

Maurício de Souza Campos



**ESTUDO COMPARATIVO DOS
PARÂMETROS CLÍNICOS,
EPIDEMIOLÓGICOS, SOROLÓGICOS,
HISTOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DE
PACIENTES INFECTADOS COM O VÍRUS DA
HEPATITE DELTA GENÓTIPOS 1 E 3**

Salvador
2018

MAURÍCIO DE SOUZA CAMPOS

**Estudo comparativo dos parâmetros clínicos, epidemiológicos,
sorológicos, histológicos e imunológicos de pacientes infectados com o
vírus da hepatite Delta, genótipos 1 e 3.**

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

Orientadora: Dra. Maria Isabel Schinoni

Co-Orientadores: Dra. Songeli Menezes Freire

Dr. Raymundo Paraná

Co-Orientador no Exterior: Dr. Heiner Wedemeyer

Salvador - BA

2018

Dados catalográficos a serem cadastrados após
versão final da tese.

MAURÍCIO DE SOUZA CAMPOS

Estudo comparativo dos parâmetros clínicos, epidemiológicos, sorológicos, histológicos e imunológicos de pacientes infectados com o vírus da hepatite Delta, genótipos 1 e 3.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em:

Professor Dr. Juan Miguel Salcedo - Avaliador externo

Professor Dr. Mário Guimarães Pessoa – avaliador externo

Professor Dr. Raymundo Paraná - Avaliador Interno

Professor Dr. Roberto Meyer- Avaliador Interno

Professora Dra. Maria Isabel Schinoni - Orientadora

Às vítimas silenciosas das
doenças negligenciadas pelo
serviço público de saúde
desse país,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Fazer o curso de doutorado foi um grande desafio. Uma longa, difícil, porém recompensadora jornada, na qual precisei da ajuda de pessoas fundamentais para lograr êxito. Agradeço a todas elas, principalmente:

À minha querida mãe Raimunda e a Celso Duran, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, me auxiliando e incentivando em mais essa conquista;

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

Ao professor, Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo, diretor do Instituto de Ciências da Saúde, pelo zelo e dedicação dispensados ao conhecimento científico;

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

Ao professor Dr. Heiner Wedemeyer pela imprescindível colaboração na execução desse projeto e por ter me recebido na Alemanha com inestimável zelo, cuidado e dedicação. Um grande amigo;

Ao Dr. Juan Miguel Salcedo e à Dra. Deusilene Vieira pela cooperação na realização desse estudo;

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

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde – UFBA, do Núcleo de Ensaio Clínicos da Bahia (NECBA) e da Escola Médica de Hannover – Alemanha, pela receptividade e auxílio inestimáveis;

À banca examinadora, por dedicar tempo ao ler e analisar meu trabalho e contribuir com conhecimento agregador, através das importantes sugestões e correções;

À CAPES e à Fundação Maria Emília, pela cooperação financeira, sem a qual esse estudo não seria viável.

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

Hipócrates.

CAMPOS, Maurício de Souza. *Estudo comparativo dos parâmetros clínicos, epidemiológicos, sorológicos, histológicos e imunológicos de pacientes infectados com o vírus da hepatite Delta, genótipos 1 e 3*. 2018. 116f. il. (Tese) Doutorado em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

RESUMO

Introdução: O vírus da hepatite Delta (HDV) é o único patógeno de RNA que requer antígenos de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) para a montagem e replicação viral. Pelo menos oito tipos diferentes de vírus Delta foram identificados com base na diversidade de seu genoma, com distribuição geográfica específica. O HDV-G3 é descrito como o genótipo mais divergente e agressivo. O HDV não causa lesão direta dos hepatócitos, a causa mais provável desse efeito é a resposta imune do hospedeiro contra o patógeno. Entretanto, até o momento, não há estudos demonstrando a associação entre a resposta imunológica do hospedeiro, em especial a ação das moléculas inflamatórias sistêmicas, e o dano hepático causado pela infecção pelo HDV. **Objetivo:** Avaliar e comparar os parâmetros clínicos, epidemiológicos, sorológicos, histológicos e imunológicos de pacientes infectados com o vírus da hepatite Delta, genótipo 1 e pacientes infectados com o genótipo 3. **Material e métodos:** Estudo do tipo descritivo, comparativo e analítico de pacientes coinfetados com o HBV e vírus Delta genótipos 1 e 3. Para cumprimento de todos os objetivos, uma plataforma de estudo *in vitro* foi desenvolvida e utilizada em concomitância com os demais procedimentos metodológicos. 92 moléculas inflamatórias sistêmicas (SIM) foram medidas pela tecnologia de Ensaio de Extensão de Proximidade (PEA). **Resultados:** Ambos os grupos foram semelhantes em termos de distribuição de gênero e idade média. Os níveis de Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) mostraram-se divergentes entre os grupos estudados. A maioria dos pacientes em ambos os grupos foi classificada como D-dominante em relação à carga viral. Pacientes infectados com HDV-G3 apresentaram maiores níveis séricos da maioria das citocinas e quimiocinas de perfil pró-inflamatório. Os métodos não invasivos utilizados para avaliação do grau de fibrose em pacientes com doença hepática de outras etiologias (relação APRI, FIB-4 e AST / ALT) revelaram baixa sensibilidade e VPP com AUROC máximo de 0,586 em pacientes infectados com o HDV-G3, mas um escore combinado incluindo CCL19 e MCP.4 revelou uma sensibilidade de 81% para identificação de fibrose avançada quando comparado com os resultados de biópsia hepática. **Conclusão:** Os níveis mais elevados de moléculas inflamatórias sistêmicas na coinfeção HBV/HDV-G3 sugerem que esse genótipo pode causar uma doença hepática mais agressiva, com uma resposta inflamatória mais exacerbada. Sugerimos aqui que a determinação dos níveis de CCL19 e MCP.4 possa ser usada para identificar pacientes infectados com HDV-G3 com fibrose avançada.

Palavras-chave: Hepatite Delta. Marcadores inflamatórios solúveis. Genótipo viral fibrose.

CAMPOS, Maurício de Souza. A comparative study of the clinical, epidemiological, serological, histological and immunological parameters of patients infected with Delta Hepatitis virus, genotypes 1 and 3. 2018. 116f. yl. (Thesis) PhD in Interactive Processes of Organs and Systems - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia.

ABSTRACT

Introduction: The hepatitis delta virus (HDV) is the only RNA pathogen that requires hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) for viral assembly and replication. At least eight different types of Delta viruses have been identified based on the diversity of their genome, with specific geographic distribution. HDV-G3 is described as the most divergent and aggressive genotype. HDV does not cause direct damage to hepatocytes, the most likely cause of this effect is the host's immune response against the pathogen. However, to date, there are no studies demonstrating the association between the host immune response, especially the action of systemic inflammatory molecules, and the liver damage caused by HDV infection. **Objective:** To evaluate and compare the clinical, epidemiological, serological, histological and immunological parameters of patients infected with Delta hepatitis virus, genotype 1 and patients infected with genotype 3. **Material and methods:** A descriptive, comparative and analytical study of patients coinfecting with HBV and Delta virus genotypes 1 and 3. To fulfill all the objectives, an in vitro study platform was developed and used in concomitance with the other methodological procedures. 92 systemic inflammatory molecules (SIM) were measured by the Proximity Extension Assay (PEA) technology. **Results:** Both groups were similar in terms of gender distribution and mean age. The levels of Alanine aminotransferase (ALT) and Aspartate aminotransferase (AST) were shown to be divergent among the groups studied. The majority of patients in both groups were classified as D-dominant in relation to viral load. Patients infected with HDV-G3 showed higher serum levels of most pro-inflammatory cytokines and chemokines. The noninvasive methods used to evaluate the degree of fibrosis in patients with liver disease of other etiologies (APRI, FIB-4 and AST / ALT ratio) revealed low sensitivity and maximal AUCOC of 0.586 in patients infected with HDV-G3, but a combined score including CCL19 and MCP.4 revealed a sensitivity of 81% for identification of advanced fibrosis when compared to liver biopsy results. **Conclusion:** Higher levels of systemic inflammatory molecules in HBV / HDV-G3 coinfection suggest that this genotype may cause more aggressive liver disease with a more exacerbated inflammatory response. We suggest here that the determination of the level of CCL19 and MCP.4 can be used to identify patients infected with HDV-G3 with advanced fibrosis.

Keywords: Delta hepatitis. Soluble inflammatory markers. NK cells. Fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica dos genótipos do HDV no mundo	5
Figura 2	(A) Microscopia eletrônica do VHD, setas (Cortesia do Dr. Mario Rizzetto, Turim, Itália). (B) Representação esquemática da partícula do VHD com envoltório do VHB (AgHBs	6
Figura 3	Ciclo de replicação do vírus da hepatite D	11
Figura 4	Patogênese do vírus da hepatite Delta	13
Figura 5	Fluxograma para o diagnóstico da infecção pelo VHD	20
Figura 6	Ciclo de vida do HDV (painel superior) e local de ação dos novos agentes de ação seletiva em desenvolvimento. (a) Inibidores de entrada (b) classe de inibidores de ácidos nucleicos e (c) inibidores da prenilação	21
ARTIGO 1		
Figura 7	Heatmap da distribuição de moléculas inflamatórias sistêmicas entre os grupos estudados	37
Figura 8	Gráficos de dispersão das SIMs com diferenças estatísticas mais significantes entre os grupos estudados	40
Figura 9	Níveis de HDV-RNA e HBV-DNA de pacientes em diferentes grupos de predominância nas coortes MHH e Brasil	43
ARTIGO 2		
Figura 10	Heat Map da comparação das concentrações séricas das moléculas inflamatórias sistêmicas dosadas em pacientes com fibrose avançada e em pacientes com fibrose mínima ou sem fibrose	62
Figura 11	Gráficos de distribuição das moléculas inflamatórias sistêmicas com valor de p estatisticamente significantes	63
Figura 12	Sensibilidade das escalas APRI, FIB-4 e da relação AST/ALT na identificação do estágio de fibrose em pacientes infectados com HDV-G3	65
Figura 13	Curva ROC comparando a sensibilidade da combinação dos níveis de CCL19 e MCP.4 em identificar estágio avançado de fibrose em pacientes infectados com HDV-G3 com a biópsia hepática	66

ARTIGO 3

Figura 14	Desenho esquemático da interação célula-célula na cocultura	78
Figura 15	Painel de anticorpos ligados a fluorocromos para marcação de proteínas de superfície e intracelulares	78
Figura 16	Estratégia de aquisição de células hepatocitárias, PBMC e células NK por citometria de fluxo	79
Figura 17	Proporção de hepatócitos infectados e excreção de $INF\gamma$ e $TNF\alpha$ em culturas de PBMC e hepatócitos em diferentes relações E:T e sem estímulo	80
Figura 18	Proporção de hepatócitos infectados e excreção de $INF\gamma$ e $TNF\alpha$ em culturas de PBMC e hepatócitos em diferentes relações E:T e estimuladas com $INF\alpha$	81
Figura 19	Proporção de hepatócitos infectados e excreção de $INF\gamma$ e $TNF\alpha$ em culturas de PBMC e hepatócitos em diferentes relações E:T estimuladas com IL12/IL18	82
Figura 20	Relação de hepatócitos infectados em cultura com PBMC. (A) Cultura de 06 horas, (B) Cultura de 24 horas.	83
Figura 21	Relação de hepatócitos infectados em culturas com PBMC em diferentes relações E:T, sem estímulo, estimuladas com $INF\alpha$ e estimuladas com IL12/IL18	84

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	Características dos pacientes das duas coortes participantes do estudo	36
Tabela 2	Valor de p das SIMs em relação aos grupos HDV-G1, HDV-G3 e controle	39

ARTIGO 2

Tabela 3	Comparação das características epidemiológicas, laboratoriais e sorológicas entre o grupo de pacientes com fibrose em estágio avançado e o grupo de pacientes sem fibrose ou com fibrose mínima	60
Tabela 4	Valor de p da comparação dos níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas entre pacientes com fibrose avançada e paciente com grau mínimo ou sem fibrose	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AgHBc	Antígeno de <i>Core</i> do HBV
AgHBe	Antígeno <i>e</i> do HBV
AgHBs	Antígeno de Superfície do HBV
ALT	Alanina Aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo contra o Antígeno de <i>Core</i> do HBV
Anti-HBc	Anticorpo contra o Antígeno c do HBV
Anti-HBs	Anticorpo contra o Antígeno de Superfície do HBV
CMV	Cytomegalovirus (Citomegalovírus)
EBV	Epstein-BarrVirus (Vírus Epstein-Barr)
ELISA	Enzyme-LinkedImmunsorbentAssay (Ensaio Imunoenzimático)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDA	United States Food and Drugs Administration
HBV	Hepatits B Virus (Vírus da Hepatite B)
HBV-DNA	Material genético do HBV
HCC	Hepatocarcinoma Celular
HCV	Hepatitis C Virus (Vírus da Hepatite C)
HDV	Hepatitis D Virus (Vírus da Hepatite D ou Delta)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HTLV	Human T-LymphotropicVírus (Vírus Linfotrópico as Subpopulações de Linfócitos T em Humanos)
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
IFN	Interferon
IL	Interleucina
MHC-I e II	Major Histocompatibility Complex Class1 (complexo principal de histocompatibilidade classe I e II)

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	JUSTIFICATIVA	18
1.2	OBJETIVOS	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	EPIDEMIOLOGIA	20
2.2	ESTRUTURA GENÔMICA E CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO HDV	22
2.2.1	Antígeno HDV	23
2.2.2	Modificações pós-tradução do HDAg	24
2.3	ACESSO CELULAR, ENTRADA E REPLICAÇÃO VIRAL	25
2.4	PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HDV	26
2.5	INTERAÇÃO DE HBV-HDV	28
2.6	INIBIÇÃO DE SINALIZAÇÃO DE INTERFERON ALFA	29
2.7	RESPOSTA IMUNE AO HDV	30
2.7.1	Papel das citocinas na infecção pelo HDV	31
2.8	ASPECTOS CLÍNICOS E EVOLUTIVOS	32
2.9	DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HDV	34
2.10	AVALIAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE NA INFECÇÃO POR HDV	36
2.11	FORMAS DE TRATAMENTO DA HEPATITE DELTA	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	41
3.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO	42
3.3	AVALIAÇÃO LABORATORIAL E CLÍNICA DOS PARTICIPANTES	42
3.3.1	Exames hematológicos e bioquímicos	42
3.3.2	Genotipagem do DNA do VHB e Vírus Delta	43

3.4	INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS NK E HEPATÓCITOS INFECTADOS COM HDV	43
3.5	DOSAGEM DOS NÍVEIS DE MOLÉCULAS INFLAMATÓRIAS SOLÚVEIS	44
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4	RESULTADOS	46
4.1	ARTIGO 1	47
4.2	ARTIGO 2	72
4.3	ARTIGO 3	91
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICE A (CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO)	
	APÊNDICE B (ARTIGO 2 – EM SUBMISSÃO A REVISTA)	
	APÊNDICE C (PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS DESENVOLVIDOS)	
	APÊNDICE D (PROTOSCOLOS DE COMPENSAÇÃO DE VALORES)	
	ANEXO A (COMITÊ DE ÉTICA - BRASIL)	
	ANEXO B (COMITÊ DE ÉTICA - ALEMANHA)	
	ANEXO B (TCLE - BRASIL)	
	ANEXO B (TCLE - ALEMANHA)	

1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite Delta (HDV) é o único patógeno de RNA que requer antígenos de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) para a montagem e replicação viral⁽¹⁾. Estudos mostraram que a coinfeção HBV-HDV pode acelerar doenças do fígado^(1,2) e que a superinfecção HBV-HDV pode resultar em hepatite fulminante aguda ou hepatite crônica, evoluindo em muitos casos para cirrose e carcinoma hepatocelular⁽³⁾. Estima-se que cerca de 240 milhões de pessoas são AgHBs positivas, em todo o mundo⁽⁴⁾ e, destas, 2% - 8% estão coinfectadas com o HDV, resultando em 10 a 20 milhões de pessoas com hepatite Delta. A prevalência da hepatite Delta é significativamente variável entre as regiões do mundo.⁽⁴⁾ Pelo menos oito tipos diferentes de vírus Delta foram identificados com base na diversidade de seu genoma, com distribuição geográfica específica^(5,6). O HDV-G1 está presente na Europa, Oriente Médio, América e Norte da África⁽⁵⁾. Os HDV-G2 ao HDV-G8 ocorrem em regiões específicas ao redor do mundo⁽⁵⁾. O HDV-G3, descrito como o genótipo mais divergente e agressivo, é encontrado exclusivamente na América do Sul, especificamente na Bacia Amazônica Ocidental, área que abrange parte dos territórios de cinco países: Brasil, Peru, Equador, Venezuela e Colômbia,⁽⁷⁾ sendo responsável por surtos graves e hepatite fulminante^(8,9). No Brasil, essa área abarca porções territoriais dos estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Roraima, com prevalência significativa na população indígena⁽¹⁰⁾.

As infecções virais são controladas por uma interação sofisticada entre respostas imunes inatas e adaptativas⁽¹¹⁾. Foi demonstrado que a mediação imunológica está geralmente implicada em danos no fígado, associados ao HDV. Até o momento, estudos têm sugerido que a patogênese do HDV envolve principalmente a ativação de linfócitos T específicos para o vírus, células NK, respostas de citocinas e sinalização do fator nuclear kappa B⁽¹²⁾. O HDV não causa lesão direta dos hepatócitos ou inflamação do tecido hepático. A causa mais provável desses efeitos é a resposta imune do hospedeiro contra o patógeno. Em geral, as infecções virais crônicas são caracterizadas pela presença de células T antivirais, mas que, muitas vezes, são incapazes de controlar a replicação viral e a progressão da infecção. Essa incapacidade de controle da infecção por parte do sistema imunológico parece estar diretamente relacionada com as formas graves da doença hepática. Entretanto, até o momento, não há estudos demonstrando a

associação entre a resposta imunológica do hospedeiro, em especial a ação das moléculas inflamatórias sistêmicas, e o dano hepático causado pela infecção pelo HDV. Estes estudos poderão oferecer novos *insights* para melhor caracterização da hepatite Delta e entendimento de questões científicas ainda pouco exploradas, como por exemplo, as diferenças imunopatológicas entre as infecções por distintos genótipos, mais particularmente o genótipo 3.

Assim, o presente estudo objetivou avaliar e comparar os parâmetros clínicos, epidemiológicos, sorológicos, histológicos e imunológicos de pacientes infectados com o vírus da hepatite Delta, genótipos 1 e 3.

1.1 JUSTIFICATIVA

Os agentes virais da hepatite B e Delta constituem um problema mundial de saúde pública. Acredita-se que cerca de dois bilhões de pessoas tiveram contato com o vírus da hepatite B (HBV) e que 18 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo HDV entre os 350 milhões de portadores crônicos do HBV, no mundo. Essa associação viral é relacionada, desde a década de 60, a uma forma de insuficiência hepática grave, descrita com o nome de Febre Negra de Lábrea. No Brasil, os estados do Amazonas, Rondônia e Acre são apontados como locais de alta prevalência. A coinfeção HBV e vírus Delta vitimiza principalmente crianças e jovens adultos, embora pouco se saiba sobre a evolução clínica desses pacientes. A investigação da relação entre a gravidade da doença e a resposta imunológica montada pelo indivíduo coinfectado, em especial, a produção e excreção de moléculas inflamatórias sistêmicas (SIM), objeto deste estudo, é de extrema importância, não só pelo ineditismo, mas também por oferecer dados importantes para avaliação da eficácia das drogas disponíveis, a fim de orientar futuramente novos protocolos de tratamento. Tem grande relevância ainda o fato deste estudo se configurar em inquestionável benefício à comunidade científica, já que será elaborado um banco de dados sobre o perfil imunológico de pacientes infectados pelo HDV- G1 e HDV- G3. Esse banco de dados será uma ferramenta útil para melhorar o serviço e o atendimento aos pacientes e poderá invocar novas ideias para trabalhos futuros sobre outros temas.

HIPÓTESE

H1 – Na infecção pelo HDV – G3, os níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas no sangue do paciente são mais elevados do que na infecção pelo HDV- G1, provocando inflamação hepática mais pronunciada e curso clínico mais agressivo.

H0 - Na infecção pelo HDV – G3, os níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas no sangue do paciente são iguais aos da infecção pelo HDV- G1 e não se relacionam nem com inflamação hepática mais pronunciada, sequer com curso clínico mais agressivo do HDV – G3.

1.2 OBJETIVOS

A seguir apresentam-se os objetivos estabelecidos para dar cumprimento a este estudo.

Objetivo Geral

- Avaliar e comparar os parâmetros clínicos, epidemiológicos, sorológicos, histológicos e imunológicos de pacientes infectados com o vírus da hepatite Delta, genótipo 1, tratados em um centro de referência na Alemanha, e pacientes infectados com o genótipo 3, tratados em um centro de referência da região Amazônica, no Brasil.

Objetivos Específicos

- Avaliar, *in vitro*, o efeito da estimulação com Interferon alpha, IL12 e IL 18, na ativação e resposta de células NK em cultura com hepatócitos infectados com o vírus da hepatite Delta;

- Comparar as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais entre indivíduos infectados com HVB-HDV, genótipos 1 e 3;

- Quantificar e comparar os níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas em pacientes infectados com os genótipos 1 e 3 do HDV;

- Avaliar a sensibilidade dos métodos não invasivos de estadiamento do grau de fibrose em pacientes com outras formas de hepatite em pacientes infectados com o vírus Delta, genótipos 3;

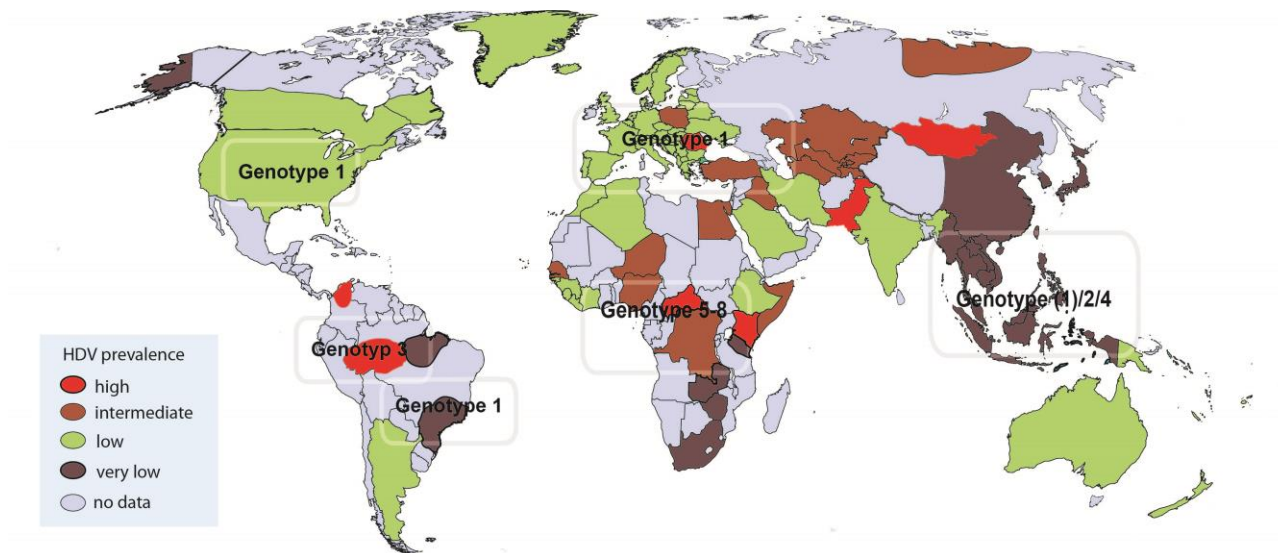
- Identificar possíveis marcadores biológicos para avaliação do grau de fibrose em pacientes infectados com o vírus da hepatite D, genótipos 3.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Existem pelo menos oito genótipos diferentes do HDV identificados e separados de acordo com a diversidade do material genético. A distribuição geográfica dos mesmos é bastante específica⁽¹³⁾, como demonstrado na figura 1. O HDV-1 é encontrado frequentemente na Europa, Oriente Médio, América e Norte da África^(13,14). Os demais genótipos, HDV-2 a HDV-8, ocorrem em regiões mais específicas^(15,16). Assim, podemos observar que o HDV-2 é mais prevalente em países como Japão⁽¹⁷⁾, o Estado insular Taiwan^(18,19) e Rússia⁽²⁰⁾. O HDV-3, o mais divergente filogeneticamente, é encontrado exclusivamente na América do Sul⁽²¹⁻²³⁾. O HDV-4 circula por todo o Japão e Taiwan, enquanto os HDV-5 a HDV-8 têm prevalência descrita na África^(24,25). Têm-se, portanto, que a distribuição do HDV varia em diferentes regiões geográficas (Figura 1), com maior incidência nos países do Oriente Médio, do Mediterrâneo, na região Amazônica, na África e na Ásia^(26,27).

Figura 1- Distribuição geográfica dos genótipos do HDV no mundo.



Fonte: AASLD, 2013

O HDV-G1 configura-se como o genótipo mais prevalente no mundo, sendo encontrado em, pelo menos, três continentes. Na Europa, a Alemanha é o país com maior prevalência ⁽²⁾. Alguns estudos apontam a migração maciça ocorrida nas últimas décadas como sendo responsável pelo aumento do número de casos de hepatite Delta na região ⁽¹³⁾.

O HDV-G3, descrito como genótipo mais divergente e agressivo, é encontrado exclusivamente na América do Sul, especificamente na Bacia Amazônica Ocidental, incluindo parte dos territórios do Brasil, Peru, Equador, Venezuela e Colômbia. É responsável por surtos graves e hepatite fulminante, comuns nessas áreas ⁽³⁾. No Brasil, abrange os estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Roraima, com prevalência significativa na população indígena ⁽²⁵⁾.

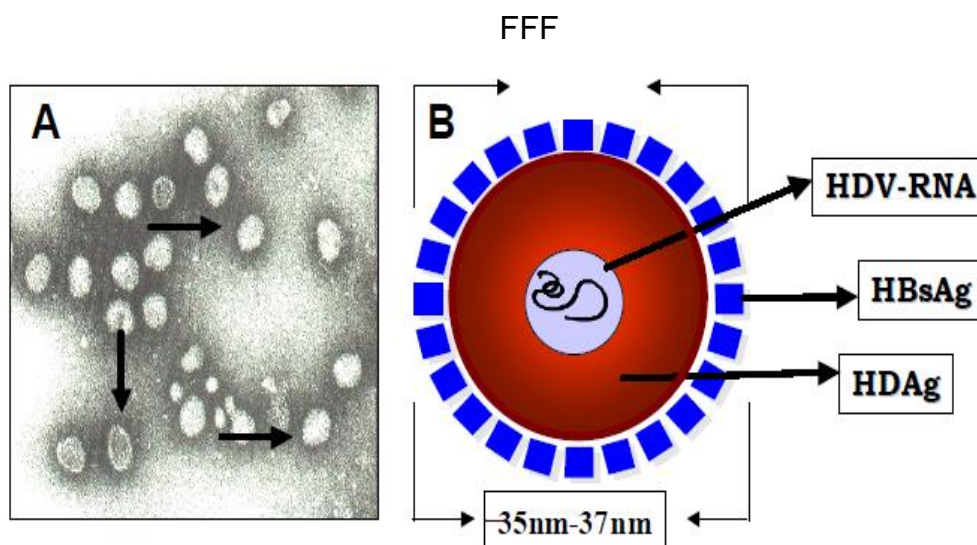
Aproximadamente 77% das infecções por HDV no Brasil ocorrem na região Norte ⁽³⁾. O isolamento deste vírus neste local pode ser uma consequência direta da prevalência do HDV entre a população indígena, que geralmente vive em regiões isoladas e interage, preferencialmente, entre indivíduos de suas próprias tribos ⁽¹⁾. Os estados do Acre e Rondônia são descritos como as duas áreas de maior prevalência da hepatite Delta no Brasil. Rio Branco, capital do Acre, foi povoada no início do século 20 pelos nativos que já habitavam a região, junto com migrantes do Nordeste do Brasil e imigrantes da Turquia, Portugal e Líbano, atraídos pelo enriquecimento do primeiro

ciclo da borracha⁽⁹⁾. Porto Velho, capital do estado de Rondônia, foi fundada como resultado da construção da ferrovia Madeira Mamoré, amplamente utilizada para extração da borracha e do ouro. Hoje, diversas tribos indígenas ainda habitam a área. Estudos confirmaram a prevalência do HDV-3 entre esses grupos, na região Amazônica do Brasil. Uma análise filogenética do vírus mostrou que a infecção permanece constante no local⁽⁸⁾.

2.2 ESTRUTURA GENÔMICA E CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO HDV

O HDV é um vírus pequeno, esférico, com diâmetro de aproximadamente 36nm⁽²⁸⁾. Possui genoma formado por uma molécula de RNA circular de cadeia simples e sentido negativo com um antígeno delta no núcleo interno rodeado por um envelope derivado da proteína de superfície do HBV⁽²⁹⁾, como ilustrado na figura 2. O RNA genômico do HDV é composto de aproximadamente 1700 nucleotídeos embalados com cerca de 200 moléculas do antígeno da hepatite Delta (HDAg)⁽³⁰⁾ para formar uma única partícula viral. Devido à extensa compactação dentro da molécula de RNA, o genoma tem forma de uma haste de estrutura dupla, assemelhando-se a viróides (patógenos de plantas)⁽³¹⁾. Contudo, ao contrário dos viróides, o HDV tem elevada quantidade de nucleotídeos em seu genoma.

Figura 2 – (A) Microscopia eletrônica do VHD, setas (Cortesia do Dr. Mario Rizzetto, Turim, Itália). (B) Representação esquemática da partícula do VHD com envoltório do VHB (AgHBs).



Fonte: Rizzetto, 2006

O HDV codifica seu próprio antígeno (AgHD), mas requer auxílio de proteínas do envelope do HBV para sua propagação⁽³¹⁾. O envelope que envolve o genoma viral é composto pelas três proteínas do envelope do HBV: S-HBsAg, HBsAg e L-HBsAg. O genoma do HDV também exibe uma atividade de auto-clivagem, ao codificar uma ribozima com domínio de cerca de 80-100 nucleótidos de comprimento.

O vírus pertence ao gênero delta vírus. Ao contrário da maioria dos vírus de RNA, o HDV não codifica sua própria replicase ou RNA polimerase; faz uso da RNA polimerase da célula hospedeira - dependente de DNA polimerases. Como o RNA genômico do HDV tem polaridade anti-mensageiro, durante a replicação três diferentes formas de RNA são sintetizadas: RNA genômico circular, RNA antígenômico complementar circular e RNA antígenômico linear. O processo se efetiva através de um mecanismo de rolamento circular.

O mecanismo de rolagem circular envolve replicação unidirecional de ácidos nucléicos para formar múltiplas cópias de genoma utilizando RNA polimerases da célula hospedeira⁽³²⁾. O RNA antígenômico linear poliadenilado serve como RNA mensageiro (mRNA) para produzir AgHD. O HDV possui uma codificação limitada de proteínas - apenas um AgHD com duas isoformas - e faz uso do maquinário de proteínas celulares do hospedeiro para realizar os processos que são essenciais ao ciclo de vida, a saber: transcrição, replicação, pós-transcrição e modificação transcricional.

2.2.1 Antígeno HDV

O genoma do HDV possui vários quadros de leitura aberta (ORFs). De todos os quadros, apenas um parece ser transcrito ativamente e codificar o antígeno (AgHD)⁽³³⁾. A função das outras ORFs ainda é desconhecida. Existem duas isoformas de AgHD: o pequeno AgHD (S-HDAg), de 24 kDa, composto por 195 aminoácidos e o grande AgHD (L-HDAg), de 27 kDa, composto por 214 aminoácidos. A leitura do quadro aberto transcreve um mRNA usando RNA polimerase da célula hospedeira que se traduz em uma molécula de S-HDAg. Uma modificação pós-transcricional pela enzima celular adenosina desaminase-1 (ADAR 1) substitui o códon de parada (UAG na posição 196) no mRNA por um triptofano (códon UGG), ampliando o quadro de leitura, adicionando 19 aminoácidos e levando à produção de L-HDAg⁽³⁴⁾. Os 19 aminoácidos extras adicionados na porção carboxiterminal do L-HDAg conferem propriedades funcionais à molécula que são diferentes do S-HDAg. O S-HDAg é necessário para o

início da replicação do genoma viral, enquanto o L-HDAg, sintetizado no final do estágio da replicação viral, é essencial para a montagem de partículas do novo vírion⁽³⁵⁾. O L-HDAg não apenas regula a replicação do genoma do HDV, mas também a sua própria síntese. O AgHD contém diferentes domínios funcionais, como domínio de ligação ao RNA, sequência de bobina enrolada e sequência de localização nuclear. Além disso, o L-HDAg contém mais alguns domínios que incluem a montagem de sinalizador viral (VAS) e sinalizador de exportação nuclear⁽³⁴⁾. O AgHD pode ativar diretamente a transcrição do genoma viral por ligação ao RNA e facilitar o alongamento da transcrição, substituindo o repressor de transcrição ligado a RNA polimerase II⁽³⁶⁾. Na falta de AgHBs, tanto o S-HDAg quanto o L-HDAg são inativos⁽³⁷⁾.

2.2.2 Modificações pós-tradução do HDAg

As modificações pós-traducionais do AgHD são de imensa importância, uma vez que podem modular a função do mesmo e podem levar à progressão do ciclo viral⁽³⁸⁾. Essas modificações pós-traducionais incluem fosforilação de serina e treonina, acetilação de lisina, metilação de arginina e farnesilação de cisteína⁽³⁹⁾. Como o HDV é deficiente de enzimas responsáveis por modificações pós-traducionais, ele depende das proteínas celulares para realizar estes processos.

A fosforilação ocorre nos resíduos de serina e treonina do S-HDAg, enquanto apenas os resíduos de serina são fosforilados em L-HDAg⁽⁴⁰⁾.

A Fosforilação pós-traducional da serina-177 da S-HDAg é crucial para a sua interação com a RNA polimerase celular II⁽⁴¹⁾, responsável pela síntese de RNA genômico do HDV e replicação do RNA antígenômico. Este processo aumenta a replicação do HDV. Além disso, a atividade de ligação do RNA do AgHD com o genoma da célula hospedeira mostrou ser mediado por modificação fosforilacional e, portanto, parece essencial para a replicação viral⁽⁴²⁾. A Acetilação de resíduos de lisina, tanto do S-HDAg quanto do L-HDAg, foram relatados e estão sendo associados com modulação da replicação do HDV. Observou-se também que a metilação do resíduo de arginina do S-HDAg influencia a replicação do HDV⁽⁴³⁾. Assim, inibidores de metilação parecem resultar em uma inibição de replicação do HDV, o que abre a possibilidade de estudos em terapêutica.

2.3 ACESSO CELULAR, ENTRADA E REPLICAÇÃO VIRAL

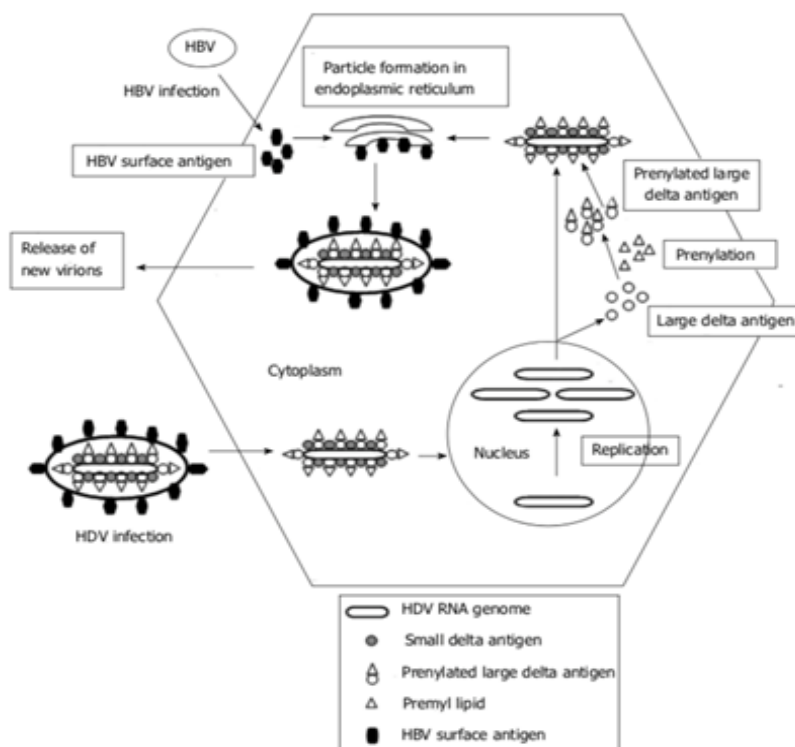
O mecanismo de entrada do HDV nos hepatócitos ainda não está totalmente elucidado. No entanto, acredita-se ser semelhante ao utilizado pelo HBV. O HDV entra nos hepatócitos por ligação às cadeias laterais de hidratos de carbono do proteoglicano de sulfato de heparina presentes na superfície dos hepatócitos ⁽⁴⁴⁾. Os Aminoácidos N-terminais do domínio pré-S1 do L-HBsAg são, portanto, essenciais para a entrada do HDV nos hepatócitos. Mutações e/ou deleções na sequência pré-S1 altamente conservada e acetilação, ou miristoilação de N-terminal pré-S1, parecem inibir a entrada do HDV nos hepatócitos⁽⁴⁵⁾. Yan et al.⁽⁴⁶⁾ identificaram um suposto receptor para a entrada do HBV e do HDV nos hepatócitos. Os autores propuseram que: o domínio pré-S1 do L-HBsAg interage com co-transportadores polipeptídicos de taurocolato de sódio (NTCP), uma glicoproteína transmembrana integral envolvida na circulação entero-hepática, para facilitar a entrada do vírus na célula.

Após o HDV entrar na célula, ocorre a remoção da partícula de revestimento e o AgHD transloca o genoma viral do núcleo onde as RNAs polimerases I e II são empregadas para replicar o genoma (Figura 3). A Polimerase I está implicada na transcrição de antígenoma viral, enquanto a polimerase II catalisa a replicação do genoma, do antígenoma e transcrição de mRNA no nucleoplasma⁽⁴⁷⁾. O processo de replicação começa com a transcrição do antígenoma, utilizando o genoma viral como molde, através de um mecanismo de rolamento circular que produz um RNA antígenômico de mais de uma unidade de comprimento. O RNA antígenômico é então auto-clivado pela atividade intrínseca da ribozima e ligado para formar um antígenoma circular, usando ligases celulares. O RNA antígenômico é, então, usado para produzir RNA genômico no nucleoplasma. O mRNA é transcrito usando o mesmo genoma transcrito anteriormente e é traduzido para produzir AgHD. Portanto, é evidente que o HBV não desempenha nenhum papel na replicação do HDV, e este pode continuar na ausência do vírus auxiliar. O AgHBs é necessário apenas para a entrada do HDV na célula, montagem do vírion e exportação.

2.4 PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HDV

O HDV se replica apenas nos hepatócitos. Sabe-se que a infecção pelo HDV está relacionada com processos imunomediados que causam lesão direta ao hepatócito ⁽⁴⁸⁾. Estudos experimentais conduzidos em chimpanzés sugeriram um efeito citopático direto do HDV nos hepatócitos, particularmente durante um quadro de hepatite aguda ⁽⁴⁹⁾. É postulado que na infecção aguda pelo HDV os hepatócitos infectados sofrem alterações degenerativas caracterizadas histologicamente por eosinofilia, encolhimento citoplasmático e picnólise, bem como presença de células inflamatórias no parênquima hepático, consistente com dano hepatocelular citopático. Estudos *in vitro* com hepatócitos humanos também evidenciaram esses processos⁽⁵⁰⁾. O pequeno antígeno delta (S-HDVag), expresso por hepatócitos infectados, foi identificado como responsável por este efeito citopático direto do HDV⁽⁵⁰⁾, enquanto o L-HDVAg mostrou não ser citotóxico. Sua atividade foi descrita como responsável pela persistência do HDV (cronicidade) e por tornar os hepatócitos suscetíveis a danos imunomediados. Modelos experimentais de marmotas provaram ser muito útil na ampliação do nosso conhecimento da patogênese da HDV e da cronicidade associada à superinfecção por HDV⁽⁵¹⁾, devido à grande semelhança entre os cursos da doença em modelos de marmota e o resultado de superinfecção por HDV em humanos. Os modelos também são inestimáveis para testar a eficácia protetora de novos tratamentos para o HDV, incluindo vacinas. Estudos sobre estes modelos experimentais revelaram que tanto a imunização proteica quanto a imunização de DNA para HDV são insignificantes na proteção contra a superinfecção por HDV ⁽⁵²⁾, destacando a necessidade de adotar diferentes abordagens para o desenvolvimento de uma vacina contra o HDV.

Figura 3 - Ciclo de replicação do vírus da Hepatite D.



Fonte: Abbas, Jafri e Raza ¹⁸

Foi observada variação nas respostas imunomediadas durante a infecção aguda e crônica por HDV ⁽⁵¹⁾, o que pode explicar a persistência e cronicidade na superinfecção por HDV. Os linfócitos T citotóxicos são os principais responsáveis pela eliminação do vírus, destruindo as células infectadas. Resposta imune insuficiente com capacidade de reconhecer apenas epítomos virais limitados foi implicada na falha em eliminar a infecção e no estabelecimento de infecção crônica. Falha na resposta imune foi observada em 1% dos pacientes coinfetados com HBV / HDV que evoluíram com hepatite fulminante, enquanto na superinfecção a incidência foi de 5%. Uma resposta imunológica exagerada, particularmente a mediada por células, parece estar envolvida com necrose hepatocítica maciça e dano hepático que evolui rapidamente para insuficiência hepática fulminante⁽⁵³⁾. A patogênese do HDV também é influenciada pela interação do HDV com o HBV ⁽⁴⁸⁾. Sabe-se que a infecção por HDV pode ocorrer tanto na forma de uma coinfecção como superinfecção. Uma coinfecção com HBV / HDV geralmente é autolimitada e frequentemente resulta em recuperação completa do indivíduo, enquanto que na superinfecção, o paciente frequentemente progride para

infecção crônica por hepatite D ⁽⁵⁴⁾. Pacientes com hepatite B crônica que desenvolvem superinfecção com hepatite D também podem evoluir rapidamente para insuficiência hepática aguda, com apresentação clínica de ascite e encefalopatia hepática.

2.5 INTERAÇÃO DE HBV-HDV

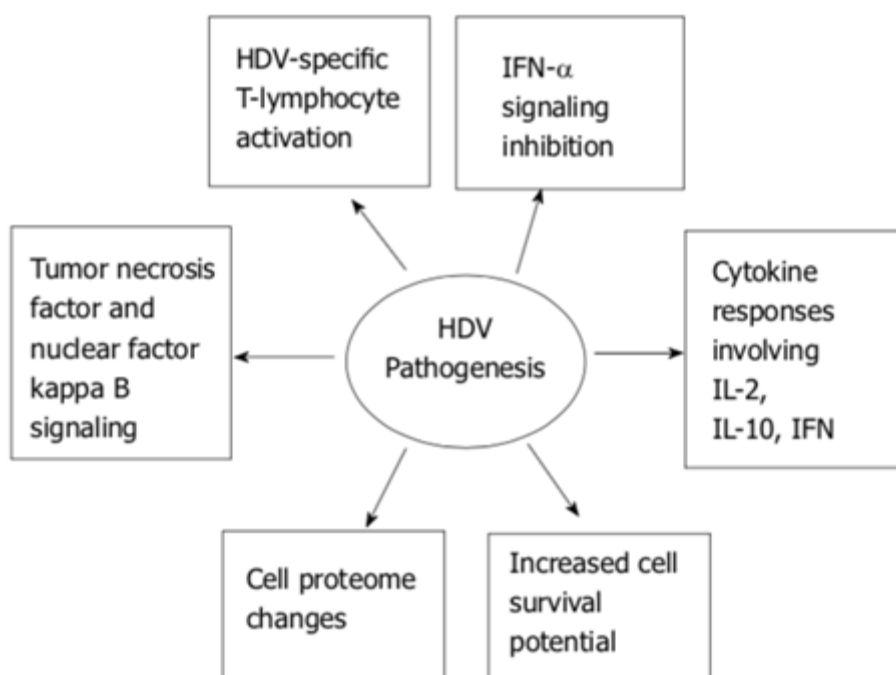
A coinfeção por HBV com outros vírus hepatotrópicos está associada a vários padrões de inibição recíproca de replicação. O HDV tem sido frequentemente relacionado à supressão da replicação do HBV ⁽⁵⁵⁾. O L-HDAg regula positivamente a transcrição da resistência ao mixovírus A, um mediador da resposta antiviral induzido pelo interferon que está envolvido na supressão da replicação do HBV. Portanto, autores sugerem que a doença hepática na superinfecção HBV / HDV se deve principalmente ao HDV ⁽⁸⁾. A infecção crônica pelo HBV / HDV causa mais doença hepática grave do que a monoinfecção por HBV isolada; a doença segue um curso rapidamente progressivo, levando à cirrose, descompensação hepática e carcinoma hepatocelular (HCC), com baixa expectativa de vida – em média, cinco anos mais curta ⁽⁵⁶⁾. A supressão da replicação do HBV por HDV não é sustentada durante todo o período da infecção, pois a resposta viral muda ao longo do tempo. Um estudo revelou replicação significativa do HBV em cerca de metade dos pacientes ⁽⁵⁷⁾. Assim sendo, do ponto de vista da evolução natural da doença, a hepatite D crônica é dividida em três fases:

- (1) fase ativa precoce, com replicação ativa do HDV e supressão da replicação do VHB;
- (2) fase intermediária, com decréscimo da replicação do HDV e reativação da replicação do HBV;
- (3) fase tardia, com o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular causados pela replicação de qualquer um dos vírus ou com remissão resultante da redução marcada da carga viral de ambos ⁽⁵⁸⁾.

2.6 INIBIÇÃO DE SINALIZAÇÃO DE INTERFERON ALFA

A patogênese do HDV envolve principalmente a inibição da sinalização do interferon- α (IFN- α)⁽⁵⁹⁾, resposta da ativação de linfócito T específico do HDV e citocinas⁽⁶⁰⁾, sinalização via fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator nuclear kappa⁽⁶¹⁾, modificações no proteoma celular e um aumento associado do potencial de sobrevivência celular⁽⁶²⁾ (Figura 4).

Figura 4 – Patogênese do vírus da hepatite Delta.



Fonte: Abbas, Jafri e Raza¹⁸

A sinalização de IFN- α pelas células infectadas pelo vírus, alertando as células vizinhas, – estado antiviral – é a primeira linha de defesa do hospedeiro para erradicar o vírus. A produção e excreção de IFN- α por células do sistema imune inato é induzido pelo RNA de cadeia dupla apresentado durante a replicação viral⁽⁶³⁾. Os INFs produzidos exercem efeito ligando-se aos receptores α e β -INF na superfície celular, resultando na ativação das tirosina cinases da família Janus Kinase (JAK), que por sua vez fosforila resíduos de tirosina dos fatores de transcrição no citoplasma, atuando como transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT). A ativação da sinalização via JAK / STAT estimula a expressão de genes de INF. Os genes estimulados por IFN- α

codificam, então, proteínas antivirais, ou seja, a resistência do Myxovirus A de cadeia dupla⁽⁶⁴⁾. O resultado da ativação das respostas imunes inata e adquirida ajuda a combater a infecção viral, mas, por alguma razão, isso não ocorre na infecção pelo HDV.

Como o HDV é composto por uma molécula de RNA de fita simples, não se espera que sua presença estimule a produção nem a excreção de $\text{INF-}\alpha$ ⁽⁶⁵⁾. Por outro lado, a sinalização para ativação de interferon alfa mostrou-se inibida pelo HDV ⁽⁵⁹⁾. O HDV previne a ativação da tirosina quinase-2 (tyr-2), fosforilação de STAT-1 e STAT-2 e sua translocação intranuclear para a expressão de genes induzidos por INF. Assim, acredita-se que o HDV inibe a ativação da via de sinalização JAK / STAT pelo $\text{INF-}\alpha$ e que esse processo pode estar implicado na persistência da infecção e falha do tratamento⁽⁵⁹⁾. O $\text{INF-}\alpha$ também é conhecido por estimular a enzima celular ADAR 1 e, portanto, aumentar a expressão de L-HDAg ⁽⁶⁶⁾. Essa insuficiência de sinalização de $\text{INF-}\alpha$ na infecção pelo HDV pode impedir uma produção precoce de L-HDAg e cessação da replicação viral. De acordo com o processo descrito acima, pode-se concluir que a inibição da sinalização de $\text{INF-}\alpha$ em um indivíduo infectado pelo HDV desempenha um papel central na falha do clearance viral e que o mesmo confere resistência ao tratamento com $\text{INF-}\alpha$. Babiker et al.⁽⁶⁷⁾ testaram um regime de tratamento antiviral composto por $\text{INF-}\alpha$, Tenofovir disoproxil fumarato e Lamivudina em um paciente com infecção aguda grave por HDV, alcançando supressão do RNA do HDV, após 16 meses de tratamento, juntamente com reduções significativas no DNA do HBV e níveis de AgHBs. Os regimes poupadores de interferon devem passar por mais ensaios clínicos para estabelecer sua eficácia no tratamento da hepatite D.

2.7 RESPOSTA IMUNE AO HDV

Já está estabelecido que a patogênese da lesão hepática na infecção pelo HDV não está vinculada ao efeito diretamente citopático do patógeno, mas a mecanismos imunomediados envolvidos. Respostas imunológicas celulares contra o HDV foram descritas ⁽⁶⁸⁾ sugerindo que a quantidade e a qualidade das respostas das células T podem estar associadas a algum controle da infecção. A frequência de células T CD4 + é maior em pacientes com HDV do que em indivíduos com HBV ou HCV ⁽⁶⁹⁾, e respostas de INF gama específicas de HDV e IL-2 são mais frequentes em pacientes

com baixa viremia de HDV ⁽⁷⁰⁾. Ainda assim, as respostas de células T específicas para o HDV são muito fracas na infecção crônica. In vitro, a estimulação de células de defesa com IL-12 foi capaz de restaurar a função de células T CD4 + e CD8 + específicas do HDV ⁽⁷¹⁾. Células NK de pacientes com HDV vêm sendo investigadas e comparadas com outras infecções por hepatites virais ⁽⁷¹⁾. No geral, as frequências de células NK aumentaram, mas as células foram menos ativadas e funcionalmente prejudicadas. A infecção por HDV também não alterou a diferenciação de células NK, e a atividade da doença hepática refletiu alterações na expressão do receptor de superfície celular nas células NK. A frequência de células NK também pode estar associada com a resposta virológica precoce à terapia com PEG-INF α , embora as células NK sejam severamente prejudicadas funcionalmente, durante a terapia antiviral ⁽⁷²⁾. Coletivamente, esta informação sugere que o HDV é principalmente uma doença imunomediada, pelo menos, na infecção pelo genótipo 1 do HDV. Idealmente, as terapias antivirais devem, portanto, também visar o aumento da imunidade anti-HDV para conferir controle de longo prazo da infecção ⁽⁷³⁾.

2.7.1 Papel das citocinas na infecção pelo HDV

A patogênese do HDV envolve a ativação de um clone de células T auxiliares específicas de HDV que, por sua vez, expressam citocinas, principalmente interleucina-2 (IL-2), receptor de IL-2, IL-10 e INF- γ (60). A IL-2 estimula a proliferação de células T citotóxicas específicas para HDV. Células T citotóxicas destroem células infectadas pelo vírus, enquanto as células T auxiliares ativadas sob a influência da IL-2 se diferenciam em células do subtipo Th-1 e, especificamente, secretam IFN- γ .

Na infecção pelo HDV, as células T mostraram produzir uma grande quantidade de INF- γ ⁽⁷⁴⁾ que ativa macrófagos fagocíticos e promove up-regulation da expressão de proteínas de MHC de classe-II nas superfícies celulares. Assim sendo, o INF- γ pode inibir a replicação viral diretamente ou a partir de imunomodulação e efeitos imunoestimuladores⁽⁶⁰⁾. O INF- γ também estimula a secreção de proteína-10 induzida por INF- γ (CXCL-10), uma quimiocina que recruta células assassinas naturais (células NK), células T, macrófagos / monócitos e células dendríticas para destruir células infectadas com o HDV e, conseqüentemente, promover clearance viral à custa de infiltrado inflamatório que causa dano hepático⁽⁷⁵⁾. Também é postulado que na hepatite

D crônica a produção de $\text{INF-}\gamma$ pelas células T auxiliares de perfil Th-1 induz a expressão de proteínas de MHC de classe-II pelos hepatócitos na tentativa de aumentar a capacidade de eliminação da infecção ⁽⁷⁶⁾. Isso pode estar associado à necrose hepática grave e aumento da gravidade da hepatite em pacientes infectados pelo HDV, pois hepatócitos não infectados expressando proteína MHC-II também serão reconhecidos e mortos por células T auxiliares e células T citotóxicas. Nisini et al.⁽⁷⁷⁾ estudaram a especificidade de epítomos de HDVAg para identificar epítomos imunogênicos de HDVAg que poderiam ser usados para gerar uma vacina para a profilaxia da infecção pelo HDV ⁽⁷⁶⁾. Além disso, dois estudos identificaram baixo grau de heterogeneidade no AgHD que encoraja o desenvolvimento de uma vacina utilizando estas sequências imunogênicas de AgHD ⁽⁷⁸⁾. Os resultados do estudo de Nisini et al.⁽⁷⁷⁾ também sugeriram que a resposta das células T específicas de AgHD no sangue periférico de indivíduos infectados pelo HDV está associada a replicação do HDV e desaparecimento de IgM anti-HDV com a consequente redução da atividade da doença hepática induzida pelo HDV ⁽⁷⁷⁾. Em suma, uma resposta imunológica vigorosa envolvendo resposta específica de células T e morte citotóxica de células infectadas pelo HDV resulta tanto na depuração viral quanto na lesão hepática aumentada.

2.8 ASPECTOS CLÍNICOS E EVOLUTIVOS

Os aspectos clínicos e evolutivos da infecção pelo HDV divergem de outros vírus hepatotrópicos. Na infecção simultânea HBV + HDV (coinfecção aguda), este último provoca interferência viral e inibe a síntese do HBV. Portanto, a coinfecção aguda B e D se apresenta como hepatite aguda recidivante, de curso clínico bifásico, com dois picos séricos das aminotransferases. Tal padrão recidivante ocorre com maior frequência do que na clássica hepatite aguda B e relaciona-se à expressão sequencial dos vírus B e D ⁽⁷⁹⁾. Na maioria dos casos, o quadro clínico da coinfecção aguda HBV + HDV evolui com hepatite aguda benigna. Excepcionalmente, a síntese do HDV torna-se intensa, soma-se aos efeitos ocasionados pelo HBV e leva a formas fulminantes e crônicas de hepatite⁽⁸⁰⁾. O prognóstico da coinfecção B e D mostra-se benigno, ocorrendo completa recuperação e eliminação dos vírus B e D em até 95% dos casos⁽⁸⁰⁾.

Na superinfecção pelo VHD em portadores do AgHBs sintomáticos ou assintomáticos, com ou sem sinais sorológicos de replicação do HBV, o prognóstico

revela-se mais grave. Entre os portadores do AgHBs, o HDV encontra nos hepatócitos antigenemia pré-existente do HBV, condição ideal para que o vírus D inicie replicação intensa, explosiva e, em consequência, produza grave dano hepático⁽⁸⁰⁾. Independentemente da gravidade da superinfecção pelo HDV, não há diferenças clínicas e bioquímicas distintas da hepatite aguda pela coinfeção VHB+VHD⁽⁸⁰⁾. Contudo, o prognóstico revela-se bem diferente e, na superinfecção, o índice de cronicidade torna-se significativamente maior (79,9%) do que na coinfeção (3%) ou na clássica hepatite B. Em adultos, portadores do AgHBs e infectados pelo HDV, o período de progressão para a cronicidade varia de dois a seis anos. Em crianças, a evolução para a cronicidade ocorre mais rapidamente⁽⁸⁰⁾. Nos pacientes com doença hepática crônica pelo HBV pré-existente, a superinfecção pelo HDV agrava o quadro clínico, bioquímico e histológico. A participação do HDV na oncogênese hepática tem sido sugerida, mas a associação do HDV ao hepatocarcinoma não parece ser frequente. Entretanto, a superinfecção pelo HDV em crianças e jovens portadores do HBV pode acelerar a evolução para cirrose hepática e, conseqüentemente, representar risco para o desenvolvimento de hepatocarcinoma. No Brasil, apesar da infecção ocorrer em jovens, não se observou prevalência significativa do vírus Delta no carcinoma hepático⁽⁸¹⁾. Em regiões tropicais, as formas fulminantes de hepatite, geralmente acometendo crianças e adultos jovens, apresentam características histopatológicas diferentes dos padrões clássicos (necrose hepática maciça), como relatado no norte da América do Sul⁽⁸²⁾ e na África⁽⁸³⁾. Só ocasionalmente, em países desenvolvidos, observa-se esta mesma forma peculiar de hepatite fulminante Delta⁽⁸⁰⁾. Na forma fulminante de hepatite D, de ocorrência nos países tropicais, observa-se no tecido hepático a presença marcante de necrose eosinofílica, esteatose microvesicular (células em mórula) e a presença do AgHD no núcleo dos hepatócitos⁽⁸²⁾. Mais tarde, observou-se que tal padrão histopatológico não era patognomônico da superinfecção pelo HDV, podendo ocorrer também nas formas fulminantes de hepatite, seja por coinfeção aguda VHB+VHD ou por outros vírus hepatotrópicos, tais como os vírus das hepatites A, B e C⁽⁸⁴⁾. Atualmente, sugere-se que a evolução e o prognóstico da infecção pelo HDV dependem essencialmente dos genótipos virais, tipos 1 a 8, com especial importância do genótipo 3⁽⁸⁵⁾.

2.9 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HDV

Um resultado positivo para anti-HDV não indica necessariamente uma infecção ativa, pois o RNA do HDV pode se tornar negativo, indicando recuperação da infecção pelo HDV. Além disso, em longo prazo, os anticorpos anti-HDV podem ser perdidos após a recuperação de HDV. No entanto, o anti-HDV pode persistir por anos, mesmo quando o paciente experimentou a soroconversão do AgHBs e o anti-HDV permanece detectável na maioria dos pacientes, mesmo após o transplante hepático, quando o AgHBs e o RNA do HDV são eliminados⁽⁸⁶⁾.

O HDV replicativo ativo deve ser confirmado pela detecção de RNA do HDV. Se o RNA do HDV for positivo, a avaliação subsequente da classificação e estadiamento da doença hepática, a vigilância do carcinoma hepatocelular e a consideração do tratamento antiviral estão indicadas. A quantificação do RNA do HDV é oferecida por alguns laboratórios. No entanto, até o momento não há evidências consistentes de que os níveis de RNA do HDV estejam fortemente correlacionados com marcadores histológicos de doença hepática⁽⁸⁷⁾, embora altos níveis de RNA do HDV possam ser preditivos de desenvolver cirrose e CHC em longo prazo⁽⁸⁸⁾. Outro estudo recente sobre a infecção pelo genótipo 3 do HDV também mostrou uma associação entre os níveis de RNA do HDV e os níveis séricos de enzimas hepáticas⁽³⁾. A quantificação do HDV-RNA é útil, em particular, se o tratamento antiviral for indicado. As regras de parada durante o tratamento antiviral, dependendo do nível de declínio da carga viral, estão sendo avaliadas atualmente. Foi estabelecido um padrão da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o HDV que permite comparar o desempenho de vários ensaios de PCR, publicados nos últimos anos⁽⁸⁶⁾.

Mesmo os ensaios comerciais podem mostrar um desempenho limitado na detecção e quantificação do RNA do HDV⁽⁸⁹⁾. Um estudo internacional de avaliação da qualidade envolvendo 28 laboratórios revelou globalmente uma heterogeneidade muito alta das características do ensaio⁽⁹⁰⁾. Menos da metade dos laboratórios quantificaram todas as amostras positivas para RNA-HDV e relataram valores quantitativos variados em grande parte entre os laboratórios.

A genotipagem do HDV é realizada por alguns laboratórios de pesquisa e pode ajudar a identificar pacientes com maior ou menor risco de desenvolverem doença hepática terminal⁽⁹¹⁾. Em países de alta renda, quase todos os pacientes estão infectados

com o genótipo 1 do HDV. Portanto, a genotipagem pode ser considerada principalmente em imigrantes ou populações com prevalência de genótipos mistos.

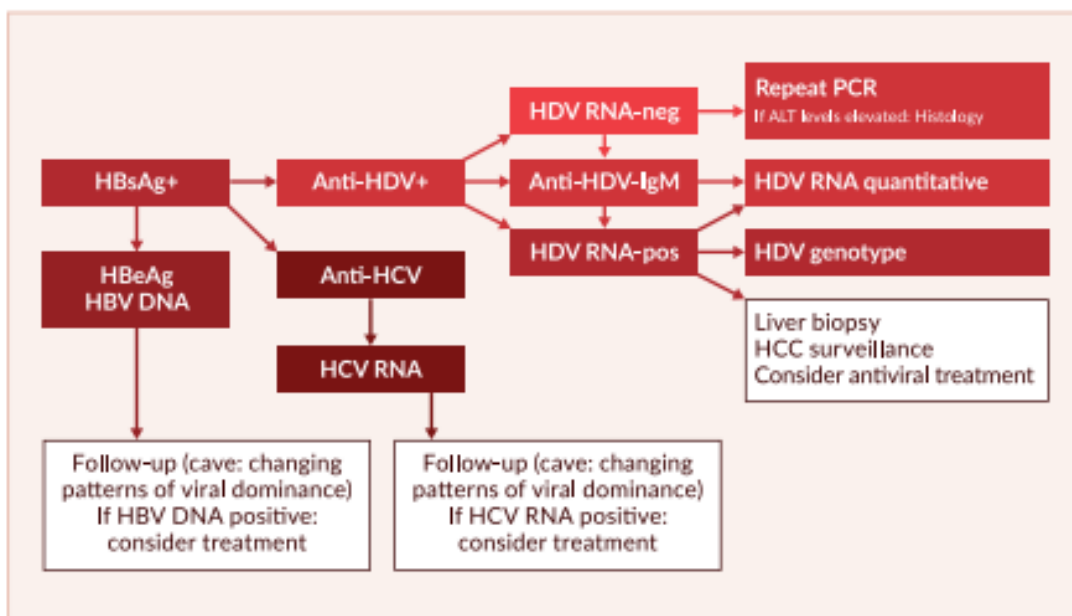
Durante as décadas de 1980 e 1990, o diagnóstico de HDV ativo foi dependente do teste IgM anti-HDV. O teste IgM anti-HDV pode ainda ser útil em pacientes que testam o HDV RNA negativo e têm evidências de doença hepática que não podem ser explicadas por outras razões. Devido à variabilidade do genoma do HDV e falta de padronização dos ensaios de RNA do HDV, o RNA do HDV pode testar um falso negativo ou estar abaixo do limite de detecção do ensaio, no caso de carga viral flutuante. Nestes casos, o teste de RNA de HDV deve ser repetido e o teste de IgM anti-HDV pode ser realizado, se disponível. Os níveis de IgM anti-HDV também se correlacionam com a atividade da doença e podem ser preditivos de resposta à terapia antiviral baseada em IFN α ⁽⁸⁶⁾.

Como o HDV ocorre apenas no contexto da co-infecção pelo HBV, uma investigação sólida da infecção pelo HBV, incluindo a quantificação do HBV – DNA e a determinação do AgHBe / anti-HBe, é justificada. Aproximadamente 10% a 20% dos pacientes com HDV são AgHBe positivos. É digno de nota que o DNA do HBV é suprimido, mesmo na hepatite AgHBe positiva ⁽⁸⁶⁾, sugerindo que o efeito inibitório do HDV no HBV é independente da fase da infecção pelo HBV. O resultado clínico, em longo prazo, de pacientes positivos para anti-HDV não diferiu entre os indivíduos AgHBe positivos e AgHBe negativos em um estudo da Alemanha⁽⁹²⁾. A maioria dos pacientes com HDV na Europa está infectada com o genótipo D do HBV, mas também pode ocorrer infecção com o genótipo A ⁽⁹³⁾, que pode ter implicações significativas nas decisões do tratamento, pois o HBV genótipo A apresenta uma resposta melhor à terapia com interferon α , confirmada no contexto da coinfeção por HDV. Da mesma forma, o teste de anti-HCV e anti-HIV é obrigatório. Até um terço dos pacientes positivos para o anti-HDV também podem testar positivo para anti-HCV ⁽⁸⁶⁾.

Os níveis quantitativos de AgHBs correlacionam-se com os níveis de RNA do HDV na infecção pelo HDV ⁽⁹⁴⁾. Níveis mais altos de AgHBs também podem indicar uma atividade histológica mais grave⁽⁹⁵⁾. Assim, a determinação quantitativa dos valores de AgHBs também tem alguma relevância clínica em pacientes com HDV. A monitoração dos níveis quantitativos de AgHBs deve ser realizada em todos os pacientes submetidos a terapias antivirais, uma vez que a terapia de longo prazo com interferon em pacientes com HDV deve ser individualizada, até que o AgHBs negativo⁽⁹⁶⁾. O estadiamento da doença hepática é de particular importância na infecção

pelo HDV, pois as opções de tratamento são limitadas e, como única terapia possível, o interferon α pode levar a efeitos colaterais frequentes e, por vezes, graves. A figura 5 mostra o fluxograma para diagnóstico da infecção pelo HDV e do acompanhamento de pacientes infectados.

Figura 5 - Fluxograma para o diagnóstico da infecção pelo VHD



Fonte: wedemeyer,2018

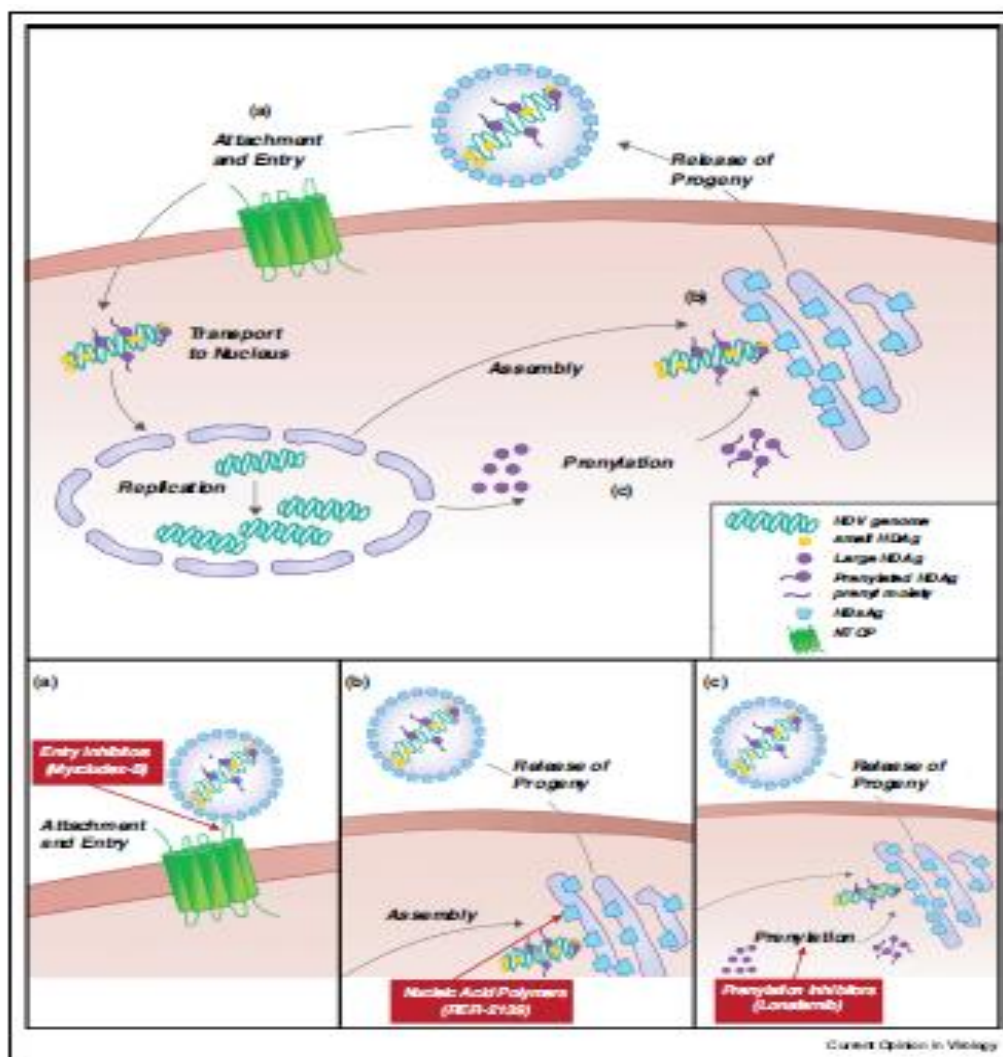
2.10 AVALIAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE NA INFECÇÃO POR HDV

Vários escores não invasivos (APRI, FIB-4 ou relação AST / ALT), que utilizam marcadores séricos, foram desenvolvidos para prever fibrose hepática e cirrose na hepatite C (HCV), hepatite B (HBV) e esteatose hepática não alcoólica (NASH). Os mesmos devem ser usados com cautela na infecção pelo HDV, pois eles têm valor limitado no estadiamento de pacientes com hepatite D ⁽⁹⁷⁾. Foi proposto um novo escore, especificamente desenvolvido para o HDV, baseado na colinesterase sérica, gama glutamil transferase, albumina e idade: o FDS, validado em pacientes europeus ⁽⁹⁷⁾. Este escore certamente deve ser testado em pacientes não europeus e outros genótipos de HDV, além do genótipo 1.

2.11 FORMAS DE TRATAMENTO DA HEPATITE DELTA

Até o momento, as opções de tratamento para o HDV têm dado resultados pouco satisfatórios. Os estudos de biologia molecular do HDV têm apontado uma variedade de candidatos a novos alvos para intervenção antiviral (98). As novas terapias potenciais em desenvolvimento para o tratamento do HDV têm procurando inibir um aspecto diferente do ciclo de vida do vírus. A figura 6 mostra o ciclo de replicação do HDV e as principais medicações em teste nos grandes centros de Hepatologia no mundo.

Figura 6 – Ciclo de vida do HDV (painel superior) e local de ação dos novos agentes de ação seletiva em desenvolvimento. (a) Inibidores de entrada (b) classe de inibidores de ácidos nucléicos e (c) inibidores da prenilação.



Fonte: wedemeyer, 2017

O Myrcludex B age inibindo a entrada do HDV no hepatócito. O Polipeptídeo co-transportador de sódio-taurocolato humano (hNTCP) foi identificado como receptor específico para entrada de HBV e HDV nos hepatócitos ⁽⁹⁹⁾. A descoberta do peptídeo miristoil, composto por 48 aminoácidos na porção N terminal da proteína L-AgHbs, que inibe a entrada do HBV e do HDV in vitro ⁽¹⁰⁰⁾ e in vivo ⁽¹⁰¹⁾ via inibição da interação de L-HBsAg viral com hNTCP, foi particularmente importante. Este peptídeo, denominado Myrcludex B (Myr), está sendo testado em pacientes infectados com HDV através da administração por injeção subcutânea. Tecnicamente, ele age como um inibidor da entrada do HBV e HDV no hepatócito. No HIDIT-2, um estudo piloto, 24 pacientes com RNA-HDV sérico baixo (média de 104 cópias / ml) foram tratados por 24 semanas com Myr exclusivo, 24 pacientes foram tratados com Myr em combinação com interferon alfa peguilado padrão (peg IFN- α) e um grupo controle foi tratado só com peg IFN- α . Todos os pacientes receberam posteriormente tratamento adicional com peg IFN- α isolado por um total de 48 semanas. O endpoint primário do ensaio clínico foi uma diminuição dos níveis de AgHbs, que não foi observada. Não houve alterações estatisticamente significantes após 24 semanas, quando os grupos foram comparados⁽¹⁰²⁾.

Os NAPs (Polímeros de ácido nucleico), representados por REP2055 e REP2139-Ca, são ácidos nucleicos de fosforotioato de polímeros de cadeia simples que exercem atividade antimicrobiana de amplo espectro ⁽¹⁰³⁾. Estudos iniciais descreveram o mecanismo de ação dessas moléculas contra o HIV-1, atribuindo-lhe o papel de inibidor de entrada viral na célula ⁽¹⁰⁴⁾. Mais tarde, foi sugerido que a atividade dos NAPs é mediada pela interação dos lados hidrofóbicos dos NAPs com trechos anfipáticos, dentro de proteínas de vários patógenos ⁽¹⁰⁵⁾. Dois ensaios clínicos (REP101 e REP102) foram projetados para testar a atividade dos NAPs em pacientes infectados pelo HBV ⁽¹⁰⁶⁾. Dentro do ensaio clínico REP101 foi observada redução de 2 a 7 log nos níveis de AgHbs em 7/8 dos doentes tratados com REP2055 intra venoso semanal, por 40 semanas, com a maioria dos pacientes mostrando diminuição concomitante nos níveis de DNA do HBV entre 3 a 10 log. No estudo REP102, o REP2139-Ca – derivado do REP2055 projetado para aumentar a tolerabilidade à droga pelo paciente – foi administrado por 40 semanas. Nove pacientes, entre os 12 observados, apresentaram uma redução de 3 a 7 log nos níveis séricos de AgHbs, com 3 destes tornando-se indetectáveis para AgHbs. Os resultados obtidos nestes estudos sugeriram a realização de testes de NAPs para o tratamento de pacientes infectados com HDV. De fato,

recentemente, o ensaio REP301 foi realizado com 12 pacientes coinfectados HBV /HDV. Eles receberam 500 mg intravenosa a cada semana, durante 15 semanas, seguidas de 250 mg, por mesma via, por mais 15 semanas, associado com pegIFN- α . Este último foi então continuado por um total de 48 semanas. 4/12 (33%) dos pacientes apresentaram impressionantes quedas nos níveis séricos de AgHBs (até 5 logs) na semana 15, que foi acompanhada por indetectabilidade de RNA - HDV ⁽¹⁰⁷⁾. 5/12 (42%) dos doentes, no entanto, permaneceram positivos para o RNA-HDV logo após a interrupção do IFN⁽¹⁰⁸⁾. A terapia causou efeitos colaterais, como perda de cabelo, disfagia e disgeusia. Enquanto estes resultados parecem promissores, várias questões ainda precisam ser elucidadas. Os resultados também mostraram níveis de AgHBs no fígado, devido à inibição de sua secreção⁽¹⁰⁸⁾. O destino metabólico dos NAPs acumulado no tecido hepático também precisará ser mais bem estudado.

O Lonafarnib é um inibidor de prenilação que atua durante a montagem do vírus. A prenilação do antígeno L do HDV (HDLAg) pelo farnesil prenil lipídico é essencial para a produção de partículas HDV (111) e os inibidores da farnesiltransferase (FTIs) se mostraram altamente eficazes em modelos animais, *in vitro*⁽¹⁰⁹⁾ e *in vivo* ⁽¹¹⁰⁾, no controle da replicação do HDV. O FTI é uma pequena molécula administrada via endovenosa. Em um ensaio clínico, mais de 100 pacientes infectados com HDV receberam a droga por 4 semanas. Os resultados demonstraram uma queda na média do RNA-HDV no soro dos pacientes ⁽¹¹¹⁾. O estudo LOWR HDV-2 procurou determinar combinações ideais de Lonafarnib com Ritonavir em doses a serem usadas por longos períodos. Observou-se que o grupo que recebeu doses altas teve efeitos colaterais significativos. Os regimes posológicos testados foram geralmente bem tolerados ⁽¹¹²⁾. Isso levou os pesquisadores a investigar a eficácia da droga administrada em dose mais baixa, com tempo de tratamento aumentado para 24 semanas. Pacientes do grupo que recebeu doses mais baixas de LNF normalizaram os níveis de ALT na 24^a semana de tratamento. Aproximadamente 20% dos pacientes que tinham RNA-HDV detectável, após receberem LNF por 12 ou 24 semanas, nos ensaios clínicos LOWR HDV-1 e LOWR HDV-2, e que foram acompanhados por, pelo menos, 24 semanas, normalizaram os níveis de ALT e negativaram RNA-HDV. Os resultados foram acompanhados por uma supressão concomitante do HBV, sugerindo que a terapia com LNF pode contribuir para uma reativação imunológica contra o HDV ⁽¹⁰²⁾.

Todos os fármacos acima descritos ainda estão sendo testados em ensaios clínicos conduzidos por grandes centros de Hepatologia do mundo. O Peg IFN-alpha

ainda é o único medicamento comercializado com atividade contra o HDV, porém com resultados pouco satisfatórios, como demonstrado nos dois maiores ensaios clínicos realizados até o momento (HIDIT-1 e HIDIT-2) ⁽¹¹⁴⁾.

O peg INF- α mostrou-se associado a um largo espectro de efeitos colaterais. Como a infecção pelo HDV é restrita ao fígado, o INF- λ (Interferon Lambda ou Interferon tipo III) representa uma alternativa atraente, já que os receptores do interferon tipo III são menos distribuídos no organismo do que os INF- α , mas são altamente expressos nos hepatócitos ⁽¹¹³⁾. Todos os ensaios clínicos descritos acima estão abrindo uma nova era na terapêutica da infecção pelo HDV. Os pacientes poderão ser tratados com medicamentos que tenham efeitos diretos sobre o vírus. À medida que os vários medicamentos em desenvolvimento para tratamento do HDV têm sua segurança e eficácia comprovadas, abre-se a possibilidade de uma terapia combinada no futuro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Estudo do tipo descritivo, comparativo e analítico de pacientes coinfectados com o HBV e vírus Delta, genótipos 1 e 3, naives, recrutados em dois centros de referência, um em Rondônia - Brasil e o outro em Hanover - Alemanha. Para cumprimento de todos os objetivos, uma plataforma de estudo *in vitro* foi desenvolvida e utilizada em concomitância com os demais procedimentos metodológicos.

Foram selecionados pacientes coinfectados com os vírus da Hepatite B e Delta, sem tratamento, de ambos os sexos e com idade superior a 18 anos. Pacientes com coinfeção por HCV, HTLV I e II e/ou HIV I e II ou com doenças autoimunes ou reumatologias associadas que pudessem influenciar no perfil sérico e/ou plasmático de citocinas foram excluídos do estudo. Todos os participantes selecionados foram avaliados clinicamente por meio de coleta de dados no prontuário médico e submetidos à investigação complementar, constando de exames hematológicos, bioquímicos, imunológicos, sorológicos e virológicos. Após esta investigação, os pacientes foram alocados em dois grupos:

- i) Grupo A – composto por indivíduos infectados pelo HDV-G1;
- ii) Grupo B – composto por indivíduos infectados pelo HDV-G3.

Para o grupo controle foram selecionados quatro indivíduos saudáveis que apresentavam sorologias negativas para o HBV, o HDV e para as demais infecções/doenças elencadas como critério de exclusão.

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil e todos os procedimentos necessários foram realizados respeitando as exigências éticas. Os convidados foram informados dos objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), elaborado especialmente para esse fim. Os dados clínicos dos pacientes foram mantidos sob sigilo, com acesso restrito ao grupo de pesquisa.

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Uma amostra de conveniência foi utilizada nessa casuística. Os participantes foram selecionados dentre pacientes coinfectados com os vírus B e Delta, naives, atendidos e acompanhados no Centro de Referência em Hepatites Virais de Rondônia - Brasil e no Hospital Universitário de Hanover - Alemanha. Foram recrutados 181 pacientes: 120 coinfectados com HBV/HDV genótipo 1 e 61 coinfectados com HBV/DHV genótipo 3. Quatro voluntários saudáveis foram alocados no grupo controle.

3.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL E CLÍNICA DOS PARTICIPANTES

Foram feitas coletas de 10 ml de sangue periférico em todos os participantes da pesquisa. O procedimento foi realizado com uso de tubo heparinizado (5 ml de sangue) e tubo contendo EDTA (5 ml de sangue) para quantificação de moléculas inflamatórias sistêmicas (SIMs), quantificação da carga e genotipagem viral e exames bioquímicos. Alíquotas das amostras coletadas no Centro de Referência em Hepatites Virais de Rondônia foram processadas e o soro enviado para a Escola Médica de Hannover para realização da dosagem dos níveis de SIMs, juntamente com as amostras de pacientes acompanhados naquele centro. Não houve armazenamento de amostras para futuras investigações. Após as análises propostas nesse estudo, o material restante (quando houve) foi inutilizado e descartado de acordo com as normas internacionais para descarte de material biológico.

3.3.1 Exames hematológicos e bioquímicos

Os dados de exames hematológicos e bioquímicos de pacientes já em acompanhamento foram obtidos nos prontuários médicos, quando disponíveis, ou através de análises realizadas no Centro de Referência em Hepatites Virais de Rondônia e no Hospital Universitário de Hanover. Os exames sorológicos e quantificação da carga viral do HBV-DNA e do Delta Vírus foram realizados no Centro de Referência em Hepatites Virais do Hospital Universitário de Rondônia (para pacientes atendidos nessa unidade) e no Hospital Universitário de Hanover (para os pacientes atendidos naquela unidade).

Os testes diagnósticos das infecções pelo HBV e HDV foram realizados por meio de ensaios imunoenzimáticos (EIE), tipo ELISA, com kits comerciais. Todas as amostras foram testadas para a presença de AgHBs (Organon Teknika Holanda), anti-HBc (Organon Teknika, Holanda) e anti-HBs (Abbott, EUA). Nas amostras positivas para o AgHBs efetuou-se a pesquisa do AgHBe, anti-HBe, anti-HBc IgM e anti-HDV (Organon Teknika, Holanda).

3.3.2 Genotipagem do DNA do VHB e Vírus Delta

Os dados de genotipagem viral dos participantes acompanhados no Hospital Universitário de Hanover foram obtidos em prontuário médico ou, quando ausentes, através do sequenciamento dos genes. Não há dados de genotipagem do HBV dos pacientes acompanhados no Centro de Referência em Hepatites Virais do Hospital Universitário de Rondônia. O HBV-DNA foi quantitativamente rastreado utilizando kits comerciais do laboratório Roche (Cobas Amplicor HBV Monitor Test Suíça), que se baseia na amplificação e hibridação do DNA viral. A detecção e quantificação do HDV-RNA foi realizada pela técnica de RT-PCR semi-nested, de acordo com a metodologia descrita por Casey et al. (1996). A genotipagem do RNA do HDV foi realizada usando a metodologia RFLP. Nessa tecnologia, o produto amplificado obtido é digerido com a enzima de restrição Sma I (Invitrogen Life Technologies), a partir da seguinte reação: 5µL do produto de PCR são incubados durante 2 horas a 37°C com 5U de enzima de restrição. Esta técnica permite a detecção específica de produtos de PCR para os genótipos 1, 2 e 3 do HDV ⁽¹⁵⁾.

3.4 INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS NK E HEPATÓCITOS INFECTADOS COM HDV

Foi desenvolvida plataforma de experimento *in vitro* específico para esse estudo no Laboratório de Hepatologia e Endocrinologia da Escola Médica de Hanover. O primeiro passo do protocolo consistia na preparação de coculturas de Células assassinas naturais (NK Cells) e Hepatócitos. Para tanto, células NK foram isoladas do sangue de voluntários saudáveis, utilizando protocolos desenvolvidos pela equipe (apêndice C). A fenotipagem celular da cultura, bem como a aquisição e quantificação da excreção de citocinas foram realizadas por Citometria de Fluxo.

3.5 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE MOLÉCULAS INFLAMATÓRIAS SISTÊMICAS

Noventa e duas moléculas inflamatórias sistêmicas (SIMs) foram medidas pela tecnologia de Ensaio de Extensão de Proximidade (PEA) (Ensaio Proseek Multiplex Inflammation I). O kit Multiplex Inflammation I demonstrou ter alta reprodutibilidade e repetibilidade, com coeficientes médios de variação inter e intra-ensaio de 7% e 18 %, respectivamente. A análise de dados seguiu um procedimento de normalização. Para cada ponto de dados, os valores delta Cq foram obtidos subtraindo o valor do controle de extensão. A normalização entre as execuções foi realizada por subtração do controle para cada ensaio. Os valores foram então ajustados em relação a um fator de correção determinado por protocolo da Companhia Olink para obter expressão proteica normalizada (NPX). Os dados foram finalmente expressos como 2NPX. Isto proporcionou uma expressão proteica relativa, em que um valor elevado de determinada proteína corresponde a uma concentração também elevada da mesma proteína em sangue periférico.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os procedimentos acima descritos fazem parte do escopo do estudo. As análises foram feitas em três etapas:

1. Na primeira etapa, foram comparados os parâmetros clínicos, epidemiológicos e os níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas (SIMs) entre o grupo de pacientes infectados com HDV, genótipos 1 e 3. Para essa análise, quatro pacientes saudáveis foram alocados no grupo controle. Assim, os pacientes foram distribuídos em três grupos: HDV- G3, HDV – G1 e Grupo Controle, com 61, 120 e 04 indivíduos respectivamente, totalizando 185 amostras. O material biológico analisado dos pacientes infectados com HDV-G1 e do grupo controle foi plasma, enquanto que, dos pacientes infectados com HDV-G3 foi utilizado soro. A fim de evitar vieses na análise, realizou-se uma compensação prévia dos valores das SIMs dosadas, seguindo protocolo do fabricante do kit (Apêndice D). Isso possibilitou a comparação real entre os três grupos. Observou-se que das 92 moléculas inflamatórias sistêmicas dosadas, 22 apresentaram inconsistência em seus dados (medidas negativas). Então, estas variáveis foram

excluídas. Para as análises estatísticas desta etapa foram utilizados *softwares* e ferramentas estatísticas suplementares: PSPP, PHstat2, Action e Past3. Realizado o teste Kolmogorov Smirnov para a normalidade dos dados, verificou-se que 51 das 70 variáveis seguiam distribuição aproximadamente normal. Como algumas das variáveis estudadas não atenderam aos pré-requisitos para a realização da análise de variância (normalidade e homogeneidade), e ainda o grupo controle possuía um $n=04$ ($n<30$), foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis para comparação entre os 03 grupos. O teste Kruskal Wallis revelou apenas a existência de diferença entre os grupos nas variáveis em estudo. Foi necessário, então, a realização de teste *Post Hoc* para descobrir onde essas diferenças se encontravam. Para tanto, foi utilizado o método de Simes-Hochberg de comparação intergrupos.

2. Na segunda etapa, foram analisados apenas os pacientes infectados com HDV – G3, divididos em dois grupos: pacientes com estágio avançado de fibrose e pacientes com fibrose mínima ou sem fibrose, identificados pelo critério internacional de classificação METAVIR score. Para a análise descritiva, as variáveis quantitativas foram representadas por suas médias e desvios-padrão, quando suas distribuições eram normais, e por medianas e interquartiles, quando não normais. A definição de normalidade foi feita por meio de análise gráfica e teste de Shapiro-Wilk. As variáveis categóricas foram representadas por frequências e porcentagens. Comparações bivariadas entre os grupos foram feitas usando o teste t de Student, para variáveis de distribuição normal, e o teste de Mann-Whitney, para variáveis de distribuição não normal. Foi realizada análise de regressão logística. Variáveis independentes para o modelo final foram selecionadas via backwise stepwise.

3. Por fim, analisou-se *in vitro* a ativação de células NK e a produção de citocinas pelas mesmas, em co-cultura com hepatócitos da linhagem Huh7.5. Os resultados descritivos foram obtidos com uso do *software Flow Jo* para graficação e comparação.

Têm-se algumas limitações nesse estudo. Primeiro, apenas um patologista avaliou as amostras de tecido hepático dos participantes, não sendo possível comparar diferentes análises do mesmo material. Segundo, a fisiopatologia do HDV-G3 ainda é pouco conhecida e há poucos estudos imunológicos realizados com pacientes infectados com esse genótipo, impossibilitando a comparação dos resultados dessa casuística com outros. Terceiro, foi analisado um grande número de moléculas inflamatórias sistêmicas de forma inédita e algumas não puderam ser avaliadas por motivos técnicos (os pontos de corte para leitura não foram atingidos). Por fim, a genotipagem do HBV, apontado

por diversos estudos anteriores como relevante para a compreensão da evolução clínica dos pacientes com hepatite Delta, não foi realizada nos pacientes infectados com o HDV-G3.

4 RESULTADOS

Apresentam-se, a seguir, os três artigos elaborados em coautoria, tratando do objeto dessa pesquisa.

O primeiro comparou os níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas em indivíduos infectados com HDV-G1 e G3.

O segundo artigo aprofundou a investigação dos parâmetros clínicos, histológicos e imunológicos de pacientes infectados com HDV-G3.

O terceiro avaliou, *in vitro*, a ativação de células do sistema imune inato, durante a infecção de hepatócitos com partículas do HDV.

4.1 ARTIGO 1

HDV-G3 induz resposta inflamatória mais exacerbada na hepatite Delta crônica

Maurício de Souza Campos^{1,2,3}
Juan Miguel Salcedo⁴
Deusilene Vieira⁴
Luan Felipe Botelho⁴
Birgit Bremer⁵
Julia Hengst⁵
Raymundo Paraná^{1,2}
Heiner Wedemeyer⁶
Maria Isabel Schinoni^{1,2,3}

Introdução: A infecção pelo vírus da hepatite Delta (HDV) é descrita como a forma mais grave de hepatite viral humana. O HDV-G3, descrito como o genótipo mais divergente e agressivo, é encontrado exclusivamente na América do Sul, especificamente na bacia amazônica ocidental. Estudos têm indicado que variações nas respostas imunomediadas durante infecção aguda e crônica por HDV podem explicar a persistência e cronicidade na superinfecção, mas até o momento, não há estudos comparando os níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas durante a infecção por genótipos distintos de HDV. **Objetivos:** Investigar possíveis associações entre o HDV – G3 e a montagem de uma resposta imunológica mais exacerbada que na infecção pelo HDV-G1. **Métodos:** Estudo do tipo descritivo, comparativo e analítico de pacientes coinfectados com o HBV e vírus Delta genótipos 1 e 3 sem tratamento. 92 moléculas inflamatórias sistêmicas (SIM) foram medidas pela tecnologia de Ensaio de Extensão de Proximidade (PEA) (ensaio Proseek Multiplex Inflammation I). Para as análises estatísticas foram utilizados os software PSPP, PHstat2, Action e Past3. Análise de regressão logística foi utilizada quando apropriado. **Resultados:** Ambos os grupos foram semelhantes em termos de distribuição de gênero e idade média. Os níveis de Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) mostraram-se divergentes entre os grupos estudados. A maioria dos pacientes em ambos os grupos foi classificada como D-dominante em relação a carga viral. Pacientes infectados com HDV-G3 apresentaram maiores níveis séricos na maioria de citocinas e quimiocinas de perfil pró-inflamatório. **Conclusões:** Os resultados aqui apresentados, em especial, os níveis mais elevados de moléculas inflamatórias sistêmicas na coinfecção HBV/HDV-G3 sugerem que esse genótipo pode causar uma doença hepática mais agressiva, com uma resposta inflamatória mais exacerbada.

Palavras-chave: Hepatite Delta. Moléculas Inflamatórias Sistêmicas. Genótipo 1. Genótipo 3. Fibrose Hepática.

1Universidade Federal da Bahia, Brasil;

2 Hospital Universitário da Universidade Federal da Bahia, Brasil;

3 Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas - Instituto de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Bahia, Brasil

4 Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de Rondônia, Brasil;

5 Departamento de Gastroenterologia, Hepatologia e Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Hanover, Alemanha;

6 Departamento de Gastroenterologia e Hepatologia, Hospital Universitário de Essen, Universidade de Duisburg-Essen.

* Correspondente: Maurício de Souza Campos, doutorando em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA); Mestre Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA). Correspondência: Maurício de Souza Campos. Núcleo de Ensaios Clínicos da Bahia – Hospital Universitário Professor Edgard Santos. 1º Subsolo = Rua. Dr. Augusto Viana, S/N - CEP 40110-060, Salvador, BA – Brasil. Tel (71) 3283-8278. mscampos2012@gmail.com

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite Delta (HDV) é descrita como a forma mais grave de hepatite viral humana ⁽¹¹⁷⁾. O HDV é um vírus satélite defeituoso que requer a presença do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) para sua montagem e propagação no interior do hepatócito. Frequentemente, a hepatite Delta crônica evolui para cirrose, descompensação hepática e carcinoma hepatocelular (CHC) ⁽¹³⁾. As opções de tratamento para a hepatite Delta ainda são limitadas. O interferon alfa peguilado, única medicação utilizada no controle da infecção, induz negatificação do HDV-RNA em apenas 25% dos pacientes e é pouco tolerado, pois apresenta efeitos colaterais significativos, especialmente em pacientes com doença hepática avançada⁽⁹⁸⁾. Aproximadamente, 50% dos pacientes que respondem ao tratamento apresentam recidiva virológica tardia⁽⁷²⁾. Apesar dessas baixas taxas de sucesso, a terapia com interferon está associada a uma menor probabilidade de progressão da doença.

Estudos têm indicado que variações nas respostas imunomediadas durante infecção aguda e crônica por HDV podem explicar a persistência e cronicidade na superinfecção⁽⁶¹⁾. Os linfócitos T citotóxicos são os principais responsáveis pela eliminação do vírus, destruindo o patógeno e as células hospedeiras. Atraso na resposta imune e habilidade limitada para reconhecer epítomos virais foram implicados na falha do clareamento viral e estabelecimento da infecção crônica. Por outro lado, a montagem de uma resposta imune exagerada pelo hospedeiro, favorecendo um quadro inflamatório severo e persistente, é apontada como a responsável pelo dano hepático na infecção pelo HDV, causando necrose hepatocitária maciça, que culmina com insuficiência hepática fulminante ⁽⁵⁰⁾.

Com base na diversidade de seu genoma, oito tipos diferentes de vírus Delta foram identificados, com distribuição geográfica específica ⁽⁶⁾. O HDV-G1 é encontrado na Europa, Oriente Médio, América e Norte da África ⁽⁵⁾. Os HDV-G2 ao HDV-G8 ocorrem em regiões específicas ao redor do mundo⁽⁵⁾. O HDV-G3, descrito como o

genótipo mais divergente e agressivo, é encontrado exclusivamente na América do Sul, especificamente na bacia amazônica ocidental, área que abrange parte dos territórios de cinco países: Brasil, Peru, Equador, Venezuela e Colômbia,⁽⁷⁾. Na segunda metade do século XX, estudos descreveram uma condição icterica grave, de evolução rápida, com registro de óbito após cinco dias do início dos sintomas, no município de Lábrea, no interior do estado do Amazonas. A condição foi chamada inicialmente de febre negra de Lábrea⁽⁹⁾. Em 1987, foi confirmada que a febre negra de Lábrea era, na verdade, um quadro de hepatite fulminante provocado pela infecção pelo HDV em pacientes portadores de HBV.

Mesmo com a observação acerca da relação entre agressividade da doença e genótipo viral, até o momento, não há estudos comparando os parâmetros imunológicos de pacientes infectados com diferentes sorotipos virais. Assim, nosso objetivo principal foi investigar possíveis associações entre o HDV-G3 e a montagem de uma resposta imunológica mais exacerbada do que na infecção pelo HDV-G1. Por fim, questionamos se citocinas, quimiocinas e fatores angiogênicos estão associados com o curso clínico mais agressivo da infecção pelo HDV-G3.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo do tipo descritivo, comparativo e analítico de pacientes coinfectados com o HBV e vírus Delta, genótipos 1 e 3, sem tratamento.

População de estudo

Uma amostra de conveniência foi utilizada nessa casuística. Foram formados dois grupos distintos:

Grupo 1 - 120 pacientes coinfectados com HBV/HDV-G1 do estudo multicêntrico HIDIT-2 (NCT00932971). Os pacientes do estudo HIDIT-2 tiveram que preencher os seguintes critérios: idade de pelo menos 18 anos, doença hepática compensada, positividade para AgHBs por pelo menos 6 meses, positividade anti-HDV por pelo menos 3 meses, bem como positividade para HDV-RNA na triagem (detalhes em clinicaltrials.gov).

Grupo 2 - 61 pacientes coinfectados com HBV/HDV-G3, atendidos e acompanhados no Centro de Referência em Hepatites Virais de Rondônia - Brasil. Foram utilizados os mesmo critérios de inclusão do estudo HIDIT-2.

Os níveis de alanina transaminase superiores a 10 vezes o limite superior ao normal, a contagem de plaquetas abaixo de 90 000/ μ L, bem como a terapêutica com interferon alpha peguilado e/ou NUC nos 6 meses anteriores ao rastreamento, levaram à exclusão em ambos os grupos.

Para o grupo controle, foram selecionados quatro indivíduos saudáveis que apresentavam sorologias negativas para o HBV, HDV, HCV, HIV I e II, HTLV I e II e ausência de doenças sistêmicas e/ou doenças autoimunes que pudessem alterar o status imunológico.

Aspectos éticos

O projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil e os procedimentos necessários foram realizados respeitando as exigências éticas. Os convidados foram informados dos objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), elaborado especialmente para esse fim. As informações clínicas dos pacientes foram mantidas sob sigilo, com acesso restrito ao grupo de pesquisa.

Avaliação laboratorial e clínica dos participantes

Foram feitas coletas de 10 ml de sangue periférico em todos os participantes da pesquisa. O procedimento foi realizado com uso de tubo heparinizado (5 ml de sangue) e tubo contendo EDTA (5 ml de sangue) para quantificação de moléculas inflamatórias sistêmicas, quantificação da carga e genotipagem viral e exames bioquímicos. Alíquotas das amostras coletadas no Centro de Referência em Hepatites Virais de Rondônia foram processadas e o soro enviado para a Escola Médica de Hannover para dosagem dos níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas, juntamente com as amostras de pacientes do estudo HIDIT-2. Não houve armazenamento de amostras para futuras investigações. Após as análises propostas nesse estudo, o material restante (quando houve) foi

inutilizado e descartado de acordo com as normas internacionais para descarte de material biológico.

Exames hematológicos e bioquímicos

Os dados de exames hematológicos e bioquímicos de pacientes já em acompanhamento foram obtidos nos prontuários médicos, quando disponíveis, ou através de análises realizadas no Centro de Referência em Hepatites Virais de Rondônia e no Hospital Universitário de Hanover. Os exames sorológicos e quantificação da carga viral do HBV-DNA e do Delta Vírus foram realizados no Centro de Referência em Hepatites Virais do Hospital Universitário de Rondônia (para pacientes atendidos nessa unidade) e no Hospital Universitário de Hanover (para os pacientes atendidos naquela unidade).

Os testes diagnósticos das infecções pelo HBV e HDV foram realizados por meio de ensaios imunoenziáticos (EIE), tipo ELISA, com kits comerciais. Todas as amostras foram testadas para a presença de AgHBs (Organon Teknika Holanda), anti-HBc (Organon Teknika, Holanda) e anti-HBs (Abbott, EUA). Nas amostras positivas para o AgHBs efetuou-se a pesquisa do AgHBe, anti-HBe, anti-HBc IgM e anti-HDV (Organon Teknika, Holanda).

Genotipagem do DNA do VHB e Vírus Delta

Os dados de genotipagem viral dos participantes acompanhados no Hospital Universitário de Hanover foram obtidos em prontuário médico ou, quando ausentes, através do sequenciamento dos genes. Não há dados de genotipagem do HBV dos pacientes acompanhados no Centro de Referência em Hepatites Virais do Hospital Universitário de Rondônia. O HBV-DNA foi quantitativamente rastreado utilizando kits comerciais do laboratório Roche (Cobas Amplicor HBV Monitor Test Suíça), que se baseia na amplificação e hibridação do DNA viral. A detecção e quantificação do HDV-RNA foi realizada pela técnica de RT-PCR semi-nested, de acordo com a metodologia descrita por Casey et al. (1996). A genotipagem do RNA do HDV foi realizada usando a metodologia RFLP. Nessa tecnologia, o produto amplificado obtido é digerido com a

enzima de restrição, Sma I (Invitrogen Life Thecnologies) a partir da seguinte reação: 5µL do produto de PCR são incubados durante 2 horas a 37°C com 5U de enzima de restrição. Esta técnica permite a detecção específica de produtos de PCR para os genótipos 1, 2 e 3 do HDV (15).

Dosagem dos níveis de Moléculas Inflamatórias Sistêmicas

Noventa e duas moléculas inflamatórias sistêmicas (SIMs) foram medidas pela tecnologia de Ensaio de Extensão de Proximidade (PEA) (Ensaio Proseek Multiplex Inflammation I). O kit Multiplex Inflammation I demonstrou ter alta reprodutibilidade e repetibilidade, com coeficientes médios de variação inter e intra-ensaio de 7% e 18 %, respectivamente. A análise de dados seguiu um procedimento de normalização. Para cada ponto de dados, os valores delta Cq foram obtidos subtraindo o valor do controle de extensão. A normalização entre as execuções foi realizada por subtração do controle para cada ensaio. Os valores foram então ajustados em relação a um fator de correção determinado por protocolo da Companhia Olink para obter expressão proteica normalizada (NPX). Os dados foram finalmente expressos como 2NPX. Isto proporcionou uma expressão proteica relativa, em que um valor elevado de determinada proteína corresponde a uma concentração também elevada da mesma proteína em sangue periférico.

Análise estatística

Todos os parâmetros foram descritos por mediana. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram feitas utilizando *softwares* e ferramentas como: PSPP, PHstat2, Action e Past3. Realizado o teste Kolmogorov Smirnov para a normalidade dos dados, verificou-se que 51 das 70 variáveis seguiam distribuição aproximadamente normal. Como algumas das variáveis estudadas não atenderam aos pré-requisitos para a realização da análise de variância (normalidade e homogeneidade) e o grupo controle foi formado por quatro participantes, $n=04$ ($n < 30$), foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis para comparação entre os 03 grupos. O teste Kruskal Wallis revelou apenas a existência de diferença entre os grupos na variável em estudo. Foi, então, necessário a realização de teste *Post Hoc* para

descobrir onde essas diferenças se encontravam. Para isto, foi utilizado o método de Simes-Hochberg de comparação intergrupos.

RESULTADOS

Características epidemiológicas e clínicas dos grupos HIDIT-2 e Brasil

Dois coortes independentes foram utilizadas para investigar as possíveis diferenças na resposta imunológica e no curso clínico da infecção pelo vírus Delta, genótipos 1 e 3. As características dos pacientes, em ambas as coortes, são mostradas na tabela 1.

Tabela 1- Características dos pacientes das duas coortes participantes do estudo. ^a

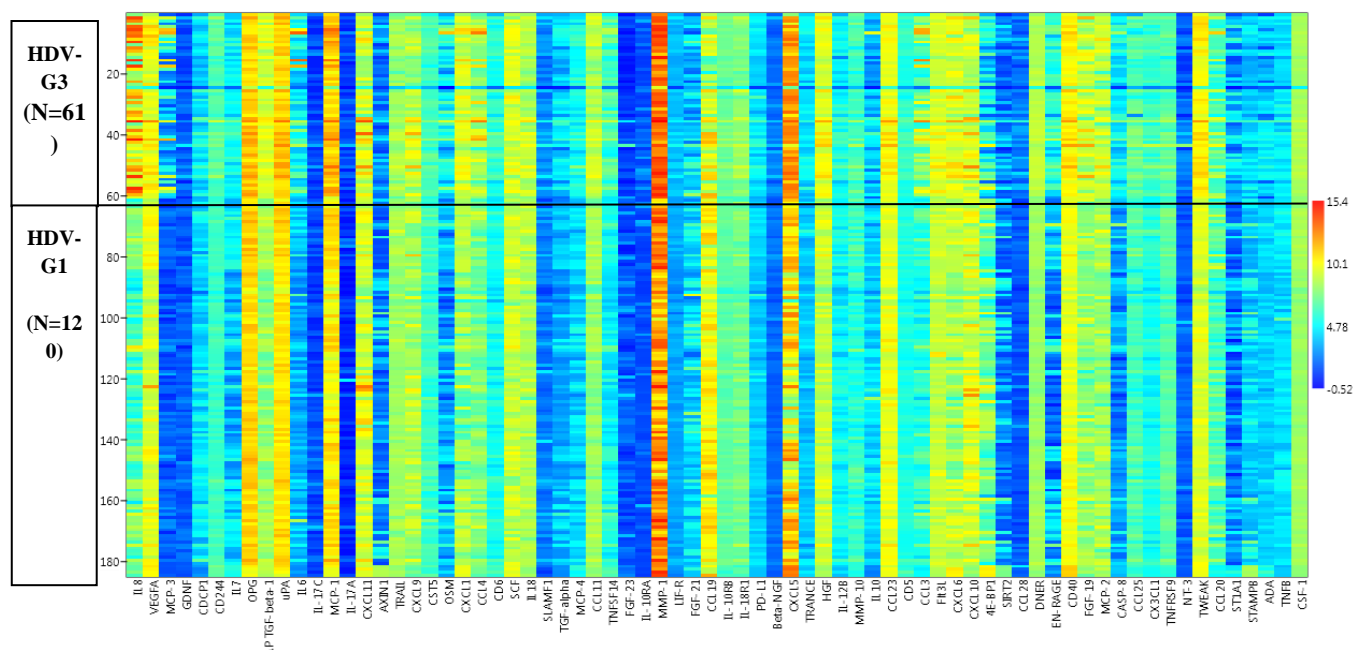
PARÂMETROS	HDV-G1 (HIDIT-2)	HDV-G3 (BRAZIL)
Total	120	61
Sexo	MASCULINO = 79 (66%) FEMININO = 34 (34%)	MASCULINO = 39 (63.9%) FEMININO = 22 (36.1%)
Idade (anos) [mediana (interquartil)]	39.9 (31.8 - 49.6)	41.0 (18-59)
País de origem	Mediterrâneo Oriental = 68 (57%) Leste Europeu = 44 (37%) Itália = 1 (1%) Europa Central = 3 (2%) Outros = 4 (3%)	Brasil = 61 (100%)
FA (x ULN) [mediana (interquartil)]	0.6 (0.5 – 0.7) (n = 119)	1.4 (0.2 – 3,2) (n=61)
Anti HCV - positivo	0 (0,0%)	2 (3,27%) (n=61)
AST (xULN) [mediana (interquartil)]	1,6 (1,1 - 2,3) (n= 119)	2,0 (1,2 - 2,6) (n=61)
ALT (xULN) [mediana (interquartil)]	2,0 (1,3 - 3,0) (n=119)	1,9 (1,1 - 3,0) (n=61)
λGT (xULN) [mediana (interquartil)]	0,8 (0,6-1,5) (n= 118)	2,1 (1,3 - 3,1) (n=61)
Bilirrubina (μmol/L) [mediana (interquartil)]	11,4 (8,6-17,1) (n=116)	13,0 (10,0 - 21,0) (n=61)
Albumina (g/L) [mediana (interquartil)]	42,0 (39,0 - 45,0) (n=119)	39,3 (20,0 - 53,0) (N=61)
Plaquetas (1000/mL)[mediana (interquartil)]	172,0 (130,0-208,0)(n=119)	210,0 (90,0 - 340,0) (n=61)
INR [mediana (interquartil)]	1,1 (1,0-1,2)(n=115)	1,0 (1,0 - 1,5) (n=61)
APRI escore [mediana (interquartil)]	1,0 (0,9-1,6) (n=119)	1,3 (0,1 – 76,7) (n=61)
Relação AST/ALT [mediana (interquartil)]	0,7 (0,6-0,8) (n=119)	1,0 (0,4 - 2,5) (N=61)
MELD escore [mediana (interquartil)]	7.5 (6.8–8.2) (n = 112)	8.1 (6.0-15.0) (n=61)
Classificação Child-Pugh	A = 112 (93%) B = 0 C = 0	A = 55 (90.1%) B = 4 (6.6%) C = 2 (3.3%)
Cirrose	51 (43%) (n=120)	17 (27,8%) (n=61)

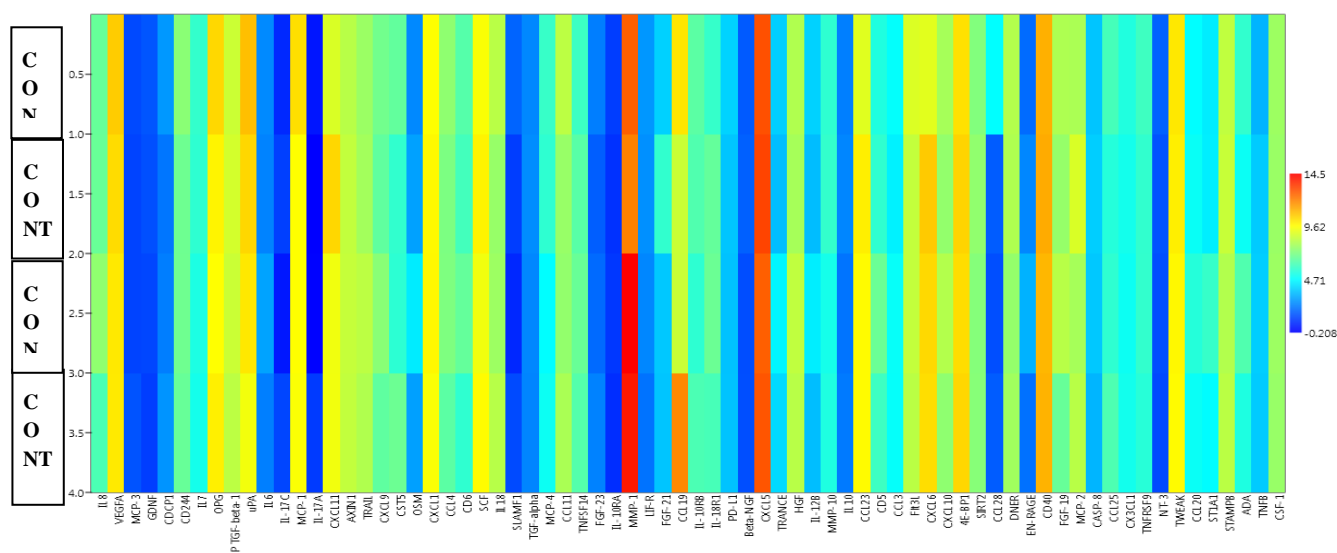
^a Os valores são expressos em mediana (intervalo interquartil) ou n (%). As percentagens são expressas em comparação com o grupo.

Quantificação dos níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas

Perfis distintos de citocinas e quimiocinas estão associados com o genótipo do HDV. Os níveis séricos da maioria das moléculas pró-inflamatórias mostraram-se mais elevados em pacientes infectados com HDV-G3, com destaque para interleucina (IL-) 6, IL-8, SCF, TGF alpha, CSF1, CCL11, MCP1, CXCL10, CCL4, MCP3, CASP 8, PDL 1, EN. RAGE e CD 40. Apenas IL-10, CCL19, 4E-BP1 e CD40 estavam mais elevadas em pacientes infectados com HDV – G1 (Figuras 7 e 8).

Figura 7- Heatmap da distribuição de moléculas inflamatórias sistêmicas entre os grupos estudados.





FGF- fator básico de crescimento de fibroblastos; G-CSF, fator estimulante de colônias de granulócitos; HGF, fator de crescimento de hepatócitos; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; IFN, interferon α / β ; IL, interleucina; IL-12p70, subunidade IL-12 p70; IL-2ra, cadeia alfa do receptor de interleucina 2 (sCD25); IP-10, proteína induzida por interferon gama 10, CXCL10; LIF, fator inibidor de leucemia; MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos 1, CCL2; M-CSF, fator estimulador de colônias de macrófagos; MIF, fator inibitório da migração de macrófagos; CCL3; MIP-1b, proteína inflamatória macrofágica-1 β , CCL4; RANTES, regulador de ativação de células T normais, CCL5; SCGF-b, fator de crescimento de células-tronco β ; SCF, fator de células-tronco CXCL12; TNF- α / β , fator de necrose tumoral α / β ; TRAIL, ligante indutor de apoptose relacionado com TNF; VCAM, proteína de adesão celular vascular; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: A autoria própria

O teste não paramétrico de Kruskal Wallis para comparação entre os 03 grupos revelou a existência de diferença estatisticamente significativa em quase todas as moléculas inflamatórias sistêmicas analisadas. Os valores de p para cada SIM, em relação aos três grupos estudados, encontram-se descritos na Tabela 2. Das moléculas avaliadas, apenas 13 não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$). Foram elas: GDNF, IL-17C, IL-12B, CCL23, CXCL10, TNFRSF9, CCL20, CXCL11, TRAIL, CST5, IL-18, FGF-21 e NT-3.

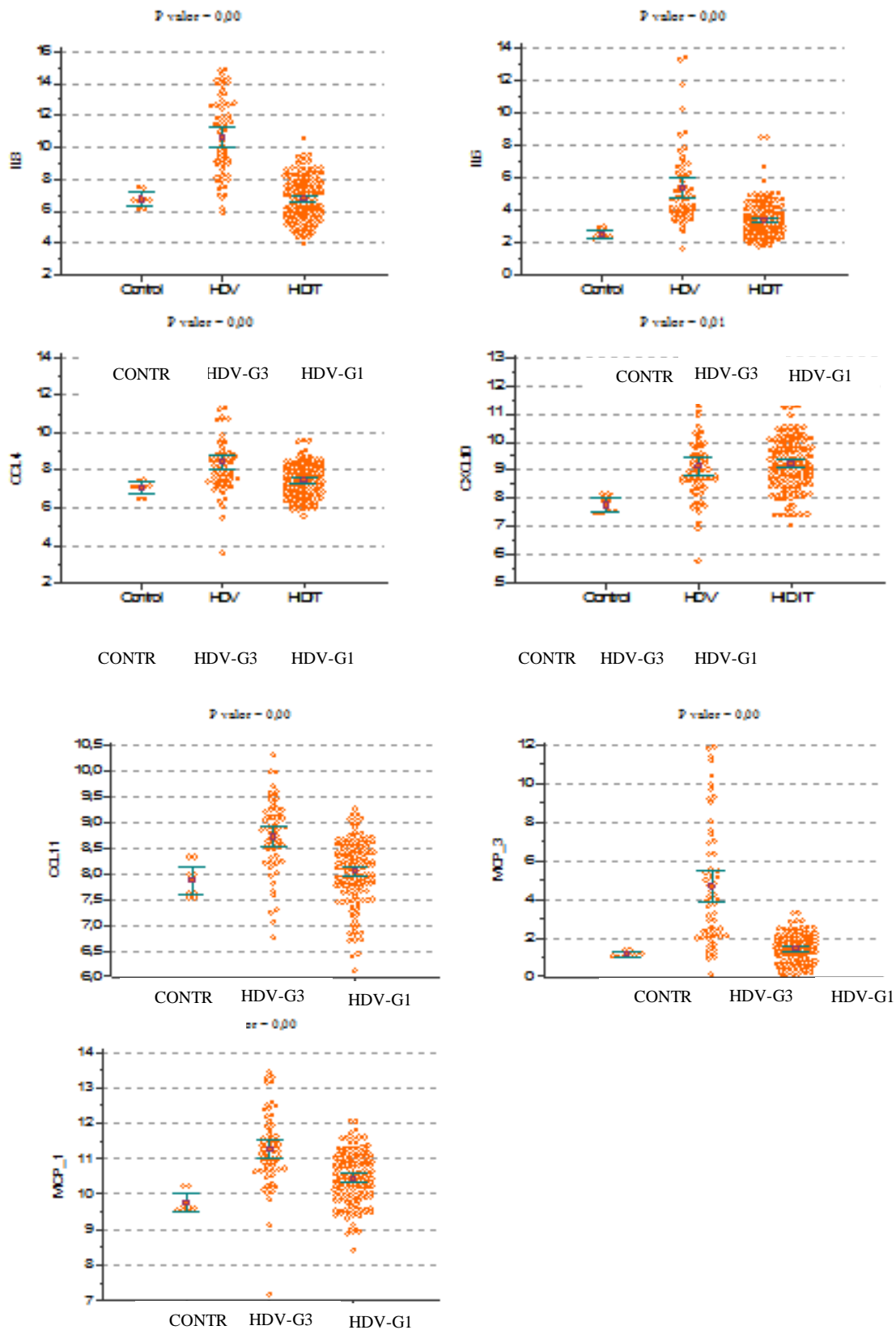
Tabela 2 – Valor de p das SIMs em relação aos grupos HDV-G1, HDV-G3 e controle.

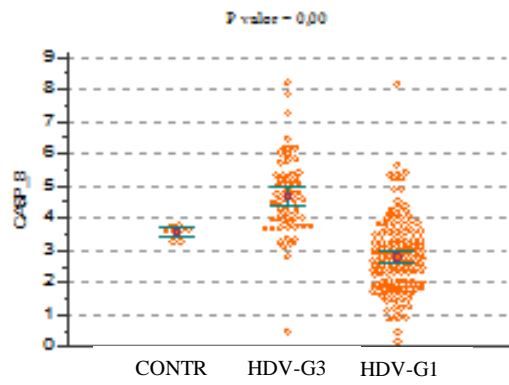
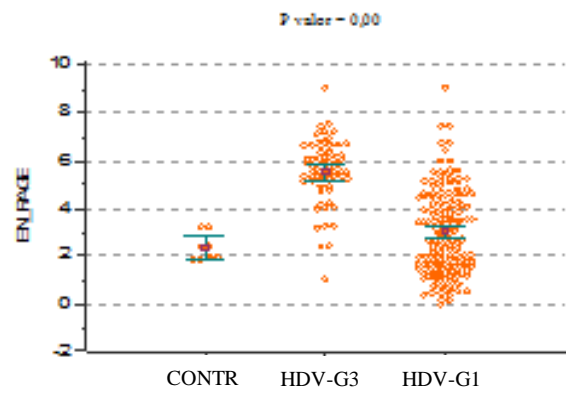
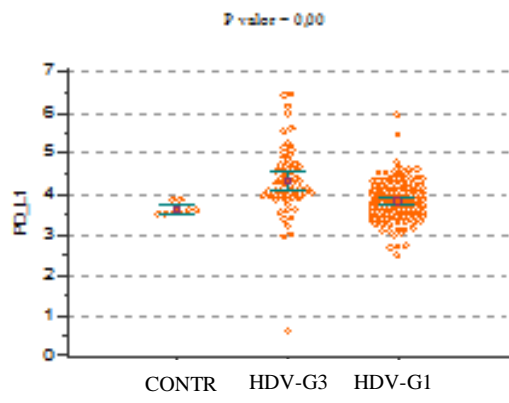
Moléculas Inflamatórias Sistêmicas		
$p \leq 0,01$	$0,01 < p < 0,05$	$p \geq 0,05$
IL8	CDCP1	GDNF
VEGFA	OPG	IL-17C
MCP-3	AXIN1	IL-12B
CD244	CXCL9	CCL23
IL7	IL-10RA	CXCL10
LAP TGF-beta-1	SIRT2	TNFRSF9
uPA	CCL25	CCL20
IL6	STAMPB	CXCL11
MCP-1	TNFB	TRAIL
OSM	ADA	CST5
CXCL1	LIF-R	IL18
CCL4		FGF-21
CD6		NT-3
SCF		
SLAMF1		
TGF-alpha		
MCP-4		
CCL11		
TNFSF14		
MMP-1		
CCL19		
IL-10RB		
IL-18R1		
PD-L1		
Beta-NGF		
CXCL5		
TRANCE		
HGF		
MMP-10		
IL10		
CD5		
CCL3		
Flt3L		
CXCL6		
4E-BP1		
CCL28		
DNER		
EN-RAGE		
CD40		
FGF-19		
MCP-2		
CASP-8		
CX3CL1		
TWEAK		
ST1A1		
CSF-1		

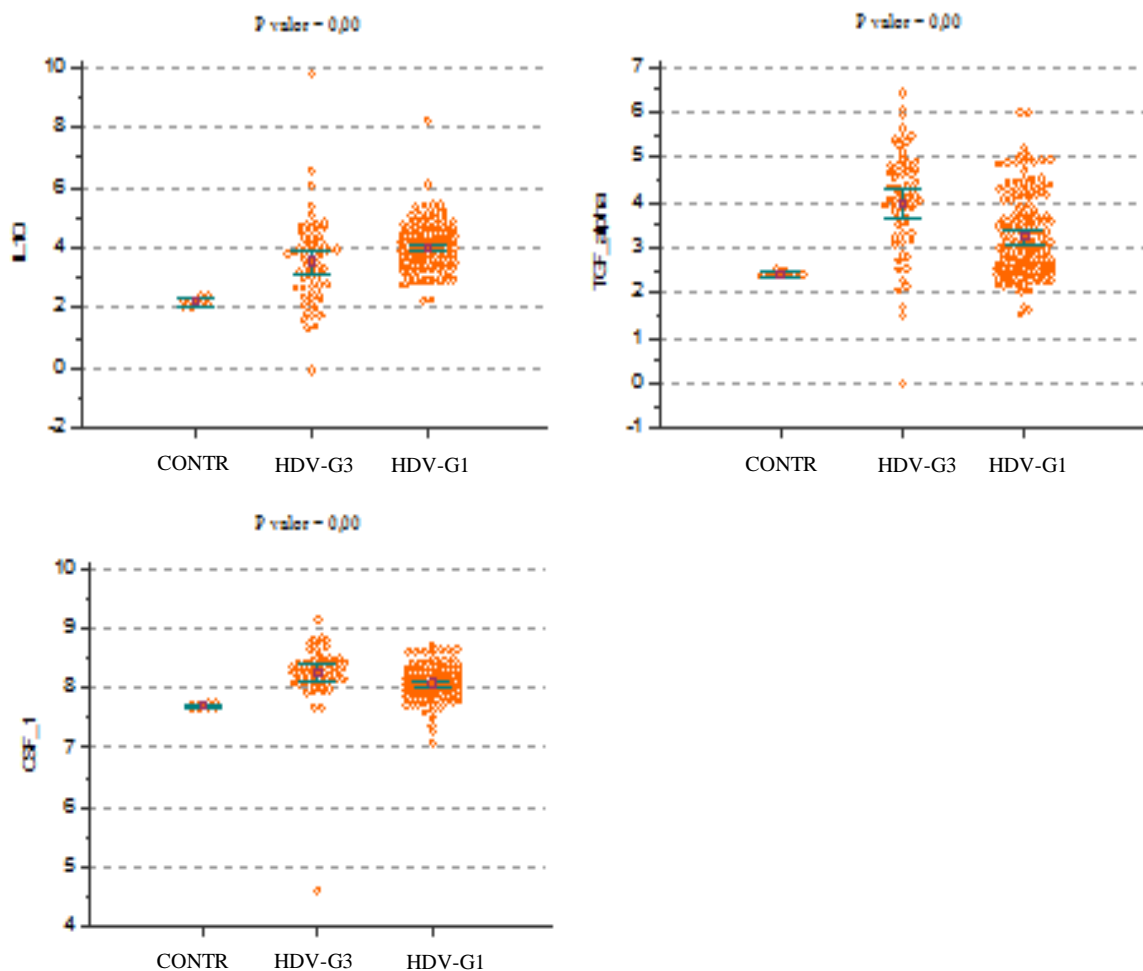
Fonte: Autoria própria

As SIMs mais significativas estão representadas por gráfico de dispersão (Figura 8).

Figura 8 – Gráficos de dispersão das SIMs com diferenças estatísticas mais significantes entre os grupos estudados



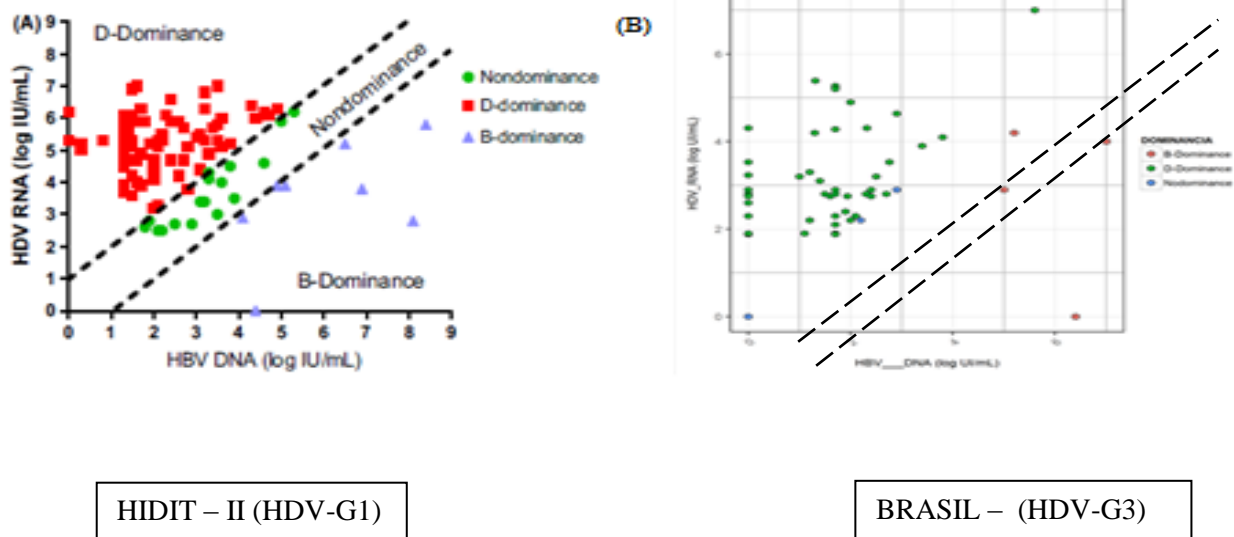




Fonte: Autoria própria

Comparamos os valores de HBV-DNA e HDV-RNA entre o grupo de pacientes infectados com HDV-G1 (HIDIT-II) e HDV-G3 (Brasil) e, seguindo a definição de dominância de Schaper et al. (132), a maioria dos pacientes em ambas coortes foi classificada como D-dominante (D-Dom), 75% e 85.3%, respectivamente. Apenas 7% na coorte HIDIT-II e 6,6% na coorte Brasil eram B-dominantes (B-Dom), enquanto 17% e 8,1%, respectivamente, não apresentaram dominância (ND), como mostra a Figura 9.

Figura 9 - Níveis de HDV-RNA e HBV-DNA de pacientes em diferentes grupos de predominância nas coortes MHH e Brasil.



Fonte: Autoria própria

DISCUSSÃO

A coorte HIDIT-2 foi formada por pacientes que preenchiam os critérios para tratamento baseado em PEG-IFNa. Indivíduos com doença hepática descompensada foram excluídos. A segunda coorte foi formada por pacientes em acompanhamento clínico de rotina, atendidos em um centro de referência terciário na cidade de Porto Velho - Rondônia - Brasil. Ambas as coortes apresentaram semelhanças, em relação a gênero e média de idade.

Dados sobre o país de nascimento de todos os participantes das duas coortes estavam disponíveis. Apenas 2% dos pacientes com hepatite Delta na coorte HIDIT-2 nasceram na Europa Central. Do total, 94% dos pacientes migraram de países do mediterrâneo oriental, especialmente oriundos da Grécia e Turquia e dos países da antiga União Soviética, para a Alemanha. Wedemeyer et al.⁽¹⁶⁾ já haviam descrito um cenário epidemiológico parecido, demonstrando que a maioria dos indivíduos infectados com HDV residentes na Alemanha era imigrante das regiões citadas⁽²⁾.

Na coorte do Brasil, todos os participantes eram nativos do país, especificamente naturais do estado de Rondônia, área pertencente à região Amazônica. Braga et al (2012) identificaram que aproximadamente 77% das infecções por HDV no Brasil ocorrem na região Norte ⁽³⁾. A prevalência da hepatite Delta no Norte do Brasil pode ser consequência direta da circulação do HDV entre populações indígenas, que geralmente vivem em regiões isoladas e interagem, preferencialmente, entre indivíduos de suas próprias tribos. Os estados do Acre e Rondônia são descritos como as duas áreas de maior prevalência da hepatite Delta no Brasil.

Os resultados dessa casuística sugerem que a prevalência da hepatite Delta na Alemanha está diretamente ligada ao intenso fluxo migratório, principalmente a partir das duas últimas décadas do século XX. Portanto, o HDV-G1 está mais biologicamente susceptível a mutações genéticas, uma vez que circula entre diferentes perfís étnicos. Já no Brasil, a doença permanece restrita a áreas endêmicas da região Amazônica, favorecendo a manutenção do padrão genético viral.

O gênero não parece ser um fator de risco. É possível, ainda, observar que no Brasil a infecção parece ocorrer mais precocemente. Dezesesseis dos 61 pacientes (26.2%) tinham idade inferior a 30 anos, enquanto na coorte HIDIT-2, todos os pacientes tinham mais de 30 anos. A infecção mais precoce na população brasileira aponta para a necessidade de reavaliação das políticas públicas voltadas para a prevenção e controle das hepatites B e Delta. Os impactos econômicos e sociais são imensuráveis, pois a maioria dos indivíduos com a doença se encontra em idade produtiva.

Marcadores bioquímicos de doença em atividade

Os resultados dos níveis de Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Gamaglutamiltransferase (γ GT), Fosfatase Alcalina (FA), as concentrações de Albumina, Plaquetas e os valores de INR sugerem diferenças significativas no curso clínico da doença, entre os indivíduos infectados pelo HDV, genótipos 1 e 3.

Os grupos estudados mostraram divergências nos níveis de ALT e AST. A coorte HIDIT-2 (pacientes infectados com HDV-G1) apresentou uma mediana de valores de ALT ligeiramente maior do que a de pacientes infectados com o HDV-G3 (2,0 e 1.9, respectivamente). A origem predominantemente citoplasmática dessa enzima

faz com que ela se eleve rapidamente após a lesão hepática. Nas hepatites virais crônicas, na maioria das vezes, seus valores não ultrapassam 15 vezes o limite de normalidade e, em alguns casos, entre pacientes assintomáticos, é o único parâmetro laboratorial sugestivo de doença hepática ⁽⁴⁸⁾.

A AST é encontrada em diversos órgãos e tecidos, incluindo fígado. Está presente no citoplasma e também nas mitocôndrias. Sendo assim, a elevações de seus níveis séricos indica um comprometimento celular mais profundo. Dosagens elevadas de AST são histologicamente relacionadas à lesão da zona 3 do fígado (região adjacente à veia centrolobular). Os hepatócitos da zona 3 possuem maior quantidade de mitocôndrias e de algumas proteínas envolvida na metabolização de substâncias tóxicas, tais como a P-450, CYP 2E1. Essa estrutura biológica diversa permite que a distância dos hepatócitos da zona 3, em relação ao aporte de oxigênio sanguíneo oriundo dos espaços porta, seja compensada. Nesse estudo, os níveis de AST nos pacientes infectados com o HDV-G3 mostraram-se mais elevados do que nos pacientes com HDV-G1. Andrade et al. ⁽¹³¹⁾ já haviam descrito um padrão de destruição hepatocitária mais agressivo em pacientes com Febre Negra de Lábrea, com intensa infiltração linfocitária, balozinação de hepatócitos e microscopia com focos de condensação, especialmente em torno das veias centrolobulares ⁽¹³¹⁾. Os dados aqui apresentandos sugerem que o padrão histológico de dano hepático provocado pelos HDV-G1 e HDV-G3 é diferente, com destaque para maior severidade entre os pacientes infectados com o genótipo 3. São necessários novos estudos anátomo patológicos para elucidar essas diferenças de agressão hepática.

Os níveis de FA e γ GT, quando avaliados conjuntamente, têm alta especificidade na predição de danos aos canalículos hepáticos. Nesse trabalho, os pacientes infectados com HDV-G3 apresentaram valores mais elevados (2 e 3 vezes mais o limite de normalidade, respectivamente), quando comparados com pacientes infectados com HDV-G1. Lemoine et al (2015), ao estudar pacientes com hepatite B, na África do Sul, concluíram que a razão entre número de plaquetas e os níveis de gama-glutamil transpeptidase (RPG) é um escore de alta especificidade no diagnóstico de fibrose hepática e cirrose, em pacientes com infecção crônica por HBV ⁽¹¹⁷⁾. Na coorte brasileira, 16 dos 61 pacientes (26%) apresentavam níveis plaquetários entre 90 e 100 mil/mL, enquanto todos os pacientes do HIDIT-2 possuíam níveis superiores a 130 mil/mL. Esses dados, aliados a menores valores de INR e albumina, encontrados na

coorte brasileira, sugerem uma doença mais agressiva em pacientes infectados com o HDV-G3.

Avaliação do grau de fibrose por método não invasivo

A análise histológica de indivíduos com coinfeção crônica HBV/HDV é necessária para avaliações prognóstica e terapêutica. Pacientes com fibrose em estágio avançado podem progredir rapidamente para cirrose e hepatocarcinoma, enquanto pacientes sem fibrose ou com fibrose mínima apresentam evolução clínica mais lenta⁽¹³⁾. A biópsia hepática permanece como *gold standard* na avaliação da fibrose e da atividade inflamatória em pacientes com hepatite Delta⁽⁴⁸⁾. No entanto, constitui procedimento de custo elevado, com complicações ocasionais como dor, hemorragia e, em raros casos, morte⁽⁹¹⁾.

Os resultados de estudos obtidos em diferentes populações com HDV mostram que escalas de avaliação de fibrose utilizadas em doenças hepáticas de etiologias diversas, como por exemplo, NASH e hepatite alcoólica, são pouco sensíveis na avaliação do grau de comprometimento do fígado na hepatite D crônica.

Neste estudo, foram comparados entre os grupos os resultados do índice de relação AST/ALT e do índice APRI na determinação de presença de fibrose hepática. Os resultados não foram submetidos a teste de sensibilidade por comparação com o diagnóstico por biópsia hepática.

A análise de parâmetros histológicos dos 120 pacientes infectados com o HDV-G1 revelou que 51 deles (43%) apresentavam cirrose, enquanto no grupo de pacientes infectados com HDV-G3, 17 dos 61 (27,8%) eram cirróticos. Nota-se uma percentagem maior de pacientes em estágio avançado de doença hepática no grupo de infectados com o genótipo viral 1. A aplicação do índice APRI na mesma população revelou uma mediana de 1,0 (0,9-1,6) e 1,3 (0,1-76,7) entre pacientes com HDV-G1 e HDV-G3, respectivamente. O índice APRI é um modelo bioquímico não invasivo baseado nos níveis de plaquetas e AST para a predição da fibrose hepática. O padrão é a classificação histológica, usando a escala Metavir⁽⁹⁷⁾. A partir dos resultados do índice APRI aqui apresentados, é possível dizer que pacientes infectados pelo Genótipo 3 apresentam estágio de doença hepática mais avançado do que o grupo com HDV-G1, diferentemente dos resultados obtidos por biópsia hepática. Essa divergência pode ser explicada por resultados de estudos anteriores, que revelaram baixa sensibilidade e

Valor Preditivo Positivo (VPP) com AUROC máximo de 0,586, na comparação entre biópsia hepática e índice APRI no estadiamento de fibrose em pacientes com hepatite Delta ⁽⁹⁷⁾. A mesma situação foi percebida na avaliação do índice AST/ALT, cujo resultado nessa casuística aponta uma maior prevalência de estágios avançados de fibrose entre os pacientes do grupo G3, com mediana de 1,0 (0,4-2,5), comparada com 0,7 (0,6-0,8), encontrada entre os pacientes do grupo G1. A determinação do índice AST/ALT é frequentemente utilizada no diagnóstico da doença hepática alcoólica, mas se mostrou pouco eficaz na avaliação de pacientes com hepatite Delta ⁽⁹⁷⁾.

O transplante de fígado vem sendo usado como terapia para doenças hepáticas terminais desde a década de 80, após sua aprovação pelo National Health Institute (EUA), em 1983. Até o momento, é a única opção terapêutica em pacientes com hepatite Delta crônica em estágios avançados.

O MELD (*Model for End-stage Liver Disease*) é um modelo matemático que utiliza os resultados de três exames laboratoriais facilmente acessíveis: RNI (Relação Normalizada Internacional) do tempo de protrombina, bilirrubina total e creatinina sérica ⁽¹³³⁾. Este modelo matemático foi escolhido para ordenar os pacientes em lista de espera para transplante hepático (TxH), porque, além de utilizar critérios objetivos, foi testado e validado como bom preditor de sobrevida de pacientes adultos em lista para TxH ⁽¹³⁴⁾.

Um estudo norte-americano avaliou a pontuação mínima do escore MELD para se considerar a inclusão do paciente em lista de espera para transplante hepático. A conclusão foi que pacientes com MELD < 14 não apresentam benefícios com o TxH, em comparação com a permanência em lista de espera. Desta forma, a sugestão é que os pacientes sejam listados a partir do MELD 15, salvo situações especiais ⁽¹³⁵⁾.

Nessa casuística, a mediana da escala MELD no grupo de pacientes infectados pelo HDV-G1 foi de 7,5 (6,8-8,2), enquanto que no grupo de participantes com HDV-G3 foi de 8,1 (6,0-15), e 2 dos 61 pacientes (3,2%) apresentaram MELD=15, sendo portanto indicados à lista de transplante. Esse resultado pode sugerir que o Genótipo 3 causa uma doença mais agressiva, com rápida evolução para doença hepática em estágio final.

O escore Child-Pugh também tem sido amplamente utilizado para a avaliação do prognóstico na cirrose hepática. Esse escore se baseia em cinco critérios que indicariam alteração de função hepática. São eles: bilirrubina sérica, albumina sérica, ascite, distúrbio neurológico e tempo de protrombina. São atribuídos pontos de acordo com os

níveis desses indicadores. A escala varia de 5 a 15 pontos, sendo os indivíduos designados como Child A os que obtiverem escore 5 ou 6, que seriam portadores de uma cirrose dita “compensada”; Child B, aqueles que alcançarem de 7 a 9 pontos; e Child C, os que tiverem escore de 10 a 15 pontos, sendo os pacientes mais graves, portadores de uma “cirrose descompensada”⁽¹³⁶⁾. Os resultados obtidos nesse estudo estão em consonância com a avaliação pela escala MELD. Todos os pacientes infectados com HDV-G1 foram classificados com Child A e, no grupo infectado com HDV-G3, dos 61 pacientes, 55 (90,1%) foram classificados com Child A, 4 (6,6%) como Child B e 2 (3,3%) como Child C. Isso sugere, mais uma vez, que o Genótipo 3 do HDV é responsável por uma doença mais grave, com repercussões clínicas mais severas que a doença provocada pelo Genótipo 1.

Níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas

A resposta imunológica montada pelo hospedeiro contra o patógeno é decisiva para o desfecho de uma infecção. Mas, até o momento, não há estudos sobre a relação entre moléculas inflamatórias sistêmicas e os diversos genótipos do vírus da hepatite Delta. Das 92 moléculas dosadas, 22 apresentaram inconsistência em seus dados (valores negativos), sendo então excluídas das análises.

Através do método de Simes-Hochberg para comparação de variáveis intergrupos, foram identificadas as moléculas cujos níveis séricos/plasmáticos eram mais divergentes. A representação dessas moléculas em gráficos de dispersão mostrou níveis mais elevados de citocinas, quimiocinas, receptores e fatores de crescimento pró-inflamatórios, na população de pacientes infectados com HDV-G3.

IL-8, IL6, CCL4 e CXCL10

A Interleucina 8 (IL-8) é o principal mediador da resposta imune inata contra vírus e é indutora-chave da imunidade mediada por célula. Produzida pelos fagócitos mononucleares ativados e pelas células dendríticas, estimula a diferenciação dos linfócitos Th em Th1 produtores de IFN-g, favorecendo o processo inflamatório do tecido lesado. A mediana de IL-8 entre os pacientes infectados com o HDV-G3 é quase

o dobro da mediana dos valores encontrados entre os infectados com HDV-G1, mas, nesses pacientes os valores são mais homogêneos que naqueles. Essas observações podem indicar uma atividade necroinflamatória maior e mais diversificada em pacientes cronicamente infectados pelo HDV-G3.

A Interleucina 6 (IL-6) age sinergicamente com a IL-8, potencializando o processo inflamatório tecidual. É secretada por células T e macrófagos para estimular a resposta imune, sendo um marcador precoce de processos inflamatórios, induzindo o fígado a liberar proteínas de fase aguda. A mediana dos níveis de IL-6 se mostrou, em média, 50% mais elevada em pacientes do grupo HDV-G3 e, mais uma vez, com valores individuais mais dispersos.

Conhecida como proteína inflamatória do macrófago-1 β (MIP-1 β), a CCL4 é uma quimiocina com especificidade para os receptores CCR5. É um quimioatrato para células NK, monócitos e uma variedade de outras células do sistema imunológico. É produzida por monócitos, células B, células T, fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais. Estudos demonstraram que a concentração de CCL4 aumenta com a idade e está relacionada com processos inflamatórios crônicos e danos ao fígado ⁽¹³⁸⁾. Pacientes da coorte brasileira apresentaram valores mais elevados e mais dispersos de MIP-1 β que os de pacientes do estudo HIDIT-II.

A CXCL10 (IP-10) é secretada por vários tipos de células – monócitos, células endoteliais e fibroblastos – em resposta ao IFN- γ . A IP-10 atua na quimioatração de macrófagos, células T, células NK e dendríticas para o sítio da infecção, na promoção da adesão de células T a células endoteliais, na atividade antitumoral e na inibição da formação de colônias de medula óssea e angiogênese. Exerce seus efeitos ligando-se ao receptor de quimiocina CXCR3, presente na superfície de algumas células.

Estudos demonstraram que níveis plasmáticos elevados de CXCL10 em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, genótipos 1 ou 4, antes do tratamento, estão relacionados com a ausência de resposta viral sustentada (RVS) com o uso de Interferon Alpha Peguilado. Isso também se aplica a pacientes co-infectados com HIV, nos quais os níveis de IP-10 abaixo de 150 pg/mL, antes do tratamento, são preditivos de uma resposta favorável ao tratamento antiviral (139). Nessa casuística, a mediana dos níveis de IP-10 em pacientes com HDV-G3 se mostraram ligeiramente mais baixas e com maior dispersão intergrupo do que nos pacientes com HDV-G1.

A análise conjunta dessas moléculas indutoras de inflamação sugere que pacientes infectados com HDV-G1 apresentam uma doença menos agressiva, com um

padrão inflamatório menos pronunciado e mais homogêneo entre os pacientes, porém, com uma resposta mais limitada ao tratamento com Interferon Alpha Peguilado. No grupo de pacientes infectados com HDV-G3, o processo inflamatório é mais agressivo, com presença maciça de células do sistema imune inato, incluindo células NK, no tecido hepático, provocando maior dano tecidual. Ainda que a mediana dos valores de IP-10 seja menor em comparação ao grupo infectado com HDV-G1, não é possível sugerir que a resposta ao tratamento com Peg Inteferon seja mais eficaz, pois, a análise individualizada dos pacientes aponta para uma doença com padrão histológico mais heterogêneo, dificultando uma análise em bloco.

CCL11, MCP3 e MCP1

A CCL11 é uma importante quimiocina específica de eosinófilos que está associada ao recrutamento dos mesmos para locais de inflamação. Eosinófilos no sangue humano expressam CCL11 e liberam essa quimiocina em resposta à estimulação por fatores do complemento e complexos imunes. Na hepatite autoimune, os achados histológicos mostram infiltrado inflamatório crônico predominante nos espaços portais, periportais e intralobulares, composto por linfócitos, plasmócitos e, em menor quantidade, por polimorfonucleares – neutrófilos e eosinófilos. Durante a fase ativa da doença, há formação de rosetas, alargamento dos espaços portais por fibrose, desarranjo da arquitetura lobular, com lesões importantes dos hepatócitos - balonização, retração, fragmentação, desintegração e necrose, culminando com um quadro de cirrose ⁽¹⁴⁰⁾.

A MCP-1 (Proteína quimiotática de monócitos) é induzida por qualquer mediador inflamatório, como LPS, IL-1, TNF-a, IFN-g, IL-6 e IL-4. Vários tipos de células têm demonstrado produzir MCP-1, incluindo células mononucleares, mastócitos, células T, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais, células estromais da medula óssea, células epiteliais, micróglia, astrócitos e células musculares lisas. Os níveis elevados de MCP-1 têm sido associados a vários processos inflamatórios, a exemplo: à sepse, doença de Crohn, nefrite lúpica, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, artrite reumatóide, pancreatite aguda e aterosclerose. A MCP-1 também está envolvida em vários tipos de câncer, incluindo carcinoma gástrico, carcinoma de células escamosas do esôfago, glioma maligno e cânceres de ovário, pâncreas, bexiga e mama ⁽¹⁴¹⁾. A MCP3 também está envolvida em vários processos inflamatórios e neoplásicos, incluindo osteoblastomas.

Valores de medianas mais elevados dessas quimiocinas encontradas em pacientes infectados com HDV-G3 sugerem a participação efetiva de células de Kupffer na exarcebação do processo inflamatório hepático durante a infecção, e podem explicar os achados histológicos descritos por Andrade et al. ⁽¹³¹⁾ na avaliação do tecido hepático de pacientes com Febre Negra de Lábrea ⁽¹³¹⁾.

PDL-1, EN. RAGE, CASP 8

O ligante de morte programada 1 (PDL-1) é uma proteína transmembrana tipo 1 de 40kDa que foi identificada como tendo um papel importante na supressão do sistema imunológico durante eventos específicos como gravidez, aloenxertos de tecido, doenças autoimunes e em doenças como hepatite . Normalmente, o sistema imunológico reage a antígenos estranhos que estão associados a sinais de perigo exógenos ou endógenos, o que desencadeia uma proliferação de células T CD8 + antígeno-específicas e/ou células auxiliares CD4 +. A ligação de PDL-1 a PD-1 ou B7-1 transmite um sinal inibitório que reduz a proliferação de células T específicas para antígenos nos linfonodos, enquanto, simultaneamente, reduz a apoptose em células T reguladoras ⁽¹⁴²⁾.

EN. RAGE (receptor para produtos finais de glicação avançada) é um receptor transmembrana que foi caracterizado pela sua capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos e por sua atuação na ativação de células inflamatórias da imunidade inata. EN. RAGE também possui um ligante agonístico: a proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1). A HMGB1 é uma proteína intracelular de ligação ao DNA, importante no remodelamento da cromatina, que pode ser liberada passivamente por células necróticas e pela secreção ativa de macrófagos, células natural killer (NK) e células dendríticas. Esse receptor tem sido associado a várias doenças crônicas, que causam danos vasculares. Acredita-se que a patogênese do dano vascular inclua a ligação do HMGB1 ao sítio de ligação da EN. RAGE que inicia uma cascata de sinalização de ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB). O NF-κB controla vários genes envolvidos na inflamação, e isto estabelece um ciclo de feedback positivo, o que leva a inflamação crônica. Essa condição crônica altera a micro e a macrovasculatura, resultando em danos aos órgãos ou até sua falência ⁽¹⁴³⁾.

A caspase-8 é uma proteína caspase, codificada pelo gene CASP 8. A ativação sequencial das caspases desempenha um papel central na fase de execução da apoptose

celular. Esta proteína está envolvida na morte celular programada, induzida por Fas e vários estímulos apoptóticos⁽¹⁴⁴⁾.

Interessante observar que nessa casuística essas três moléculas possuem medianas dos níveis séricos/plasmáticos mais elevadas em indivíduos da coorte brasileira. A mediana dos níveis de EN. RAGE nesses pacientes é quase o dobro das medianas dos pacientes do estudo HIDIT-2 (5,6 e 3,2, respectivamente). A função apoptótica das mesmas sugere que, durante a infecção pelo HDV-G3 ocorra uma maior indução de morte programada dos hepatócitos, com substituição dos mesmos por fibroblastos, aumentando o grau de fibrose e agravando a doença.

IL-10, TGF alpha, CSF-1

A interleucina 10 (IL-10), também conhecida como fator inibidor da síntese de citocinas (CSIF), é uma citocina de perfil anti-inflamatório. Em humanos, a interleucina 10 é codificada pelo gene IL10. Sua função regulatória da resposta imunológica é bem descrita em diversos trabalhos. Durante processos inflamatórios teciduais, a IL-10 atua inibindo a ativação de novas células do sistema imune inato, incluindo células NK e macrófagos, diminuindo a expressão de citocinas de perfil Th1 e conseqüentemente, controlando a inflamação e o dano ao tecido.

O fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) é uma proteína que em humanos é codificada pelo gene TGFA. Trata-se de um polipeptídeo mitogênico. A proteína torna-se ativada quando se liga a receptores de atividade de proteína quinase para sinalização celular. É produzido por macrófagos, células cerebrais e queratinócitos. Quando o TGF- α se liga ao seu receptor celular, ocorre indução de vários eventos de proliferação celular relacionados principalmente a processos de cicatrização por substituição de tecido necrosado por fibroblastos⁽¹⁴⁵⁾.

O fator estimulador de colônia 1 (CSF1), também conhecido como fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), é uma citocina que faz com que as células-tronco hematopoiéticas se diferenciem em macrófagos ou outros tipos celulares relacionados. O M-CSF afeta macrófagos e monócitos de várias maneiras, incluindo a estimulação do aumento da atividade fagocítica e quimiotática e o aumento da citotoxicidade contra células tumorais⁽¹⁴⁶⁾.

As medianas dos níveis de TGF alpha e CSF-1 mais elevadas no grupo de pacientes infectados com HDV-G3, encontrados nessa casuística, sugerem que, durante

a infecção por esse genótipo ocorre intensa substituição de tecido hepático por fibroblastos e indução de fibrose hepática. A mediana dos níveis de IL-10 em pacientes infectados com HDV-G1 é mais elevada do que no grupo com HDV-G3. Esse dado pode indicar que o processo inflamatório induzido pela infecção por HDV-G1 é mais bem controlado e causa menos dano ao fígado.

Análise da dominância viral

A análise da dominância viral nas duas coortes estudadas mostraram resultados semelhantes, com predomínio de D- dominância da ordem de 80%. Sabe-se que um dos mecanismos fisiopatológicos da coinfeção HBV/HDV é a supressão viral promovida pelo agente D contra o agente B. Os mecanismos não são totalmente esclarecidos, mas, estudos demonstram que a coinfeção provoca uma doença mais grave que a mo infeção pelo HBV⁽³⁵⁾. Essas observações podem indicar que o dano hepático durante a coinfeção está mais diretamente ligação à ação do HDV.

Nesse estudo não foi realizada a genotipagem viral do HBV em pacientes da coorte brasileira. Alguns trabalhos têm demonstrado que os subtipos A, D e F do HBV são os mais prevalentes na região Norte do Brasil. O genótipo do HBV também pode contribuir para o curso clínico diferenciado da infecção pelo HDV. Não há evidências de que um genótipo específico do HDV só possa infectar pacientes com um genótipo específico de HBV. Estudos recentes indicaram que mutações distintas do HDV podem facilitar a associação de certos genótipos de HDV com diferentes genótipos de HBV⁽¹⁴⁷⁾.

CONCLUSÕES

Em resumo, esta extensa análise de dados clínicos, histológicos e imunológicos de pacientes coinfectados com HBV e HDV sugere a implicação direta do genótipo do HDV na fisiopatologia da doença. Os resultados aqui apresentados, em especial os níveis mais elevados de moléculas inflamatórias sistêmicas na coinfeção HBV/HDV-G3, indicam que esse genótipo pode causar uma doença hepática mais agressiva, com resposta inflamatória mais exarcebada. Essas informações poderão auxiliar na elaboração de novos protocolos clínicos terapêuticos individualizados para cada genótipo do HDV. A dominância do HDV em relação ao HBV se mostrou

marcadamente superior, confirmando resultados de pesquisas anteriores. Esses dados fornecem novos insights para o entendimento da história natural da hepatite Delta, causada por diferentes genótipos.

4.2 ARTIGO 2

Moléculas inflamatórias sistêmicas estão associadas à fibrose avançada na hepatite
Delta por HDV G3

Maurício de Souza Campos^{1, 2,3}
Juan Miguel Salcedo⁴
Deusilene Vieira⁴
Luan Felipe Botelho⁴
Birgit Bremer⁵
Julia Hengst⁵
Raymundo Paraná^{1,2}
Heiner Wedemeyer⁶
Maria Isabel Schinoni^{1,2,3}

Introdução: O HDV-3 é responsável por surtos de hepatite fulminante no nordeste da América do Sul. Até o momento, não há estudos investigando a relação entre a resposta imunológica montada contra o patógeno e o grau de fibrose dos pacientes. **Objetivos:** Avaliar o nível de moléculas inflamatórias sistêmicas (SIM) no soro de pacientes infectados com o HDV-G3 e a sua relação com o estágio de fibrose hepática. **Métodos:** 61 pacientes co-infectados com HBV / HDV-3 foram incluídos neste estudo. Os testes de diagnóstico para rastreamento de infecções por HBV / HDV foram realizados utilizando ensaio padrão de imunologia. A quantificação e genotipagem do HDV foram realizadas pela metodologia semi-nested RT-PCR e RFLP. Foram dosados os níveis de 92 moléculas inflamatórias sistêmicas com uso da tecnologia de Ensaio de Extensão de Proximidade (PEA) (ensaio Proseek Multiplex Inflammation I). Shapiro-Wilk, teste t de Student, testes de Mann-Whitney e análise de regressão logística foram utilizados quando apropriado. **Resultados:** A idade média dos pacientes foi de 41 anos (18-59 anos) e apenas um paciente apresentou status sorológico AgHBe positivo. Fibrose em estágio avançado ou cirrose (F3 / F4) foi diagnosticada por estadiamento histológico em 17 pacientes, enquanto 44 apresentaram fibrose mínima ou ausência de fibrose. A atividade necroinflamatória avançada correlacionou-se positivamente com os níveis séricos de AST e ALT ($p = 0,024$ e $0,020$, respectivamente) e não houve relação com os níveis de gama-glutamilttransferase. Os métodos não invasivos utilizados para avaliação do grau de fibrose em pacientes com doença hepática de outras etiologias (relação APRI, FIB-4 e AST / ALT) revelaram baixa sensibilidade e VPP com AUROC máximo de 0,586. Entre as 92 SIMs analisadas, MCP4 ($p = 0,032$), CCL19 ($p = 0,024$), EN.RAGE ($p = 0,014$), SCF ($p = 0,01$) e IL 18 ($p = 0,054$) apresentaram correlação positiva com o estágio de fibrose. Um escore combinado incluindo CCL19 e MCP.4 revelou uma sensibilidade de 81% para identificação de fibrose avançada quando comparado com os resultados de biópsia hepática e Odds Ratio de 2.202 para fibrose avançada. **Conclusões:** Os métodos não invasivos clássicos de avaliação de estágio de fibrose em pacientes com doença hepática de outras etiologias mostraram um desempenho insatisfatório na avaliação de pacientes infectados com HDV G3. Sugerimos aqui que a determinação de CCL19 e MCP.4 possa ser usada para identificar pacientes com fibrose avançada na hepatite D causada pelo genótipo 3. Além disso, este estudo fornece novos insights sobre a imunopatogênese da infecção por HDV G3.

Palavras-chave: Hepatite Delta. Moléculas Inflamatórias Sistêmicas. Fibrose. Marcadores Biológicos.

1 Universidade Federal da Bahia, Brasil;

2 Hospital Universitário da Universidade Federal da Bahia, Brasil;

3 Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas - Instituto de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Bahia, Brasil

4 Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de Rondônia, Brasil;

5 Departamento de Gastroenterologia, Hepatologia e Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Hanover, Alemanha;

6 Departamento de Gastroenterologia e Hepatologia, Hospital Universitário de Essen, Universidade de Duisburg-Essen.

*Correspondente: Maurício de Souza Campos, doutorando em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA); Mestre Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA). Correspondência: Maurício de Souza Campos. Núcleo de Ensaios Clínicos da Bahia – Hospital Universitário Professor Edgard Santos. 1º Subsolo = Rua. Dr. Augusto Viana, S/N - CEP 40110-060, Salvador, BA – Brasil. Tel (71) 3283-8278. mscampos2012@gmail.com

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite Delta (HDV) é um único patógeno de RNA que requer antígenos de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) para a montagem e transmissão viral ⁽¹⁾. Estudos mostraram que a coinfeção HBV-HDV pode acelerar doenças do fígado^(1,2) e que a superinfecção HBV-HDV pode resultar em hepatite fulminante aguda ou hepatite crônica, evoluindo em muitos casos para cirrose e carcinoma hepatocelular ⁽³⁾. Estima-se que cerca de 240 milhões de pessoas são AgHBs positivas em todo o mundo ⁽⁴⁾ e, destas, 2% - 8% estão co-infectadas com o HDV, resultando em 10 a 20 milhões de pessoas com hepatite Delta. A prevalência da infecção por HDV é significativamente diferente entre as regiões do mundo (4). Pelo menos oito tipos diferentes de vírus Delta foram identificados, com base na diversidade de seu genoma, com distribuição geográfica específica ^(5,6). O HDV-G1 é distribuído na Europa, Oriente Médio, América e Norte da África⁽⁵⁾. Os HDV-G2 ao HDV-G8 ocorrem em regiões específicas⁽⁵⁾. O HDV-G3, descrito como o genótipo mais divergente e agressivo, é encontrado exclusivamente na América do Sul, especificamente na Bacia Amazônica Ocidental, incluindo Brasil, Peru, Equador, Venezuela e Colômbia, ⁽⁷⁾ e é responsável por surtos graves e hepatite fulminante ^(8,9). No Brasil, essa área corresponde aos estados

do Acre, Amazonas, Rondônia e Roraima, com prevalência relativamente alta entre as comunidades indígenas ⁽¹⁰⁾.

As infecções virais são controladas por uma interação sofisticada entre respostas imunes inatas e adaptativas ⁽¹¹⁾. Foi demonstrado que a mediação imunológica está geralmente implicada em danos hepáticos associados ao HDV e que a patogênese envolve principalmente a ativação de linfócitos T específicos para o HDV, células assassinas naturais (NK Cells), respostas de citocinas e sinalização do fator nuclear kappa B ⁽¹²⁾. O HDV não causa lesão direta dos hepatócitos ou inflamação do tecido hepático. A causa mais provável desses processos é a resposta imune do hospedeiro contra o patógeno. Em geral, as infecções virais crônicas são caracterizadas pela presença de células T antivirais, mas, muitas vezes, elas são incapazes de controlar a replicação viral e a progressão da infecção, graças ao processo de exatão celular. Schirdewahn et al. ⁽¹²⁾ demonstraram, em um estudo com 92 pacientes, dos quais 49 co-infectados com HBV / HDV, que a recuperação funcional dessas células T específicas para o HDV é possível se houver direcionamento de sinais mediados por receptores de células T (sinal 1), um sinal coestimulatório (sinal 2) e um sinal de citocina (sinal 3), que é cada vez mais implicada no controle da infecção viral ⁽¹²⁾. Até o momento, não há estudos demonstrando a associação entre essas moléculas inflamatórias sistêmicas e o dano hepático causado pelo HDV, incluindo o genótipo 3 ⁽¹³⁾.

Marcadores biológicos de estágios de fibrose foram investigados em pacientes com hepatite D, genótipo 1, com objetivo de padronizar um escore utilizando métodos não invasivos. Até o momento, todas as escalas validadas (FIB4, APRI, Relação AST / ALT) para avaliar o grau de fibrose em pacientes com doença hepática avançada, causada por outros agentes etiológicos, mostraram-se insatisfatórias para avaliar a fibrose em pacientes com hepatite D crônica. Lutterkort et al. ⁽⁹⁷⁾, em um estudo com 100 pacientes infectados com HDV- G1, desenvolveram um novo modelo para avaliação da presença e do grau de fibrose nesses pacientes, com base nos níveis de colinesterase, albumina, gama glutamil transferase, bem como na idade do paciente. O Delta Fibrose Score (DFS) mostrou uma sensibilidade em relação à biópsia hepática de 85% e VPP de 93%, com AUROC de 0,87 ⁽¹⁴⁾. Achados semelhantes foram obtidos no estudo de Takyar ⁽¹⁶⁾, que objetivou avaliar a segurança da biópsia hepática percutânea realizada com agulha de Klatskin ⁽¹⁵⁾. Entretanto, a nova escala para avaliar o grau de fibrose na infecção pelo vírus Delta ainda requer o estabelecimento de novos parâmetros, e não foi testada nem validada para pacientes infectados com o HDV-G3.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre moléculas inflamatórias sistêmicas e o grau de fibrose em pacientes cronicamente infectados com HDV-G3.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de Estudo

No total, 61 pacientes co-infectados com o HBV-HDV-G3, diagnosticados entre 2002 e 2016, foram incluídos neste estudo. Todos os pacientes tinham mais de 18 anos e foram incluídos pacientes de ambos os sexos. Pacientes diagnosticados com HCV, HTLV I e II, HIV I e II, ou com doenças autoimunes ou reumatológicas que pudessem afetar o perfil sérico das citocinas foram excluídos. Todos os participantes foram informados dos objetivos do projeto e, após explicação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Dados clínicos e epidemiológicos foram coletados dos prontuários dos pacientes, quando disponíveis. Este estudo foi realizado em conformidade com os princípios da declaração de Helsinque. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia-Brasil.

Amostras e Ensaio Laboratoriais

Dados clínicos, imunológicos e laboratoriais foram obtidos nos prontuários dos participantes.

Cerca de 10 mL de sangue total foram coletados de cada participante em um tubo sem anticoagulante. Após centrifugação a 3.500 rpm, por 10 minutos, alíquotas de soro com aproximadamente 1 mL foram armazenadas a -20 ° C para testes sorológicos e -70 ° C para testes moleculares.

Os testes de diagnóstico de infecções por HBV e HDV foram realizados utilizando testes imunoenzimáticos do tipo ELISA com kits comerciais. Todos os soros foram testados para AgHBs (Organon Teknika Holland), anti-HBc (Organon Teknika, Holanda), anti-HBs (Abbott, EUA) anti-HBe, anti-HBc IgM e anti-HDV (Organon Teknika, Holanda).

Quantificação viral e genotipagem

O HBV-DNA foi quantitativamente rastreado utilizando kits comerciais do laboratório Roche (Cobas Amplicor HBV Monitor Test Suíça), que se baseia na amplificação e hibridação do DNA viral. A detecção e quantificação do HDV-RNA foi realizada pela técnica de RT-PCR semi-nested, de acordo com a metodologia descrita por Casey et al. (1996). A genotipagem do HDV foi realizada usando a metodologia RFLP. O produto amplificado obtido foi digerido com a enzima de restrição Sma I (Invitrogen Life Technologies) a partir da seguinte reação: 5 microlitos do produto de PCR foram incubados durante 2 horas a 37°C com 5U de enzima de restrição. Esta técnica permite a detecção específica de produtos de PCR para os genótipos I, II e III⁽³⁴⁾.

Dosagem de moléculas inflamatórias sistêmicas (SIMs)

Noventa e duas moléculas inflamatórias sistêmicas (SIMs) foram dosadas pela tecnologia de Ensaio de Extensão de Proximidade (PEA) (ensaio Proseek Multiplex Inflammation I). O kit Multiplex Inflammation I demonstrou ter alta reprodutibilidade e repetibilidade com coeficientes médios de variação inter e intra-ensaio de 7% e 18 %, respectivamente. A análise de dados seguiu um procedimento de normalização. Para cada ponto de dados os valores delta Cq foram obtidos subtraindo o valor da concentração da molécula no soro do paciente do controle de extensão. A normalização entre as execuções foi realizada por subtração do controle interplaca, para cada ensaio. Os valores foram então ajustados em relação a um fator de correção determinado pelo fabricante para obter a expressão proteica normalizada (NPX). Os dados foram finalmente expressos como 2NPX. Essa metodologia proporciona uma expressão proteica relativa, em que um valor elevado da proteína dosada corresponde a uma concentração também elevada no material biológico.

Essa técnica foi utilizada para determinar se pacientes diabéticos com aneurisma de aorta abdominal (AAA) tinham um perfil inflamatório plasmático distinto, em comparação com pacientes não diabéticos⁽¹⁴¹⁾. Neste estudo, os autores concluíram que pacientes diabéticos com AAA expressavam níveis plasmáticos de CCL19, CCL23 e TNFSF14 mais elevados do que os não diabéticos.

Análise Estatística

Para a análise descritiva, as variáveis quantitativas foram representadas por suas médias e desvios-padrão quando suas distribuições foram normais e por medianas e interquartiles quando não normais. A definição de normalidade foi feita por meio de análise gráfica e teste de Shapiro-Wilk. As variáveis categóricas foram representadas por frequências e porcentagens. Comparações bivariadas entre os grupos foram feitas usando o teste t de Student para variáveis de distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para variáveis de distribuição não normal. Análise de regressão logística foi implementada quando necessária. Variáveis independentes para o modelo final foram selecionadas via backwise stepwise.

RESULTADOS

Características clínicas dos participantes do estudo

Neste estudo, foram avaliados 61 pacientes coinfectados com HBV / HDV – G3. Destes, 17 foram diagnosticados, através de biópsia hepática, com fibrose avançada ou cirrose e 44 com fibrose mínima ou sem nenhum grau de fibrose. Como todos os pacientes eram de uma região endêmica, não houve avaliação de fatores de risco, como o uso de drogas intravenosas, transfusões de sangue ou tatuagens. Nenhum paciente se declarou profissional da área da saúde. A média de idade dos participantes foi de 41 anos (18 a 59 anos). A relação entre a infecção pelo HDV-G3 e a idade dos pacientes não foi estatisticamente significativa ($p = 0,105$). Em relação ao gênero, 39 pacientes eram do sexo masculino, representando 63,9% do total. As características epidemiológicas dos participantes da pesquisa encontram-se representadas na tabela 3.

A atividade necroinflamatória avançada foi correlacionada positivamente com os níveis séricos de ALT e AST ($p = 0,024$ e $p = 0,020$, respectivamente). Níveis séricos de gama glutamil transferase (γ GT), bilirrubina total e plaquetas não mostraram associação com o estágio de fibrose nos pacientes estudados. Testes sorológicos foram realizados no período pré-tratamento e todos os pacientes apresentaram AgHBs positivo e Anti-HBs negativo. Apenas um paciente testou positivo para AgHBe.

Tabela 3- Comparação das características epidemiológicas, laboratoriais e sorológicas entre o grupo de pacientes com fibrose em estágio avançado e o grupo de pacientes sem fibrose ou com fibrose mínima.

Características	Total (n = 61)	Sem ou Fibrose mínima (n = 44)	Fibrose Avançada (n = 17)	p valor
Gênero				
Feminino	22 (36.1%)	17(77.3%)	5(22.7%)	
Masculino	39 (63.9%)	27(69.2%)	12(30.8%)	
Idade	41(18-59)	39(18-57)	44(18-59)	0,105
Uso de Álcool				
Não	45 (73.8)	32(72.7)	13(76.5)	
Sim	16 (26.2)	12(27.3)	4(23.5)	
ALT(U/L)	19.0(11.0-29.0)	17.0(10.0-26.2)	28.0(17.0-36.0)	0.024
AST(U/L)	20.0(12.0-26.0)	17.0(10.8-23.0)	28.0(13.0-32.0)	0.020
GGT(U/L)	21.0(13.0-31.0)	20.5(14.8-30.0)	26.0(9.0-35.0)	0.929
BT* (mmol/L)	13.0(10.0-21.0)	13.0(10.5-19.0)	21.0(10.0-24.0)	0.083
AFP** (ng/mL)	25.0(13.0-39.0)	30.5(16.8-39.2)	21.0(5.0-25.0)	0.012
Plaquetas (10 ⁹ /L)	21.0(9.0-34.0)	22.5(9.8-34.2)	18.0(9.0-34.0)	0.778
ALB	17.0(10.0-23.0)	17.0(12.8-24.2)	11.0(8.0-18.0)	0.085
PT	12.0(8.0-20.0)	14.0(8.0-20.5)	9.0(7.0-16.0)	0.143
HBV DNA	348786,257 (0,0 - 18700000)	101425,0 (0,0 - 2.295.572)	113(0,0-745)	0,346
HDV Genótipo3	61 (100)	44	17	
AgHbe				
Positivo	1 (1,6)	1(2,27)	0(0)	
Negativo	60 (98.4)	43(97,73)	17(100)	

BT* - Bilirrubina Total

AFP** - Alpha-fetoproteína

Fonte: Autoria própria

Foi avaliado um perfil multi-analítico de 92 moléculas inflamatórias sistêmicas (quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento) em todas as amostras, por tecnologia de Ensaio de Extensão de Proximidade (PEA) (ensaio Proseek Multiplex Inflammation I). Destas, 65 foram efetivamente analisadas (tabela 4). O padrão de expressão das SIMs analisadas mostrou-se diferente entre pacientes com fibrose avançada ou cirrose e pacientes com fibrose mínima ou nenhuma. Dentre as 65 SIMs analisadas, apenas cinco apresentaram significância estatística, MCP.4 ($p = 0,032$), CCL19 ($p = 0,024$), EN.RAGE ($p = 0,014$), SCF ($p = 0,01$) e IL 18 ($p = 0,054$). Embora a maioria das moléculas inflamatórias sistêmicas não tenha apresentado significância estatística ($p > 0,05$), foi possível observar variações consideráveis dos seus níveis séricos na comparação entre os dois grupos, conforme demonstra a figura 15. Ao comparar os pacientes classificados na escala METAVIR, como F0, F1, F2, F3 e F4, pode-se observar que pacientes com estágio mais avançado de fibrose ou cirrose (F3 e F4) apresentam níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias mais elevados. Os

gráficos de dispersão representados na figura 16 mostram que os níveis de CCL19 ($p = 0,024$) e IL18 ($p = 0,05$) foram maiores em pacientes com grau avançado de fibrose, enquanto que EN. RAGE ($p = 0,014$), SCF ($p = 0,01$) e MCP4 ($p = 0,032$) apresentam níveis mais elevados entre os pacientes com baixo ou nenhum grau de fibrose.

Tabela 4 – Valor de p da comparação dos níveis de moléculas inflamatórias sistêmicas entre pacientes com fibrose avançada e paciente com grau mínimo ou sem fibrose.

$p \leq 0,01$	$0,01 < p < 0,05$	$0,05 < p < 0,5$	$p \geq 0,5$
SCF	CCL19	TGF.alpha	SLAMF1
EN.RAGE	MCP.4	TNFB	IL8
	IL18	TNFSF14	IL.15RA
		VEGFA	IL6
		NRTN	MMP.1
		IL.12B	X4E.BP1
		TRAIL	CCL28
		MCP.2	CD40
		CCL20	ADA
		FGF.23	CXCL6
		NT.3	CXCL5
		IL.18R1	SIRT2
		MMP.10	FGF.5
		LIF	IL33
		CCL4	TNFRSF9
		CXCL1	GDNF
		CD6	PD.L1
		LIF.R	Flt3L
		STAMPB	IL.10RA
		IL.17C	CASP.8
		FGF.21	IL10
		Beta.NGF	CSF.1
		CX3CL1	LAP.TGF.beta.1
		AXIN1	TRANCE
			DNER
			ST1A1
			MCP.3
			CCL23
			TWEAK
			CST5
			MCP.1
			CD5
			IL5
			CCL11
			IL.10RB
			CCL25
			AXIN1

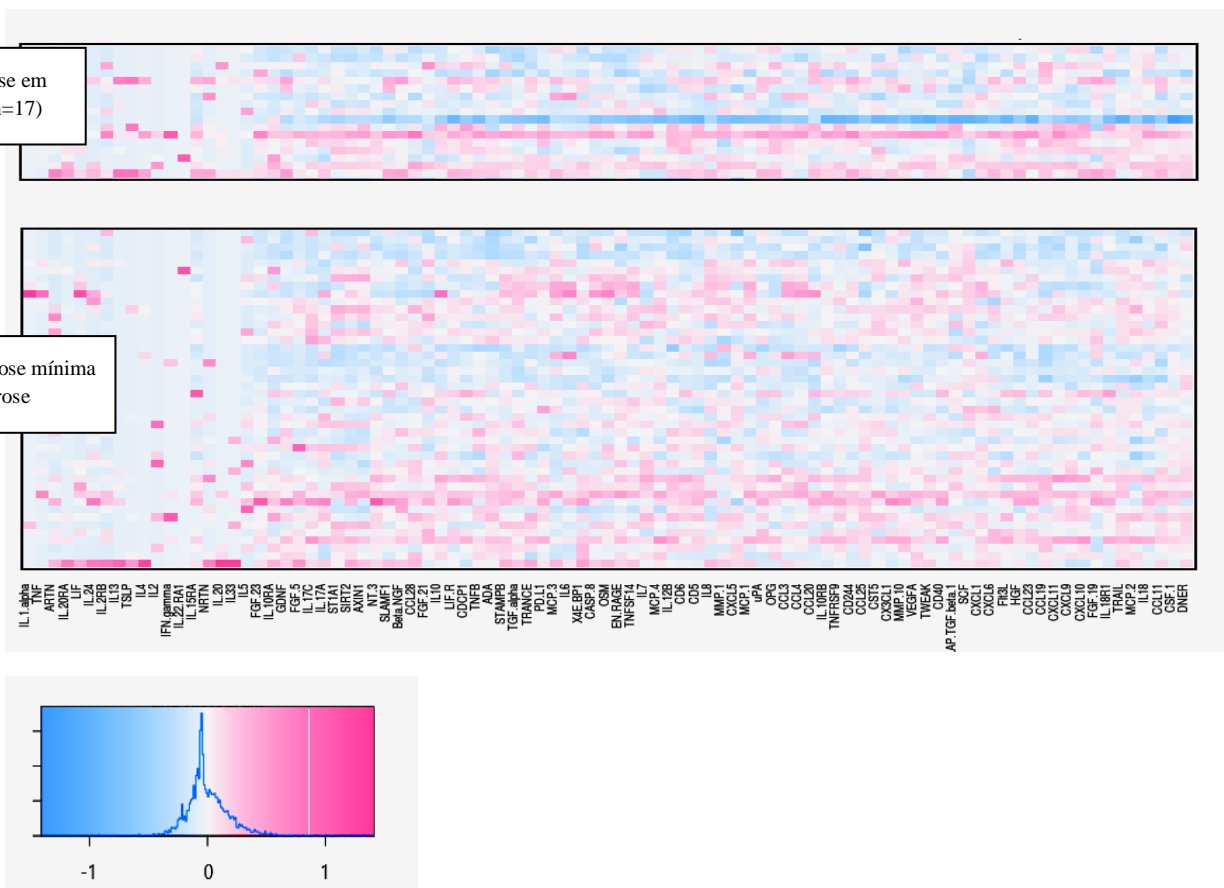
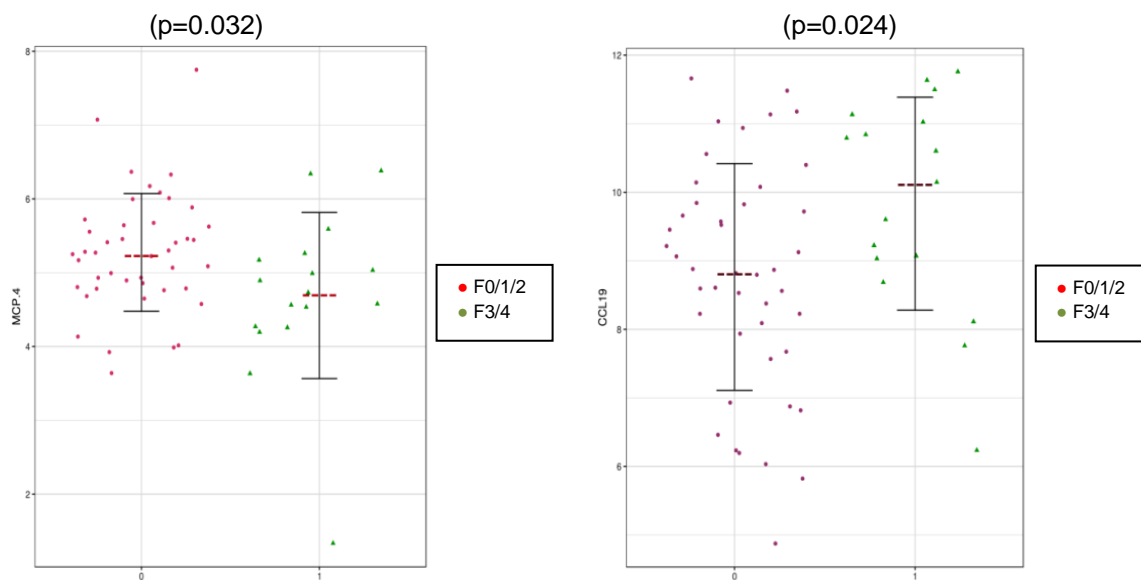
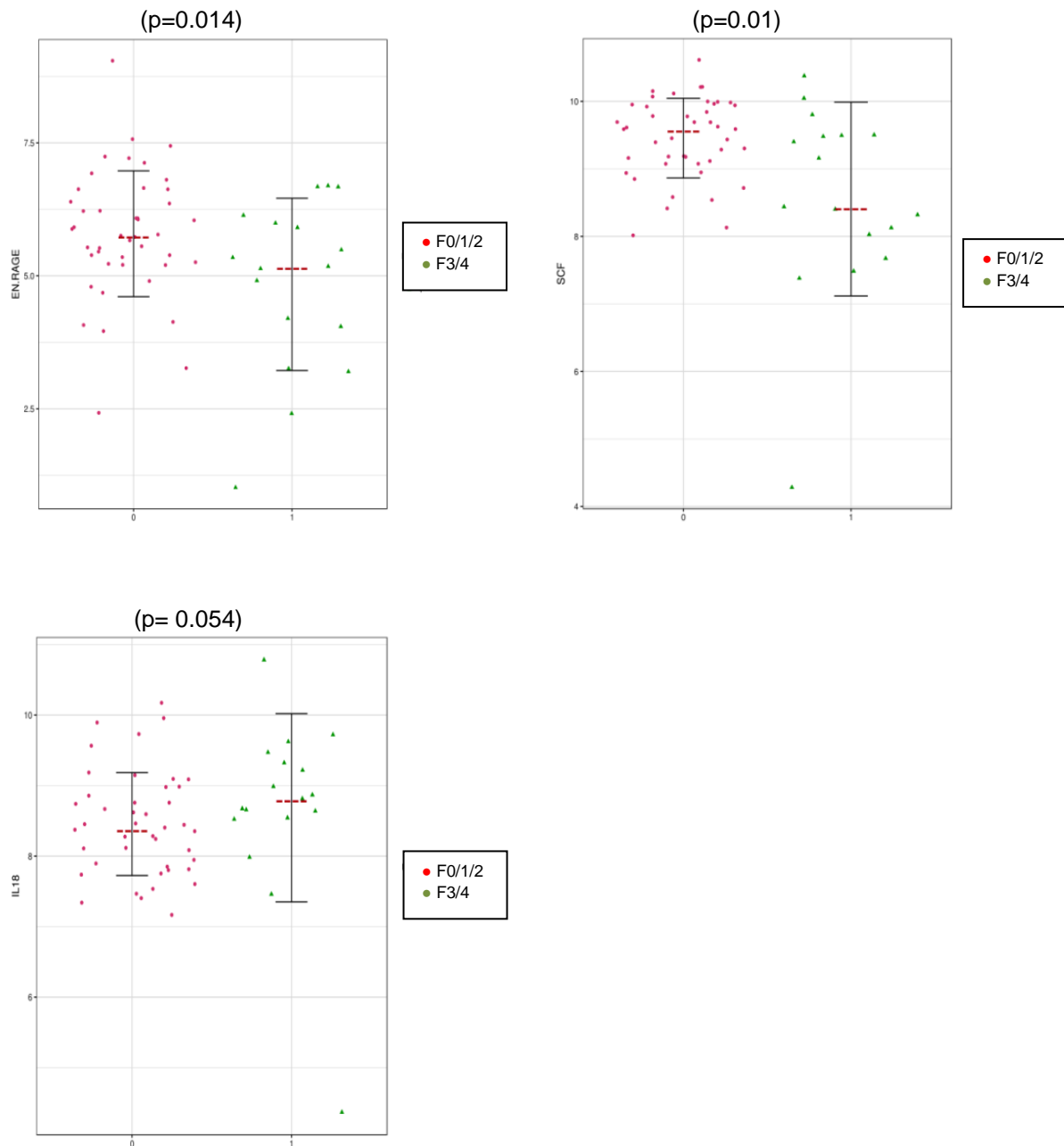


Figura 10 – Heat Map da comparação das concentrações séricas das moléculas inflamatórias sistêmicas dosadas em pacientes com fibrose avançada e em pacientes com fibrose mínima ou sem fibrose.

Figura 11 – Gráficos de distribuição das moléculas inflamatórias sistêmicas com valor de p estatisticamente significantes.





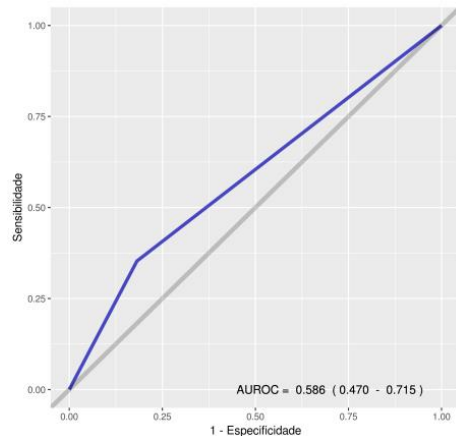
Marcadores clínicos de fibrose em pacientes infectados pelo HDV-G3

A avaliação de métodos não invasivos existentes para estadiamento de fibrose nas doenças hepáticas de outras etiologias (APRI, FIB-4 e AST / ALT) revelaram baixa sensibilidade e VPP com AUROC máximo de 0,586 para o escore APRI e FIB-4 e

0,503 para a relação AST/ALT. Embora os resultados tenham mostrado uma especificidade relativamente alta nos três escores analisados, nenhum revelou valor preditivo (VPN) superior a 50%.

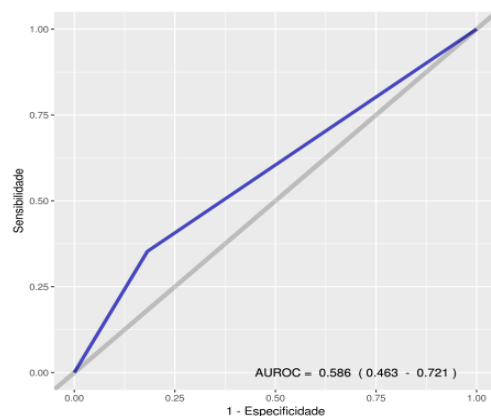
Figura 12 – Sensibilidade das escalas APRI, FIB-4 e da relação AST/ALT na identificação do estágio de fibrose em pacientes infectados com HDV-G3.

APRI Score



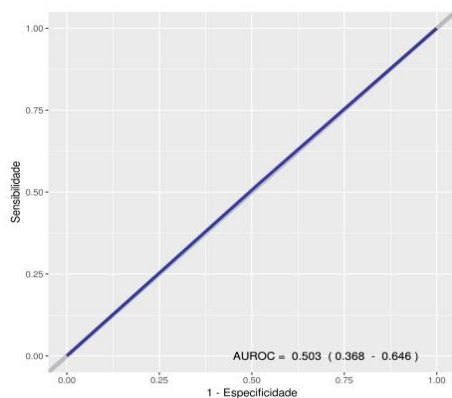
	Est	SdEr	OR (2.5%-97.5%)	p value
(Intercept)	-1.186	0.345	0.306 (0.148 - 0.580)	0.0005
APRI Score	0.898	0.641	2.455 (0.681 - 8.694)	0.1609

FIB-4 Score



	Est	SdEr	OR (2.5%-97.5%)	p value
(Intercept)	-1.186	0.345	0.306 (0.148 - 0.580)	0.0005
FIB4 Score	0.898	0.641	2.455 (0.681 - 8.694)	0.1609

Relação AST/ALT

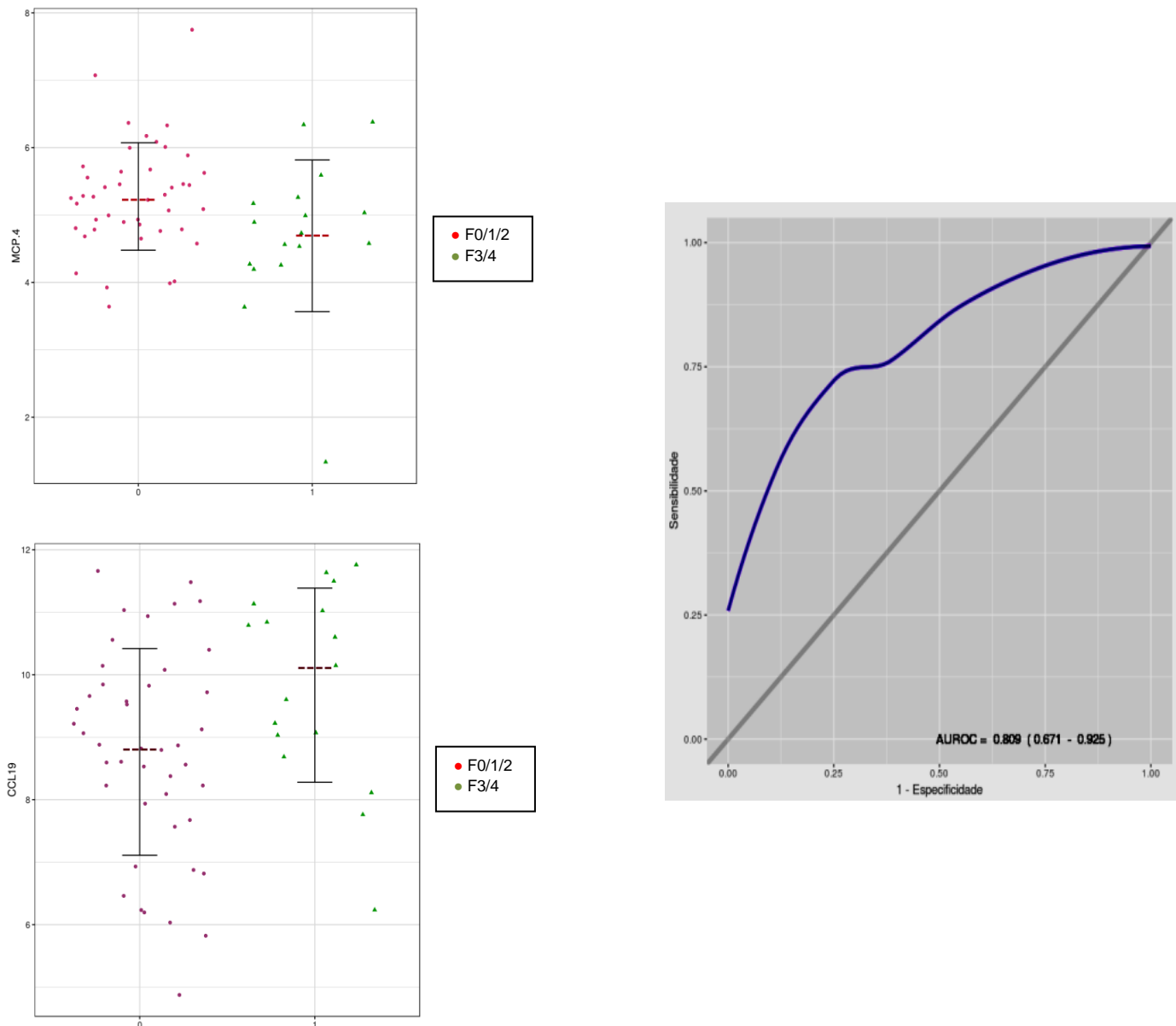


	Est	SdEr	OR (2.5%-97.5%)	p value
(Intercept)	-0.965	0.415	0.381 (0.159 - 0.828)	0.0201
AST/ALT	0.027	0.572	1.027 (0.333 - 3.209)	0.9626

Considerações sobre a Curva ROC dos SIMs

Uma análise de regressão logística foi realizada para comparar os resultados da biópsia hepática, considerado o padrão ouro para a definição do grau de fibrose em pacientes com doença hepática crônica, com as SIMs quantificadas entre os grupos de pacientes com fibrose avançada e pacientes sem fibrose ou estágio inicial de doença. As variáveis independentes para o modelo final foram selecionadas via backwise stepwise. Pode-se observar na figura 13 que a citocina CCL19 e a quimiocina MCP.4, quando analisadas em conjunto, apresentam uma AUROC com sensibilidade de diferenciação do estágio de fibrose de 80,9%, quando comparada à biópsia hepática. A regressão logística também mostrou que a associação de CCL19 ($p = 0,004$) e MCP4 ($p = 0,032$) apresentou um Odds Ratio (OR) de 2,202.

Figura 13 – Curva ROC comparando a sensibilidade da combinação dos níveis séricos de CCL19 e MCP.4 em identificar estágio avançado de fibrose em pacientes infectados com HDV-G3 com a biópsia hepática.



	Est	SdEr	OR (2.5%-97.5%)	p value
(Intercept)	-1.916	2.467	0.147 (0.001 - 22.905)	0.431
CCL19	0.789	0.275	2.202 (1.358 - 4.059)	0.004
MCP.4	-1.286	0.443	0.277 (0.102 - 0.604)	0.003

DISCUSSÃO

Alguns estudos recentes com foco na fisiopatologia da infecção pelo HDV demonstraram que a resposta imune do hospedeiro contra o vírus está diretamente ligada a danos no tecido hepático, bem como ao curso clínico da doença, mas, até o momento, nenhum estudo avaliou a importância de moléculas inflamatórias sistêmicas (SIMs) no desfecho clínico nesses pacientes. Este estudo fornece a primeira análise abrangente sobre a associação de SIMs e fibrose avançada em pacientes com HDV-G3.

A população do estudo foi constituída por 61 indivíduos, com idade média geral de 41 anos (39 anos entre pacientes sem fibrose ou fibrose mínima e 44 anos entre pacientes com estágio avançado de fibrose). A infecção foi mais prevalente em homens, em média duas vezes maior que nas mulheres, mas quando o grau de fibrose entre os dois grupos foi comparado, a proporção de fibrose em estágio avançado em homens e mulheres foi muito próxima (30,8% e 22,7%, respectivamente). Outros estudos realizados em populações nativas da Amazônia já haviam demonstrado o mesmo padrão de distribuição descrito^(1,3,7-9). Pacientes em estágios mais avançados da doença hepática (fibrose avançada ou cirrose) apresentaram níveis séricos de AST e ALT mais elevados que os pacientes sem fibrose ou em estágios iniciais ($p = 0,024$ e $p = 0,020$, respectivamente). Os níveis plaquetários em pacientes com lesão hepática mais avançada foram menores do que nos pacientes sem ou com fibrose mínima, ainda que sem significância estatística. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores que avaliaram os níveis das aminotransferases em sangue de pacientes infectados com o HDV-G3 de populações da região Amazônica^(115,118). Curiosamente, os níveis séricos de gamaglutamiltransferase (γ GT) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados. Lemoine et al. (2015), estudando um grupo de pacientes cronicamente infectados pelo HBV na África Ocidental, concluíram que a razão plaquetária gama-glutamil transpeptidase (RPG) prediz fibrose hepática avançada e cirrose em pacientes com hepatite B^(115,117). Zachou et al. (2010), estudando os níveis quantitativos de AgHBs e HDV-RNA na hepatite Delta crônica em oitenta pacientes recrutados na Alemanha, Turquia e Grécia, todos infectados com HDV-G1, identificaram trinta e cinco pacientes (48%) com fibrose avançada (Ishak 3-4) e quinze (20,5%) com cirrose. A carga viral do HDV variou de $1,1 \times 10$ a $8,4 \times 10$ cópias/ml com 60% dos pacientes apresentando níveis de HDV-RNA acima de 10 cópias/ml, acompanhadas de baixa viremia do HBV (<10 cópias/ml). No entanto, os níveis de

HDV-RNA e HBV-DNA não apresentaram correlação inversa direta. O HDV-RNA correlacionou-se positivamente com o AgHBs e negativamente com a idade. O AgHBs correlacionou-se negativamente com a idade e positivamente com a classificação histológica. Apenas a gama-glutamilttransferase (γ GT) foi independentemente associada à cirrose ($P = 0,032$). A falta de um papel da γ GT na patogênese da infecção pelo HDV-G3 nessa casuística sugere que novas investigações são necessárias para elucidar os resultados encontrados.

Apenas um paciente apresentou resultado AgHBe positivo. Esses dados divergem de um estudo anterior conduzido por Braga et al. ⁽¹¹⁹⁾, que identificou um número de pacientes AgHBe positivos muito maior numa coorte de co-infectados pelo HBV/HDV, bem como uma população mais jovem, com uma idade média de 22 anos⁽¹¹⁹⁾.

Os resultados do HBV-DNA nessa casuística demonstraram que pacientes em estágio inicial ou sem fibrose possuem carga viral de HBV mais elevada que as de pacientes com fibrose avançada, ainda que não tenha havido significância estatística ($p = 0,346$). Alfaiate et al. (2016), estudando a suscetibilidade a drogas diretas anti-HBV em pacientes infectados com HDV, descreveram uma diminuição significativa de marcadores de replicação do HBV, incluindo AgHBe, HBV-DNA total e RNA pré-genômico, mas não evidenciou diminuição dos níveis de HBV-DNA de cadeia covalente circular fechada (cccDNA) nem de proteínas do envelope viral (AgHBs). Os autores estabeleceram um modelo celular para caracterizar mais detalhadamente a interferência direta do HBV e do HDV e a interação indireta entre os dois vírus por meio de respostas imunes inatas. Outro estudo, conduzido por Heidrich et al. (2012), com 512 pacientes com hepatite Delta, detectou AgHBe positivo em 71 deles, correspondendo a 13,3% do total estudado. A positividade do AgHBe foi associada a uma maior atividade bioquímica da doença e níveis mais altos de AgHBs, em pacientes co-infectados pelo HDV. Sessenta e um por cento dos pacientes AgHBe-positivos infectados pelo HDV apresentaram níveis de HBV-DNA abaixo de 2000 UI/ml, pelo menos uma vez, durante o acompanhamento. Tanto os pacientes AgHBe positivos quanto os negativos mostraram um curso clinicamente severo e semelhante, a longo prazo, com cerca de metade dos pacientes desenvolvendo uma complicação clínica relacionada ao fígado, após um período médio de acompanhamento de 51 meses (variação: 9-193 meses) ⁽¹²⁹⁾.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que a infecção pelo HDV desempenha um papel crucial na modulação da replicação do HBV, suprimindo-a na maioria dos casos, e pode estar relacionada à maior severidade do dano hepático⁽¹²⁰⁻¹²²⁾.

No presente estudo, das 64 moléculas inflamatórias sistêmicas analisadas, cinco apresentaram associação estatisticamente significativa com o estágio de fibrose hepática: MCP4 ($p = 0,032$), CCL19 ($p = 0,024$), EN.RAGE ($p = 0,014$), SCF ($p = 0,01$) e IL 18 ($p = 0,054$). Até o momento, não há estudos relacionando SIMs com grau de fibrose na hepatite Delta, portanto, esses achados apontam para a necessidade de aprofundamento na investigação do papel das citocinas no curso da doença hepática provocada pelo HDV-G3.

A MCP-4, também chamada de CCL13, é induzida por proteínas inflamatórias, como IL-1 e TNF α . Ela atua como um ligante para três diferentes receptores (CCR2, CCR3 e CCR5) acoplados à proteína G e ativa a sinalização intracelular em monócitos, linfócitos T, eosinófilos e basófilos, estando associada às respostas alérgicas. Tem sido sugerido que a CCL13 atua em uma variedade de doenças inflamatórias crônicas, incluindo asma⁽¹²³⁾. Neste estudo, os níveis de MCP-4 em pacientes com fibrose avançada foram menores do que em pacientes sem fibrose ou em estágio inicial. Paradoxalmente, enquanto que em pacientes asmáticos altos níveis de MCP-4 estão implicados na exacerbação da doença, em indivíduos infectados com o HDV-G3 essa quimiocina parece diminuir a atividade inflamatória.

O papel da CCL19 é atrair células do sistema imune inato, principalmente células dendríticas, para o local da inflamação, retroalimentando o processo e contribuindo para a exacerbação e manutenção da atividade inflamatória⁽¹²⁴⁾. Estudos *in vitro* demonstraram que, ao induzir a ativação e proliferação de células imunes do sistema inato, a CCL19 contribui para aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Os resultados deste estudo mostraram que os níveis de CCL19 em pacientes com fibrose avançada são maiores do que no outro grupo. A atração de células do sistema imune inato para o fígado durante a infecção pelo HDV-G3 parece ser um fator-chave na evolução do dano tecidual hepático.

Embora os resultados dos níveis de MCP4 e CCL19 encontrados neste estudo pareçam contraditórios, uma vez que ambos são descritos como recrutadores de células do sistema imune inato para o local da infecção, sugerem que moléculas inflamatórias sistêmicas atuam juntas, modulando os efeitos uma da outra, agindo de forma diferente em várias doenças.

Hasegawa et al. ⁽¹²⁵⁾, estudando a regulação da expressão de EN.RAGE em macrófagos humanos, demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, aumentam a expressão de EN RAGE em macrófagos residentes teciduais, contribuindo para a manutenção do processo inflamatório⁽¹²⁵⁾. Nos nossos resultados, foram encontrados níveis de IL-6 mais elevados em pacientes com fibrose avançada, mas, a expressão de EN. RAGE encontrava-se mais elevada nos pacientes em estágio inicial ou sem fibrose. É provável que na infecção pelo HDV-G3 a regulação da expressão de moléculas inflamatórias sistêmicas seja influenciada por outros fatores ainda desconhecidos. Isso demonstra a importância do desenvolvimento de novas pesquisas para esclarecer a fisiopatologia da infecção.

O SCF (fator estimulador de célula-tronco) é uma citocina pleiotrópica que exerce seu papel em diferentes estágios de desenvolvimento da medula óssea, afetando a ativação dos eosinófilos, quimiotaxia e sobrevivência de mastócitos e basófilos. Estudos anteriores mostraram aumento da produção de SCF em diferentes doenças alérgicas como asma, rinite alérgica e dermatite atópica ⁽¹²⁶⁾. A expressão de SCF e do receptor c-kit mRNA no epitélio das vias aéreas de pacientes com asma mostrou-se aumentada, em comparação com as vias aéreas dos controles saudáveis. Em nosso estudo, os níveis de SCF foram maiores em pacientes com fibrose mínima ou sem fibrose do que em pacientes com fibrose avançada. Esses resultados divergentes em doenças tipicamente inflamatórias parecem confirmar a natureza pleiotrópica dessa citocina. Pode haver feedback negativo da expressão de SCF nos pacientes com hepatite Delta em estágio avançado de lesão hepática e ativação de diferentes vias de manutenção do processo inflamatório. O conhecimento desse complexo mecanismo pode fornecer dados importantes para o desenvolvimento de novos arsenais terapêuticos, pois é sabido que a exacerbação da atividade necroinflamatória, mediada por citocinas, é um fator chave para o desfecho de inúmeras doenças sistêmicas crônicas.

Sharma et al. ⁽¹²⁷⁾ realizaram um estudo para investigar o possível papel da IL-18 na patogênese e persistência do HCV. Os níveis de IL-18 foram medidos no soro de 50 pacientes em vários estágios da infecção pelo HCV (resolvidos, crônicos e cirróticos) e comparados com aqueles de controles normais. A expressão gênica de IL-18 foi estudada em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em cada grupo e em tecido de biópsia hepática de pacientes com hepatite C crônica. Os níveis séricos médios de IL-18 estavam marcadamente mais elevados em pacientes com hepatite crônica e cirrose do que em pacientes com infecção pelo HCV resolvida. As concentrações

séricas de IL-18 foram relacionadas à gravidade da doença hepática em pacientes cirróticos ⁽¹²⁷⁾. Houve também uma forte correlação positiva dos níveis de IL-18 com atividade histológica e escore de necrose. Em nosso estudo, os níveis séricos de IL-18 também foram maiores em pacientes com fibrose avançada, sugerindo uma relação entre essa citocina e a atividade inflamatória do fígado.

A hepatite Delta continua a ser um desafio para a medicina, pois os pacientes infectados frequentemente evoluem para cirrose e carcinoma hepatocelular ⁽¹²⁸⁾. Os tratamentos disponíveis têm se mostrado pouco eficazes no controle da progressão da doença. Nos últimos anos, alguns ensaios clínicos usando novos medicamentos foram conduzidos com resultados aparentemente promissores. Na ausência de medicações mais eficazes, a monitorização do estágio de fibrose em pacientes com hepatite D crônica é fundamental para identificar pacientes graves que requerem intervenção médica imediata ⁽¹²⁹⁾. O padrão ouro no estadiamento de fibrose e atividade necroinflamatória continua sendo a biópsia hepática. Entretanto, por se tratar de um método invasivo com riscos relevantes, não é utilizada para acompanhamento seriado dos pacientes ⁽¹³⁰⁾. Uma alternativa seria o desenvolvimento de escores de avaliação de fibrose não invasiva. Métodos clássicos utilizados, desenvolvidos para estadiamento de doenças hepáticas de outras etiologias, falharam em avaliar os pacientes deste estudo, revelando baixa sensibilidade e VPPs com AUROC máximo de 0,586. Estes resultados são consistentes com um estudo conduzido por Heidrich e colaboradores (2018), que também demonstrou baixa sensibilidade dos escores clássicos de avaliação de fibrose hepática. Concluiu-se que, a biópsia hepática ainda é necessária como uma ferramenta diagnóstica e na vigilância da evolução clínica da hepatite Delta.

Todos os estudos acima mencionados corroboram com os achados desta coorte e sugerem uma correlação entre o nível de citocinas/quimiocinas e a atividade inflamatória em diversos modelos de doença. Nosso estudo também sugere que algumas citocinas estão implicadas na fisiopatologia da fibrose hepática em pacientes com HDV-G3 crônico e podem ser usadas como marcadores biológicos para a identificação do estágio de fibrose. O uso combinado dos níveis séricos de CCL19 e MCP.4 mostrou ser um método não invasivo sensível para a detecção de fibrose avançada em pacientes cronicamente infectados com o HDV-G3, mas ainda precisa ser validado em coortes independentes e também deve ser estudado em pacientes com outros genótipos de HDV.

É importante ressaltar que alguns estudos demonstraram a influência da carga viral do HBV e do HDV em pacientes co-infectados sobre os níveis séricos de citocinas

e, conseqüentemente, na evolução clínica da doença. Neste estudo, apenas a carga viral do HBV dos pacientes foi analisada.

Nessa casuística, apenas um patologista avaliou as amostras de tecido hepático. Portanto, não é possível comparar diferentes análises do mesmo material. Outra limitação foi a impossibilidade de avaliação de todas as SIMs dosadas nesta série. Algumas SIMs não puderam ser avaliadas por motivos técnicos (os pontos de corte para leitura não foram atingidos). Nenhum dos parâmetros analisados neste estudo foram validados por estudos prévios com coortes de pacientes infectados com HDV-G3, de modo que não podemos comparar os resultados deste estudo com outros. Escore discriminante de fibronectina (FDS) prediz fibrose hepática com alto grau de precisão em pacientes infectados com outros vírus hepatotrópicos, diminuindo potencialmente o número de biópsias hepáticas necessárias. Também não há estudos de exatidão desse escore na avaliação do grau de fibrose em pacientes infectados pelo HDV-G3. Assim, estudos futuros precisarão investigar mais detalhadamente características histológicas dessa infecção e sua correlação com parâmetros clínicos e virológicos.

CONCLUSÕES

Até o momento, não há estudos relacionando moléculas inflamatórias sistêmicas ao grau de fibrose em pacientes com hepatite Delta HDV- G3. Nesse estudo, os pacientes com fibrose avançada ou cirrose, diagnosticados por biópsia hepática, apresentaram níveis mais elevados de citocinas e quimiocinas relacionadas a recrutamento e ativação de células do sistema imune inato e a processos inflamatórios. A manutenção de uma resposta imune de perfil Th1 com expressão de citocinas inflamatórias parece estar implicada na evolução clínica da doença hepática provocada pelo HDV-G3 e na maior gravidade do dano hepático. Os escores padrão de avaliação de fibrose por método não invasivo mostraram baixo desempenho na infecção pelo HDV-G3. Isso torna o acompanhamento desses pacientes um desafio para os médicos. Sugerimos aqui que a determinação de CCL19 e MCP.4 pode ser usada para identificar pacientes com fibrose avançada. Além disso, este estudo fornece novos insights sobre a imunopatogênese da infecção por HDV G3.

4.3. ARTIGO 3

CÉLULAS NK ESTIMULADAS COM INF α E IL12/IL18 REDUZEM O NÚMERO DE HEPATÓCITOS INFECTADOS PELO HDV *IN VITRO*

Maurício de Souza Campos*
Thomas Schiderwan**
Heiner Wedemeyer***
Maria Isabel Schinoni****

Introdução: O vírus da hepatite D (HDV) é um vírus dependente do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) para entrar no hepatócito e iniciar a montagem do vírion. O HDV não está diretamente envolvido na citotoxicidade e inflamação hepática. Estudos têm sugerido que a lesão hepática provavelmente está associada à resposta imunológica do hospedeiro contra o vírus. O presente estudo objetivou examinar o potencial citolítico das células NK contra hepatócitos contaminados com partículas antigênicas do HDV e a excreção de citocinas na presença ou ausência de estimulação com Interferon alpha (INF α) e Interleucinas 12 e 18 (IL-12 e IL-18). **Método:** Foram desenvolvidos protocolos específicos para esse estudo. Todo procedimento foi realizado *in vitro*, com uso de técnicas de Biologia Molecular e ensaios por Citometria de fluxo. Todos os protocolos desenvolvidos foram baseados em orientações dos fabricantes dos kits utilizados e passaram por criterioso controle de qualidade de dupla checagem. **Resultado:** Em cultura *in vitro* de PBMC e hepatócitos da linhagem Huh 7.5, infectados com partículas virais do HDV – G1, o estímulo das células efectoras com INF alpha e IL-12 e IL – 18 por 6h reduziu em 60% o número de hepatócitos infectados. Culturas de 24h estimuladas com IL-12 e IL – 18 reduziram quase em 100% o número de hepatócitos infectados com partículas de HDV-G1. O estímulo de células efectoras, com IL-12 e IL-18 concomitantemente, potencializou a ação de células citolíticas NK sobre hepatócitos contaminados. **Conclusões:** A relação entre o número de células efectoras (PBMC) e células alvo (Hepatócitos da linhagem Huh 7.5 infectados com partículas imunogênicas do HDV) e o tempo de estímulo da cultura determinam a redução de células infectadas. O estímulo *in vitro* de células efectoras com IL-12 e IL-18 potencializaram os efeitos citotóxicos das mesmas.

Palavras-chave: Células NK. HDV-G1. Estímulo *in vitro*. Células Huh 7.5. Citometria de Fluxo.

*Correspondente: Maurício de Souza Campos, doutorando em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA); Mestre Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA). Correspondência: Maurício de Souza Campos. Núcleo de Ensaios Clínicos da Bahia – Hospital Universitário Professor Edgard Santos. 1º Subsolo = Rua. Dr. Augusto Viana, S/N - CEP 40110-060, Salvador, BA – Brasil. Tel (71) 3283-8278. mscampos2012@gmail.com

** Doutorando em Biologia Molecular e Imunopatologia na Escola Médica de Hanover – Alemanha.

*** Médico Gastrohepatologista, Doutor em Hepatologia. Diretor do Hospital Universitário de Essen – Alemanha.

****Médica, Doutora em Medicina e Saúde pela Universidade Federal da Bahia. Professora de Bioquímica Médica na Faculdade de Medicina – UFBA e Chefe do Serviço de Investigação do Núcleo de Ensaios Clínicos da Bahia.

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite D (HDV) é um vírus que pode se propagar apenas na presença do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) ⁽¹⁾. Aproximadamente quinze milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas com o HDV. A infecção persistente por HDV se desenvolve em aproximadamente 90% dos portadores de HBV superinfectados com HDV, levando ao desenvolvimento de cirrose hepática precoce e descompensação hepática ⁽²⁾. Até o momento, a terapia padrão anti-HDV com interferon- α (IFN- α) parece ser a única opção de tratamento, com taxas de resposta limitadas (<25%) ⁽²⁾. O HDV não está diretamente envolvido na citotoxicidade e inflamação hepática. Estudos têm sugerido que a lesão hepática provavelmente está associada à resposta imunológica do hospedeiro contra o vírus. Infecções virais persistentes geralmente são caracterizadas pela presença de células T antivirais, que são capazes de controlar a infecção, mas, em algumas situações, esse controle é ineficaz, graças ao mecanismo de exaustão celular. A recuperação funcional destas células T específicas para vírus pode ser alcançada através de engatilhamento de processos de sinalização intracelular que inclui sinais mediados por receptores de células T (sinal 1), um sinal coestimulatório (sinal 2) e um sinal de citocina (sinal 3), que são cada vez mais reconhecidos como sendo coletivamente crucial na geração, otimização e sustentação da diferenciação de células T efetoras específicas de patógenos ⁽⁴⁾.

Danos hepáticos imunomediados em pacientes com infecção por HBV têm sido convencionalmente atribuídos à morte citolítica de hepatócitos infectados por células T CD8 específicas para o vírus. Contudo, trabalhos anteriores demonstraram a presença de células T CD8 específicas do HBV em altas quantidades no fígado de pacientes que controlam a infecção pelo HBV, sem qualquer evidência de inflamação hepática. Os resultados têm demonstrado que a característica distintiva entre pacientes com ou sem doença hepática crônica relacionada ao HBV é a presença de um infiltrado linfocítico não antígeno-específico no tecido hepático ⁽³⁾. Os mecanismos que resultam no recrutamento e ativação desses linfócitos não específicos foram explorados em modelo de camundongo transgênico infectado com HBV. Neste modelo, foi possível reduzir a intensidade do dano hepático por inibição do infiltrado celular não específico ^(4,5), reforçando o conceito de que a inflamação do fígado iniciada por células CD8 específicas do vírus é amplificada por outras células do sistema imunológico ⁽⁶⁾.

Um dos maiores constituintes encontrados no infiltrado linfocitário em camundongos transgênicos infectados com HBV são células assassinas naturais (células NK), com um aumento de 10 a 12 vezes em seus números, no infiltrado inflamatório, em comparação com outras doenças^(4,5). Células NK (fenótipo CD3-/CD56+) são também um componente importante do infiltrado no fígado humano, compreendendo 30-40% do total de linfócitos intra-hepáticos⁽⁷⁾. Um aumento precoce na circulação de células NK foi documentado na fase de incubação na infecção pelo HBV, sugerindo que eles podem contribuir para a contenção viral neste cenário⁽⁸⁾. O efeito antiviral e o potencial imuno patogênico das células NK em pacientes com infecção crônica por HBV ainda é pouco conhecido.

Sabe-se que a função efetora da célula NK é resultado do equilíbrio de sinais, através de seus receptores ativadores e inibitórios. Esse equilíbrio é influenciado pela presença de citocinas. Dessa forma, as células NK podem ter sua atividade antiviral ativada diretamente por citocinas promotoras de citotoxicidade, como o IFN- α ⁽²¹⁾ e pela expressão de TRAIL (22) e IL-12, que favorecem a produção de IFN- γ ⁽²¹⁾. A produção de IFN- α caracteriza os estágios iniciais das infecções virais agudas, mas não está claro se a sua liberação pode, também, ser desencadeada por flutuações na carga viral encontradas na infecção crônica por HBV. Os efeitos dessa produção podem ser modulados ou modificados pelo aumento de outras citocinas, tais como IL-1 β ⁽²⁵⁾ e IL-8^(26,27).

Os efeitos dos mecanismos acima descritos durante a coinfeção HBV/HDV ainda permanecem sem elucidação, embora muitos estudos sugiram que células assassinas naturais (NK) pertencentes ao sistema imune inato, desempenhe um papel crucial na evolução clínica da hepatite Delta. No presente estudo, realizamos uma análise fenotípica de células NK do sangue periférico, bem como da sua ativação e expressão de marcadores biológicos durante o contato, *in vitro*, com hepatócitos infectados com partículas imunogênicas do HDV-G1. Nossos objetivos foram examinar o potencial citolítico das células NK em hepatócitos contaminados com partículas antigênicas do HDV e a excreção de citocinas na presença ou ausência de estimulação com Interferon alfa (INF α) e Interleucinas 12 e 18 (IL-12 e IL-18).

MATERIAIS E MÉTODO

Trata-se de uma plataforma *in vitro* desenvolvida especificadamente para este experimento. A aquisição das células utilizadas na cultura, bem como o seu preparo, encontram-se descritos a seguir:

Linhagem Celular

Células da linhagem de hepatocarcinoma humano Huh7.5 foram utilizadas nesse trabalho. As mesmas foram doadas pelo Laboratório de Virologia da Escola Médica de Hanover, coordenado pelo Professor Thomas Von Hans e cultivadas em uma estufa contendo 5% de CO₂ a 37 ° C, em meio de cultura contendo DMEM (Paneco, Rússia), 10% de soro embrionário bovino (Gibco, Estados Unidos), glutamina 2 mM, e gentamicina 50 µg/mL. Estudos anteriores, desenvolvidos no mesmo centro de pesquisa, com HCV e HDV, também utilizaram a mesma linhagem celular ⁽¹²⁾.

Transfecção e incubação celular

Um dia antes da transfecção, alíquotas de 5×10^4 células/mL de hepatocarcinoma humano Huh7.5 foram colocadas em uma placa de 24 poços (SPL Life Sciences, Coréia do Sul). No dia seguinte, foi realizada a transfecção com partículas de HDV-G1, utilizando a técnica da Transfecção Turbo Fect Reagent (Thermo Scientific, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante. Um dia após a transfecção, foram adicionados ao meio de cultura 2,5 mM de DFMO, 10 µM de MDL, e 20 µM de ENSPM. As células foram incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C, por 48 h. As concentrações escolhidas para o meio de cultura foram identificadas como ótimas, em experimentos preliminares. Após o final da incubação, as amostras foram analisadas por técnica de biologia molecular para determinação da proporção de células Huh 7.5 infectadas pelo HDV. Alíquotas com proporções de hepatócitos infectados igual ou maior que 4% foram utilizadas para preparação final da cultura, contendo células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

Isolamento e Armazenamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico

O protocolo do estudo encontra-se em conformidade com as diretrizes éticas da Declaração de 1975 de Helsinque e foi aprovado pelos Conselho e Comitê de Ética da Escola Médica de Hanover. Amostras de sangue periférico de voluntários foram coletadas no Serviço de Medicina Transfusional do Hospital da Escola Médica de Hanover. As amostras eram provenientes do sangue retido no equipo de transfusão (aproximadamente 20ml) e não representaram perdas para o estoque do banco de sangue. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por gradiente de densidade de Ficoll-Isopaque padrão e centrifugação (Lympho Separation Medium, MP Biomédicos, OH). As células foram marcadas com anticorpos ligados a fluorocromos anti CD56-PE e anti CD3-FITC e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Debris celulares e células mortas foram excluídas da análise, baseando-se em sinais fluorescentes de iodeto de propídio emitidos pelos mesmos.

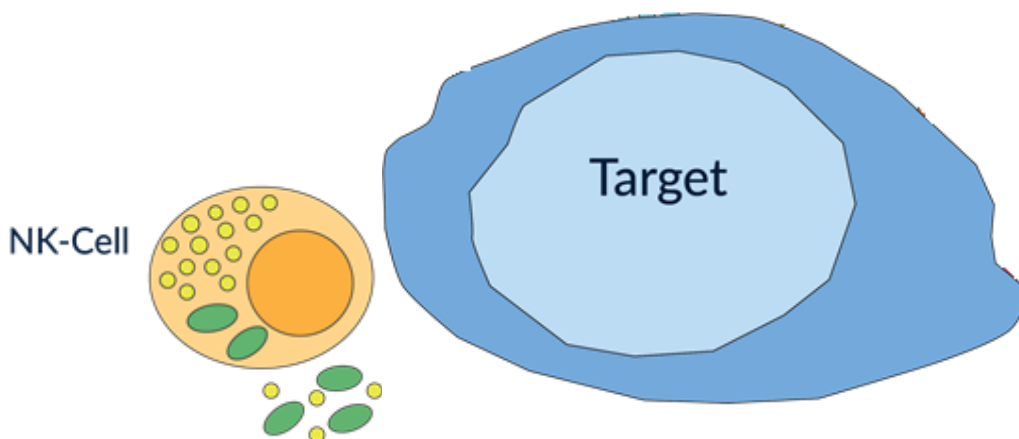
Preparação das coculturas contendo hepatócitos da linhagem Huh 7.5 e PBMC

Após isolamento de PBMC, foram aliqüotadas três amostras de 100.000 células de cada paciente. Cada aliqüota foi suspensa em 1 mL de AB medium e colocada em um poço de uma placa de 24 poços. Cada uma das aliqüotas foi submetida a uma condição distinta:

- Aliqüota A – sem nenhum estímulo;
- Aliqüota B – estimulada com 10 μ L de IFN α (concentração de 100 ng/mL);
- Aliqüota C – estimulada com 5 μ L de IL-12 (concentração de 10 ng/mL) e 5 μ L de IL-18 (concentração de 100 ng/mL).

As aliqüotas foram então incubadas em estufa a 37°C e com 5% de Dióxido de Carbono, por 24 horas. Após período de incubação, foram adicionadas a cada aliqüota 100.000 células da linhagem Huh-7.5, transduzida via NTCP (receptor de entrada do HBV e HDV no hepatócito) com partículas de HDV geradas no Laboratório Virologia e Biologia Molecular da Escola Médica de Hanover. Foram preparadas coculturas com diferentes proporções entre célula efetora e célula alvo (E:T) de 1:1, 5:1, 10:1 e 15:1. Finalmente, as mesmas foram incubadas a 37° C e 5% de concentração de CO₂, em dois tempos distintos: 06 e 24 horas. A figura 14 representa a interação célula-célula da cocultura.

Figura 14 – Desenho esquemático da interação célula-célula na cocultura



Fonte: Autoria própria

Aquisição de resultados por Citometria de Fluxo

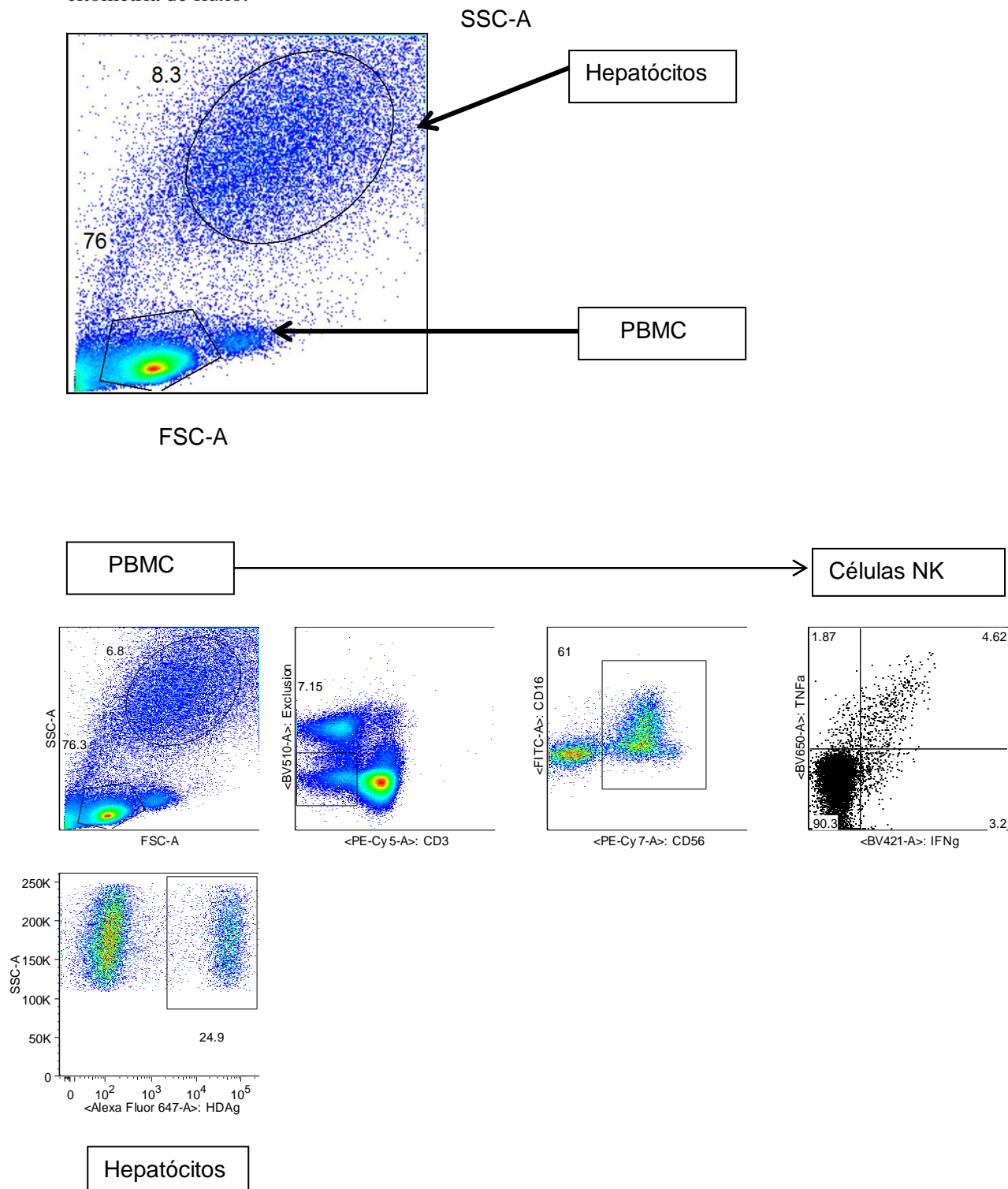
Após período de incubação, as células da cultura (PBMC + Hepatócitos) foram marcadas com anticorpos ligados a fluorocromos de acordo com o painel abaixo:

Figura 15 - Painel de anticorpos ligados a fluorocromos para marcação de proteínas de superfície e intracelulares.

Superfície		Intracelular	
Fluorocromo	Proteína	Fluorocromo	Proteína
FITC	CD56	PeCy5	CD107a
PE	Annexina	PeCy7	Mip-1b
PeCy5	CD107a	APC	HDAg
BV510	CD14 (V500)	BV421	IFNg
V500	CD19 (V500)	BV650	TNFa
BV510	CD3 (BV510)		
BV786	CD38		

Após marcação com anticorpos específicos ligados a fluorocromos, procedeu-se aquisição de eventos em citômetro de fluxo FACS BD com janelas abertas para hepatócitos e PBMC, conforme figura 16.

Figura 16 – Estratégia de aquisição de células hepatocitárias, PBMC e células NK por citometria de fluxo.



Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados em um pacote de software específico para análise de dados de citometria de fluxo, denominado Flow Jo. Os arquivos produzidos por citômetros de fluxo modernos são gravados no formato padrão de citometria de fluxo com uma extensão de arquivo (.fcs.).

RESULTADOS

Figura 17 - Proporção de hepatócitos infectados e excreção de $\text{INF}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ em culturas de PBMC e hepatócitos em diferentes relações E:T e sem estímulo.

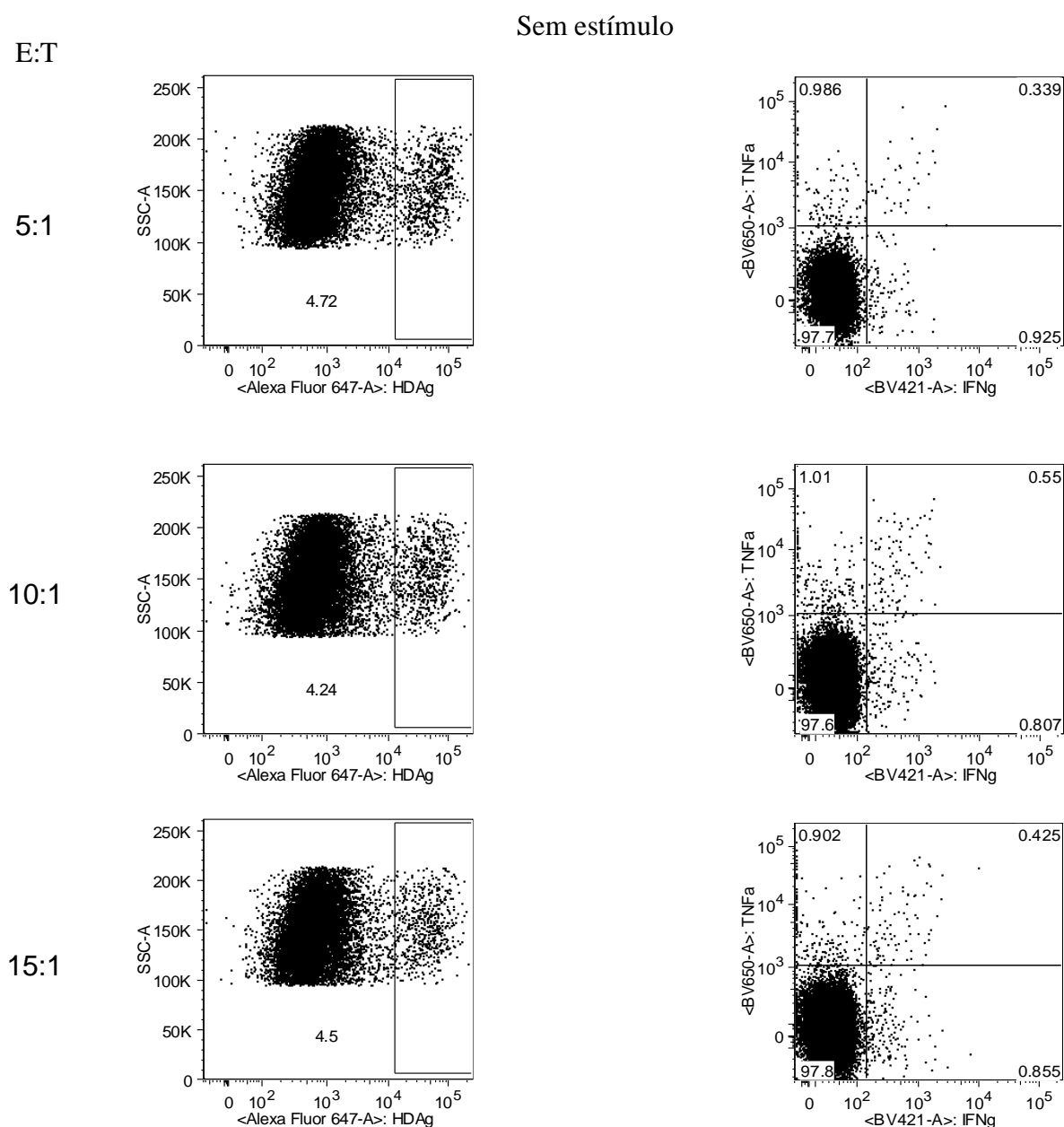


Figura 18 - Proporção de hepatócitos infectados e excreção de $\text{INF}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ em culturas de PBMC e hepatócitos em diferentes relações E:T e estimuladas com $\text{INF}\alpha$.

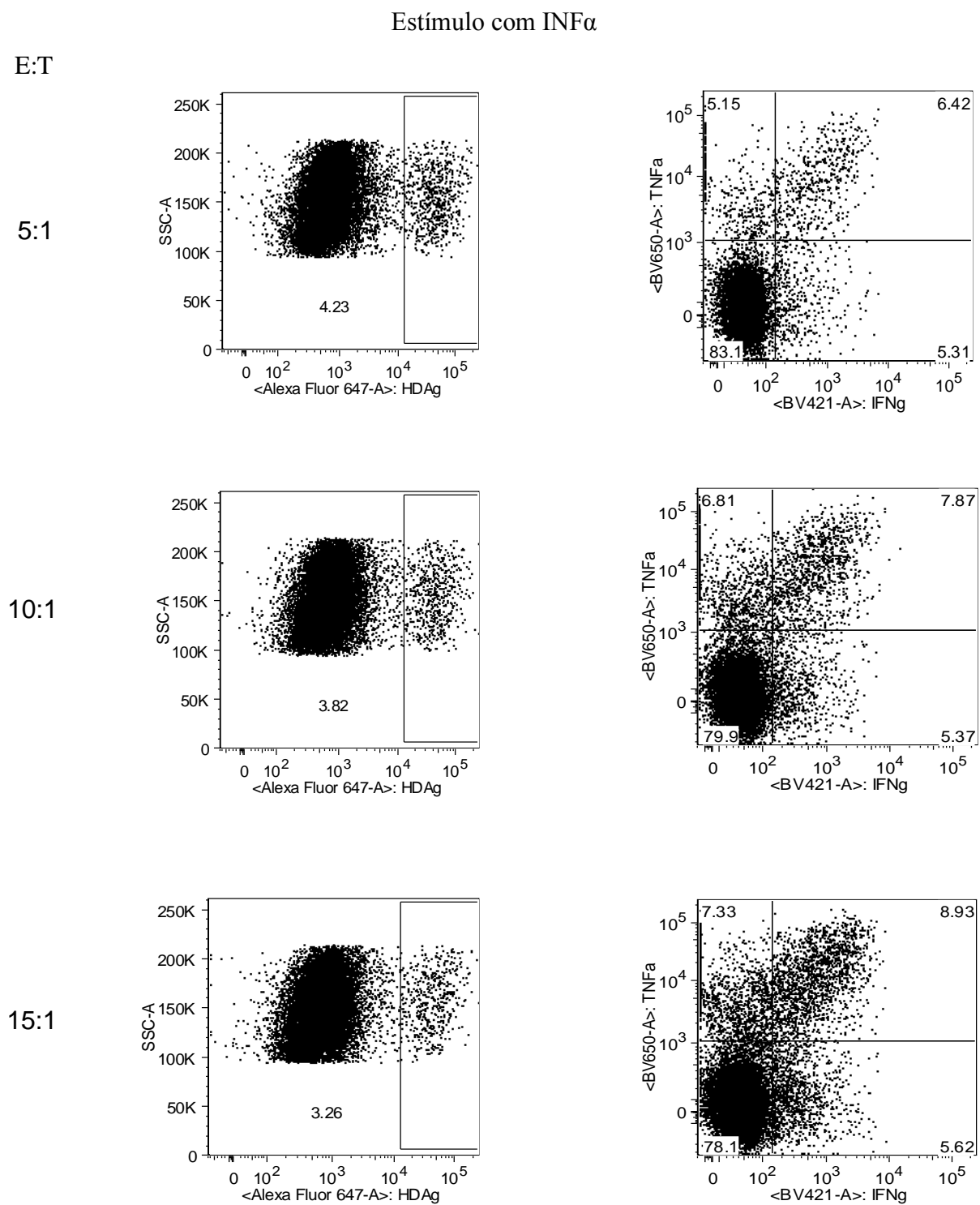
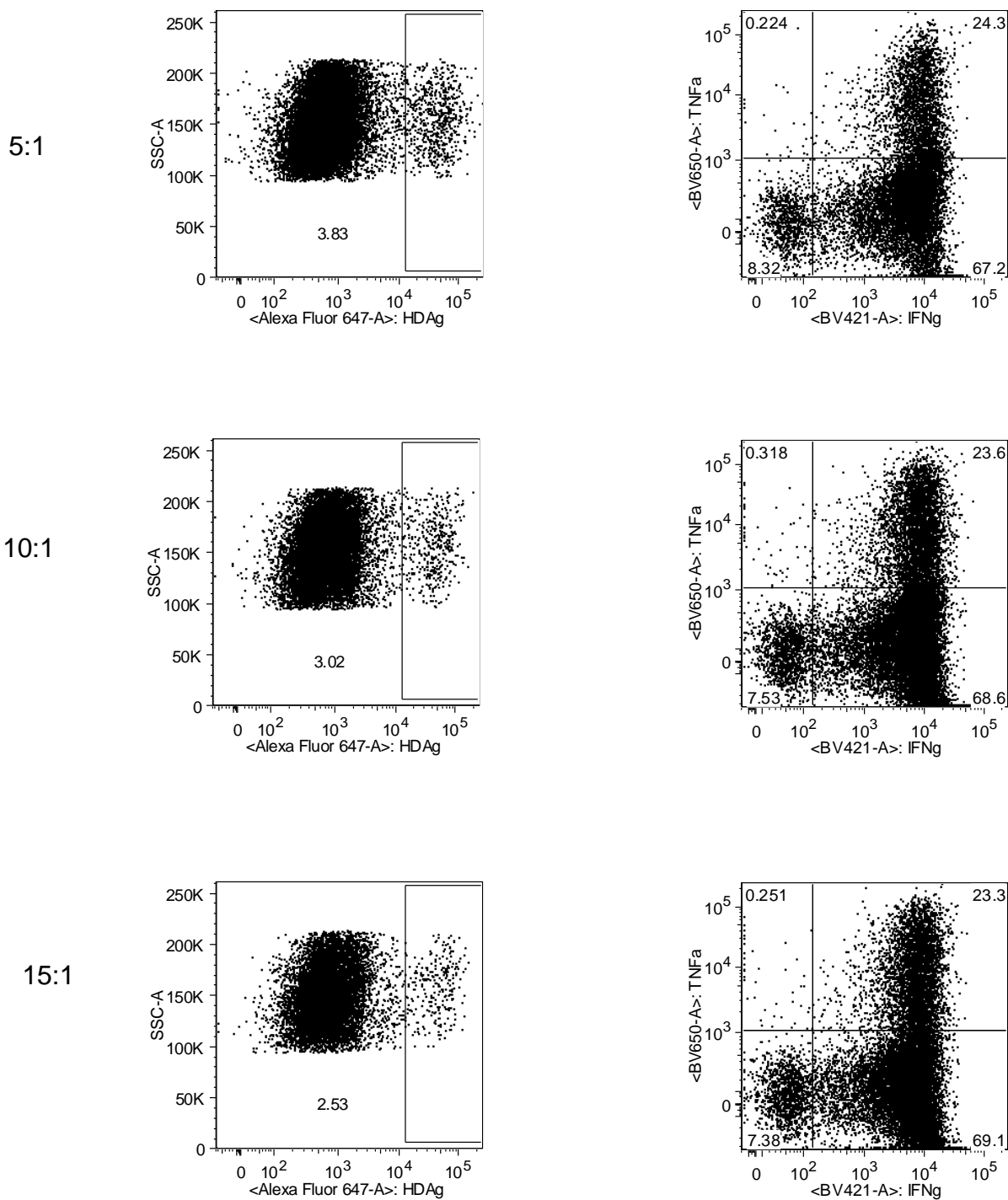


Figura 19 - Proporção de hepatócitos infectados e excreção de $\text{INF}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ em culturas de PBMC e hepatócitos em diferentes relações E:T estimuladas com IL12/IL18.

Estímulo com IL12/IL18

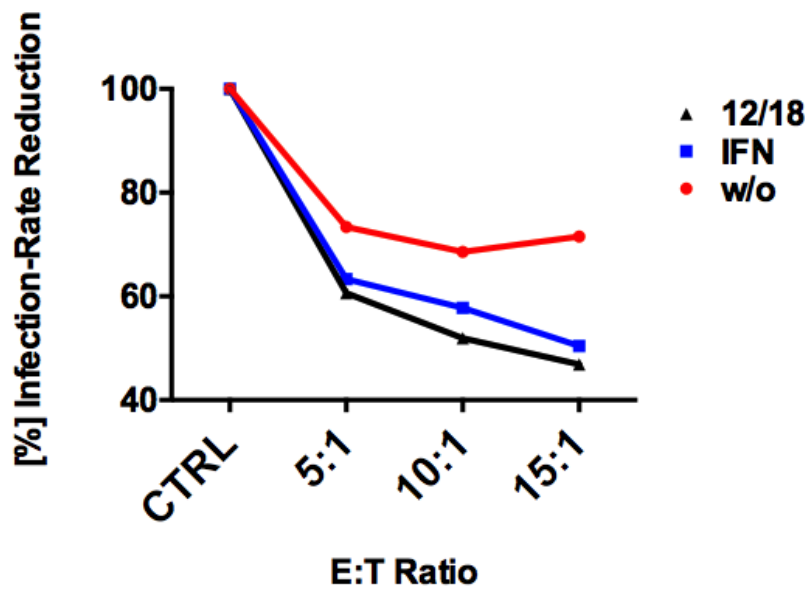
E:T



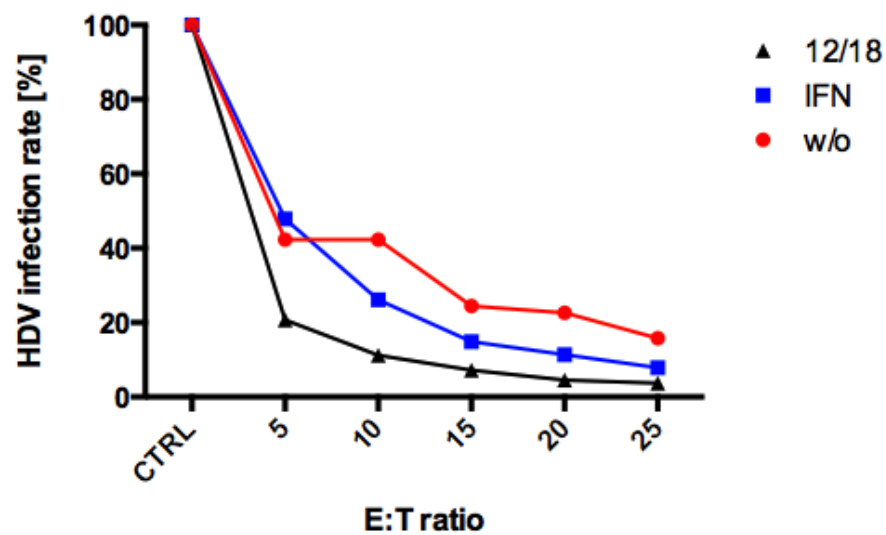
A relação entre o número de células efectoras (PBMC) e células alvo (Hepatócitos da linhagem Huh 7.5 infectados com HDV) e o tempo de estímulo em cultura determinam a redução de células infectadas.

Figura 20 – Relação de hepatócitos infectados em cultura com PBMC. (A) Cultura de 06 horas, (B) Cultura de 24 horas.

(A) Cocultura de 06 horas

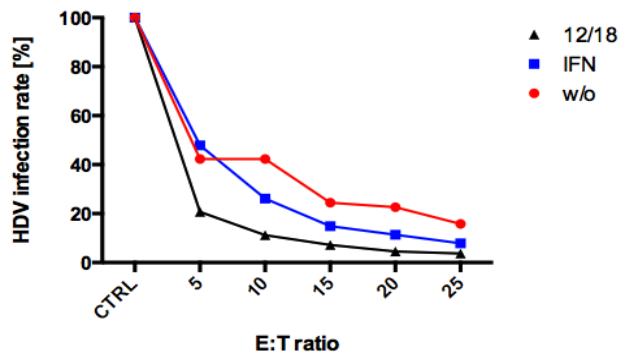


(B) Cocultura de 24 horas

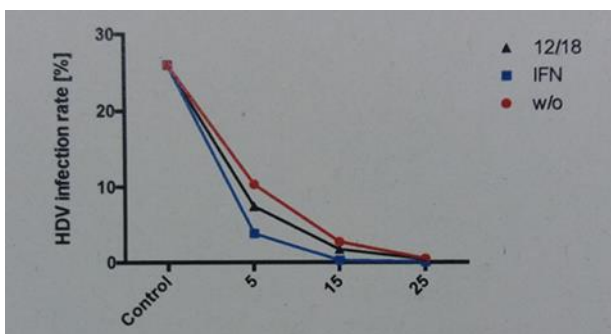


A seguir, apresentamos dados sobre a reprodutibilidade dos resultados em amostras de participantes.

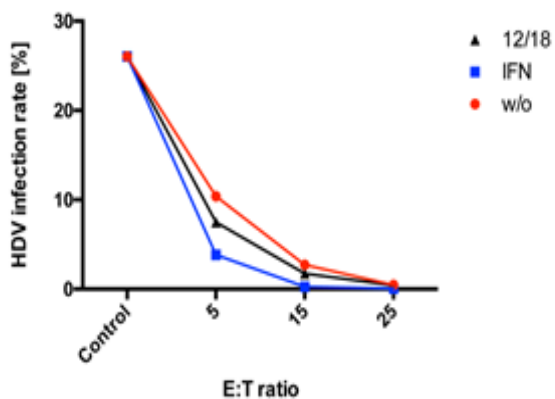
Figura 21 – Relação de hepatócitos infectados em culturas com PBMC em diferentes relações E:T, sem estímulo, estimuladas com $IFN\alpha$ e estimuladas com IL12/IL18.



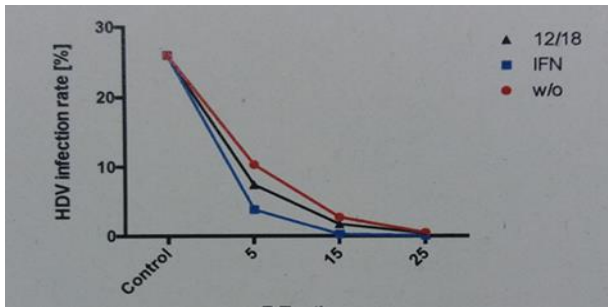
Paciente 1



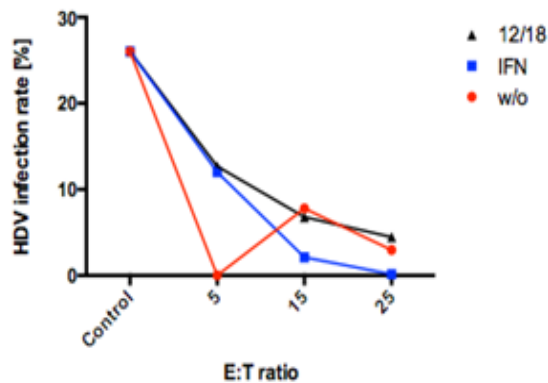
Paciente 2



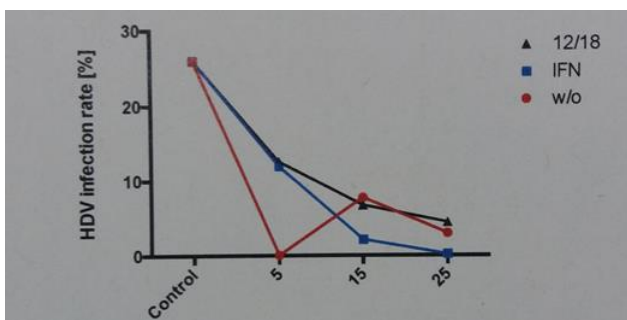
Paciente 3



Paciente 4



Paciente 5



Paciente 6

Em cultura *in vitro* de PBMC e hepatócitos da linhagem Huh 7.5 infectados com partículas virais do HDV-G1 o estímulo das células efectoras com IFN- α e IL-12 e IL-18, por 6h, reduziu em 60% o número de hepatócitos infectados. Culturas de 24h de estímulo reduziram quase 100% o número de hepatócitos infectados com partículas de HDV-G1.

O sinal fornecido por citocinas pode regular a ativação e diferenciação de células imunes efectoras ⁽⁴⁾. Nas infecções persistentes por HBV e HCV, a adição de IL-12 restaurou a função efectora de células T antígeno-específicas que classicamente são caracterizadas pelo esgotamento funcional ^(17,18). Então, pretendíamos estudar o efeito

estimulador de IFN- α (única medicação disponível comercialmente para tratamento de infecção por HDV) e da IL-12 em sinergia com a IL-18 em PBMC, particularmente células NK contra o HDV em pacientes infectados pelo HDV. Reduções significativas de hepatócito infectados são mostradas na figura 21. A funcionalidade de células NK, medidas pela produção de IFN- γ e TNF α foi significativamente aumentada em todas as amostras sob estímulo com IFN- α (8,5 vezes mais excreção de TNF α e 11,5 vezes mais IFN- γ do que em células sem nenhum estímulo). O estímulo combinado com IL-12/IL-18 mostrou-se ainda mais eficaz na ativação funcional das células NK (15,7 vezes mais excreção de TNF α e 18,5 vezes mais IFN- γ do que em células sem nenhum estímulo) em meio de cultura com hepatócitos infectados com partículas de HDV-G1.

DISCUSSÃO

São apresentados dados de uma análise sistemática da resposta *in vitro* ao HDV por células do sistema imune inato (células NK) obtidas de pacientes saudáveis. Os resultados sugerem que ⁽¹⁾ A infecção por HDV pode estar associada a um estado imunológico de senescência⁽²⁾. Respostas imunológicas proliferativas e funcionais específicas contra o HDV são relativamente fracas, mas podem ser parcialmente restauradas por estimulação com IFN- α ou combinação de IL12/IL18, e ⁽³⁾. O estímulo de PBMC com de IL-12 combinada com IL-18 restaura a capacidade efetora de células do sistema imune inato, em especial células NK, contra hepatócitos contaminados com HDV.

Lünemann e colaboradores (2014), estudando células da resposta imune inata em 134 indivíduos, incluindo pacientes com hepatite B e C agudas e pacientes com hepatites B, C e Delta crônicas, identificaram que a infecção por hepatite viral está associada ao aumento das frequências de células NK no sangue periférico e maior expressão do fenótipo menos ativadas dessas células, com comprometimento da função citolítica e da produção de citocinas.

As infecções virais são controladas por um complexo mecanismo de resposta imunológica que envolve o sistema imune inato e adaptativo. Na infecção pelo HDV, o comprometimento proliferativo de células efectoras pode levar à senescência celular e, conseqüentemente, incapacidade do hospedeiro de controlar a infecção. A incapacidade de células NK produzirem citocinas pode ser uma das principais causas de infecção persistente e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de doença hepática grave.

No presente estudo, não foi possível relacionar o comprometimento funcional de células NK em pacientes infectados com HDV com a evolução natural da doença, pois todo o protocolo foi desenvolvido *in vitro*, com amostras de pacientes saudáveis. Embora a funcionalidade das células NK tenha demonstrado melhora quando submetidas a estímulos, não foi possível fazer correlação entre as respostas imunes e o status de RNA-HDV.

CONCLUSÕES

Em resumo, esta extensa análise de dados clínicos, histológicos e imunológicos de pacientes coinfectados com HBV e HDV sugere a implicação direta do genótipo do HDV na fisiopatologia da doença. Os resultados aqui apresentados, em especial os níveis mais elevados de moléculas inflamatórias sistêmicas na coinfeção HBV/HDV-G3, indicam que esse genótipo pode causar uma doença hepática mais agressiva, com resposta inflamatória mais exarcebada. Essas informações poderão auxiliar na elaboração de novos protocolos clínicos terapêuticos individualizados para cada genótipo do HDV. A dominância do HDV em relação ao HBV se mostrou marcadamente superior, confirmando resultados de pesquisas anteriores. Esses dados fornecem novos insights para o entendimento da história natural da hepatite Delta, causada por diferentes genótipos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo se constitui em uma extensa análise de parâmetros clínicos, epidemiológicos, sorológicos, histológicos e imunológicos de pacientes com hepatite Delta infectados com os genótipos 1 e 3. Os resultados apresentados sugerem que a doença pode se manifestar com quadros clínicos diversos e que a severidade do dano hepático parece ter relação com o genótipo viral. Os níveis mais elevados de moléculas inflamatórias sistêmicas na coinfeção HBV/HDV-G3, indicam que esse genótipo pode causar uma doença hepática mais agressiva, com resposta inflamatória mais exacerbada. A avaliação do perfil de dominância viral na coinfeção HBV/HDV mostrou que o HDV exerce controle efetivo sobre a replicação do HBV, confirmando resultados de pesquisas anteriores.

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados com o HDV-G3, mas, até o momento, não há informações disponíveis acerca do envolvimento de moléculas inflamatórias sistêmicas com o grau de fibrose em pacientes com HDV-G3. Nesse estudo, os pacientes com fibrose avançada ou cirrose, diagnosticados por biópsia hepática, apresentaram níveis mais elevados de citocinas e quimiocinas relacionadas a recrutamento e ativação de células do sistema imune inato e a processos inflamatórios. A eficácia de escores não invasivos de avaliação de fibrose se mostrou insuficiente em pacientes com HDV-G3, por isso sugerimos, após criteriosa análise, que a determinação dos níveis séricos de CCL19 e MCP.4 possa ser usada para identificar pacientes com HDV-G3 com fibrose hepática em estágio avançado. Esses dados fornecem novos insights para o entendimento da história natural da hepatite Delta, causada por diferentes genótipos. Essas informações poderão auxiliar na elaboração de novos protocolos clínicos terapêuticos individualizados para cada genótipo do HDV.

REFERÊNCIAS

1. Fonseca JCF, Brasil LM, Castilho MC, Braga WSM, Souza RAB, Ferreira LCL . Hepatitis delta virus (HDV) infectious in the Brazilian Amazon basin and its role in chronic liver disease. *Hepatology*. 1994; 19: 631.
2. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009; 7(1):31-40.
3. Braga WS, Castilho Mda C, Borges FG, Et al. Hepatitis D virus infection in the Western Brazilian Amazon - far from a vanishing disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012; 45:691-5.
4. Lunemann S, Malone D, Grabowski J, Porta K, Beziat V, Bremer B, et al. Effects of HDV infection and pegylated interferon α treatment on the natural killer cell compartment in chronically infected individuals. *BMJ*. 2014.
5. Wranke A, Borzacov LM, Paraná, R. Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions world-wide: the Hepatitis Delta International Network (HDIN). *Liver International*. 2018.
6. Shadmand E, Baharlou R, Shokouh M, et al. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006; 307:151-71
7. Gomes-Gouvea MS, Soares MC, Bensabath G, De Carvalho-Mello IM, Brito EM, Souza SO, et al. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *J gen virol*. 2009; 90:2638-43.
8. Kay A, Melo da Silva E, Pedreira H, Negreiros S, Lobato C, Braga W, et al. HBV/HDV co- infection in the Western Brazilian Amazonia: an intriguing mutation among HDV genotype 3 carriers. *J Viral Hepat*. 2014; 21:921-4.
9. Braga WS, de Oliveira CM, de Araujo JR, et al. Chronic HDV/HBV coinfection: Predictor of disease stage a case seriee of HDV-3 pacients. *J Hepatol*. 2014; 61:1205-11.
10. Parana R, Kay A, Molinet F, Viana S, Silva LK, Salcedo JM, et al. HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: a preliminary report. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75(3):475-9.
11. Grabowski J, Yurdaydin C, Zachou K, Buggisch P, Hofmann WP, Jaroszewicz J, et al. Hepatitis D virus-specific cytokine responses in patients with chronic hepatitis delta before and during interferon α treatment. *Liver Int*. 2011; 31(9):1395-405.

12. Schirdewahn T, Grabowski J, Owusu Sekyere S, Bremer B, Wranke Um, Lünemann S, et al. The third signal cytokine interleukin 12 rather than immune checkpoint inhibitors contributes to the functional restoration of hepatitis D virus-specific t cells. *J Infect Dis.* 2017; 215:139-45.
13. Wedemeyer H, Heidrich B, Manns MP. Hepatitis D virus infection—not a vanishing disease in Europe! *Hepatology.* 2007; 45:1331-2.
14. Heidrich B, Deterding K, Tillmann HL, Raupach R, Manns MP, Wedemeyer H. Virological and clinical characteristics of delta hepatitis in Central Europe. *J Viral Hepat* 2009; 16:883-94.
15. Botelho-Souza LF, Souza Vieira D, Oliveira Dos Santos A, Cunha Pereira AV, Villalobos-Salcedo JM. Characterization of the genotypic profile of hepatitis delta virus: isolation of HDV genotype-1 in the western Amazon Region of Brazil. *Intervirology.* 2015; 58(3):166-71. Doi: 10.1159/000431040.
16. Butt FA, Amin I, Idrees M, Iqbal M. Hepatitis delta virus genotype-1 alone cocirculates with hepatitis B virus genotypes A and D in Pakistan. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2014; 26(3):319-24.
17. Bulut Y, Bahcecioglu IH, Aygun C, Oner PD, Ozercan I, Demirdag K. High genetic diversity of hepatitis delta virus in eastern Turkey. *J Infect Dev Ctries.* 2014; 8(1):74-8. Doi: 10.3855/jidc.
18. Abbas Z, Jafri W, Raza S. Hepatitis D: scenario in the Asia-Pacific region. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(5):554-62.
19. Celik I, Karatayli E, Cevik E, Kabakçi SG, Karatayli SC, Dinç B, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of hepatitis delta viruses isolated from nine Turkish patients. *Arch Virol.* 2011; 156(12):2215-20. Doi:10.1007/s00705-011-1120-y.
20. Taylor JM. Virology of hepatitis D virus. *Sem Liver Dis* 2012; 32:195-200.
21. Lin HH, Lee SS, Yu ML, Chang TT, Su CW, Hu BS, et al. Changing hepatitis D virus epidemiology in a hepatitis B virus endemic area with a national vaccination program. *Hepatology.* 2015; 61(6):1870-9. Doi: 10.1002/hep.27742.
22. Arakawa Y, Moriyama M, Taira M, Hayashi N, Tanaka N, Okubo H, et al. Molecular analysis of hepatitis D virus infection in Miyako Island, a small Japanese island. *J Viral Hepat.* 2000; 7(5):375-81.
23. Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, Gault E, Semenov S, Salhi H, et al. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J Gen Virol.* 2001; 82(Pt 11):2709-18. Doi: 10.1099/0022-1317-82-11-2709.
24. Di Filippo Villa D, Cortes-Mancera F, Payares E, Montes N, De la Hoz F, Arbelaez MP et al. Hepatitis D virus and hepatitis B virus infection in Amerindian

communities of the mazonas state, Colombia. *Virology*. 2015; 12:172. Doi:10.1186/s12985-015-0402-5.

25. Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouveia MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR. Dynamics of hepatitis D (delta) virus genotype 3 in the Amazon region of South America. *Infect Genet Evol*. 2011; 11(6):1462-8.

26. Le Gal F, Gault E, Ripault M-P, Serpaggi J, Trinchet J-C, Gordien E, et al. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(9):1447-50.

27. Andernach IE, Leiss LV, Tarnagda ZS, Tahita MV, Otegbayo JA, Forbi JC, et al. Characterization of hepatitis delta virus in sub-Saharan Africa. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(5):1629-36. Doi: 10.1128/JCM.02297-13.

28. Lin JH, Chang MF, Baker SC, Govindarajam S, Lai MMC. Characterization of hepatitis delta antigen: specific binding to hepatitis delta virus RNA. *J Virol*. 1990; 64(9): 4051-8. Doi: 10.1055/s-0032-1323628.

29. Lai MM. Molecular biologic and pathogenetic analysis of hepatitis delta virus. *J Hepatol*. 1995; 22: 127-31.

30. Gudima S, Chang J, Moraleda G, Azvolinsky A, Taylor J. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *J Virol*. 2002; 76(8): 3709-19. Doi: 10.1128/JVI.76.8.3709-3719.2002.

31. Flores R, Ruiz-Ruiz S, Serra P. Viroids and hepatitis delta virus. *Semin Liver Dis*. 2012; 32(3): 201-10. Doi: 10.1055/s-0032-1323624.

32. Huang CR, Lo SJ. Evolution and diversity of the human hepatitis d virus genome. *Adv Bioinformatics*. 2010 Feb 24; 2010:9. Doi: 10.1155/2010/323654.

33. Wang JG, Lemon SM. Hepatitis delta virus antigen forms dimers and multimeric complexes in vivo. *J Virol*. 1993; 67: 446-54.

34. Casey JL. Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2012; 353:123-43. Doi: 10.1007/82_2011_146.

35. Dastgerdi ES, Herbers U, Tacke F. Molecular and clinical aspects of hepatitis D virus infections. *World J Virol*. 2012; 1: 71-8. Doi: 10.5501/wjv.v1.i3.71.

36. Rizzeto M. The Delta agent. *Hepatology* 1983;3: 729-37.

37. Hong SY, Chen PJ. Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II. *J Virol*. 2010; 84(3):1430-8. Doi: 10.1128/JVI.02083-09.

38. Wang YC, Huang CR, Chao M, Lo SJ. The C-terminal sequence of the large hepatitis delta antigen is variable but retains the ability to bind clathrin. *Virology*. 2009; 6: 31. Doi: 10.1186/1743-422X-6-31.
39. Sikora D, Greco-Stewart VS, Miron P, Pelchat M. The hepatitis delta virus RNA genome interacts with eEF1A1, p54(nrb), hnRNP-L, GAPDH and ASF/SF2. *Virology* 2009; 390:71-8. Doi: 10.1016/j.virol.2009.04.022.
40. Greco-Stewart V, Pelchat M. Interaction of host cellular proteins with components of the hepatitis delta virus. *Viruses*. 2010;2:189-212. Doi: 10.3390/v2010189]
41. Alfaiate D, Lucifora J, Abeywickrama-Samarakoon N, et al. HDV RNA replication is associated with HBV repression and Interferon stimulated genes induction in super-infected hepatocytes. *Antiviral Res*. 2016; 136:19-31.
42. Hong SY, Chen PJ. Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II. *J Virol* 2010; 84:1430-8. Doi: 10.1128/JVI.02083-09.
43. Li YJ, Stallcup MR, Lai MM. Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication. *J Virol*. 2004; 78:13325-34. Doi: 10.1128/JVI.78.23.13325-13334.2004.
44. Lamas Longarela O, Schmidt TT, Schöneweis K, Romeo R, Wedemeyer H, Urbana S, et al. Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors. *PLoS ONE*. 2013; 8(3):e58340. Doi: 10.1371/journal.pone.0058340.
45. Engelke M, Mills K, Seitz S, Simon P, Gripon P, Schnolzer M, et al. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology* 2006; 43:750-60. Doi: 10.1002/hep.21112.
46. He W, Cao Z, Mao F, et al. Modification of Three Amino Acids in Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Renders Mice Susceptible to infection with Hepatitis D Virus In Vivo. *J Virol*. 2016; 90:8866-74.
47. Huang WH, Chen YS, Chen PJ. Nucleolar targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication. *J Virol*. 2008; 82: 692-9. Doi: 10.1128/JVI.01155-07]
48. Niro GA, Smedile A. Current concept in the pathophysiology of hepatitis delta infection. *Curr Infect Dis Rep*. 2012; 14:9-14. Doi: 10.1007/s11908-011-0233-5.
49. Govindarajan S, Fields HA, Humphrey CD, Margolis HS. Pathologic and ultrastructural changes of acute and chronic delta hepatitis in an experimentally infected chimpanzee. *Am J Pathol* 1986; 122(2): 315-22.

50. Cole SM, Gowans EJ, Macnaughton TB, Hall PD, Burrell CJ. Direct evidence for cytotoxicity associated with expression of hepatitis delta virus antigen. *Hepatology*. 1991; 13:845-51. Doi: 10.1002/hep.184013050.
51. Casey JL, Tennant BC, Gerin JL. Genetic changes in hepatitis delta virus from acutely and chronically infected woodchucks. *J Virol*. 2006; 80(13):6469-77. Doi: 10.1128/JVI.00245-06.
52. Fiedler M, Roggendorf M. Vaccination against hepatitis delta virus infection: studies in the woodchuck (*Marmota monax*) model. *Intervirology*. 2001; 44(2-3):154-61. Doi: 10.1159/000050042.
53. D'Ugo E, Canitano A, Catone S, Argentini C, Giuseppetti R, Orobello S, et al. Kinetics of HBV-HDV replication in acute fatal course of woodchuck hepatitis. *Arch Virol*. 2008; 153: 2069-76. Doi: 10.1007/s00705-008-0236-1.
54. De Sousa BC, Cunha C. Development of mathematical models for the analysis of hepatitis delta virus viral dynamics. *PLoS ONE* 2010; 5(9):pii: e12512. Doi: 10.1371/journal.pone.0012512.
55. Williams V, Brichler S, Radjef N, Lebon P, Goffard Um, Hober D, et al. Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *J Gen Virol*. 2009; 90: 2759-67. Doi: 10.1099/vir.0.011239-0.
56. Romeo R, Del Ninno E, Rumi M, Russo UM, Sangiovanni UM, De Franchis R et al. A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2009; 136:1629-38. Doi: 10.1053/j.gastro.2009.01.052.
57. Su CW, Huang YH, Huo TI, et al. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology* 2006; 130:1625-35.
58. Hadziyannis SJ. Hepatitis delta: an overview. In: Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, (ed.) *Viral hepatitis and liver disease*. Turin: Edizioni Minerva Medica; 1997. p. 283-9.
59. Pugnale P, Pazienza V, Guilloux K, Negro F. Hepatitis delta virus inhibits alpha interferon signaling. *Hepatology* 2009; 49:398-406. Doi: 10.1002/hep.22654.
60. Magrin S, Craxì A, Carini C, Colombo P, Di Blasi F, Spinelli G, et al. Interleukin-2, interleukin-2 receptor and gamma-interferon synthesis by peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis delta virus infection. *J Hepatol*. 1989; 8:358-66. Doi: 10.1016/0168-8278(89)90035-4.

61. Williams V, Brichtler S, Khan E, Chami H, Deny P, Kremsdorf D, et al. Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF- κ B via oxidative stress. *J Viral Hepat.* 2012; 19:744-53. Doi: 10.1111/j.1365-2893.2012.01597.x.
62. Liao FT, Lee YJ, Ko JL, Tsai CC, Tseng CJ, Sheu GT. Hepatitis delta virus epigenetically enhances clusterin expression via histone acetylation in human hepatocellular carcinoma cells. *J Gen Virol* 2009; 90(5):1124-34. Doi: 10.1099/vir.0.007211-0.
63. Löseke S, Grage-Griebenow E, Heine H, Wagner UM, Akira S, Bauer S, et al. In vitro-generated viral double-stranded RNA in contrast to polyinosinic: polycytidylic acid induces interferon-alpha in human plasmacytoid dendritic cells. *Scand J Immunol* 2006; 63(4):264-74. Doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01736.x.
64. Larner A, Reich NC. Interferon signal transduction. *Biotherapy* 1996; 8(3-4):175-81 Doi: 10.1007/BF01877202.
65. Katashiba Y, Miyamoto R, Hyo A, Shimamoto M, Murakami N, Ogata M, et al. Interferon- α and interleukin-12 are induced, respectively, by double-stranded DNA and singlestranded RNA in human myeloid dendritic cells. *Immunology* 2011; 132(2):165-73. Doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03350.x.
66. Hartwig D, Schütte C, Warnecke J, Dorn I, Hennig H, Kirchner H, et al. The large form of ADAR 1 is responsible for enhanced hepatitis delta virus RNA editing in interferonalpha-stimulated host cells. *J Viral Hepat.* 2006; 13(3):150-7. Doi: 10.1111 / j.1365-2893.2005.00663.x.
67. Babiker ZO, Hogan C, Ustianowski A, Wikins E. Interferon-sparing tenofovir disoproxil fumarate-based therapy have a role in the management of severe acute hepatitis delta superinfection? *J Med Microbiol.* 2012; 61(12): 1780-3. Doi: 10.1099/jmm.0.046649-0.
68. Nisini R, Paroli M, Accapezzato D, Bonino F, Rosina F, Santantonio T, et al. Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. *J Virol.* 1997; 71(3): 2241-51.
69. Huang IC, Chien CY, Huang CR, Lo SJ. Induction of hepatitis D virus large antigen translocation to the cytoplasm by hepatitis B virus surface antigens correlates with endoplasmic reticulum stress and NF-kappaB activation. *J Gen Virol* 2006; 87:1715-23. Doi: 10.1099/vir.0.81718-0.
- 70.
- 71.

72. Heidrich B, Yurdaydin C, Kabacam G, Ratsch BA , Zachou K , Bremer B, et al. Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. *Hepatology* 2014; 60:87-97.
73. Negro F, Rizzetto M. Diagnosis of hepatitis delta virus infection. *J Hepatol.* 1995; 22:136-39.
- 74.
- 75.
76. Franco A, Barnaba V, Natali P, Balsano C, Musca UM, Balsano F. Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes. *Hepatology* 1988; 8(3):449-44. DOI: 10.1002/hep.1840080302.
77. Nisini R, Paroli M, Accapezzato D, Bonino F, Rosina F, Santantonio T, et al. Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. *J Virol* 1997; 71: 2241-51.
78. Imazeki F, Omata M, Ohto M. Heterogeneity and evolution rates of delta virus RNA sequences. *J Virol* 1990; 64: 5594-9.
79. Rizzetto M, Macagno S, Chiaberge E. et al. Liver transplantation in hepatitis Delta virus disease. *Lancet.* 1987; 2: 469-71.
80. Rizzetto M, Canese MG, Aricó S, Crivelli Ó, Trepo C, Bonino F, et al. Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system (Delta/anti-Delta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *GUT* 1997; 18(2):997-1003. 81. *In: Fonseca JCF (ed.) Hepatite Delta. Manaus: Imprensa Universitária; 1993. p.1-66.*
82. Bensabath G, Hadler SC, Pereira Soares MC, Campos H, Dias LB, Popper H, et al. Hepatitis delta virus infection and Labrea hepatitis. Prevalence and role of fulminant hepatitis in the Amazon Basin. *J Am Med Assoc.* 1987; 258(4):479-83.
83. Lesbordes JL, Trepo C, Ravisse P, et al. Infection with hepatitis Delta virus in Bangui. *N Engl J Med.* 1986; 314:517-8.
84. Fonseca JCF, Brasil LM, Castilho MC, Botelho R, Braga WM, Ferreira LC. Fulminant hepatitis and microvesicular steatosis (morula-like cells). A study in children and adolescents. *Hepatology.* 1999; 30:284A.
85. Wolters LMM, Van Nunen AB, Honkoop P, Vossen AC, Niesters HG, Zondervan PE, et al. Lamivudine-high dose interferon combination therapy for chronic hepatitis B patients co-infected with the hepatitis D virus. *J Viral Hepat.* 2000;7(6): 428-34.

86. Mederacke I, Bremer B, Heidrich B, Kirschner J, Deterding K, Bock T, et al. Establishment of a novel quantitative hepatitis D virus (HDV) RNA assay using the Cobas TaqMan platform to study HDV RNA kinetics. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:2022-9.
87. Yan H, Zhong G, Xu G, Ele W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife.* 2012; 1: e00049.
88. Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology.* 2014; 147:48-64.
89. Gripon P, Cannie I, Urban S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol.* 2005; 79:1613-22.
90. Lutgehetmann M, Mancke LV, Volz T, Helbig H, Allweiss G, T, et al. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology* 2012; 55(3):685-94.
91. Bogomolov P, Alexandrov A, Voronkova N, Macievich M, Kokina K, Petrachenkova M, et al. Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: first results of a phase Ib/IIa study. *J Hepatol.* 2016; 65(3):490-8.
92. Blank A, Markert C, Hohmann N, Carls A, Mikus G, Lehr T, et al. First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. *J Hepatol.* 2016; 65(3):483-9.
93. Vaillant A, Juteau JM, Lu H, Liu S, Lackman-Smith C, Ptak R, et al. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit human immunodeficiency virus type 1 fusion by blocking gp41 core formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:1393-401.
94. Bernstein DI, Goyette N, Cardin R, Kern CR, Boivin G, Irlanda J, et al. Amphipathic DNA polymers exhibit antiherpetic activity in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8):2727-33.
95. Guzman EM, Cheshenko N, Shende V, Keller MJ, N Goyette, JM Juteau et al. Amphipathic DNA polymers are candidate vaginal microbicides and block herpes simplex virus binding, entry and viral gene expression. *Antivir Ther.* 2007; 12(8):1147-56.
96. Lee AM, Rojek JM, Gundersen A, Ströher L, Juteau JM, Vaillant UM, et al. Inhibition of cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus by amphipathic DNA polymers. *Virology* 2008; 372:107-17.
97. Lutterkort G, Wranke A, Yurdaydin C, Budde E, Westphal M, Lichtinghagen R, et al. Non-invasive fibrosis score for hepatitis delta. *Liver Int.* 2017; 37(2):196-204. DOI: 10.1111/liv.13205.

98. Heidrich B, Manns M, Wedemeyer H. Treatment options for hepatitis delta virus infection. *Current Infect Dis Rep.* 2013; 15:31-8.
- 99.
100. Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberg DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, et al. Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(41):16666-71.
- 101.
102. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012; 7:31-40.
103. Vaillant A. Nucleic acid polymers: broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection. *Antivir. Res.* 2016; 133:32-40.
- 104..
- 105.
106. Al-Mahtab M, Bazinet M, Vaillant A. Safety and efficacy of nucleic acid polymers in monotherapy and combined with immunotherapy in treatment-naive Bangladeshi patients with HBeAg+ chronic hepatitis B infection. *PLoS ONE* 2016; 11: e0156667.
107. Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, et al. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect Dis.* 2015; 15(10):1167-74.
108. Noordeen F, Scougall CA, Grosse A, Qiao Q, Ajilian BB, Reaiche-Miller G, et al. Therapeutic antiviral effect of the nucleic acid polymer REP 2055 against persistent duck hepatitis B virus infection. *PLoS ONE* 2015; 10(11):e0140909.
109. Bordier BB, Marion PL, Ohashi K, Kay MA, Greenberg HB, Casey JL, et al. A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *J Virol.* 2002; 76(20):10465-72.
110. Bordier BB, Ohkanda J, Liu P, Lee SY, Salazar FH, PL Marion, et al. In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *J Clin Invest.* 2003; 112(3):407-14
- 111.
112. Muir AJ, Arora S, Everson G, Flisiak R, George J, Ghalib R, et al. A randomized phase 2b study of peginterferon lambda-1a for the treatment of chronic HCV infection. *J Hepatol.* 2014; 61(6):1238-46.
- 113.

114.

115. Borzacova LMP, Nicolete LDdeF, Souza LFB, Santos AdeO, Vieira DS, Salcedo JMV. Treatment of hepatitis delta virus genotype 3 infection with peg-interferon and entecavir. *Int J Infect Dis*. 2016.

116. Takyar V, Etzion O, Heller T, Kleiner DE, Rotman Y, Ghany MG, et al. Complications of percutaneous liver biopsy with Klatskin needles: a 36-year single-centre experience. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017; 45(5):744-53

117. Wedemeyer H, Heidrich B, Manns MP. Hep – Not a vanishing disease in Europe. *Hepatology*. 2007; 45:1331-1332.

118. Viana S, Parana R, Moreira R, Compri AP, Macedo V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hygiene*. 2005; 73(4):808-14.

119. Braga WSM, Brasil LM, Souza RABde, Castilho MdaC, Fonseca JCda. Ocorrência da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e delta (VHD) em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34(4):349-55.

120.

121. Tseng C, Lai M. Hepatitis delta virus RNA replication. *Viruses*. 2009; 1:818-31. DOI: 10.3390/v1030818.

122. Kiesslich D, Crispim M, Santos C, Ferreira LFde, Fraiji NA, Komninakis SV, et al. Influence of hepatitis B virus (HBV) genotype on the clinical course of disease in patients coinfecting with HBV and hepatitis delta virus. *J Infect Dis*. 2009; 199(11):1608-11. DOI: 10.1086/598955.

123. Kalayci O, Sonna L, Woodruff P, Camargo Junior CA, Luster AD, Lilly CM, et al. Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4; CCL-13): a biomarker of asthma. *J Asthma*. 2004; 41(1):27-33.

124. Scandella E, Men Y, Legler DF, Gillessen S. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood* 2004; 103:1595-601; doi: 10.1182/blood-2003-05-1643

125. Hasegawa T, Kosaki A, Kimura T, Matsubara H, Okigaki M, Masaki H, et al. The regulation of EN-RAGE (S100A12) gene expression in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*. 2004; 171(2): 211-8.

126. Heinemann A, Sturm GJ, Ofner M, Sturm EM, Weller V, Peskar BA, et al. Stem cell factor stimulates the chemotaxis, integrin upregulation, and survival of human basophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 116:820-6.

127. Sharma A, Chakraborti A, Ashim D, Dhiman RK. Elevation of interleukin-18 in chronic hepatitis C: implications for hepatitis C virus pathogenesis. *Immunology*. 2009; 128:514-22.

128. Wedemeyer H, Yurdaydin C, Dalekos G, Erhardt A, Çakaloglu Y, Degertekin H, et al. HIDIT Study Group: Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta. *N Engl J Med*. 2011; 364:322-31.

129.

130. Calle-Serrano B, Großhennig A, Homs M, Heidrich B. Development and Evaluation of a Baseline Event- Anticipation (BEA) – Score for hepatitis delta. *J Viral Hepat*. 2014 Nov; 21(11):e154-63. Doi: I0.IIII/jvh.12251.

131. Andrade ZA, Lesbordes L, Ravisse P, Paraná R, Prata A, Barberino JS, et al. Fulminant hepatitis with microvesicular Steatosis (a histologic comparison of cases Occurring in brazil - *labrea hepatitis* - and in Central africa - *bangui hepatitis*). *Rev Soc Bras Med Trop*. 1992 Jul- Sept; 25(3):155-60.

132. Schaper M, Rodriguez-Frias F, Jardi R, Tabernero D, Homs H, Ruiz L, et al. Quantitative longitudinal evaluations of hepatitis delta virus RNA and hepatitis B virus DNA shows a dynamic, complex replicative profile in chronic hepatitis B and D. *J Hepatol*. 2010; 52(5):658-64.

133. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001 Feb; 33(2):464-70.

134. Brandao A, Fuchs SC, Gleisner AL, Marroni C, Zanotelli ML, Cantisani G. Model for the end-stage liver disease and death prediction in a cohort of Brazilian patients on the waiting list for liver transplantation. *Clin Transplant*. 2008 Sept-Oct; 22(5):651-6.

135. Perkins JD, Halldorson JB, Bakthavatsalam R, Fix OK, Carithers RL, Reyes Junior JD. Should liver transplantation in patients with model for end-stage liver disease scores ≤ 14 be avoided? A decision analysis approach. *Liver Transpl*. 2009 Feb; 15(2):242-54.

136.

137. Lareyre F, Moratal C, Chikande J, Jean-Baptiste E, Hassen-Khodja R, Neels J, et al. Investigation of plasma inflammatory profile in diabetic patients with abdominal aortic aneurysm: a pilot study. *Vas Endovasc Surg*. 2018;1-5. DOI: 10.1177/1538574418784717.

138. Kamin-Lewis R, Abdelwahab SF, Trang C, et al. "Perforin-low memory CD8+ cells are the predominant T cells in normal humans that synthesize the beta -chemokine macrophage inflammatory protein-1beta". *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2001; 98(16):9283-8. doi:10.1073/pnas.161298998.

139. Askarieh G, Alsiö A, Pugnale P, Negro F, Ferrari C, Neumann AU, et al. "Systemic and intrahepatic interferon-gamma-inducible protein 10 kDa predicts the first-phase decline in hepatitis C virus RNA and overall viral response to therapy in chronic hepatitis C". *Hepatology*. 2010; 51(5):1523-30. DOI:10.1002/hep.23509.

140. Bianchi L. Liver biopsy interpretation in hepatitis. Part II: Histopathology and classification of acute and chronic viral hepatitis differential diagnosis. *Pathol Res Pract.* 1983; 178: 180-213.
141. De Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003; 107:690-5.
142. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, et al. "Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection". *Nat Med.* 2010; 16(4): 452-9. doi:10.1038/nm.2106.
143. Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, Tessier PA, Mayer D. "S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells". *Exp Cell Res.* 2006; 312(2):184-97. doi:10.1016/j.yexcr.2005.10.013.
144. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, et al. "Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria". *J Biol Chem.* 2002; 277(16): 13430-7. doi:10.1074/jbc.M108029200.
145. Werner S, Roth WK, Bates B, Goldfarb M, Hofschneider PH. "Fibroblast growth factor 5 proto-oncogene is expressed in normal human fibroblasts and induced by serum growth factors". *Oncogene.* 1991; 6(11):2137-44.
146. Zhang MZ, Yao B, Yang S, Jiang L de, Wang S Ventilador X, et al. "CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury". *J Clin Invest.* 2012; 122(12):4519-32. doi:10.1172/JCI60363.

APÊNDICES

ANEXOS



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil