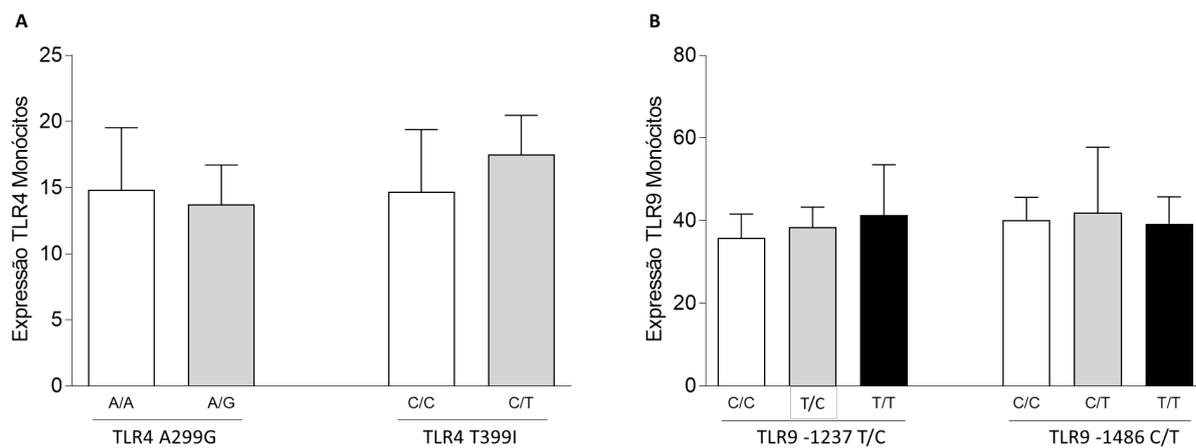


Figura 18 - Expressão de *TLR4* e *TLR9* em monócitos de pacientes com hepatite Delta de acordo com os genótipos para cada polimorfismo. A expressão de *TLR4* está representada em **A** e a expressão de *TLR9* em **B**. Os resultados estão expressos através da média e desvio padrão. As diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1 Aspectos demográficos e clínicos

Este estudo foi realizado na região amazônica brasileira e obteve faixa etária dos indivíduos infectados pela hepatite Delta (45 anos) superior a idade de prevalência da mesma no Brasil de acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde sobre as Hepatites Virais em 2019 (BRASIL, 2019), do qual 51% possuem idade entre 20 e 30 anos. Porém, há um consenso em relação à predominância do gênero masculino, que neste estudo foi de 53% e no Boletim Epidemiológico 57,7%.

A região do Juruá também mostrou ser a mais incidente para hepatite Delta da região amazônica ocidental brasileira em uma pesquisa entre os anos de 2003 e 2009, de Crispim et al. (2014); assim como relatou casos em moradores das regiões do Purus, Rio Negro-Solimões, Triângulo Jutai-Solimões-Juruá e do Estado do Acre.

A forma clínica crônica corresponde à maioria dos casos notificados de hepatites B e Delta (BRASIL, 2019) havendo, portanto, comprometimento hepático e destruição celular pela perpetuação do quadro inflamatório na tentativa da eliminação viral; podendo progredir para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (BRASIL, 2009; PIRES-NETO et al., 2015).

Os marcadores hepáticos dos pacientes com hepatite Delta avaliados neste estudo indicam dano hepático, sendo evidenciado no grupo de fibrose avançada (>F2). Assim como foi observado uma trombocitopenia nos indivíduos HDV⁺ com agravamento no grupo >F2, que, segundo Aster (1966) e Kawasaki et al. (1999), pode ocorrer devido ao acúmulo de plaquetas no baço com esplenomegalia, por sequestro, nos indivíduos com evolução de danos hepáticos.

A taxa de mortalidade dos pacientes deste estudo foi de 14,3%, enquanto no Brasil, os últimos números referem-se aos anos entre 2000 e 2017, com 781 óbitos relacionados à hepatite Delta. É importante ressaltar que 74,9% dos casos de hepatite Delta no país ocorrem na região Norte (BRASIL, 2019).

6.2 Análise dos polimorfismos de nucleotídeo único *TLR4* A299G, *TLR4* T399I, *TLR9* -1237 T/C e *TLR9* -1486 C/T e suas frequências

As evidências sugerem que a resposta imune inata, em especial a via de sinalização dos receptores *Toll-like* (*TLRs*), apresenta-se como um dos mecanismos de defesa essenciais contra vários agentes patogênicos, ativando as cascatas de sinalização e produção de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG & LU, 2014).

Uma deficiência funcional pode estar relacionada às variantes genéticas no receptor, causadas por polimorfismos, e pode estar associada à progressão para a forma crônica da infecção e conseqüentemente ao agravamento clínico do paciente (PIRES-NETO et al., 2015).

Em indivíduos com hepatite crônica, o DNA de células destruídas pode ser reconhecido pelo receptor celular *TLR9* de células estreladas hepáticas e de Kupffer, que reconhece DNA de fita simples ou dupla e CpG-DNA, e ocasionar um aumento do processo inflamatório (ABBAS et al., 2015; WATANABE et al., 2017).

Na hepatite crônica pode ocorrer também a translocação bacteriana, devido à alteração na permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, facilitação da migração de bactérias típicas da flora intestinal para o fígado (GARCIA-TSAO & WIEST, 2004). Tais bactérias podem ativar o receptor *TLR4* das células hepáticas, que reconhecem lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, exacerbando ainda mais o dano hepático (SEKI et al., 2007; ZHU et al., 2012).

Por meio de experimentos de transfecção de células, Arbour et al. (2000) observaram que nas células com o SNP *TLR4* A299G houve interrupção da sinalização de LPS intercedida por *TLR4*, o que não ocorreu nas transfectadas com o SNP *TLR4* T399I, pois se apresentaram hiporresponsivas ao LPS.

Outros estudos também citam que o SNP *TLR4* A299G pode interferir na resposta celular pela alteração na relação do *TLR4* com o LPS (RALLABHANDI et al., 2006; FERWERDA et al., 2008).

Pandey et al. (2019) associaram o SNP *TLR4* A299G à infecção pelo HPV (Papilomavírus Humano) 16/18. Já WU e colaboradores (2012), realizaram um estudo de coorte em pacientes com hepatite B crônica entre os anos de 1984 e 2010, com acompanhamento regularmente a cada 6 meses no Departamento de Pediatria e Medicina do Hospital Universitário de Taiwan e relacionaram a presença do alelo G no polimorfismo do gene de *TLR4* A299G à soroconversão e “*clearance*” espontânea do HBsAg por mais de 6 meses.

As frequências genotípicas e alélicas do *TLR4* A299G deste estudo não diferiram entre os pacientes infectados pela hepatite Delta e o grupo controle. A grande maioria dos pacientes HDV⁺ não apresentou o alelo variante G do *TLR4* A299G, uma minoria possuía o genótipo heterozigoto A/G e não houve o genótipo homozigoto variante, o que, de acordo com os estudos de Arbour et al. (2000), Rallabhandi et al. (2006) e Ferwerda et al., (2008), indica a não interrupção da sinalização de LPS intercedida por *TLR4* na maioria dos pacientes HDV⁺ que, se ativado, origina um processo inflamatório.

Para este marcador, a frequência de alelos dos grupos controle e HDV⁺ se assemelham à população americana descrita no projeto “*Genomes* 1000 - fase 3” e às subpopulações americanas de ancestrais mexicanos (em Los Angeles, Califórnia; A= 97% e G= 3%) e de peruanos (em Lima, Peru; A= 99% G= 1%) (ENSEMBL, 2020a).

Assim como o *TLR4* A299G, o marcador *TLR4* T399I apresentou diferença sutil das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos controle e HDV⁺. Também não ocorreu o genótipo homozigoto variante, neste caso T/T. No grupo HDV⁺, houve a predominância do genótipo selvagem, enquanto apenas 2,6% apresentaram o genótipo em heterozigose (C/T).

A frequência alélica para o marcador *TLR4* T399I da população estudada é semelhante à frequência alélica da população africana, segundo o projeto “*Genomes* 1000 - fase 3”; mais precisamente, o grupo controle assemelha-se à subpopulação africana de Gâmbia (na divisão Ocidental, C= 98% e T= 2%) e o grupo HDV⁺ às subpopulações africanas de Esan (na Nigéria) e de Mende (em Serra Leoa), ambas com 99% do alelo C e 1% do alelo T (ENSEMBL, 2020b).

Em uma meta-análise de associação entre polimorfismos e risco de câncer, Ding et al. (2017) associaram o *TLR4* T399I à diminuição significativa do risco de câncer entre caucasianos e asiáticos após avaliação de 55 artigos (totalizando 28244 controles e 20107 casos) e, conforme citado anteriormente, nos experimentos de Arbour et al. (2000) o *TLR4* T399I apresentou hiporresponsividade à sinalização de LPS intercedida por *TLR4*.

Costa et al., 2017, elaboraram uma pesquisa retrospectiva na Amazônia brasileira de caso controle sobre a malária por *Plasmodium vivax*, em área de intensa transmissão, e relataram não haver associação entre o tipo de malária

estudada e os polimorfismos do gene *TLR4* aqui estudados: o *TLR4* A299G e o *TLR4* T399I.

O SNP *TLR9* -1237 T/C obteve distribuição semelhante de frequências alélicas e genóticas entre os grupos controle e pacientes com hepatite Delta, tendo um predomínio do genótipo homozigoto selvagem, seguido pelo genótipo heterozigoto e uma minoria com o genótipo homozigoto variante. As diferenças destas frequências entre os grupos estudados para este marcador não foram tão sutis quanto as encontradas nos SNPs do *TLR4*, porém não foram estatisticamente significativas.

Quando as frequências alélicas e genóticas de cada marcador foram observadas de acordo com o estadiamento da fibrose, somente o marcador *TLR9* -1237 T/C obteve significância estatística, com maior frequência do genótipo homozigoto variante no grupo de fibrose moderada quando comparado a esse genótipo no grupo de fibrose avançada, que foi ausente.

Segundo estudo realizado por Ng e colaboradores (2010), o SNP *TLR9* -1237 T/C pode estar relacionado a um estado inflamatório mais intenso pelo fato de que, na presença do alelo C, há uma maior afinidade de ligação com NF-κB, além de um suposto sítio adicional de ligação a NF-κB; o que causaria maior ativação deste fator de transcrição e aumento da ligação deste com a região promotora do *TLR9*.

Já para Carvalho et al., 2011, na presença do alelo C de *TLR9* -1237 T/C, ocorre a criação de vários sítios regulatórios do promotor de *TLR9*, inclusive a criação de um sítio de resposta à IL-6. E, em experimentos, mostrou a IL-6 regulando de forma positiva a expressão de *TLR9* em células mononucleares portadoras do genótipo T/C de *TLR9* -1237 T/C; gerando uma resposta aumentada a CpG-DNA, como aumento da produção de IL-6 e da proliferação de células B.

O alelo C de *TLR9* -1237 T/C foi relacionado à várias doenças inflamatórias, como: significativamente mais frequente em pacientes alemães com doença de Crohn que em indivíduos controles (TOROK et al., 2004); possível fator de risco para asma (LAZARUS et al., 2003); e também significou exacerbação do acometimento gástrico em portadores de *Helicobacter pylori*, com atrofia gástrica e hipocloridria, que são estados pré-malignos do câncer gástrico nestes indivíduos (NG et al., 2010).

Já o genótipo T/C de *TLR9* -1237 T/C foi associado à soroconversão espontânea precoce de HBeAg na hepatite B crônica (WU et al., 2012).

O *TLR9* -1486 C/T, foi o único SNP desta pesquisa a destoar nas distribuições genóticas e alélicas entre os grupos HDV⁺ e controle, inclusive, com significância estatística. No grupo controle, há maior frequência do genótipo C/T, seguido do T/T e C/C. Quanto ao grupo HDV⁺, há maior ocorrência do genótipo T/T, seguido dos genótipos C/T e do C/C. A frequência do genótipo C/C foi significativamente maior no grupo HDV⁺ que no grupo controle. Já a frequência do genótipo C/T foi significativamente maior no grupo controle que no grupo de pacientes infectados pelo vírus da hepatite Delta.

Apesar de anteriormente Ng e colaboradores (2010) associarem o *TLR9* -1237 T/C à lesões pré-malignas do câncer gástrico em indivíduos com *Helicobacter pylori*, Zhang et al. (2013) analisaram os SNPs *TLR9* -1486 C/T e *TLR9* -1237 T/C quanto ao risco de câncer, através de uma meta-análise contendo 11 estudos de caso controle (7506 controles e 6585 casos de câncer no total) e não obtiveram significância estatística.

Outro estudo relacionando os dois SNPs foi feito por Costa et al. (2017), na Amazônia brasileira, em uma pesquisa retrospectiva de caso controle sobre a malária por *Plasmodium vivax*, em área de intensa transmissão no Estado do Amazonas, e relacionaram o polimorfismo *TLR9* -1237 T/C à alta carga parasitária, bem como o *TLR9* -1486 C/T à predisposição à doença; o que corroborou com a pesquisa de Alipoor et al. (2016), em que foi realizada uma análise de bioinformática (*in-silico*) sobre a repercussão dos SNPs em genes da via dos receptores do tipo *Toll* na busca de facilitar a seleção de variantes gênicas para estudos futuros e torná-los menos dispendiosos. Tal estudo apresentou uma lista contendo 19 SNPs com potencial deletério e, dentre eles, o *TLR9* -1486 C/T apresentou provável modificação de predição a doenças, devido possível interferência na ligação dos fatores transcripcionais.

Ao estudarem a associação do SNP *TLR9* -1486 C/T com a depuração espontânea na hepatite C crônica na China Central, Wei et al. (2014) não encontraram associação estatisticamente significativa, indicando não ser crucial na infecção crônica em questão.

Além do SNP *TLR4* A299G, Pandey et al. (2019) também associaram o *TLR9* -1486 à infecção pelo HPV. Martínez-Campos et al. (2017) fez essa mesma associação para *TLR9* -1486, porém acrescentou para o genótipo T/T deste

marcador associação significativa à lesão cervical intraepitelial escamosa e ao desenvolvimento de câncer do colo uterino na população feminina mexicana.

6.3 Análise de citocinas séricas na população de estudo

Os pacientes com hepatite Delta deste estudo possuem níveis séricos das citocinas IL-2, IL-6 (ambas de perfil Th1), IL-4 (perfil Th2) e IL-10 (regulatória) superiores ao grupo controle, de forma estatisticamente significativa. Apenas as citocinas de perfil Th1 TNF e IFN- γ obtiveram níveis séricos mais expressivos no grupo controle que no grupo HDV⁺, porém com diferença estatística significativa apenas em TNF.

Um estudo recente realizado com indivíduos infectados somente pelo vírus da hepatite B, infectados pelo vírus da hepatite Delta e indivíduos que não possuíam hepatites (controle) obteve concentrações significativamente maiores de TNF- α em indivíduos com hepatite Delta que em indivíduos controles. Porém, também obteve maiores concentrações de IFN- γ no grupo controle que no grupo HDV⁺ (TOWNSEND et al., 2019).

O TNF também é denominado como TNF- α a fim de diferenciá-lo do TNF- β (linfotóxina), citocina homóloga que também tem efeitos pró-inflamatórios (ativam neutrófilos e endotélio) e com os mesmos receptores (FNTR1 e FNTR2) de TNF, sintetizada por células T (LIN et al., 2000; ZHANG & AN, 2007; ABBAS et al., 2015)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que estimula a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6; secretada principalmente por linfócitos T, monócitos e macrófagos (HAJEER & HUTCHINSON, 2000; LIN et al., 2000; ZHANG & AN, 2007). TNF- α pode atrair monócitos e neutrófilos para os locais de infecção, estimular moléculas de adesão no endotélio vascular, estimular a produção de quimiocinas por macrófagos e células endoteliais que recrutam leucócitos, bem como influenciar a apoptose celular (BARBARA et al., 1996; MAKHATADZE, 1998). Sua ação é benéfica em infecções, porém, por tempo prolongado pode provocar danos (TRACEY et al., 1986).

Ainda segundo Townsend et al. (2019), o predomínio do perfil Th1 pode ser decisivo para que se atinja estágios mais avançados da hepatite Delta de forma relativamente mais acelerada.

Por outro lado, a ativação clássica dos macrófagos pode ser suprimida pelas citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-13), induzindo a ativação alternativa de macrófagos, que passam a produzir IL-10 e TGF- β , gerando efeitos anti-inflamatórios, de reparação tecidual e, conseqüentemente, inibindo a função e o desenvolvimento do perfil de resposta Th1. Com isso, as citocinas de perfil Th2 também acabam interferindo na proteção contra infecções virais que é mediada pelo perfil de resposta Th1. Classicamente, os macrófagos são ativados por IFN- γ e ligantes de *TLR* microbianos, liberando substâncias com ação microbicida e inflamatória, como: espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, enzimas lisossomais, IL-1, IL12, IL-23 e quimiocinas (ABBAS et al., 2015).

Contudo, a ativação atípica mantida de miofibroblastos pelo TGF- β pode desencadear processos patológicos como a fibrose (TSOU et al., 2014).

Em uma pesquisa sobre padrões de dominância viral em pacientes HDV⁺ revelou-se a dominância do vírus da hepatite Delta em 75% em relação ao HBV, que foi de 7%, e 17% não obtiveram dominância. Tal pesquisa sugeriu uma ativação de IFN, porém em exaustão, em pacientes que apresentaram dominância do HDV (LUTTERKORT et al., 2018).

Para o marcador *TLR4* A299G, apenas quando o grupo HDV⁺ foi analisado quanto ao grau de fibrose que obteve-se diferença estatística, com maior nível sérico da citocina IL-6 nos indivíduos com fibrose moderada de genótipo A/A que nos indivíduos com fibrose moderada de genótipo A/G, corroborando com o estudo de Korppi et al. (2020), onde menores níveis de proteínas pró-inflamatórias, inclusive da IL-6, foram observados em indivíduos portadores do genótipo variante para este polimorfismo (A/G); sugerindo que realmente ocorra uma interrupção da sinalização de LPS intercedida por *TLR4* na presença de seu alelo variante, como encontrado por Arbour et al. (2000) em seus experimentos.

A IL-6 é uma citocina que estimula a síntese de proteínas de fase aguda (como a proteína C reativa), a maturação de macrófagos, células endoteliais, condrócitos e osteoclastos, assim como a maturação e ativação de células T e B (BRENNAN & MCLNNES, 2018); sendo uma citocina produzida em resposta a microrganismos e a outras citocinas como IL-1 e TNF- α (KISHIMOTO, 2005).

Não houve nenhuma relação estatística significativa entre as citocinas séricas estudadas e os genótipos encontrados no polimorfismo *TLR4* T399I.

Os indivíduos com hepatite Delta portadores do genótipo T/C de *TLR9* -1237 T/C obtiveram concentrações séricas de TNF significativamente superiores quando comparados aos de genótipo T/T do mesmo grupo nesta pesquisa, reforçando a ideia de estudos (LAZARUS et al., 2003; NG et al., 2010; CARVALHO et al., 2011) que relacionam o alelo variante C do *TLR9* -1237 T/C a um processo inflamatório mais intenso.

Em relação ao *TLR9* -1237 T/C, a IL-10 estaria regulando a inflamação nos pacientes com hepatite Delta e no grupo fibrose moderada (\leq F2), com níveis séricos superiores em portadores dos genótipos T/C e TT em relação aos de genótipo homozigoto variante CC, de forma estatisticamente significativa.

A IL-10 possui propriedades antifibróticas (ZHANG & WANG, 2006), capaz de suprimir a função de células NK, células T e, especialmente, macrófagos ativados no intuito de inibir as citocinas IL-1, TNF, IL-12, IL-6 e IL-8. A IL-10, também consegue inibir moléculas de MHC II e coestimuladores das células anteriormente citadas (MOORE et al., 2001; COUPER et al., 2008).

Na presença de grandes quantidades de IL-10 no fígado, pode ocorrer ainda a diferenciação de células TCD4⁺ naivas em células T reguladoras e supressão da maturação de células dendríticas (CRISPE et al., 2006).

Tal citocina pode ser usada como terapia para diminuição dos processos inflamatório e fibrótico na hepatite, mas seu uso prolongado pode contribuir para o aumento dos níveis das partículas virais (NELSON et al., 2003).

Da mesma forma que a IL-10 pode ser usada terapêuticamente para redução do dano hepático, o antagonista de TNF- α também seria viável para tal uso segundo pesquisa recente desenvolvida em um modelo de camundongo com infecção grave e aguda pelo HDV, em que o uso do antagonista de TNF- α promoveu uma redução significativa da lesão hepática causada pelo HDV (USAI et al., 2020).

Assim como no marcador *TLR9* -1237 T/C, a citocina TNF possui diferença estatística significativa para *TLR9* -1486 C/T em pacientes com hepatite Delta, porém, com maior média de intensidade de fluorescência nos portadores de genótipos T/T e C/T quando comparados aos de genótipo C/C (homozigoto selvagem).

Também houve significância estatística de TNF para este marcador quanto à fibrose avançada, com níveis séricos significativamente maiores em pacientes portadores do genótipo C/T quando comparados aos de genótipo C/C.

Outra citocina que apresenta significância estatística para *TLR9* -1486 C/T em pacientes com hepatite Delta é a IL-6, com níveis séricos maiores nos indivíduos com genótipo T/T quando comparados aos de genótipo C/C.

Os resultados das citocinas TNF e IL-6 em *TLR9* -1486 C/T conferem um perfil de resposta inflamatória Th1 mais expressivo ao alelo variante T em relação ao alelo selvagem C; se alinhando com a pesquisa de Martínez-Campos et al. (2017), que associou o genótipo T/T deste marcador à lesão cervical intraepitelial escamosa e ao desenvolvimento de câncer do colo uterino em mulheres mexicanas.

Também foi observado que a IL-6 possui maior concentração sérica no grupo de fibrose avançada (>F2) que no grupo de fibrose moderada (≤F2), com significância estatística, tanto nos pacientes com hepatite Delta vivos quanto nos que tiveram óbito confirmado, conferindo perfil Th1 mais expressivo nesses indivíduos.

6.4 Análise da expressão de *TLR4* e *TLR9* em monócitos de pacientes com hepatite Delta de acordo com os genótipos para cada polimorfismo

As análises de expressão dos receptores *TLR4* e *TLR9* em monócitos de pacientes HDV⁺ de acordo com os genótipos para cada polimorfismo não apresentaram diferenças estatísticas neste estudo.

Apesar de ocorrer uma alteração estrutural e sequencial de proteína no SNP *TLR4* A299G, que inicialmente não interfere em seus níveis de expressão (LANGE et al., 2011), nota-se em nossos resultados uma maior expressão de *TLR4* em monócitos de pacientes HDV⁺ que não possuem o alelo variante G em relação aos de genótipo heterozigoto A/G para *TLR4* A299G.

O *TLR4* A299G é um SNP que pode interferir na resposta celular interrompendo a sinalização de LPS mediada por *TLR4*, o que não foi observado em *TLR4* T399I (ARBOUR et al., 2000).

Na presença de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , bem como de LPS (Lipopolissacarídeo) e LAM (Lipoarabinomanana), observa-se um aumento da expressão de *TLR4* em monócitos e em leucócitos polimorfonucleares.

O efeito contrário é observado na presença da citocina regulatória IL-10, com a inibição de expressão do *TLR4* (MUZIO et al., 2000).

No marcador *TLR4* T399I ocorre o inverso de *TLR4* A299G, com maior expressão de *TLR4* em indivíduos do grupo HDV⁺ com genótipo heterozigoto quando comparados aos de genótipo homozigoto selvagem, sugerindo não acontecer a interrupção da sinalização de LPS mediada por *TLR4* na ocorrência do SNP *TLR4* T399I.

Segundo Carvalho e colaboradores (2011), na presença do alelo C de *TLR9* -1237 T/C ocorre uma maior expressão do *TLR9*, pela geração de um sítio de resposta a IL-6, descrita como reguladora positiva do *TLR9*, porém, foram os pacientes com genótipo homozigoto selvagem deste estudo que obtiveram maior expressão do receptor *TLR9* em monócitos em relação aos de genótipos heterozigoto e homozigoto variante para *TLR9* -1237 T/C.

Sabe-se que na hepatite B, conforme a cronicidade da doença avança, pode ocorrer uma tolerância imunológica ao HBeAg, podendo estar associado a uma regulação negativa de receptores *TLRs* (VISVANATHAN et al., 2007; WEI et al., 2010).

Assim como o SNP *TLR9* -1237 T/C, o SNP *TLR9* -1486 C/T também está localizado na região promotora do gene, podendo interferir na regulação transcricional e expressão de *TLR9* (ENSEMBL, 2018).

Em *TLR9* -1486 C/T houve uma maior expressão do receptor *TLR9* em monócitos de indivíduos com genótipo heterozigoto em comparação aos de genótipos homozigoto selvagem e homozigoto variante.

Conclusão

CONCLUSÃO

- Nossos resultados demonstraram níveis séricos da citocina IL-6, de perfil Th1, significativamente elevados em pacientes HDV⁺ com fibrose avançada em relação aos de fibrose moderada (tanto em vivos quanto em pacientes com óbito confirmado).

- Outra citocina importante observada na fibrose avançada foi TNF (Th1), com níveis séricos significativamente maiores na presença do genótipo C/T em relação ao genótipo selvagem C/C de *TLR9* -1486 C/T.

- A citocina IL-6 também se mostrou importante na fibrose moderada, com concentrações significativamente maiores em pacientes portadores do genótipo selvagem A/A em relação aos de genótipo A/G de *TLR4* A299G. Porém, também observamos na fibrose moderada a citocina regulatória IL-10 com concentrações significativamente elevadas nos indivíduos de genótipos homocigoto selvagem T/T e heterocigoto T/C em relação aos de genótipo homocigoto variante C/C de *TLR9* -1237 T/C; o que pode significar um balanceamento de resposta entre o perfil Th1 (com IL-6) e o perfil regulatório (com IL-10) para que a fibrose moderada não progrida para a fibrose avançada.

A realização de estudos sobre esses polimorfismos frente à hepatite Delta é de suma importância para se obter uma previsibilidade da resposta imune frente a um determinado genótipo de polimorfismo e para o desenvolvimento de uma terapia individualizada que possibilite um tratamento mais assertivo.

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª Edição. Elsevier. 2015; p. 150, 480-499.
- Abbas Z, Afzal R. **Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review**. World Journal of Hepatology. 2013; 27; 5 (12): 666-675.
- Al-Anazi MIR, Matou-Nasri S, Abdo AA, Sanai FM, Alkahtani S, Alarifi S, Alkahtane AA, Al-Yahya H, Ali D, Alessia MS, Alshahrani B, Al-Ahdal MN, Al-Qahtani AA. **Association of Toll-like Receptor 3 Single-Nucleotide Polymorphisms and Hepatitis C Virus Infection**. Journal of Immunology Research. 2017; 1-11.
- Alfaiate D, Dény P, Durantel D. **Hepatitis delta virus: from biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options**. Antiviral Research. 2015; 122.112-129.
- Alfaiate D, Lucifora J, Abeywickrama-Samarakoon N, Michelet M, Testoni B, Cortay JC, Sureau C, Zoulim F, Dény P, Durantel D. **HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated genes induction in super-infected hepatocytes**. J. Antiviral Res. 2016; 136:19-31: 10.1016/.2016.10.006.
- Alipoor B, Ghaedi H, Omrani MD, Bastami M, Meshkani R, Golmohammadi T. **A Bioinformatics Approach to Prioritize Single Nucleotide Polymorphisms in TLRs Signaling Pathway Genes**. Int J Mol Cell Med. 2016; 5 (2): 65 -79.
- Almeida AM; Silva AL; Brandão CMR; Cherchiglia ML; Andrade EIG; Oliveira GLA; Carmo RA; Acurcio FA. **Cost-effectiveness of nucleoside/nucleotide analogues in chronic hepatitis B**. Revista de Saúde Pública. São Paulo. 2012; 46 (6): 942-949.
- Alvarado-Mora MV, Locarnini S, Rizzetto M, Pinho JR. **An update on HDV: virology, pathogenesis and treatment**. Antiviral Therapy. 2013; 18 (3 Pt B): 541-548.
- AMAZONAS. Secretaria de Estado da Fazenda. Secretaria Executiva de Orçamento. Departamento de Diretrizes e Elaboração Orçamentária. **Manual Técnico do Orçamento (2ª versão)**. 2019; p. 69-72 – Manaus, AM. Disponível

em: <file:///C:/Users/NATAN/Downloads/MANUAL_DO_OR%C3%87AMENTO_-_2019_-_2%C2%AA_vers%C3%A3o.pdf> Acesso em: 20 dez. 2019.

- Araújo TME, Silva NC. **Accidents with sharp instruments and hepatitis B among nursing staff of emergency units in Teresina, Piauí state, Brazil.** Revista Brasileira de Saúde Ocupacional. 2014; n.39 (130), p.175-183.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. **TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans.** Nature Genetics. 2000; 25: 187-191.
- Aster RH. **Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of “hypersplenic” thrombocytopenia.** J Clin Invest. 1966; 45 (5): 645–657.
- Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. **Candidate gene polymorphisms in solid cancers.** European Journal of Surgical Oncology. 2004; 30 (6): 593-601.
- Barbara JA, VAN OSTADE X, LOPEZ A. **Tumour necrosis factor alpha (TNF alpha): the good, the bad and potentially very effective.** Immunology and Cell Biology. 1996; 74 (5): 434-443.
- Bataller R, Brenner DA. **Liver fibrosis.** J Clin Invest. 2005; 115 (2): 209–218.
- Beck J, Nassal M. **Hepatitis B virus replication.** World Journal of Gastroenterology. 2007; n. 7; 13 (1), p. 48-64.
- Blumberg Bs, Alter Hj, Visnich A. **A “new” antigen in leukemia sera.** JAMA. 1965; 191: 541-546.
- Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M, Gerlich WH. **Hepatitis Delta virus: protein composition of Delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope.** Journal of virology. 1986; 58 (3):945-950.
- Braga WSM, Castilho MC, Borges FG, Leão JRDT, Martinho ACS, Rodrigues IS, Azevedo EP, Júnior GMB, Paraná R. **Hepatitis D virus infection in the Western Brazilian Amazon - far from a vanishing disease.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2012; 45(6):691-695.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **A B C D E do Diagnóstico para as Hepatites Virais.** 2009. 1 ed. p. 24 – Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais.** 2019; vol. 50, nº 17 - Brasília, DF.

Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2019>> Acesso em: 02 fev. 2020.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Manual A B C D E das Hepatites Virais para Cirurgiões Dentistas**. 2010; 100 p.: il - Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções**. 2011. Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Hepatite D. 2018. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-sao-hepatites/hepatite-d>> Acesso em: 02 dez. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções**. 2017a. 120 p.: il – Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. 2017b. Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Material instrucional para capacitação em vigilância epidemiológica das hepatites virais**. 2008. 1 ed – Brasília, DF.
- Brennan FM, McInnes IB. **Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis**. Journal of Clinical Investigation. 2008; 118 (11): 3537-3545.
- Buti M, Fung S, Gane E, Afdhal NH, Flisiak R, Gurel S, Flaherty JF, Martins EB, Yee LJ, Dinh P, Bornstein JD, Mani Subramanian G, Janssen HL, George J, Marcellin P. **Long-term clinical outcomes in cirrhotic chronic hepatitis B patients treated with tenofovir disoproxil fumarate for up to 5 years**. Hepatology international. 2015; 9 (2): 243-50.
- Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. **Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins**. Hum Mutat. 2009; 30 (8): 1237-44.
- Carvalho A, Osório NS, Saraiva M, Cunha C, Almeida AJ, Teixeira-Coelho M, Ludovico P, Pedrosa J, Pitzurra L, Aversa F, Romani L, Castro AG, Rodrigues F.

The C allele of rs5743836 polymorphism in the human TLR9 promoter links IL-6 and TLR9 up-regulation and confers increased B-cell proliferation. PLoS One. 2011; 6 (11): e 28256.

- Casey JL. **Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs.** Current Topics Microbiology and Immunology. 2012; 353, 123–143.
- Casey JL. **RNA Editing in Hepatitis Delta Virus Genotype III Requires a Branched Double-Hairpin RNA Structure.** Journal of Virology. 2002; 76:7385–97.
- Chang FL, Chen PJ, Tu SJ, Wang CJ, Chen DS. **The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991; Vol. 88, p. 8490-8494.
- Chang J, Nie X, Chang He, Han Z, Taylor J. **Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II.** Journal of Virology. 2008; 82, 1118–1127.
- Chao M, Hsieh SY, Taylor J. **Characterization of RNA-binding domains of hepatitis delta antigen.** Journal of Virology. 1990; 64 (10): 5066-5069.
- Choe J, Kelker MS, Wilson IA. **Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain.** Science. 2005; 309, 581-585.
- Costa AG, Ramasawmy R, Ibiapina HNS, V.S. Sampaio VS, Xábregas LA, Brasil LW, Tarragô AM, Almeida ACG, Kuehn A, Vitor-Silva S, MeloGC, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MVG, Malheiro A. **Association of TLR variants with susceptibility to Plasmodium vivax malaria and parasitemia in the Amazon region of Brazil.** PLoS One. 2017; 12: 1–14.
- Couper KN, Blount DG, Riley EM. **IL-10: The master regulator of immunity to infection.** Journal of Immunology. 2008; 180 (9): 5771-5777.
- Crispe IN. **The liver as a lymphoid organ.** Annual review of Immunology. 2009; 27: 147–163.
- Crispe IN, Giannandrea M, Klein I, John B, Sampson B, Wuensch S. **Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance.** Immunological Reviews. 2006; 213 (1): 101-118.
- Crispim MAE, Fraiji A, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MMA, Kiesslich D. **Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil.** BMC Infectious Diseases. 2014; n. 14, 94, p.2.

- Deviere J, Content J, Denys C, Vandenbussche P , Schandene G , Wybran J , Dupont E. **Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis.** Hepatology. 1990;11(4):628–634.
- Dhiman N, Ovsyannikova IG, Vierkant RA, et al. **Associations between SNPs in Toll-like receptors and related intracellular signaling molecules and immune responses to measles vaccine: preliminar results.** Vaccine 2008; 26:1731–6.
- Dias ÁL, Oliveira CMC, Castilho MC, Silva MSP, Braga WSM. **Molecular Characterization Of The Hepatitis B Virus In Autochthonous And Endogenous Populations In The Western Brazilian Amazon.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2012; vol. 45 no.1 Uberaba, MG.
- Ding L, Jiang Q, Li G, Shen J, Du J, Lu X, Xiong X. **Comprehensive assessment of association between TLR4 gene polymorphisms and cancer risk: a systematic meta-analysis.** Oncotarget. 2017; 8 (59): 100593-100602.
- Eiras M, Daròs JA, Flores R, Kitajima, EW. **Viróides e virusóides: relíquias do mundo de RNA.** Fitopatologia Brasileira. 2006; 31:229-246.
- Eiger Biopharmaceuticals. **Hepatitis Delta.** Conquering Rare Diseases. Disponível em: <<http://www.eigerbio.com/hepatitis-d/>>. Acesso em: 04 jan. 2018.
- Ensembl. **Archive Humano.** Disponível em: <http://Oct2018.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000239732;r=3:52221080-52226163;t=ENST00000360658>. Acesso em: 18 dez. 2018.
- Ensembl. **Archive Humano.** Disponível em: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:117712524-117713524;v=rs4986790;vdb=variation;vf=686787230#population_freq_AMR>. Acesso em: 30 abr. 2020a.
- Ensembl. **Archive Humano.** Disponível em: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:117712824-117713824;v=rs4986791;vdb=variation;vf=686787250#population_freq_AFR>. Acesso em: 30 abr. 2020b.
- Farci P, Anna Niro G. **Current and Future Management of Chronic Hepatitis D.** Gastroenterology & hepatology (N Y). 2018; 14 (6): 342-351.

- Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, Van der Ven AJ, Van der Meer JW, Netea MG. **Functional consequences of Toll-like receptor 4 polymorphisms**. *Molecular medicine*. 2008; 14 (5-6): 346 – 52.
- Fonseca, J.C.F. **Hepatitis D**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002; 35 (2): 181 - 190.
- Fonseca, J.C.F. **Hepatitis fulminant in Brazilian Amazon**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2004; 37.
- Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. **Human genetic variation and its contribution to complex traits**. *Nat Rev Genet*. 2009; 10 (4): 241-51.
- Gara N, Zhao X, Collins MT, Chong WH, Kleiner DE, Jake Liang T, Ghany MG, Hoofnagle JH. **Renal tubular dysfunction during long-term adefovir or tenofovir therapy in chronic hepatitis B**. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2012; 35 (11): 1317-25.
- Garcia-Tsao G, Wiest R. **Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis**. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004; 18 (2): 353–372.
- Geng PL, Song LX, An MDH, Huang JY, Li S, Zeng XT. **Toll-like Receptor 3 is Associated With the Risk of HCV Infection and HBV-Related Diseases**. *Medicine*. 2016; V 95, 21.
- Giersch K, Dandri M. **Hepatitis B and Delta Virus: Advances on Studies about Interactions between the Two Viruses and the Infected Hepatocyte**. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2015; 3 (3): 220–229.
- Greco-Stewart VS, Miron P, Abraham A, Pelchat M. **The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome**. *Virology*. 2007; 357, 68–78.
- Hajeer AH, Hutchinson IV. **TNF- α gene polymorphism: Clinical and biological implications**. *Microscopy Research and Technique*. 2000; 50 (3): 216-228.
- Hartmann P, Haimerl M, Mazagova M, Brenner DA, Schnabl B. **Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor I contribute to liver fibrosis in mice**. *Gastroenterology*. 2012; 143(5):1330-40. e 1.
- Huang CR, Lo SJ. **Evolution and diversity of the human hepatitis virus genome D**. *Advances in Bioinformatics*. 2010; 323654.

- Huang CR, Lo SJ. **Hepatitis D virus infection, replication and cross-talk with the hepatitis B virus**. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20 (40): 14589-14597; 10,3748 / w jg. V 20. i40.14589.
- Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. **Hepatitis delta virus**. *Lancet*. 2011; 378:73–85. doi: 10.1016 / S0140-6736 (10) 61931-9.
- Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. **Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo**. *Journal of Virology*. 2005; 79: 7269–7272.
- Jagavelu K, Routray C, Shergill U, O'Hara SP, Faubion W, Shah VH. **Endothelial cell toll-like receptor 4 regulates fibrosis-associated angiogenesis in the liver**. *Hepatology*. 2010; 52(2):590-601.
- Jeulin H, Velay A, Murray J, Schvoerer E. **Clinical Impact of Hepatitis B and C Virus Envelope Glycoproteins**. *World Journal of Gastroenterology*. 2013; n.19 (5). p. 654-664.
- Kalambokis G, Tsianos EV. **Endotoxaemia in the pathogenesis of cytopenias in liver cirrhosis**. Could oral antibiotics raise blood counts? *Med Hypotheses*. 2011; 76 (1): 105–109.
- Kawasaki T, Takeshita A, Souda K, Kobayashi Y , Kikuyama M , Suzuki F , Kageyama F , Sasada Y , Shimizu E , Murohisa L , Koide S , Yoshimi T , Nakamura H , Ohno R. **Serum thrombopoietin levels in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis**. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94 (7): 1918–1922.
- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. **Genetic variability in hepatitis B viruses**. *J Gen Virol*. 2002; 83 (Pt 6): 1267-80.
- Kishimoto T. **Interleukin-6: from basic science to medicine - 40 years in immunology**. *Annual Reviews of Immunology*. 2005; 23, p. 1-21.
- Kobe B, Deisenhofer J. **A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands**. *Nature*. 1995; 374, 183-186.
- Korppi M, Teräsjärvi J, Lauhkonen E, Huhtala H, Nuolivirta K, He Q. **Toll-like receptor 4 polymorphisms were associated with low serum pro-inflammatory cytokines in BCG osteitis survivors**. *Acta Paediatr*. 2020; 109 (7): 1417-1422.
- Kuo My, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G, Taylor J. **Characterization of selfcleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus**. *Journal of Virology*. 1988; 62, 4439–4444.

- Kuratsune H, Koda T, Kurahori T. **The relationship between endotoxin and the phagocytic activity of the reticuloendothelial system.** *Hepatogastroenterology*. 1983; 30 (3): 79–82.
- Lago BV, Mello FCA, Barros TM, Mello VM, Villar LM, Lewis-Ximenez LL, Pardini MIMC, Lampe E. **Hepatitis D infection in Brazil: prevalence and geographical distribution of anti-Delta antibody.** *Journal of Medical Virology*. 2018; 90 (8): 1358-1363.
- Lai MM. **The molecular biology of hepatitis delta virus.** *Annual Review Biochemistry*. 1995; 64: 259-286.
- Lai MMC. **RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: surprises from hepatitis delta virus.** *Journal of Virology*. 2005; 79, 7951–7958.
- Lange NE, Zhou X, Lasky-Su J, Himes BE, Lazarus R, Soto-Quirós M, Avila L, Celedón JC, Hawrylowicz CM, Raby BA, Litonjua AA. **Comprehensive genetic assessment of a functional TLR9 promoter polymorphism: no replicable association with asthma or asthma-related phenotypes.** *BMC Medical Genetics*. 2011; 12:26.
- Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez F, Weiss ST. **Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies.** *Genomics*. 2003; 81 (1): 85-91.
- Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. **Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus.** *Cellular Microbiology*. 2008; 10, 122-133.
- Lempp FA, Ni Y, Urban S. **Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options.** *Nature Review. Gastroenterology of Hepatology*. 2016; v. 13, p. 580-589.
- Leoratti FM, Farias L, Alves FP, Suarez-Mutis MC, Coura JR, Kalil J, et al. **Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria.** *J Infect Dis*. 2008; 198 (5): 772-80.
- Lian JQ, Wang XQ, Zhang Y, Huang CX, Bai XF. **Correlation of circulating TLR2/4 expression with CD3 + /4 + /8 + T cells and Treg cells in HBV-related liver cirrhosis.** *Viral Immunol*. 2009; 22:301–8.

- Lin YT, Verma A, Hodgkinson CP. **Toll-like Receptors and Human Disease: Lessons from Single Nucleotide Polymorphisms**. *Current Genomics*. 2012; 13, 633-645 633.
- Lin E, Calvano SE, Lowry SF. **Inflammatory cytokines and cell response in surgery**. *Surgery*. 2000; 127: 117-126.
- Lo K, Hwang S B, Duncan R, Trousdale M, Lai M M. **Characterization of mRNA for hepatitis delta antigen: exclusion of the full-length antigenomic RNA as an mRNA**. *Virology*. 1998; 250, 94–105.
- Longarela OI, Schmidt TT, Schoneweis K, Romeo R, Wedemeyer H, Urban S, Schulze A. **Proteoglycans act as cellular receptors binding to the hepatitis delta virus**. *Plos One*. 2013; 8, e 58340.
- Lumsden AB, Henderson JM, Kutner MH. **Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis**. *Hepatology*. 1988;8(2):232–236.
- Lutterkort GL, Wranke A, Hengst J, Yurdaydin C, Stift J, Bremer B, Hardtke S, Keskin O, Idilman R, Manns MP, Dienes HP, Falk C, Wedemeyer H, Heidrich B. **Viral dominance patterns in chronic hepatitis delta determine early response to interferon alpha therapy**. *Journal Viral Hepatology*. 2018; 25: 1384-94.
- Ma Z, Zhang E, Yang D, Lu M. **Contribution of Toll-like receptors to the control of hepatitis B virus infection by initiating antiviral innate responses and promoting specific adaptive immune responses**. *Cellular & Molecular Immunology*. 2014; 12 (3): 273-282.
- Makhatadze NJ. **Tumor Necrosis Factor Locus: Genetic Organisation and Biological Implications**. *Human Immunology*. 1998; 59 (9): 571-579.
- Martínez-Campos C, Bahena-Román M, Torres-Poveda K, Burguete-García AI, Madrid-Marina V. **TLR9 gene polymorphism -1486T/C (rs 187084) is associated with uterine cervical neoplasm in Mexican female population**. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2017; 143 (12): 2437-2445.
- McMahon BJ. **The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B**. *Hepatology Int*. 2009; 3:334–342.
- Mello FCA, Souto FJD, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HSMC, Franz HCFF, Saraiva JCP, Virgolino HÁ, Motta-Castro AR, Melo MMM, Martins RMB,

- Gomes AS. **Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotypes F isolates.** *Bio Med Central Microbiology.* 2007; n. 7, p. 103.
- Modahl LE, Macnaughton TB, Zhu N, Johnson DL, Lai MMC. **RNA-Dependent Replication and Transcription of Hepatitis Delta Virus RNA Involve Distinct Cellular RNA Polymerases** *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20(16): 6030–603.
 - Moore KW, Malefyt RW, Coffman RL, O'garra A. **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.** *Annual Review of Immunology.* 2001; 19, p. 683-765.
 - Morris PW, Patton TB, Balint JA, Hirschowitz BI. **Portal hypertension, congestive splenomegaly, and portacaval shunt.** *Gastroenterology.* 1962; 42: 555–559.
 - Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, Van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. **Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells.** *Journal Immunology.* 2000; 164 (11): 5998-6004.
 - Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, Abdelmalek M, Zhu H, Xu YL, Cabrera R, Liu C, Davis GL. **Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and antiinflammatory effect.** *Hepatology.* 2003; 38 (4): 859-868.
 - Ng MTH, Van't Hof R, Crockett JC, Hope ME, Berry S, Thomson J, McLean MH, McColl KEL, El-Omar EM, Hold GL. 2010. **Increase in NF-kappa B binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with Helicobacter pylori-induced gastric disease.** *Infect. Immun.* 78: 1345–52.
 - Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Falth M, Stindt J, Koniger C, Nassal M, Kubitz R, Sülthmann H, Urban S. **Hepatitis B and D viruses exploit the co-transporter of sodium taurocholate for species-specific entry into hepatocytes.** *Gastroenterology.* 2014; 146, 1070-1083.
 - Niro GA, Casey JL, Gravinese E, Garrubba M, Conoscitore P, Sagnelli E, et al. **Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: molecular evidence.** *Journal of Hepatology.* 1999; 30 (4): 564-9.
 - Niro GA, Rosina F, Rizzetto M. **Treatment of hepatitis D.** *J Viral Hepat.* 2005; 12 (1): 2–9.

- NUSSBAUM RL, MCINNES RR, WILLARD HF. **Thompson & Thompson Genética Médica**. Tradução da 8ª Edição. Editora Elsevier. 2016; 45-46.
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. 2018. Disponível em: <<http://www.omim.org/geneMap/9/413?start=-3&limit=10&highlight=413>> Acesso em: 11 dez. 2018.
- Pandey NO, Chauhan AV, Raithatha NS, Patel PK, Khandelwal R, Desai AN, Choxi Y, Kapadia RS, Jain ND. **Association of TLR4 and TLR9 polymorphisms and haplotypes with cervical cancer susceptibility**. Scientific Reports. 2019; 9 (1): 9729.
- Paraná R, Kay A, Molinet F, Viana S, Silva LK, Salcedo JM, Tavares-Neto J, Lobato C, Rios-Leite M, Matteoni L, D'Oliveira AJ, Tauil P, Trépo C. **HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: a preliminary report**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2006; 75: 475–79.
- Pires-Neto OS, Sá KSG, Santana BB, Gomes STM, Amoras ESG, Conde SRS, Demachki S, Azevedo VN, Martins-Feitosa RN, Ishak MOG, Ishak R, Vallinoto ACR. **Lack of Association between Polymorphisms of the TLR4 Gene and Infection with the Hepatitis B and C Viruses**. Mediators of Inflammation, 2015.
- Polson AG, Bass BL, Casey JL. **RNA editing of hepatitis delta vírus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase**. Nature. 1996; 380, 454–456.
- Pugnale P, Pazienza V, Guilloux K, Negro F. **Hepatitis delta virus inhibits alpha interferon signaling**. 2009; Hepatology, 49: 398-406.
- Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, Hemming VG, Blanco JCG, Segal DM, Vogel SN. **Analysis of TLR4 Polymorphic Variants: New Insights into TLR4/MD-2/CD14 Stoichiometry, Structure, and Signaling**. The Journal of Immunology. 2006; 177 (1): 322-32.
- Ramasawmy R, Cunha-neto E, Fae KC, Borba SCP, Teixeira PC, Ferreira SCP, Goldberg AC, Ianni B, Mady C, Kali J. **Heterozygosity for the S180L Variant of MAL / TIRAP, a Gene Expressing an Adaptor Protein in the Toll-like Receptor Pathway, Is Associated with Lower Risk of Developing Chronic Chagas Cardiomyopathy**. Journal Infection Diseases. 2009; 199:1838-1845.
- Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F. **Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti**

- delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers.** Gut. 1977; 18: 997–1003.
- Rizzetto M, Canese MG, Gerin JL, Londres WT, Sly DL, Purcell RH. **Transmission of the delta antigen associated with hepatitis B virus to chimpanzees.** The Journal of Infectious Diseases. 1980; 141: 590-602.
 - Rizzetto M, Verme G. **Delta hepatitis-present status.** Journal of hepatology. 1985; 1(2):187-193.
 - Rizzetto M, Ciancio A. **Epidemiology of Hepatitis D.** Semin Liver Diseases. 2012; 32: 211–219.
 - Rodriguez-Frias F, Jardi R. **Virologia molecular do vírus da hepatite B.** Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008; s 26. 7: 2-10.
 - Roh YS, Park S, Kim JW, Lim CW, Seki E, Kim B. **Toll-like receptor 7-mediated type I interferon signaling prevents cholestasis - and hepatotoxin-induced liver fibrosis.** Hepatology. 2014; 60(1):237-49.
 - Rosenblum L, Darrow W, Witte J, Cohen J, French J, Gill PS, et al. **Sexual practices in the transmission of hepatitis B virus and prevalence of hepatitis delta virus infection in female prostitutes in the United States.** Jama: the Journal of the American Medical Association. 1992; 267(18): 2477-81.
 - Sá KSG, Pires-Neto OS, Santana BB, Gomes STM, Amoras ESG, Conde SRS, Demachki S, Azevedo VN, Machado LFA, Martins-Feitosa RN, Ishak MOG, Ishak R, Vallinoto ACR. **Toll-like receptor 3 gene polymorphisms are not associated with the risk of hepatitis B and hepatitis C virus infection** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2015; 48 (2): 136-142.
 - Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. **Virologia Humana**, 3. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015.
 - Sawhney R, Visvanathan K. **Polymorphisms of toll-like receptors and their pathways in viral hepatitis.** Antiviral Therapy. 2011; 16(4):443-58.
 - Seki E, Brenner DA. **Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: Update.** Hepatology. 2008; v 48, p 322–335.
 - Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. **TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis.** Nat Med. 2007; 13(11):1324-32.

- Serganov A, Patel DJ. **Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins.** *Nature Review Genetics.* 2007; 8 776–790.
- Shin EC, Sung OS, Park SH. **Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis.** *Nature Reviews Immunology.* 2016; 10.1038/nri.2016.69.
- Sureau C, Salisse J. **A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus A-determinant.** *Hepatology.* 2013; 57, 985–994.
- Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. **Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis.** *Hepatology.* 2003; 37: 87–95.
- Takeuchi O, Akira S. **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell.* 2010; 140: 805–820.
- Takkenberg RB, Zaaier HL, Molenkamp R, Menting S, Terpstra V, Weegink CJ, Dijkgraaf MGW, Jansen PLM, Reesink HW, Beld MGHM. **Validation of a sensitive and specific real-time PCR for detection and quantitation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in plasma of chronic hepatitis B patients.** *Journal of Medical Virology.* 2009; 10.1002/jmv.21477.
- Tavanez JP, Cunha C, Silva MCA, David E, Monjardino J, Carmo-Fonseca M. **Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm.** *RNA.* 2002; 8, 637–646.
- Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. **Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism.** *Gastroenterology.* 2004; 127 (1): 365-366.
- Townsend EC, Zhang GY, Ali R, Firke M, Moon MS, Han MAT, Fram B, Glenn JS, Kleiner DE, Koh C, Heller T. **The balance of type 1 and type 2 immune responses in the contexts of hepatitis B infection and hepatitis D infection.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2019; 34 (4): 764-775.
- Tracey KJ, Beutler B, Iowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, Zentella A, Albert JD. **Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin.** *Science.* 1986; 234 (4775): 470-474.
- Tsou PS, Haak AJ, Khanna D, Neubig RR. **Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 8. Current and future drug targets in fibrosis: focus on Rho**

GTPase-regulated gene transcription. Am Journal Physiology Cell Physiology. 2014; 307 (1): C2-C13.

- Usai C, Maestro S, Camps G, Olague C, Suárez-Amaran L, Vales A, Aragon T, Hommel M, Aldabe R, Gonzalez-Asequinolaza G. **TNF-alpha inhibition ameliorates HDV-induced liver damage in a mouse model of acute severe infection.** JHEP Rep. 2020; 2 (3): 100098.
- Verme G, Brunetto MR, Oliveri F, Baldi M, Forzani B, Piantino P, Ponzetto A, Bonino F. **Role of infection hepatitis delta virus in hepatocellular carcinoma.** Dig Dis Sei. 1991; 36: 1.134-1.136.
- Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, Norder H, Protzer U, Hainaut P, Zoulim F, Tommasino M, Trepo C, Hasan U, Chemin I. **Hepatitis B Virus Impairs TLR9 Expression and Function in Plasmacytoid Dendritic Cells.** Plos One. 2011; v.6, 10, 26315.
- Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, Rodgers S, Kurtovic J, Chang J, Lewin S, Desmond P, Locarnini S. **Regulation of Tolllike receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein.** Hepatology. 2007; 45: 102-10.
- Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian RC, Thayer RM. **Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome.** Nature. 1986; 323, 508–514.
- Wang L, Wang K, Zou ZQ. **Crosstalk between innate and adaptive immunity in hepatitis B virus infection.** 2015; World Journal of Hepatology, 28; 7(30): 2980-2991.
- Washington State University. **Bloodborne Diseases.** Environmental Health & Safety. Pullman WA/USA. Disponível em: <<https://ehs.wsu.edu/labsafety/bloodbornediseases.html>>. Acesso em: 04 jan. 2018.
- Watanabe A, Hashmi A, Gomes DA, Town T, Badou A, Flavell RA, Mehal WZ. **Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9.** Hepatology. 2007; 46(5):1509-18.
- Wedemeyer H, Manns MP. **Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead.** Nature Review Gastroenterology Hepatology. 2010; 7: 31-40.

- Wei C, Ni C, Song T, Liu Y, Yang X, Zheng Z, Jia Y, Yuan Y, Guan K, Xu Y, Cheng X, Zhang Y, Yang X, Wang Y, Wen C, Wu Q, Shi W, Zhong H. **The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein.** *Journal Immunology.* 2010; 185: 1158-68.
- Wei XS, Wei CD, Tong YQ, Zhu CL, Zhang PA. **Single nucleotide polymorphisms of toll-like receptor 7 and toll-like receptor 9 in hepatitis C virus infection patients from central China.** *Yonsei Medical Journal.* 2014; 55 (2): 428-34.
- WHO. World Health Organization. **Global hepatitis report 2017.** 2017. ISBN: 978-92-4-156545-5. Geneva. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- WHO. World Health Organization. **Guidelines for the Screening, Care and Treatment of Persons With Hepatitis Infection.** 2014.
- WHO. World Health Organization. **Hepatitis B. 18 July 2019. (Key facts).** Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>>. Acesso em: 02 jan. 2020.
- Wu HN, Lin YJ, Lin FP, Makino S, Chang MF, Lai MM. **Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989; 86, 1831–1835.
- Wu JF, Chen CH, Ni YH, Lin YT, Chen HL, Hsu HY, Chang MH. **Toll-like receptor and hepatitis B virus clearance in chronic infected patients: a long-term prospective cohort study in Taiwan.** *The Journal of Infectious Diseases.* 2012; 206 (5): 662-668.
- Wu J, Lu M, Meng Z, Trippler M, Broering R, Szczeponek A, Krux F, Dittmer U, Roggendorf M, Gerken G, Schlaak JF. **Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice.** *Hepatology.* 2007; 46: 1769–1778.
- Xu R, Zhang Z, Wang FS. **Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury.** *Cellular & Molecular Immunology.* 2012; 9 (4): 296–301.

- Xu Y, Hu Y, Shi B, et al. **HbsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells.** Mol Immunol. 2009; 46:2640–6.
- Yamaguchi Y, Filipovska J, Yano K, Furuya A, Inukai N, Narita T, Wada T, Sugimoto S, Konarska MM, Handa H. **Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis Delta antigen.** Science. 2001; Vol. 293, Ed 5527, pp. 124-127 /10.1126 /1057925.
- Ye XG, Su QM. **Effects of entecavir and lamivudine for hepatitis B decompensated cirrhosis: meta-analysis.** World Journal of Gastroenterology. 2013; 19 (39): 6665-6678.
- Yi Z, Chen J, Kozlowski M, Yua Z. **Innate detection of hepatitis B and C virus and viral inhibition of the response.** Cellular Microbiology. 2015; 17(9), 1295–1303.
- You CR, Lee SW, Jang JW, Yoon SK. **Update on hepatitis B virus infection.** World Journal of Hepatology. 2014; 7; 20 (37): 13293 -13305.
- Yurdaydin C. **Treatment of chronic delta hepatitis.** Semin Liver Dis. 2012; 32 (3): 237–244.
- Zhang E, Lu M. **Toll-like receptor (TLR)-mediated innate immune responses in the control of hepatitis B virus (HBV) infection.** Medical Microbiology Immunology. 2014; 204:11–20.
- Zhang JM, An J. **Cytokines, inflammation, and pain.** Int Anesthesiol Clin 2007; 45: 27-37.
- Zhang L, Qin H, Guan X, Zhang K, Liu Z. **The TLR9 gene polymorphisms and the risk of cancer: evidence from a meta-analysis.** PloS one. 2013; 8 (8): e 71785.
- Zhang LJ, Wang XZ. **Interleukin-10 and chronic liver disease.** World Journal Gastroenterology. 2006; 12 (11): 1681-1685.
- Zhu J, Zhang T, Cao L, Li A, Zheng K, Zhang N, Su B, Chen Z, Chen N, Wu H, He Q. **Toll like receptor7 polymorphisms in relation to disease susceptibility and progression in Chinese patients with chronic HBV infection.** Scientific reports. 2017; 7:1-11.
- Zhu Q, Zou L, Jagavelu K, Simonetto DA, Huebert RC, Jiang ZD, DuPont HL, Shah VH. **Intestinal decontamination inhibits TLR4 dependent fibronectin-**

mediated cross-talk between stellate cells and endothelial cells in liver fibrosis in mice. J Hepatol. 2012; 56(4):893-9.

Anexos

ANEXOS

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

<p>INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - IPEC / FIOCRUZ</p> 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
Elaborado pela Instituição Coparticipante								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
Título da Pesquisa: Estadiamento da fibrose hepática de pacientes infectados pelo vírus da Hepatite Delta por métodos não-invasivos na região Norte do Brasil								
Pesquisador: Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda								
Área Temática:								
Versão: 1								
CAAE: 46865015.8.3001.5262								
Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM								
Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 1.223.737								
Apresentação do Projeto:								
Estudo observacional de corte transversal realizado em cooperação entre as unidades: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) (Manaus, AM, Brasil). Os pacientes, estima-se a inclusão de 350, serão recrutados exclusivamente no FMT-HVD.								
Objetivo da Pesquisa:								
Objetivo Primário:								
O objetivo primário deste projeto será avaliar a prevalência transversal do estadiamento da fibrose hepática por métodos não-invasivos, assim como identificar os fatores de risco associados à presença de fibrose significativa (F2) e cirrose hepática (F=4) em pacientes com hepatite Delta.								
Objetivo Secundário:								
Os objetivos secundários deste projeto serão:								
1. Comparar o desempenho dos métodos não-invasivos (APRI, FibroTest e das sondas M e XL do Fibroscan) na avaliação da fibrose hepática;								
2. Estimar a sensibilidade e especificidade dos métodos não-invasivos utilizando modelo estatístico sem exame padrão-ouro (análise de classes latentes);								
3. Correlacionar os estágios de fibrose com fatores associado à doença hepática;								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Endereço: Avenida Brasil 4365</td> <td style="border: none;">CEP: 21.040-360</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Bairro: Manguinhos</td> <td style="border: none;">Município: RIO DE JANEIRO</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">UF: RJ</td> <td style="border: none;">E-mail: cep@ipec.fiocruz.br</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Telefone: (21)3865-9585</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>	Endereço: Avenida Brasil 4365	CEP: 21.040-360	Bairro: Manguinhos	Município: RIO DE JANEIRO	UF: RJ	E-mail: cep@ipec.fiocruz.br	Telefone: (21)3865-9585	
Endereço: Avenida Brasil 4365	CEP: 21.040-360							
Bairro: Manguinhos	Município: RIO DE JANEIRO							
UF: RJ	E-mail: cep@ipec.fiocruz.br							
Telefone: (21)3865-9585								
<small>Página 01 de 03</small>								

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 1.223.737

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Excelente projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências e nem inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

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

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49652815.8.0000.0009

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.406.965

Apresentação do Projeto:

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

Trata-se de um estudo descritivo, transversal constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre Biotecnologia & Saúde

intitulado: "Desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao diagnóstico e terapia de doenças infecciosas tropicais", que será desenvolvido pelos

grupos de Pesquisa "Virologia" da Universidade Federal do Pará – UFPA, em parceria com os grupos "Imunologia Básica e Aplicada" da

Universidade Federal do Amazonas e "Nanotecnologia" da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. Ainda teremos apoio das Universidade da

Califórnia (UCDAVIS) e da Universidade de Miami(UM). Aprovado pelo Edital Pró-Amazônia n. 047/2012,

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

• Determinar a reatividade em soro de indivíduos HCV+ para peptídeos miméticos ao HCV identificados pela técnica phage display e caracterizar o

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq

Bairro: Chapeda **CEP:** 69.050-002

UF: AM **Município:** MANAUS

Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemocem.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.408.865

perfil de citocinas envolvidas no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células

Objetivo Secundário:

- Selecionar e identificar peptídeos miméticos reativos a soros de pacientes HCV+ com fibrose hepática;
- Sequenciar os clones isolados e realizar análises de bioinformática;
- Descrever o perfil de citocinas envolvidos no desenvolvimento da fibrose em cultura de células mesenquimais e hepatócitos;
- Pré-validar os clones selecionados através de ensaios de Phage-ELISA utilizando proteínas totais de pacientes com fibrose hepática;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Benefícios: Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de

pacientes que possam prever e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa Relevante que busca detectar marcadores que auxiliem na detecção de peptídeos miméticos ao vírus da hepatite C capazes de prever fibrose utilizando tecnologias combinadas em engenharia genética, como Phage Display com o intuito de gerar estratégias direcionadas para a investigação do processo do desenvolvimento da fibrose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	09/09/2015	-	Aceito

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

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.408.965

Básicas do Projeto	ETO_579290.pdf	15:35:04		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/09/2015 15:32:42	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 15:30:02	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/09/2015 15:26:05	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.pdf	09/09/2015 15:21:14	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.docx	09/09/2015 14:46:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 12 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Elisa Brosina de Leon
(Coordenador)

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

Anexo 03: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HEMOAM (CAAE:0024.0.112.000-10).



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
CAAE- 0024.0.112.000-10 - VERSÃO 002/10

IDENTIFICAÇÃO	
Título:	Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus.
Instituição:	Fundação HEMOAM
Pesquisador:	Laura Patricia Viana Maia
Data da Reapresentação:	06.10.2010

OBJETIVOS	
Geral:	Avaliar o perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus.
Específico:	Avaliar a soroprevalência de doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B, através dos marcadores HBsAg e/ou anti-HBc; Analisar o perfil celular dos linfócitos T CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+; Analisar a sub-população de leucócitos ativadas através do marcador CD69+ (linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos); Analisar a sub-população linfócitos T reguladores através do marcador CD25+; Avaliar o perfil de citocinas TH1 (IL-12 e IFN- γ); citocinas Th2 (IL-4); citocina supressora (IL-10) e citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF - α); f - Caracterizar os genótipos virais na população de doadores e correlacionar com a resposta imune encontrada.

SUMÁRIO DO PROJETO	
Metodologia:	Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilístico que será realizado com doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc no período de novembro de 2010 a abril de 2011, com uma amostra de 123 doações reativas.
Caracterização da Amostra:	Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilística que será realizado com todos os doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc do vírus da hepatite B no período de setembro de 2010 a setembro de 2011, totalizando 1.396 doadores (valor estimado).
Crítérios de Inclusão	Doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos e os que apresentarem

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS – HEMOAM
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. CONSTANTINO NERY, 4397 – CHAPADA – CEP 69050-002 – MANAUS/AMAZONAS
FONE (92) 3655-0113 FAX (92) 3655-0112
E-mail: cep_hemoam@hotmail.com



	co-infecção (sífilis, doença de chagas, HCV, HIV e HTLV).
Crítérios de Exclusão	Doadores que apresentarem resultados negativos para ambos os marcadores da hepatite B na segunda amostra de sangue.

COMENTÁRIOS DO CEP FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E RESOLUÇÕES COMPLEMENTARES

Na análise do protocolo observou-se que os autores responderam aos questionamentos descritos no parecer anterior.

PARECER DO CEP

Projeto Aprovado. Conforme determinado pela resolução CNS 196/96 os pesquisadores deverão apresentar a este CEP relatórios parcial e/ou final, ficando determinado desde então, o prazo para apresentação de relatório: 27/04/2011. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem se apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O termo de Consentimento deverá ser aplicado em duas vias sendo que uma delas ficará com o sujeito da pesquisa.

SITUAÇÃO	DATA DO PARECER
APROVADO	26.10.2010