



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FACULDADE DE BIOMEDICINA

JÉSSICA RODRIGUES FERREIRA

INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO CRP -717 T>C (rs2794521) EM  
PACIENTES COM INFEÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE B  
(HBV)

Orientadora: Dra. Profa. Rosimar Neris Martins Feitosa

Belém-Pará  
ANO 2017

**JÉSSICA RODRIGUES FERREIRA**

**INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO CRP -717 T>C (rs2794521) EM  
PACIENTES COM INFEÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA  
HEPATITE B (HBV)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Faculdade de Biomedicina da Universidade  
Federal do Pará, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em  
Biomedicina.

Orientadora: Dra. Profa. Rosimar Neris Martins Feitosa

BELÉM-PARÁ

ANO 2017

**JÉSSICA RODRIGUES FERREIRA**

**INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO CRP -717 T>C (rs2794521) EM  
PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA  
HEPATITE B (HBV)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, aprovado com o conceito Excelente.

09 de fevereiro de 2017

**BANCA EXAMINADORA**

Orientadora: Dra. Profa. Rosimar Neris Martins Feitosa – ICB – UFPA.

Avaliador 1: Dra. Ednelza da Silva Graça Amoras – ICB- UFPA

Avaliador 2: Dra. Maria Alice Freitas Queiroz – ICB- UFPA

Avaliador 3: Dra. Vânia Nakauth Azevedo (Suplente) - ICB - UFPA

**BELÉM-PARÁ**

**ANO 2017**



**EPIÍGRAFE**

<sup>1</sup>*O Senhor me examina e conhece todas as coisas a meu respeito.*

<sup>2</sup>*Sabe quando me sento ou quando me levanto.*

*Conhece de longe cada um dos meus pensamentos.*

<sup>3</sup>*Examina cuidadosamente todos os meus passos e observa com atenção o meu sono;  
sim, conhece muito bem tudo o que eu faço.*

<sup>4</sup>*O Senhor sabe tudo o que eu vou dizer antes de a palavra ser formada em minha boca.*

<sup>5</sup>*O Senhor me cerca, pela frente e por trás, e põe sua mão sobre mim.*

<sup>6</sup>*Saber isso é algo tão maravilhoso que eu não consigo compreender!*

<sup>7</sup>*É impossível fugir do seu Espírito!*

*Em lugar algum conseguirei me esconder da sua presença!*

<sup>10</sup>*A sua mão direita dirigirá meus passos e o seu poder me dará forças para ficar de pé.*

<sup>13</sup>*O Senhor criou todas as partes internas do meu corpo;  
uniu todas essas partes para formar o meu corpo,  
enquanto eu ainda estava no ventre de minha mãe.*

<sup>14</sup>*Agradeço ao Senhor por ter me criado de forma tão perfeita e maravilhosa!  
Suas obras são maravilhosas; e eu sei disso muito bem.*

*Aos meus amados pais, Jonas Alves Ferreira e Jorgina Rodrigues Ferreira, meus grandes incentivadores. Aos meus irmãos, Joás e Jackson Rodrigues Ferreira. Família, meus amores, minha base!*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, toda honra, toda glória a Deus! A quem registro o meu primeiro agradecimento, pois sem Ele nada podemos fazer, sem Ele nada viria a existir. Muito obrigada Senhor por esta oportunidade, sua graça e bondade me constroem. Jesus, I love you!

Aos meus familiares, especialmente aos meus pais, Jonas e Jorgina, por todo incentivo, todo investimento, amor, carinho. Vocês foram e sempre serão o motivo para eu lutar pelos meus objetivos, pois sempre acreditaram que eu conseguiria chegar até o final. Aos meus irmãos, Joás e Jackson, por toda ajuda em diversos momentos da vida e da graduação. Família, vocês são os meus maiores amores, nunca conseguirei retribuir tudo o que fizeram por mim.

Ao meu avô Ozano, pelo amor e incentivo, que ao ver a conquista dos seus netos sempre se emociona. A minha avó Domingas (in memoriam) que foi um exemplo de vida.

Ao meu tio-avô Américo (in memoriam) que sempre acreditou nos meus sonhos, e com amor me aconselhou com palavras que sempre guardarei em meu coração.

A minha cunhada, Janaína, e minha sobrinha, Júlia, que nasceu no decorrer da graduação e se tornou um dos motivos da minha luta e entrega na busca dessa carreira. Aos meus tios Samuel, Eliezer, Raimundo, Olival e Isaías, pelas palavras de incentivo e toda ajuda dada. As minhas tias, Creusa, Ozana, Midian, Marta, Mirian, Eremita, Ruth, Francisca e Carmem, por toda ajuda e pelos conselhos. Aos meus primos e primas, que são tantos para poder citar todos, mas vocês também fazem parte dessa conquista. A minha melhor amiga e irmã de coração, Elizabeth, que nos momentos de dificuldades sempre tinha uma palavra amiga, e com um humor que é só seu, me alegrava, mesmo quando eu não queria sorrir (te amo amiga!).

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e a Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa do Pará (FAPESPA) pelo suporte financeiro disponibilizado através da concessão de bolsa de iniciação científica para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Virologia, Dr. Ricardo Ishak, Dr. Antônio Vallinoto, Prof<sup>a</sup>. Vânia Azevedo, Prof<sup>a</sup>. Jacqueline Cortinhas e Prof. Luiz Machado. Muito obrigada por todo ensinamento e pela oportunidade de fazer parte desse grande grupo.

A minha professora Dra. Profa. Rosimar Neris Martins Feitosa, não somente pela orientação neste trabalho, mas também pela oportunidade e confiança ao me escolher para ser sua aluna de Iniciação Científica. À MSc. Tuane Carolina Ferreira Moura, por toda disponibilidade e toda ajuda, que foi essencial para a construção desta monografia.

A todos os integrantes do laboratório de Virologia, que tive a oportunidade de conhecer, os quais sempre estiveram dispostos a ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

Aos amigos com quem tive a oportunidade de conhecer nesses quatro anos de curso, Aliane, Larissa, Natália e João Marcos, com os quais compartilhei diversos momentos e que me ajudaram grandemente desde o início da graduação.

A todos meus amigos e colegas que de alguma forma contribuíram comigo, seja com palavras de incentivo, ou de qualquer outra forma.

Muito obrigada! Só Deus pode recompensar a todos vocês!

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> - Fígado normal e com cirrose .....	2
<b>Figura 2</b> - Baruch Blumberg, descobridor do HBV em 1965 .....	3
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da estrutura das partículas virais do HBV .....	4
<b>Figura 4</b> - Estrutura genômica do HBV .....	4
<b>Figura 5</b> - Representação dos antígenos virais .....	5
<b>Figura 6</b> - Ciclo replicativo do HBV .....	6
<b>Figura 7</b> - Taxa de detecção de hepatite B segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2002 a 2015 .....	7
<b>Figura 8</b> - Células da imunidade inata e adaptativa .....	8
<b>Figura 9</b> - Níveis de HBV-DNA e ALT na hepatite B aguda e crônica .....	10
<b>Figura 10</b> - Local de síntese de PrtCR .....	12
<b>Figura 11</b> - Representação da estrutura da Proteína C reativa .....	13
<b>Figura 12</b> - Localização do gene da <i>Proteína C reativa</i> no cromossomo 1 (1q.23.2) .....	13
<b>Figura 13</b> - Representação esquemática da localização do polimorfismo -717 (rs2794521 - T>C) do gene da <i>Proteína C reativa</i> .....	14
<b>Figura 14</b> - Níveis plasmáticos das enzimas hepáticas AST, ALT nos pacientes com hepatite B (HBV) e doença hepática de causa não viral (DHNV) de acordo com o polimorfismo rs2794521 do gene da PrtCR .....	20

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

	<b>Página</b>
<b>Quadro 1</b> - Marcadores sorológicos para o diagnóstico laboratorial da hepatite B .....	11
<b>Tabela 1</b> - Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do gene <i>Proteína c reativa (Pr<sub>t</sub>CR)</i> do polimorfismo rs2794521(T>C) nas amostras de pacientes infectados com HBV, DHNV e grupo Controle .....	18
<b>Tabela 2</b> - Correlação entre o polimorfismo rs2794521 (T>C) <i>Proteína c reativa (Pr<sub>t</sub>CR)</i> e a atividade inflamatória e escore de fibrose nas amostras de pacientes infectados com HBV. (METAVIR) .....	19

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

- AgAu** - antígeno Austrália;
- ALT**- Alanina aminotransferase;
- anti-HBc** - anticorpo contra o antígeno de core do HBV;
- anti-HBs** - anticorpo contra o antígeno de superfície do HBV;
- AST**- Aspartato aminotransferase;
- Ca<sup>++</sup>** - íons cálcio;
- cccDNA** - *Covalently closed circular DNA*;
- CRP** - gene da Proteína C Reativa;
- DHGNA** - Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica;
- DHNV** - Doença hepática de origem não-viral;
- DNA** - Ácido desoxirribonucléico;
- HBcAg** - Antígeno do core da hepatite B;
- HBeAg** - antígeno “e” do HBV;
- HBsAg** - Antígeno de superfície do HBV;
- HBV** - Vírus da Hepatite B;
- HBx** - proteína x do HBV;
- HDV** - Vírus da hepatite D;
- HIV**- Vírus da imunodeficiência humana;
- HUJBB** - Hospital Universitário João Barros Barreto;
- IFN- $\gamma$**  - Interferon lambda;
- IFN-1  $\alpha / \beta$**  - Interferon tipo 1  $\alpha / \beta$ ;
- IgG** - imunoglobulina classe G;
- IgM** - imunoglobulina classe M;
- IL-1** - Interleucina-1;
- IL-2** - Interleucina-2;
- IL-6** - Interleucina-6;
- JAMA** - Journal of the American Medical Association;
- LTCD4<sup>+</sup>** - linfócitos T CD4<sup>+</sup>;
- LTCD8<sup>+</sup>** - linfócitos T CD8<sup>+</sup>;
- NK** - Células *natural killer*;
- NKT** - Células *natural killer* T;

**OMS** - Organização Mundial de Saúde;

**ORF** - *Open Reading Frame*;

**PCR** - Reação em cadeia mediada pela polimerase;

**PrtCR** - Proteína C reativa;

**RNA** - Ácido ribonucléico;

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

**TNF** - fator de necrose tumoral;

**TNF- $\alpha$**  - fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

## RESUMO

O vírus da hepatite B (HBV) é um dos principais agentes causadores de doença hepática crônica no mundo. Quando um indivíduo é infectado por este vírus e não possui uma resposta imune capaz de eliminá-lo, desenvolve uma infecção persistente, tornando-se portador crônico do vírus. A Proteína C Reativa (PrCR), que é sintetizada no fígado, é produzida em resposta a lesões teciduais ocasionadas por processos infecciosos e também em quadros inflamatórios crônicos. Polimorfismos genéticos no gene da *CRP* tem sido associados com a expressão ou produção da proteína C reativa e a suscetibilidade a doenças inflamatórias, incluindo o câncer. Neste estudo, foi investigada a presença do polimorfismo *CRP* -717 T>C (rs2794521) em amostras de sangue, provenientes do Hospital Universitário João Barros Barreto (HUJBB), de 69 pacientes cronicamente infectados pelo HBV, 21 amostras de pacientes com doenças hepáticas de causa não viral (DHNV) e 300 amostras controles de doadores de sangue saudáveis provenientes do HEMOPA por meio da PCR em tempo real. As frequências genótípicas e alélicas apresentaram resultados significantes quando correlacionados os grupos HBV e DHNV, assim como DHNV e Controle. No grupo HBV observou-se associação estatisticamente significativa dos genótipos CT+CC em relação ao TT considerando o nível de atividade inflamatória, já em relação ao grau de fibrose não houve diferença estatística. O presente estudo sugere que as variantes genótípicas deste polimorfismo não influenciam diretamente no quadro clínico-laboratorial da infecção por HBV. Sugere-se um aumento do número amostral, assim como uma análise de haplótipos para confirmação dos resultados obtidos nesse trabalho.

Palavra-chave: HBV, infecção crônica, CRP.

## SUMÁRIO

<b>EPÍGRAFE</b> .....	i
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS E QUADROS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 FÍGADO .....	1
1.2 VÍRUS DA HEPATITE B (HBV) .....	2
1.2.1 Morfologia do HBV .....	3
1.2.2 Organização genômica do HBV .....	4
1.2.3 Replicação do HBV .....	5
1.2.4 Epidemiologia do HBV .....	6
1.2.5 Resposta Imune ao HBV.....	7
1.2.6 Diagnóstico Laboratorial do HBV.....	9
1.3 PROTEÍNA C REATIVA .....	12
1.3.1 Estrutura da PrtCR .....	13
1.3.2 Polimorfismos no gene da <i>Proteína C Reativa (CRP)</i> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
3.1- ÁREA DE ESTUDO .....	15
3.2- TIPO DE ESTUDO E LEVANTAMENTO DE DADOS .....	15
3.3 - DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO METODOLÓGICO .....	16
3.4- ORDENAÇÃO DE DADOS .....	17
3.5 - ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA .....	17
<b>4 RESULTADOS</b> .....	17
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	21

6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	22
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	22
	<b>APÊNDICES</b> .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

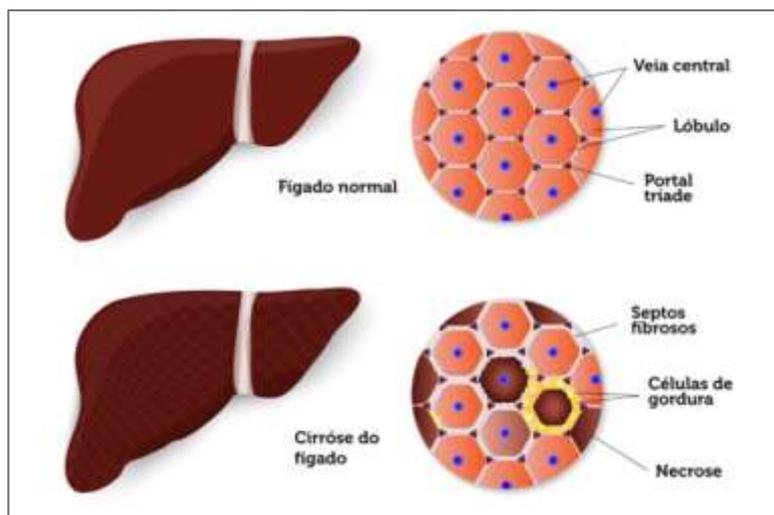
### 1.1 FÍGADO

O fígado é um órgão de vital importância por possuir diversas funções ligadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídios, além de atuar na remoção de toxinas e agentes patogênicos, e atuar na regulação das respostas imunes, sendo o hepatócito a principal célula funcional do fígado (PROTZER; MAINI; KNOLLE, 2012; YOUNG et al, 2007).

Este órgão apresenta uma grande importância no metabolismo e homeostase do organismo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004), apresentando uma alta taxa de exposição a antígenos e toxinas, determinadas respostas imunitárias são reguladas no fígado, visando preservar a integridade deste órgão vital, por isso diversas células componentes da resposta imune estão presentes no tecido hepático (HEYMANN e TACKE, 2016; GUIDOTTI et al, 1999).

A maioria dos patógenos que chegam ao fígado através do sangue são eliminados pelas respostas imune inata e adaptativa. No entanto, alguns patógenos (como os vírus causadores de hepatite) apresentam afinidade por células hepáticas, podem escapar ao controle imunológico, persistindo nos hepatócitos (PROTZER; MAINI; KNOLLE, 2012). Na busca de promover o restabelecimento da homeostase, o sistema imunológico sob ação dos fagócitos, linfócitos e proteínas do sistema complemento, atuam na tentativa de eliminar a infecção ocasionando destruição celular (ABBAS e LICHTMAN, 2008).

Quando células parenquimatosas do tecido hepático são destruídas, o órgão, por meio de divisão celular, responde na tentativa de substituir as células hepáticas mortas por células estreladas (também chamada célula de Ito ou lipócito hepático). As células estreladas hepáticas apresentam em seu citoplasma gotículas de lipídios contendo vitamina A, e suas principais funções são: armazenamento de vitamina A, produção de matriz extracelular e colágeno. Quando há lesão hepática, as células estreladas produzem quantidades elevadas de colágeno, levando ao aparecimento de fibrose, ocasionando a diminuição do fluxo sanguíneo por este órgão, dando início assim a um processo patológico chamado cirrose hepática (Figura 1) (YOUNG et al, 2007; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010; GUYTON e HALL, 2006).



**Figura 1** - Fígado normal e com cirrose (Fonte: VALE, 2014).

## 1.2 VÍRUS DA HEPATITE B (HBV)

No ano de 1965 foi publicado no *Journal of the American Medical Association* (JAMA), com o título *A New antigen in Leukemia sera* (Um Novo antígeno em soros de Leucemia) que se tratava do antígeno Austrália (AgAu) (BLUMBERG; ALTER; VISNICH, 1965). Essa descoberta ocorreu em 1963 por Baruch Blumberg (Figura 2), geneticista americano, ao examinar amostras de soro de diversas pessoas de diferentes áreas do mundo. Ao avaliar uma amostra de soro proveniente de um aborígine australiano, verificou a presença de um antígeno que reagia especificamente com anticorpos presentes no soro de um paciente hemofílico dos EUA. Inicialmente, Blumberg associou a presença AgAu com leucemia, levantando a hipótese de que tal antígeno poderia predispor ou até mesmo ser o agente causal desta doença (ROMANOS; WIGG; SANTOS, 2015; ALTER, 2003; BLUMBERG, 2003).

A associação de AgAu com hepatite ocorreu em 1967, quando Blumberg e colaboradores sugeriram que a alta frequência desse antígeno no soro de pacientes portadores de hepatite aguda poderia estar relacionada com um vírus introduzido entre humanos através de transfusões sanguíneas (BLUMBERG et al., 1967).

O Vírus da Hepatite B (HBV) é membro da família *Hepadnaviridae*, cujos vírus de DNA são causadores de hepatite em várias espécies animais (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010). Este vírus pertence ao gênero *Orthohepadnavirus* onde estão incluídos vírus que infectam mamíferos (seres humanos e outros primatas, esquilos e marmotas) (ROMANOS; WIGG; SANTOS, 2015). Os *hepadnavirus* possuem tropismo por células hepáticas, mas

partículas do DNA viral já foram observadas nos rins, pâncreas e células mononucleares (KIDD-LJUNGGREN; MIYAKAWA; KIDD, 2002).



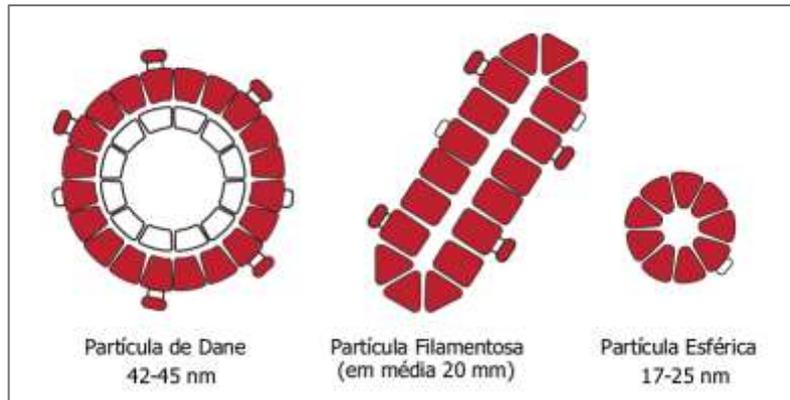
**Figura 2** - Baruch Blumberg, descobridor do HBV em 1965 (Fonte: FONSECA, 2010).

### 1.2.1 Morfologia do HBV

Morfologicamente, o HBV pode ser identificado a partir de três partículas diferentes: partícula de Dane (partícula viral completa), partícula filamentosa e partícula esférica (subvirais) (Figura 3). A partícula de Dane é capaz de replicar-se e causar infecção, já as outras partículas não apresentam ácidos nucleicos e não são infecciosas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; GERLICH, 2013; LEE e AHN, 2011).

A partícula infecciosa possui diâmetro de aproximadamente 42nm, e o seu capsídeo, com simetria icosaédrica, aproximadamente 27nm. O envelope viral é originado da última célula infectada pelo vírus, e este contém três proteínas que formam o antígeno de superfície (HBsAg) (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007).

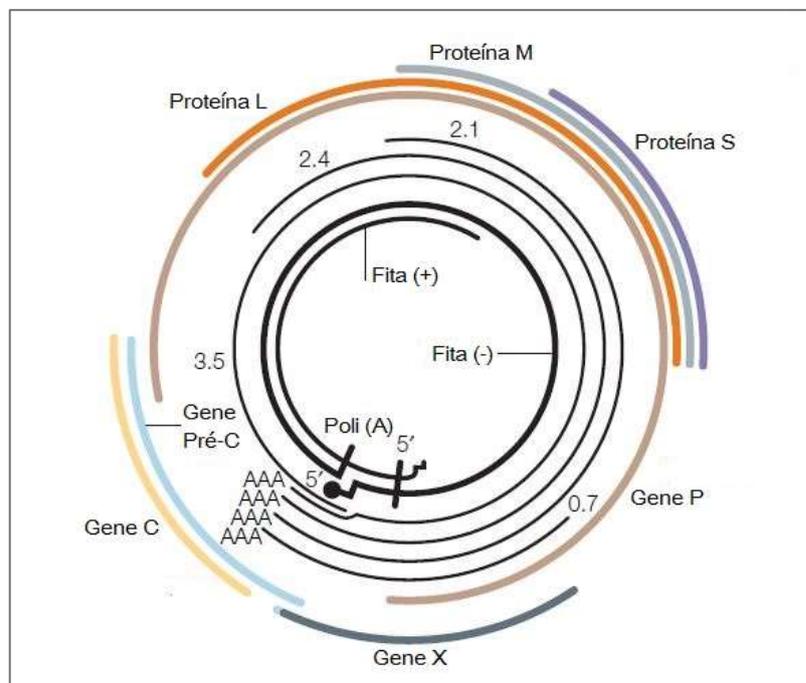
Em portadores do HBV, a maior parte do HBsAg detectado na corrente sanguínea corresponde a partículas subvirais (LEE e AHN, 2011).



**Figura 3** - Representação esquemática da estrutura das partículas virais do HBV. (Fonte: BRASIL, 2015)

### 1.2.2 Organização genômica do HBV

O genoma do HBV é constituído por ácido desoxirribonucleico (HBV-DNA) parcialmente circular de dupla fita, possuindo 3.200 nucleotídeos e peso molecular 3.2kb. Em partículas virais completas, o genoma replica-se por meio da transcriptase reversa (Figura 4) (HATZAKIS; MAGIORKINIS; HAIDA, 2006; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).



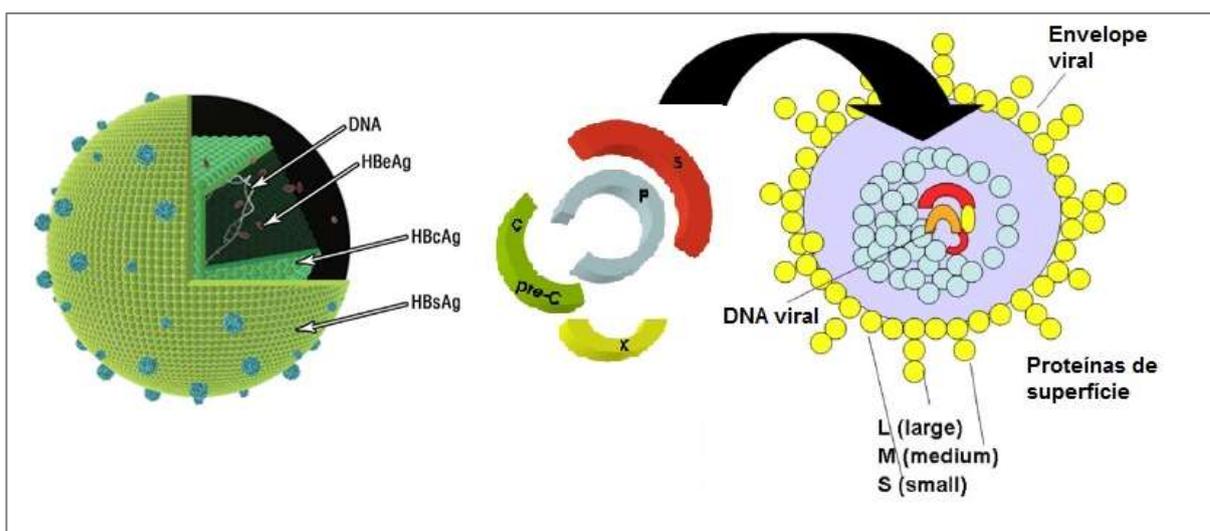
**Figura 4** - Estrutura genômica do HBV (Fonte: REHERMANN e NASCIMBENI, 2005).

O genoma contém quatro fases abertas de leitura (ORF), e estes codificam as proteínas de superfície (proteína L, proteína M e proteína S), o gene P, o gene X, e o gene C

juntamente com o pré-core. Mais internamente estão as fitas positiva e negativa de DNA do vírus, na sequência estão as transcrições de RNAm do vírus (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

As proteínas do envelope viral (proteína L, proteína M e proteína S), vão codificar três diferentes antígenos de superfície, o HBsAg grande (*L-large*), o HBsAg médio (*M-middle*) e o HBsAg pequeno (*S-small*) (Figura 5) (BLOCK; GUO; GUO, 2007). Dentre as proteínas, a mais abundante é a proteína S. A proteína L possui papel importante na ligação dos vírus aos receptores da célula hospedeira, na sua entrada, montagem e liberação de novas partículas (KLINGMULLER e SCHALLER, 1993).

Os genes C e pré-C (pré-core) irão codificar o antígeno do core (HBcAg) e o antígeno “e” (HBeAg), sendo o HBcAg o polipeptídeo estrutural do capsídeo viral (Figura 5) (LEE, 1997). O gene P irá codificar a DNA polimerase que também exibe atividade de transcriptase reversa. Já o gene X irá codificar a proteína HBx que atua na transmissão de sinais na célula hospedeira, sinais esses que potencializam a replicação do vírus (FEITELSON et al.,



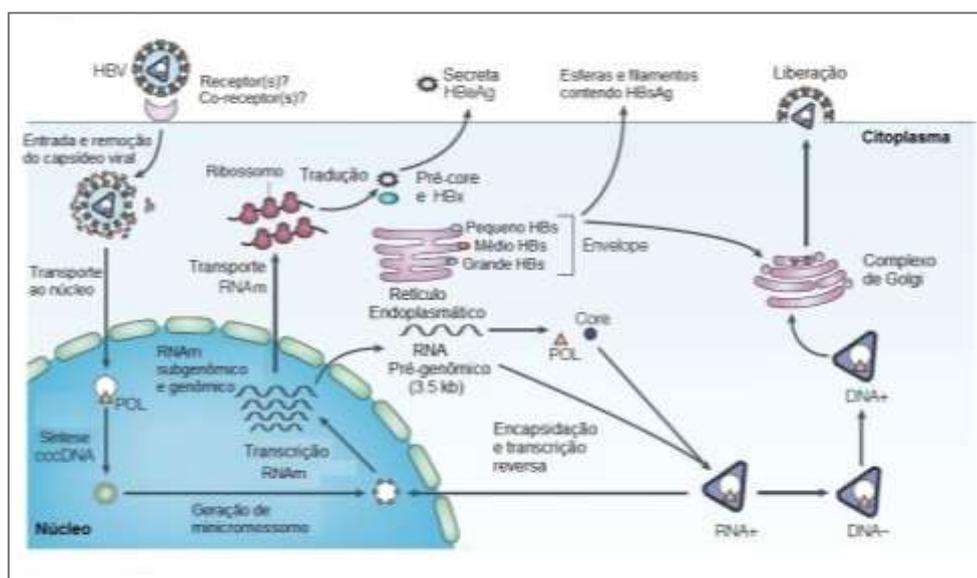
**Figura 5** - Representação dos antígenos virais (Fonte: BRASIL, 2014; RIZZETTO e CIANCIO, 2008).

1993).

### 1.2.3 Replicação do HBV

O ciclo replicativo começa a partir da ligação do vírus ao hepatócito. O vírus entra na célula após a ligação da sua glicoproteína de superfície a um receptor presente na membrana do hepatócito, possibilitando a fusão das membranas. Os mecanismos pelo quais ocorrem a adsorção e penetração do HBV nos hepatócitos não estão bem elucidados. Uma vez no

citoplasma, ocorrerá a remoção das proteínas do envelope e capsídeo viral, e seu material genômico será transportado para o núcleo, onde seu DNA de fita parcialmente dupla será convertido em DNA circular de fita dupla covalentemente fechado (cccDNA). O cccDNA servirá de molde para a transcrição de quatro RNAs virais que serão exportados para o citoplasma e utilizados como RNA mensageiro (RNAm) para a tradução das proteínas do envelope viral, core, polimerase, polipeptídeos X e pré-core (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007; GERLICH, 2013) (Figura 6).



**Figura 6** - Ciclo replicativo do HBV (Fonte: REHERMANN e NASCIMBENI, 2005).

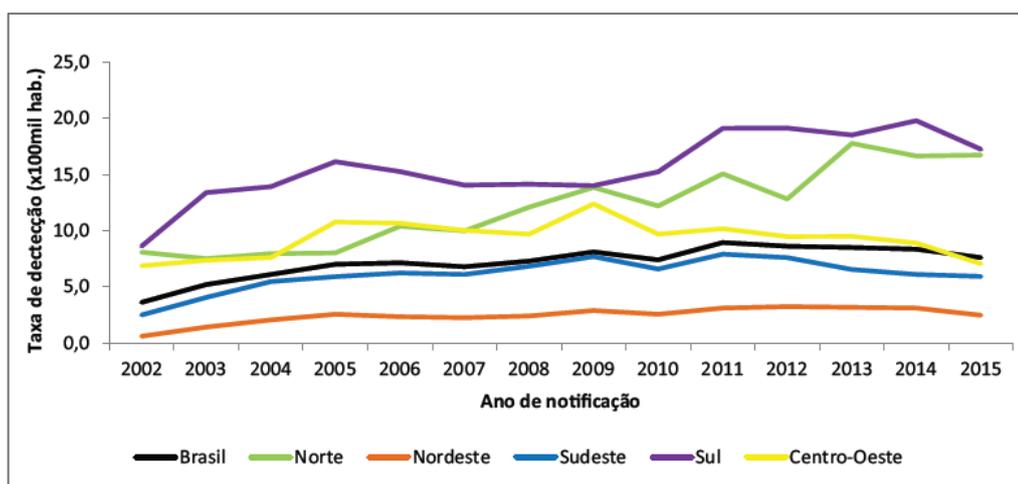
O capsídeo é formado no citoplasma e neste processo uma única molécula de RNA pré-genômico é incorporado ao interior do capsídeo (POLLACK e GANEM, 1994), onde este pode retornar novamente ao núcleo da célula para replicar-se e liberar novos genomas virais, ou continuar a síntese dos dois filamentos de DNA. Esse capsídeo irá migrar para o complexo de Golgi, onde irá adquirir o envelope viral, transformando-se em vírus completo, podendo então ser exportado para o exterior da célula (WANG e SEEGER, 1993; GERLICH, 2013; REHERMANN e NASCIMBENI, 2005).

#### 1.2.4 Epidemiologia do HBV

A infecção causada pelo HBV é um dos mais sérios problemas de saúde pública no mundo (FONSECA, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 240 milhões de pessoas estejam cronicamente infectados por este vírus, e que mais de 686 mil

peças morrem todos os anos por complicações causadas pela hepatite B (cirrose e câncer de fígado). Um indivíduo é considerado portador crônico do HBV quando possui o HBsAg positivo por mais de seis meses (WHO, 2015). Ásia, Pacífico Sul e África apresentam a maior incidência e prevalência de casos no mundo (LAVANCHY, 2004; LOK e MCMAHON, 2007).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, no período de 1999 a 2015, foram notificados cerca de 196.701 casos de hepatite B confirmados. O número de casos se distribuiu dessa forma nas regiões brasileiras: 35,5% no Sudeste, 31,4% no Sul, 14,3% no Norte, 9,4% no Nordeste e 9,3% no Centro-Oeste. Entretanto, nos últimos anos observou-se um aumento na proporção de casos na região Norte (Figura 7). A principal forma clínica apresentada entre os casos notificados foi forma crônica de infecção, sendo este em média 81,1% dos casos (BRASIL, 2016).



**Figura 7** - Taxa de detecção de hepatite B segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2002 a 2015 (BRASIL, 2016).

Em áreas endêmicas de infecção pelo HBV, como a Ásia, prevalece a transmissão vertical (mãe para filho), em outras áreas a transmissão é geralmente horizontal (percutânea, sexual) (LAVANCHY, 2004; LEE, 1997). No Brasil, em média, 51,5% dos casos a transmissão se dá por via sexual, seguido pela transmissão vertical, por transfusão sanguínea e por uso de drogas injetáveis (6,2%, 5,4% e 4,3% respectivamente) (BRASIL, 2016).

### 1.2.5 Resposta Imunológica

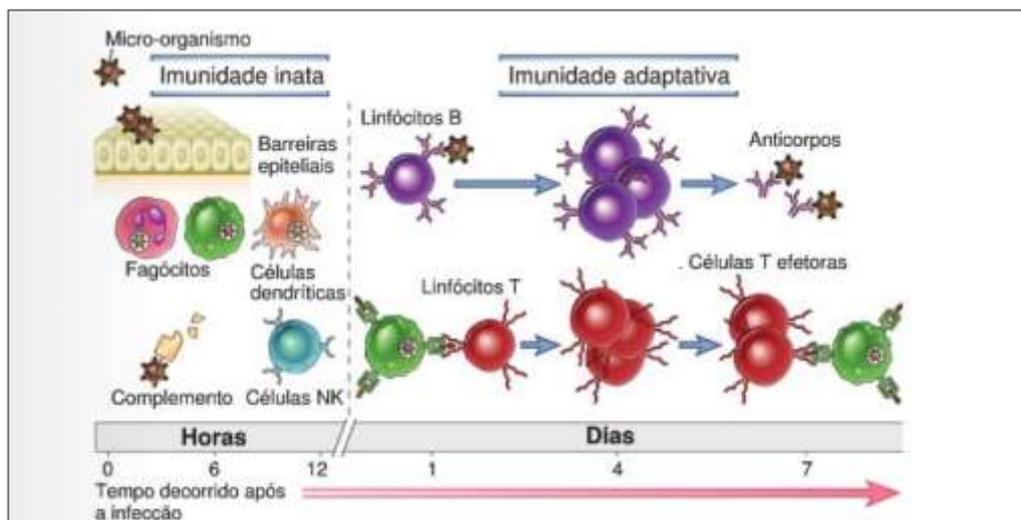
A resposta imune do portador do vírus é o fator determinante para a progressão da infecção (BERTOLETTI e GEHRING, 2006). Acredita-se que o vírus não cause lesão direta

ao hepatócito, e que o dano produzido na estrutura do órgão resulte da resposta imune adaptativa mediante células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

A resposta imune inata a primeira a se desenvolver nos processos infecciosos, mediada pelas próprias células infectadas, que secretam citocinas que atuam ativando os fagócitos estimulando assim a inflamação (ABBAS e LICHTMAN, 2008; GUIDOTTI et al, 1999).

O fígado é um órgão que possui muitas células que participam da resposta imune inata, como as células *natural killer* (NK), células *natural killer* T (NKT) e as células de Kupffer. As próprias células infectadas atuam produzindo interferon tipo 1  $\alpha/\beta$  (INF- $\alpha/\beta$ ) que atuam sobre produtos da replicação viral. Haverá a produção interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), pelas células infectadas, que atuará ativando células NK e células NKT (BERTOLETTI e GEHRING, 2006). Além disso, percebe-se aumento nos níveis de interleucina 2 (IL-2) e do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), havendo também o recrutamento intra-hepático de células inflamatórias (GUIDOTTI et al, 1999).

Para que a eliminação da infecção ocorra, é necessário que a resposta imune adaptativa se desenvolva. O recrutamento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (LTCD4<sup>+</sup>) ativam os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (LTCD8<sup>+</sup>) e linfócitos B. Os linfócitos B irão se diferenciar em plasmócitos para a produção de anticorpos, e estes agirão neutralizando partículas virais livres, podendo também prevenir a reinfeção (BERTOLETTI e GEHRING, 2006; GUIDOTTI et al, 1999). Na figura 8 há a representação de células da resposta imunológica.



**Figura 8** - Células da imunidade inata e adaptativa (Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A ação dos LTCD8<sup>+</sup> é crucial para a recuperação da infecção (THIMME et al., 2003), pois estes atuam na eliminação do vírus por vias citolíticas (promovendo apoptose dos

hepatócitos infectados) e não-citolíticas, ocasionando assim diminuição de vírus na circulação (GUIDOTTI et al, 1999; BAUMERT et al., 2007).

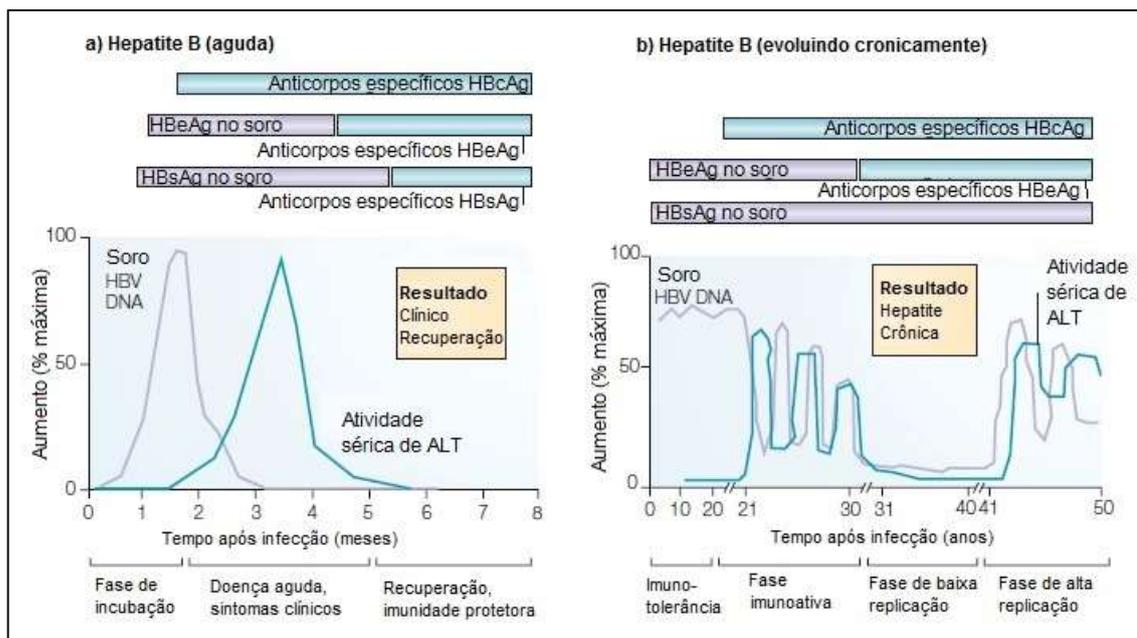
Indivíduos que não possuem uma resposta imune eficiente poderão desenvolver uma infecção persistente, tornando-se portadores crônicos do HBsAg (RAIMONDO *et al.* 2005), o que ocorre em 90% dos indivíduos que foram infectados quando criança, devido principalmente à imaturidade do sistema imune (ROMANOS; WIGG; SANTOS, 2015).

### 1.2.6 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da infecção pelo HBV deve ser realizado mediante análise de exames clínicos e laboratoriais para melhor esclarecimento da doença. Por meio de exames bioquímicos pode-se avaliar as taxas de transaminases do indivíduo. As enzimas, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), são utilizadas na avaliação do fígado. De modo geral, essas enzimas não são utilizadas somente para avaliação do tecido hepático, no entanto, o aumento de atividade das transaminases reflete dano celular, sendo a ALT mais específica para o fígado do que a AST (ROMANOS; WIGG; SANTOS, 2015; MARSHALL; BANGERT; LAPSLEY, 2013).

Na hepatite aguda observa-se o aumento das transaminases no soro, sendo que os níveis séricos de ALT são maiores do que AST. Nas primeiras semanas os níveis de ALT permanecem normais, ou minimamente elevado. Cerca de 10-15 semanas após a infecção, os níveis de ALT no soro começam a subir (Figura 9), o que indica lesão hepática mediada por células T (ROMANOS; WIGG; SANTOS, 2015; FONSECA, 2007; REHERMANN e NASCIMBENI, 2005).

A pesquisa do ácido nucleico viral (DNA do HBV) pode ser realizada por meio de técnicas de biologia molecular quantitativa e qualitativa (ROMANOS; WIGG; SANTOS, 2015), sendo a carga viral o marcador mais informativo quando se analisa a evolução da doença hepática (GONÇALVES JUNIOR, 2013).



**Figura 9** - Níveis de HBV-DNA e ALT na hepatite B aguda e crônica (Fonte: REHERMANN e NASCIMBENI, 2005).

Na infecção aguda pelo HBV, o DNA do HBV é detectável logo no primeiro mês de infecção (REHERMANN e NASCIMBENI, 2005). O primeiro marcador sorológico a ser detectado é o HBsAg (período de incubação: 4-12 semanas), seguido pelo antígeno “e” do HBV (HBeAg) e pelos anticorpos contra o antígeno central do HBV (anti-HBc) (LEE, 1997). A detecção do HBsAg, do HBeAg e do DNA do HBV no soro irá indicar replicação viral ativa (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010). Já as transaminases só apresentarão níveis elevados no soro após a infecção pelo HBV estar devidamente estabelecida, indicando ação da resposta imune mediada por linfócitos T citotóxicos (LEE, 1997).

Havendo resolução da infecção, os antígenos HBsAg e HBeAg desaparecem da circulação, e então o anti-HBsAg começa a ser detectado no soro (CHU e LOK, 2002).

A infecção crônica pelo HBV é caracterizada pela persistência do HBsAg no soro por mais de seis meses. Esse tipo de infecção é mais comum em casos de transmissão vertical. O curso da doença apresenta várias fases, onde os níveis de DNA do HBV e ALT na circulação sofrem aumentos e diminuições (REHERMANN e NASCIMBENI, 2005; LEE, 1997).

Os testes imunoenzimáticos são as principais ferramentas para o diagnóstico sorológico das hepatites virais, pois a partir destes é possível detectar antígenos e anticorpos no soro do portador da infecção, podendo assim indicar a fase de infecção (Quadro 1) (ROMANOS; WIGG; SANTOS, 2015).

Quadro 1 - Marcadores sorológicos para o diagnóstico laboratorial da hepatite B.

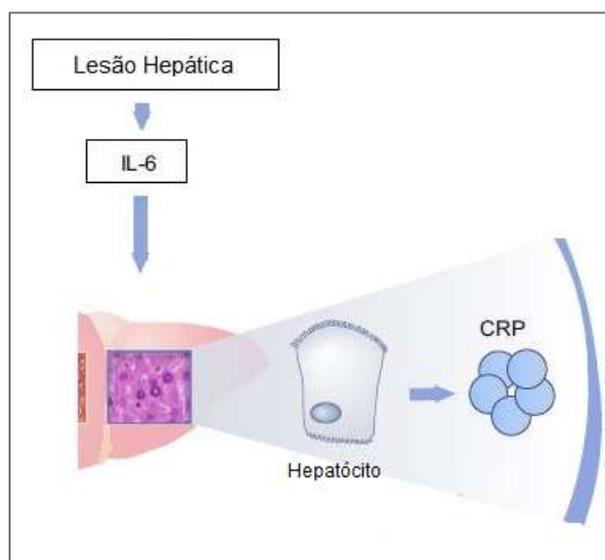
	<b>Marcador</b>	<b>Significado</b>
<b>Hepatite B aguda</b>	HBsAg	Primeiro marcador que aparece no curso da infecção pelo HBV, e declina a níveis indetectáveis em 24 semanas
	IgM anti-HBc	É o marcador de infecção recente, encontrado no soro até 32 semanas após a infecção
	IgG anti-HBc	É marcador de longa duração, presente nas infecções agudas e crônicas. Representa contato prévio com o vírus
	HBeAg	É marcador de replicação viral. Sua positividade indica alta infecciosidade
	Anti-HBe	Surge após o desaparecimento do HBeAg, indicando o fim da fase replicativa
	Anti-HBs	É o anticorpo que confere imunidade ao HBV. Está presente no soro após o desaparecimento do HBsAg, sendo indicador de cura e imunidade. Está presente em pessoas vacinadas
	<b>Hepatite B crônica</b>	HBsAg
HBeAg		Está presente enquanto ocorrer replicação
Anti-HBe		Sua presença sugere redução ou ausência de replicação viral, exceto em cepas com mutação pré-core (não produtoras de antígeno “e”)

HBsAg = antígeno de superfície do HBV; HBeAg = antígeno “e” do HBV; anti-HBc = anticorpo contra o antígeno de core do HBV; anti-HBs = anticorpo contra o antígeno de superfície do HBV; IgG = imunoglobulina classe G; IgM = imunoglobulina classe M (Adaptado de MS/SVS/DVE. Fonte: ROMANOS; WIGG; SANTOS, 2015).

### 1.3 PROTEÍNA C REATIVA

A Proteína C Reativa (PrCR) é uma das proteínas plasmáticas que são produzidas na fase aguda da inflamação, sendo esta muito utilizada para avaliação de pacientes que apresentam desordens inflamatórias. Por ser um indicador sensível de processos inflamatórios, essa proteína é utilizada para auxiliar no diagnóstico, controle terapêutico e para o acompanhamento de várias patologias (SOARES e DAVID, 2002). Os níveis normais da PrCR para a população apresentam uma variação média entre 0,25 e 0,5mg/dL. Em casos de processos inflamatórios esse valor pode aumentar de 100 a 1.000 vezes (CORRÊA e BURINI, 2000; ABBAS e LICHTMAN, 2008) e em estados inflamatórios crônicos a PrCR pode permanecer elevada por um período indefinido (VIGUSHIN; PEPYS; HAWKINS, 1993).

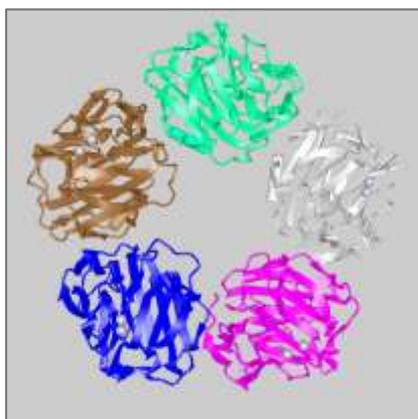
A PrCR é sintetizada no fígado pelos hepatócitos, produzida em resposta a uma lesão tecidual, em processos infecciosos (PANNACCIULLI et al, 2001; SNODGRASS et al., 2007; VIGUSHIN; PEPYS; HAWKINS, 1993). Sua síntese ocorre em resposta ao estímulo produzido pela interleucina-6 (IL-6) em quadros de inflamação e infecção (Figura 10) (PEPYS e BALTZ, 1983) e também pelo estímulo da interleucina-1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral (TNF) (CLYNE e OLSHAKER, 1999). A elevação da PrCR tem sido considerada como marca registrada de inflamação aguda e crônica, sendo que sua concentração pode aumentar em até 10 mil vezes durante respostas agudas a infecção ou a dano tecidual (GABAY e KUSHNER, 1999).



**Figura 10** - Local de síntese de PrCR  
(Fonte: BOTTAZZI et al, 2016).

### 1.3.1 Estrutura e função da PrtCR

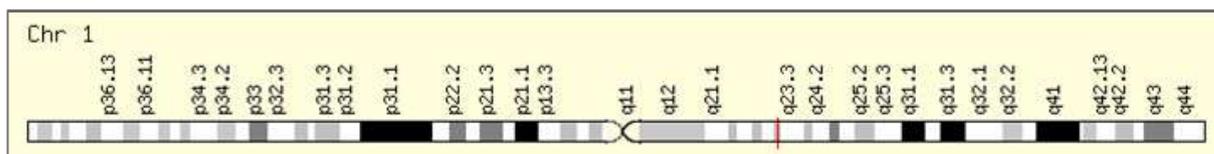
A PrtCR é membro da família das pentraxinas, sua forma pentamérica possui subunidades de 23KDa composta por 224 aminoácidos, sendo estas 5 subunidades iguais resistentes à proteólise (Figura 11) (WOO; KORENBERG; WHITEHEADS, 1985; GABAY e KUSHNER, 1999). A PrtCR é dependente de íons cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), na presença destes íons possui a capacidade de ligar-se a vários polissacarídeos e peptídeo polissacárides presentes em vários microrganismos. Quando ligados, este complexo é capaz de ativar a via clássica do complemento, e através de sua função como opsonina, promover a fagocitose (MOLD; GEWURZ; DU CLOS, 1999).



**Figura 11** - Representação da estrutura da Proteína C reativa. (Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/3PVO>. Acesso em: 23/12/2016).

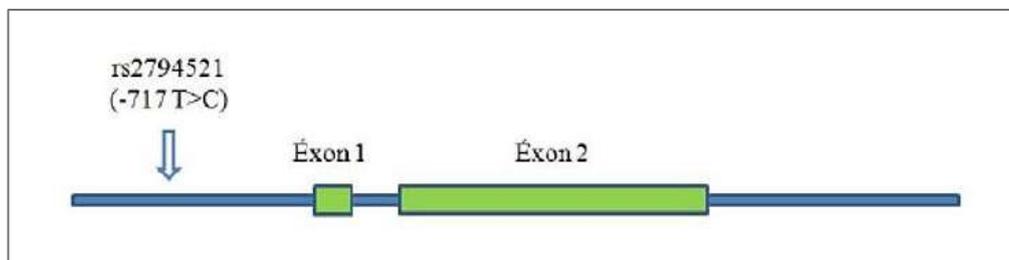
### 1.3.2 Polimorfismos no gene da *Proteína C Reativa (CRP)*

O gene que codifica a PrtCR encontra-se localizado no cromossomo 1 (humano) na posição 1q23.2 (Figura 12) (WOO; KORENBERG; WHITEHEADS, 1985).



**Figura 12** - Localização do gene da *Proteína C reativa* no cromossomo 1 (1q.23.2). (Fonte: Weizman Institute of Science. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CRP&keywords=CRP>. Acesso em: 23/12/2016).

Polimorfismos no gene da *CRP* foram descritos e associados a mudança sérica dessa proteína. O polimorfismo  $-717\text{ CRP T>C}$  (rs2794521) (Figura 13) está localizado na região promotora do gene (ZEE e RIDKER, 2002; BRULL et al., 2003; HAGE e SZALAI, 2007).



**Figura 13** - Representação esquemática da localização do polimorfismo CRP  $-717\text{ T>C}$  (rs2794521). (Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

Os polimorfismos no gene da *CRP* têm sido associados a alterações nas concentrações desta proteína no soro e no plasma (SZALAI, A. J. et al, 2002; SUK, H. J. et al, 2005), com isso, polimorfismos podem estar relacionados no desenvolvimento de doença inflamatória (PENG, Q. et al, 2014).

Um estudo realizado numa população masculina chinesa (Guangxi) por Lao *et al.* (2015), investigou a associação de polimorfismos  $T>C$  no gene da *CRP* e o risco de hepatocarcinoma celular (HCC) relacionado a infecção pelo HBV. Os polimorfismos estudados foram o rs2794521 e o rs3093059. Neste estudo, o haplótipo TC foi significativamente correlacionado com o aumento do risco HCC induzido por HBV na população avaliada. Ainda foi sugerido, que o polimorfismo rs3093059 pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de HCC relacionado a infecção; o mesmo não foi evidenciado para o SNP rs2794521.

Devido ao fato da PrtCR ser de grande importância para a resposta imune inata, por sua ação como biomarcador do processo inflamatório, do seu papel na eliminação de patógenos, o estudo dessa proteína é relevante para que se possa compreender cada vez mais a sua ação, assim como o papel dos seus polimorfismos nas infecções.

#### 1.4 DOENÇAS HEPÁTICAS NÃO VIRAIS

A inflamação no fígado pode ocorrer em decorrência de outros fatores não estando relacionado a vírus hepatotrópicos. É o que acontece em casos de hepatite autoimune, em

doenças hepáticas induzidas por drogas e toxinas, e em doenças hepáticas alcoólica e metabólica (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010). Estas patologias são caracterizadas por lesão dos hepatócitos em decorrência do aumento da liberação de citocinas inflamatórias (FERREIRA, 2000).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a presença do polimorfismo CRP -717 T>C (rs2794521) em pacientes cronicamente infectados pelo Vírus da hepatite B, buscando identificar possíveis marcadores imunogenéticos associados à infecção por este agente.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- (i) Avaliar a frequência do polimorfismo do gene da CRP -717 T>C entre os portadores de hepatite B, pacientes com outras doenças hepáticas crônicas de causas não virais e o grupo Controle;
- (ii) Buscar associação entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo CRP -717 T>C e a apresentação clínica da infecção crônica pelo HBV;
- (iii) Comparar o polimorfismo CRP -717 T>C, com os níveis de marcadores de injúria hepática (alanina aminotransferase, ALT, e aspartato aminotransferase, AST).

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

3.1- ÁREA DE ESTUDO: ciências biológicas.

### **3.2- TIPO DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Trata-se de um estudo do tipo analítico transversal, cuja coleta de sangue foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário João Barros Barreto. Foram selecionados casos consecutivos de pacientes portadores crônicos do HBV e com outras

doenças hepáticas crônicas, incluindo a doença hepática não-alcoólica (DHGNA), hepatite autoimune, cirrose biliar primária, entre outras.

As amostras de sangue foram transportadas ao Laboratório de Virologia da UFPA, onde foi realizado a separação (massa celular e plasma) e o armazenamento (somente do plasma) em freezer -70°C.

Todos os pacientes selecionados foram avaliados clinicamente e submetidos à investigação complementar que constam de exames hematológicos, bioquímicos, sorológicos e virológicos, sendo estes dados transcritos dos prontuários para o protocolo de pesquisa específico. O estudo incluiu 2 grupos de pacientes (HBV e DHNV) e um grupo controle, que apresentaram as seguintes características:

a) Grupo 1 (HBV) – formado por 69 amostras de portadores de hepatite B crônica, caracterizados por alterações clínicas e dos testes hepáticos, HBsAg positivo, HBeAg positivo ou negativo.

b) Grupo 2 (DHNV) – formado por 21 amostras de portadores de hepatite crônica, incluindo a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), a hepatite autoimune, a cirrose biliar primária, entre outras, caracterizados por alterações clínicas e dos testes hepáticos.

Foram incluídos no estudo indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os gêneros, portadores de HBsAg por mais de 6 meses, persistência de alanina aminotransferases elevadas ou não e que não fizeram uso de terapia antiviral. Foram excluídos da pesquisa indivíduos que não preenchiam os requisitos estipulados acima e aqueles pacientes co-infectados pelo HDV e/ou HIV e pacientes que estavam ou fizeram uso de terapia antiviral específica contra o HBV.

c) Grupo 3 (CONTROLE) – formado por 300 amostras de doadores sangue do HEMOPA, os quais apresentarem negatividade para marcadores sorológicos dos *Vírus da Hepatite B* (HBV), *Vírus da Hepatite C* (HCV), *Vírus da Hepatite D* (HDV) e para o *Vírus da Imunodeficiência Humana* (HIV), sendo que esse grupo só foi utilizado para comparação das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo CRP -717 T>C (rs2794521).

### 3.3- TESTES LABORATORIAIS

#### 3.3.1 Extração do DNA

Todas as amostras foram submetidas a extração de DNA total a partir de leucócitos do sangue total periférico das amostras, de acordo com o protocolo do kit de isolamento de ácido nucléico da Puregene, Gentra Systems, Inc., USA. O procedimento ocorreu seguindo-se as etapas de lise celular, de precipitação de proteínas, de precipitação do DNA e de hidratação do DNA.

### 3.3.2 Identificação do polimorfismo CRP -717 T>C (rs2794521)

A identificação foi realizada através da amplificação gênica por meio da PCR em tempo real no equipamento Step One Plus, Applied Biosystem (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.), sendo utilizado o Assay C\_318207\_10, que continha um par de iniciadores e uma sonda utilizando a marcação VIC e FAM para cada um dos alelos do respectivo polimorfismo, pré-desenhados pela empresa Applied Biosystem.

## 3.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística utilizou-se o programa Biostat 5.0v (Ayres et al., 2007). As frequências alélicas e genótípicas foram estimadas por contagem direta. As análises comparativas das frequências alélicas e genótípicas entre os grupos investigados foram realizadas por meio dos testes, Teste-G e Exato de Fisher. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado. Para as análises de comparação entre os níveis dos marcadores de injúria hepática (AST e ALT) o Teste de Mann-Whitney. A construção do gráfico foi feito por meio do programa Graphpad versão 5 (Inc. Prism, 2007).

## 3.5 - ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa via Plataforma Brasil e pelo Hospital Universitário João Barros Barreto (Protocolo de nº 962.537/2015), conforme prevê a resolução nº 196/96 versão 2012 do CNS/MS, que trata de pesquisa em seres humanos (Apêndice 1). Os pacientes selecionados para a pesquisa foram informados sobre os objetivos da pesquisa e deram seu consentimento através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 2).

#### 4. RESULTADOS

Pacientes dos três grupos investigados apresentaram maior frequência do genótipo selvagem (TT), sendo observada diferença significativa apenas quando os grupos HBV e controle foram comparados com o grupo DHNV, o qual apresentou maior frequência do genótipo CC (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do gene *Proteína c reativa (CRP)* do polimorfismo rs2794521(T>C) nas amostras de pacientes infectados com HBV, DHNV e grupo Controle.

Perfil genético	HBV n= 69 n (%)	DHNV n= 21 n (%)	CONTROLE n= 300 n (%)	p1	p2	p3
<b>Genótipos</b>						
<i>TT</i>	44 (63,8)	10 (47,6)	189 (63,0)	<b>0,0064</b>	0,9838	<b>0,0007</b>
<i>CT</i>	23 (33,3)	05 (23,8)	103 (34,3)			
<i>CC</i>	02 (02,9)	06 (28,6)	08 (02,7)			
<b>Alelos</b>						
* <i>T</i>	0,804	0,595	0,802	<b>0,0083</b>	0,9431	<b>0,0007</b>
* <i>C</i>	0,196	0,405	0,198			

HBV: *Vírus da hepatite B*; DHNV: Doença Hepática não-viral. p1= HBV x DHNV; p2=HBV x CONTROLE; p3= DHNV x CONTROLE. Teste G (com correção de Williams).

O genótipo CT apresentou frequência de 100% nos portadores do HBV com atividade inflamatória hepática elevada, porém sem significância estatística (p=0,0581). Já na análise de dominância os genótipos CT+CC estiveram presentes em 100% dos pacientes com níveis (2 a 3) de atividade inflamatória, com diferença estatística significativa quando comparado com os demais genótipos (p=0,0161) (Tabela 2).

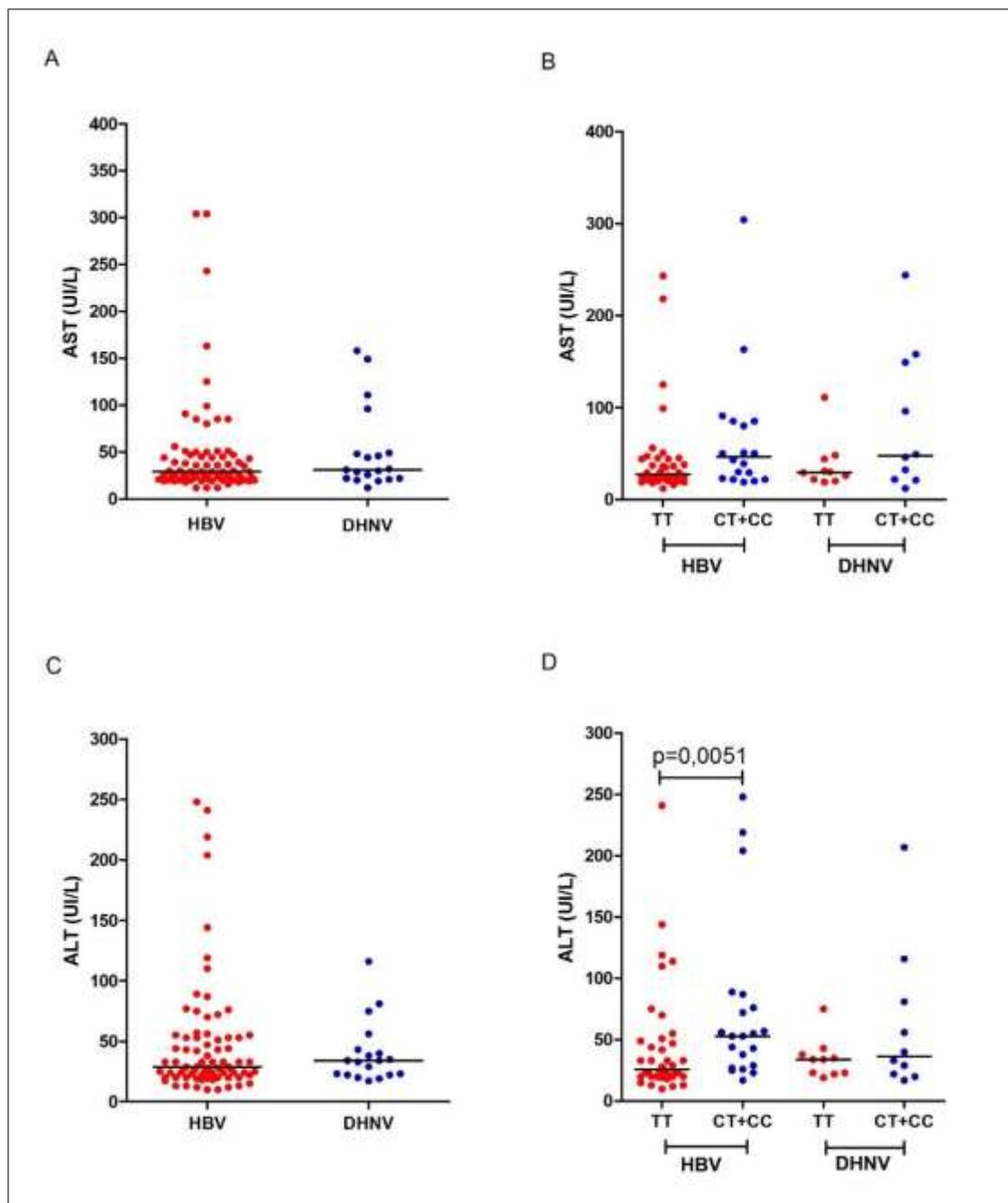
Em relação aos escores de fibrose nos portadores do HBV, o genótipo TT foi o mais frequente tanto nos pacientes com fibrose leve e moderada quanto naqueles com fibrose acentuada e cirrose hepática (60%) seguido pelo genótipo CT (40%), não sendo observada diferença estatisticamente significante (Tabela 2).

Tabela 2- Correlação entre o polimorfismo rs2794521 (T>C) *Proteína c reativa (CRP)* e a atividade inflamatória e escore de fibrose nas amostras de pacientes infectados com HBV. (METAVIR).

Perfil genético Infecção	Atividade inflamatória			Escore de fibrose		
	0 a 1 n (%)	2 a 3 n (%)	<i>p</i>	0 a 2 n (%)	3 a 4 n (%)	<i>p</i>
<b>HBV</b>						
<b>TT</b>	17 (70,8)	00 (00,0)	†0,0581	15 (60,0)	09 (60,0)	†0,6127
<b>CT</b>	06 (25,0)	04 (100,0)		09 (36,0)	06 (40,0)	
<b>CC</b>	01 (04,2)	00 (00,0)		01 (04,0)	00 (00,0)	
<b>*T</b>	0,833	0,500	*0,0553	0,780	0,800	*0,5335
<b>*C</b>	0,167	0,500		0,220	0,200	
<b>TT</b>	17 (70,8)	00 (00,0)	<b>*0,0161</b>	15 (60,0)	09 (60,0)	<b>*0,6321</b>
<b>CT+CC</b>	07 (29,2)	04 (100,0)		10 (40,0)	06 (40,0)	

Atividade inflamatória: 0 a 1, sem inflamação e níveis leves; 2 a 3, muita inflamação. Escore de fibrose: 0 a 2, leve e moderada; 3 a 4: acentuada e cirrose. † Teste G com correção de Williams \*Teste Exato de Fisher.

As análises em relação aos marcadores bioquímicos foram realizadas nos grupos de pacientes com HBV e nos pacientes com DHNV. Contudo, não foram observados níveis estatisticamente significantes entre os grupos estudados (Figura 14 A e C).



**Figura 14** - Níveis plasmáticos das enzimas hepáticas AST, ALT nos pacientes com hepatite B (HBV) e doença hepática de causa não viral (DHDV) de acordo com o polimorfismo CRP -717 T>C (rs2794521). Valores de referência: AST (16-40 IU/L), ALT (08-54 IU/L). <sup>p</sup>Teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

Nas análises entre os genótipos e as enzimas hepáticas em cada grupo de pacientes estudados, foi possível observar que os níveis plasmáticos das enzimas hepáticas AST e ALT foram maiores nos indivíduos com os genótipos CT+CC quando comparados com o genótipo TT, em todos os grupos de pacientes estudados (Figura 14 B e D), porém, essa diferença só teve

significância estatística na análise de ALT no grupo HBV, onde os pacientes com os genótipos CT+CC apresentaram níveis mais elevados dessa enzima (Figura 14 D).

## 5. DISCUSSÃO

A frequência do polimorfismo investigado foi avaliada em todos os grupos, sendo o genótipo TT o que apresentou as maiores frequências em todos os grupos. Estudos indicam que a presença desse alelo garante uma maior atividade transcricional do gene da *CRP*, conferindo assim, um aumento no nível dessa proteína (WANG Q. et al., 2009).

Entre os grupos analisados, o grupo com HBV foi o que apresentou a maior frequência do genótipo TT, e da mesma forma se comportou o grupo controle. Esses resultados corroboram com os resultados apresentados por Peng *et al.* (2014), onde a frequência do genótipo TT foi maior nos pacientes com HBV.

No grupo de pacientes com DHNV, o genótipo CC e o alelo \*C foram os que apresentaram maiores frequências. A presença desse alelo ocasiona uma produção menor de proteína C reativa, sendo possível supor que uma baixa produção de PrtCR confere um quadro de inflamação mais branda em pacientes portadores do alelo \*C, quando comparados ao genótipo TT (WANG et al., 2009).

Pacientes com HBV, portadores do genótipo CT, apresentaram atividade inflamatória com níveis moderados e elevados. Um estudo que avaliou os níveis séricos desta PrtCR, verificou que a presença do alelo \*T pode influenciar no aumento dos níveis séricos desta proteína, ocasionando aumento de inflamação nesses pacientes (ABRAHAM et al., 2009). O mesmo foi observado por Ma *et al.* (2015), onde níveis séricos de PrtCR em pacientes com HBV foram correlacionados com maior grau de fibrose.

A análise dos escores de fibrose nos pacientes, não apresentou resultados significantes. No entanto, 60 % dos pacientes, que possuíam o genótipo TT, apresentaram maiores escores de fibrose hepática. No estudo feito por Ma *et al.* (2015), onde a sensibilidade e a especificidade da PrtCR no diagnóstico de fibrose F3 e F4 foi de 81,8% e 80,0%, respectivamente, sugeriu-se o uso da PrtCR no diagnóstico de fibrose em pacientes com HBV. Contudo, o mesmo não foi evidenciado por Yilmaz *et al.* (2015), o qual não encontrou associação dos níveis de PrtCR com o grau de fibrose em pacientes crônicos com HBV.

Com relação aos marcadores bioquímicos, foi possível observar que muitos pacientes apresentaram essas enzimas acima do nível normal. As enzimas AST e ALT são

consideradas marcadores sensíveis para detecção de lesão no parênquima hepático, sem apresentar especificidade para nenhum tipo de hepatite, mas as mesmas apresentam-se elevadas em pacientes com doença hepática (BRASIL, 2015; Pratt *et al.*, 1999). Apesar de apresentarem-se em níveis elevados, não foi observada correlação entre os níveis das enzimas com os genótipos de CRP -717 T>C nos grupos estudados, sugerindo assim que o polimorfismo possivelmente não atue influenciando nos níveis destas enzimas.

O papel da proteína C reativa nas hepatites ainda não foi bem elucidado, havendo poucos trabalhos na literatura que tenham investigado a presença de polimorfismo nas infecções por HBV e em doenças hepáticas de causa não-viral.

## 6. CONCLUSÕES

Em nosso estudo, o polimorfismo -717 T>C da proteína C reativa, não apresentou associação com a infecção pelo HBV, assim como com a atividade inflamatória e com os escores de fibrose. Com relação as transaminases, apesar de muitos pacientes terem apresentado as transaminases acima da normalidade, essa associação não apresentou significância, mas foi possível observar que genótipos polimórficos apresentaram níveis mais elevados das enzimas.

Sugere-se um aumento do número amostral do grupo com DHNV para confirmação dos resultados obtidos nesse trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 6ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2008.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2012.

ABRAHAM, G., SUNDARAM, V., SUNDARAM, V., et al. Proteína C-reativa, um marcador preditivo valioso na doença renal crônica. **Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, **20** (5): 811-815, 2009.

ALTER, H.J. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. **Journal of Hepatology**, **39**: 149-152, 2003.

BAUMERT T.F., THIMME R., von WEIZSÄCKER F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, **13** (1): 82-90, 2007.

BERTOLETTI, A.; GEHRING, A.J. The immune response during hepatitis B virus infection. **Journal of General Virology**, **87**: 1439-1449, 2006.

BLOCK, T.M.; GUO, H.; GUO, J. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. **Clin Liver Dis**, **11** (4): 685–706, 2007.

BLUMBERG, B.S. **Hepatitis B: The hunt for a killervirus**. Princeton University Press, New Jersey; 2003.

BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J.; VISNICH, S. A new antigen in leukemia sera. **Journal of the American Medical Association**, **191**: 541-546, 1965. (BLUMBERG; ALTER; VISNICH, 1965)

BLUMBERG, B.S.; GERSTLEY, B.J.; HUNGERFORD, D.A. et al. A Serum Antigen (Australia Antigen) in Down's Syndrome, Leukemia, and Hepatitis. **Annals of Internal Medicine**, **66** (5): 924-931, 1967.

BOTTAZZI, B.; INFORZATO, A.; MESSA, M. et al. The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodeling. **Journal of Hepatology**, **64**: 1416–1427, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico Hepatites Virais. Ano V nº 01**. Brasília: MS. 2016, p. 13-17. Acesso em: 21/11/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Manual técnico para o diagnóstico das Hepatites Virais. 1ed**. Brasília: MS. 2015. Acesso em: 29/03/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde -Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Diagnóstico de Hepatites Virais**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2014.

BRULL, D.J.; SERRANO, N.; ZITO, F. et al. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, **23** (11): 2063-2069, 2003.

CHU, C-J.; LOK, A.S. Clinical utility in quantifying serum HBV-DNA levels using PCR assays. **Journal of Hepatology**, **36**: 549-551, 2002.

CLYNE, B., OLSHAKER, J.S. The C-reactive protein. **The Journal of Emergency Medicine**, **17** (6): 1019-1025, 1999.

CORRÊA, C.R.; BURINI, C.R. Proteínas plasmáticas reativas positivas à fase aguda. *Jornal Brasileiro de Reumatologia*, **36**: 26-34, 2000

FEITELSON, M.A.; ZHU, M.; DUAN, L.X.; et al. HBxAg and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, **8**: 1109-1117, 1993.

FERREIRA, M.S. Diagnosis and treatment of hepatitis B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **33** (4): 389-400, 2000.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields' Virology**. 5ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams &Wilkins, 2007.

FLOYD-SMITH, G.A.; WHITEHEAD, A.S.; COLTEN, H.R. et al. O gene da proteína C reactiva humana (CRP) e componente amilóide P de soro gene (APCs) são localizados no braço longo do cromossoma 1 proximal. **Immunogenetics**, **24**: 171-176, 1986.

FONSECA, J.C.F. História natural da hepatite crônica B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **40**(6): 672-677, 2007.

FONSECA, J.C.F. Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **43** (3): 322-330, 2010.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England Journal of Medicine**, **340** (6): 448-454, 1999.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **N Engl J Med**, **340**: 448–54, 1999.

GERLICH, W.H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. **Virology journal**, **10** (1) 239, 2013.

GONÇALVES JUNIOR, F. L. Hepatite por Vírus B: História Natural da Infecção. **Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas**. 3ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 327-339, 2013.

GUIDOTTI, L.G.; ROCHFORD, R.; CHUNG, J. et al. Viral clearance with out destruction of infected cells during acute HBV infection. **Science**, **284**: 825-829, 1999.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2006.

HAGE, F.G.; SZALAI, A.J. C-reactive protein gene polymorphisms, C-reactive protein blood levels, and cardiovascular disease risk. **Journal of the American College of Cardiology**, **50**: 1115-1122, 2007.

HATZAKIS, A.; MAGIORKINIS, E.; HAIDA, C. HBV virological assessment. **Journal of Hepatology**, **44**: 71-76, 2006.

HEYMANN, F.; TACKE, F. Immunology in the liver - from homeostasis to disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, **13** (2): 88-110, 2016.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004. 533p.

KIDD-LJUNGGREN, K.; MIYAKAWA, Y.; KIDD, A.H. Genetic variability in hepatitis B viruses. **Journal of General Virology**, **83**: 1267-1280, 2002.

KLINGMULLER, U.; SCHALLER, H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. **Journal of Virology**, **67**: 7414-7422, 1993.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. et al. **Robbins e Contran, bases patológicas das doenças**. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

- LAO, X.; REN, S.; LU, Y. et al. Polimorfismos genéticos de C-reativa aumento proteína susceptibilidade a carcinoma hepatocelular relacionados com o HBV numa população masculina Guangxi. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, **8** (12): 55-66, 2015.
- LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **Journal of Viral Hepatitis**, **11** (2): 97-107, 2004.
- LEE, J. M.; AHN, S. H. Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice. **World journal of gastroenterology**, **17** (3): 283-289, 2011.
- LEE, W.M. Hepatitis B virus infection. **New England Journal of Medicine**, **337**: 1733-1745, 1997.
- LOK, A.S.F.; MCMAHON, B.J. Chronic hepatitis B. **Hepatology**, **45**: 507-539, 2007.
- MA, L.N.; LIU, X.Y.; LUO, X. et al. De alta sensibilidade ao soro da proteína C-reativa estão associados com a replicação de HBV, o fígado danos e fibrose em pacientes com infecção crônica da hepatite B. **Hepatogastroenterology**, **62** (138): 368-372, 2015.
- MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K.; LAPSLEY, M. **Química Clínica**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.
- MOLD, C.; GEWURZ, H.; DU CLOS, T.W. Regulation of complement activation by C-reactive protein. **Immunopharmacology**, **42** (1-3): 23-30, 1999.
- PENG, Q.; REN, S.; LAO, X. et al. C-reactive protein genetic polymorphisms increase susceptibility to HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population. **Tumor Biology**, **35**: 10169-10176, 2014.
- PEPYS, M.B.; BALTZ, M.L. Acute phase proteins with special reference to C reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid a protein. **Immunology**, **34**: 141-21, 1983.
- POLLACK, J.R.; GANEM, D. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. **Journal Virology**, **68** (9): 5579-5587, 1994.
- PRATT, D.S.; KAPLAN, M.M. Diseases of the liver. **Laboratory test**, **8** (1): 205-244, 1999.

PROTZER, U.; MAINI, M.K.; KNOLLE, P.A. Living in the liver: hepatic infections. **Nature Review Immunology**, **12** (3): 201-213, 2012.

QILIU, P.; SHAN, R.; XIANJUN, L. et al. C-reactive protein genetic polymorphisms increase susceptibility to HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population. **Tumor Biol**, **35**: 10169–10176, 2014.

RAIMONDO, G.; POLLICINO, T.; CACCIOLA, I. et al. Occult hepatitis B vírus infection. **Journal Hepatology**, **46**: 160-170, 2005.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis b virus and hepatitis c virus infection. **Nature Reviews Immunology**, 215-229, 2005.

RIZZETTO, M.; CIANCIO, A. Chronic HBV-related liver disease. **Molecular Aspects of Medicine**, **29**: 72–84, 2008.

ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D.; SANTOS, N.S.O. **Introdução à Virologia Humana**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SNODGRASS, J.J.; LEONARD, W.R.; TARSKAIA, L.A. et al. Anthropometric correlates of c-reactive protein among indigenous Siberians. **Journal of Physiological Anthropology**, **26**: 241-246, 2007.

SOARES, A.J.C.; DAVID, C.M.N. A avaliação do comportamento da proteína C-reativa em pacientes com sepse na UTI. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, **14**(4): 156-64, 2002.

SUK, H. J.; RIDKER, P. M.; COOK, N. R. et al. Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. **Atherosclerosis**, **178**: 139–45, 2005.

SZALAI, A. J.; MCCRORY, M. A.; COOPER, G. S. et al. Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the crp gene. **Genes Immun**, **3**: 14–9, 2002.

THIMME, R.; WIELAND, S.; STEIGER C. et al. CD8+ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. **Journal of Virology**, **77** (1): 68-76, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VALE, A.F. Hepatites virais, 15 de setembro de 2014 às 14h56. Disponível em: <<http://www.humbertoabrao.com.br/hepatites-virais/>>. Acesso em: 23 dezembro 2016.

VIGUSHIN, D.M.; PEPYS, M.B.; HAWKINS, P.N. Metabolic and scinti graphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in heal thand disease. **J Clin Invest**, **91** (4): 1351-7, 1993.

WANG, G.H.; SEEGER, C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. **Cell**, **13** (4): 663-670, 1993.

WANG, L.; LU, X.; LI, Y. et al. Functional analysis of the C-reactive protein (CRP) gene - 717A>G polymorphism associated with coronary heart disease. **BMC Medical Genetics**, **10**: 73, 2009.

WANG, Q.; DING, H.; TANG, J.R. et al. C-reactive protein polymorphisms and genetic susceptibility to ischemic stroke and hemorrhagic stroke in the Chinese Han population. **Acta Pharmacol Sin** (3): 291-298, 2009.

WOO, P.; KORENBERG, J.R.; WHITEHEADS, A.S. Characterization of Genomic and Complementary DNA Sequence of Human C - reactive protein, and Comparison with the Complementary DNA Sequence of Serum Amyloid P Component. **The Journal of Biological Chemistry**, **260** (24): 13384-13388, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2015. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. Disponível em: <[http://www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html)> Acesso em: 24 de setembro de 2016.

YILMAZ, H.; YALCIN, K.S.; NAMUSLU, M. et al. Neutrófilos de Linfócitos Ratio (NLR) poderia ser melhor preditor de proteína C-reativa (CRP) para o fígado fibrose na esteato-hepatite não alcoólica (NASH). **Annals of Clinical & Laboratory Science**, **45** (3): 278-286, 2015.

YOUNG, B.; LOWE, J.S.; STEVENS, A. et al. **Wheater Histologia Funcional: texto e atlas em cores**. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

ZEE, R.Y.; RIDKER, P.M. Polymorphism in the human C reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. **Atherosclerosis**, **162**: 217-219, 2002.

**APÊNDICE I**

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
JOÃO DE BARROS BARRETO -  
UFPA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS, GENÉTICOS E PROTEÔMICOS EM PACIENTES PORTADORES DOS VÍRUS DAS HEPATITES B E C

**Pesquisador:** Antonio Vallinoto

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP:);

**Versão:** 1

**CAAE:** 31223214.2.3002.0017

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 982.537

**Data da Relatoria:** 24/02/2015

**Apresentação do Projeto:**

As hepatites virais são consideradas a maior pandemia da atualidade e os vírus das hepatites B e C são responsáveis pela grande maioria das formas de doenças hepáticas crônicas no mundo, por isso constituem relevante problema de saúde pública. Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que exista cerca de 3% da população mundial portadoras de infecção crônica pelo vírus da hepatite C, com diferentes padrões de distribuição relacionados à região geográfica e temporal, enquanto que, aproximadamente, 7% da população do mundo estão cronicamente infectados com o vírus da hepatite B. No contexto da infecção pelo VHB e VHC, em todas as fases da resposta imune, seja inata ou adaptativa, o papel das citocinas, das proteínas, dos marcadores apoptóticos e das células T reguladoras é fundamental. Sua secreção e ativação surgem em resposta a antígenos estimulando o desenvolvimento da imunidade e da inflamação. As citocinas têm entre as suas funções o estímulo para a diferenciação e crescimento de linfócitos, a ativação de diferentes células efetoras para eliminação de antígenos e estimulação do crescimento das células hematopoiéticas. A importância da apoptose para a patogênese de várias doenças, incluindo as hepatites B e C, tem sido reconhecida. Tem sido sugerido que um aumento da apoptose de células T durante a infecção pelo VHB e VHC é a causa de prejuízo na regulação da resposta imunitária

**Endereço:** RUA DOS MUNDURUCUS 4487

**Bairro:** GUAMA

**CEP:** 66.073-000

**UF:** PA

**Município:** BELEM

**Telefone:** (91)3201-6754

**Fax:** (91)3201-6663

**E-mail:** cephujbb@yahoo.com.br

**FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ**  
**LABORATÓRIO DE VIROLOGIA – ICCB**  
**INSTITUTO EVANDRO CHAGAS**  
**DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA – UFPA**  
**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO**  
**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Estou sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre a ESTUDO DA CORRRELAÇÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS, GENÉTICOS E PROTEÔMICO EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E C, que está sendo desenvolvida na Fundação Santa Casa, no laboratório do Instituto Evandro Chagas, no de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA) e no Hospital Universitário João de Barros Barreto.

- 1- Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:
- 2- Os pesquisadores responsáveis são o Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, biomédico e professor de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA e a Dra. Simone Conde Professora do Instituto de Ciências da Saude da UFPA. Como integrante a aluna de doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários Ednelza da Silva Graça, Farmacêutica-Bioquímica, Bárbara Brasil Santana ( Biomédica) e de Mestrado, Tuane Carolina de Souza Ferreira ( Bióloga).
- 3- O objetivo da pesquisa é avaliar a associação entre as citocinas e o polimorfismo de seus genes, bem como a expressão dos genes Fas, FasL, NGF, P75NTR e FOXP3 com o padrão de infecção crônica pelo vírus da hepatite B.
- 4- Para esta pesquisa, será coletada uma pequena quantidade de sangue (10 mL) e nos casos possíveis será realizada uma biópsia do fígado.
- 5- Os possíveis riscos incluem dor local e sangramentos. Todos os pacientes permanecerão em observação por quatro horas após a realização da biópsia, sendo utilizados todos os meios para evitar estes riscos. Serão utilizados materiais descartáveis, como agulhas e seringas.
- 6- Além da coleta de sangue e biópsia hepática, os dados referentes a todo seu acompanhamento e história clínica serão transportados para uma ficha de protocolo, permitindo comparar os resultados do questionário com os achados nos testes de sangue.
- 7- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como qualquer pessoa poderá deixar o estudo no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa, garantindo o atendimento médico participando ou não da pesquisa.
- 8- Não haverá nenhum tipo de despesa para participação, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.
- 9- O grande benefício desta pesquisa par todos que participam é possibilitar um melhor entendimento sobre a influência da resposta imunológica do hospedeiro (pessoa infectada) através de suas citocinas e genes apoptóticos no tipo de evolução da doença crônica do fígado pelo vírus da hepatite B. Alguns que se infectam podem eliminar espontaneamente o vírus, enquanto outros se tornam crônicos, podendo evoluir para cirrose ou tumor de fígado.
- 10- A participação é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.
- 11- Ao final da pesquisa, os resultados serão fornecidos a todos os participantes através do contato direto com seu médico assistente.

12- Qualquer dúvida sobre a pesquisa, o paciente poderá em contato com a Dra. Simone Conde, no ambulatório de doenças hepáticas da Fundação Santa Casa, de 7:00 às 11:00h, nas segundas, quartas e quintas-feiras, ou pelo telefone 4009-2273.

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

---

No. da Carteira de Identidade

#### Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido (a) acerca do conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar, cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

---

Assinatura do Participante ou Responsável Legal

---

No. da Carteira de Identidade

Prontuário: \_\_\_\_\_ Protocolo: \_\_\_\_\_

Fone de contato: (91) 4009-2273

Ambulatório de Doença Hepática da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará  
Hospital Universitário João de Barros Barreto/UFPA.

