

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Andréa do Livramento

**AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA IMUNOLÓGICA PARA O VÍRUS
DA HEPATITE B EM INDIVÍDUOS VACINADOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia. Área de concentração: Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Celso Spada.
Co-orientador: Prof. Dr. Caio Mauricio Mendes de Cordova.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Livramento, Andréa do
Avaliação da memória imunológica para o vírus da hepatite B
em indivíduos vacinados / Andréa do Livramento ;
orientador, Celso Spada ; coorientador, Caio Mauricio
Mendes de Cordova. - Florianópolis, SC, 2014.
121 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Hepatite B. 3. Vacina. 4. Imunidade. I.
Spada, Celso. II. Cordova, Caio Mauricio Mendes de. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. IV. Título.

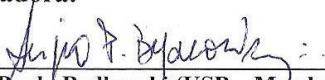
**“Avaliação da memória imunológica para o vírus da
hepatite B em indivíduos vacinados”**

POR

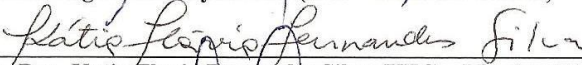
Andréa do Livramento

**Tese julgada e aprovada em sua
forma final pelo(a) Orientador(a) e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:**

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski (USP – Membro Titular)




Profa. Dra. Katia Flavia Fernandes Silva (UFG – Membro Titular)



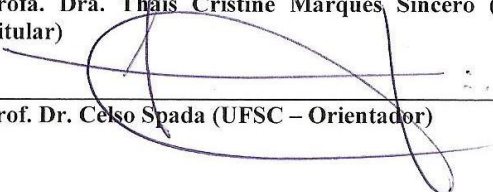
Prof. Dr. Eduardo Mongiullotti Dalmarco (UFSC – Membro Titular)



Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto (UFSC – Membro Titular)



Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)



Prof. Dr. Celso Spada (UFSC – Orientador)

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 18 de julho de 2014.

*Aos meus queridos pais,
pelo amor e apoio em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar e dar forças para que eu concluísse mais esta etapa em minha vida;

Aos meus pais, todo meu amor e minha gratidão por estarem ao meu lado sempre, pelo imenso apoio, incentivo e dedicação;

Ao meu orientador Prof. Dr. Celso Spada, pela oportunidade, motivação e, sobretudo, pela confiança depositada;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Caio Maurício Mendes de Cordova, pela importante contribuição na minha formação, por seus ensinamentos, incentivo e amizade;

À minha tia Neli do Livramento, por me acolher durante todos estes anos. Agradeço imensamente pela ajuda e carinho;

Aos funcionários das Unidades de Saúde, por me receber e me ajudar de forma tão generosa, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho;

À Profa. Dra. Ednéia Casagranda Bueno, pelo valioso auxílio na metodologia dos ensaios de cultura celular;

À Janaína Sampaio, Júnia Schultz e Lais Del Pra Netto Machado, pela amizade e colaboração na realização dos experimentos, e à Valentina, pelo auxílio na coleta das amostras sanguíneas;

À Profa. Dra. Keila Zaniboni Siqueira Batista e ao Prof. Dr. Hercilio Higino da Silva Filho, pelo uso da infra-estrutura do Laboratório de Imunologia;

Às minhas amigas Patricia, Priscila, Bruna, Jaqueline, Cristiane, Rúbia, Joice e Berenice, por me acompanharem e me apoiarem durante esta caminhada, de perto ou de longe;

À Secretaria de Saúde do Estado de Santa Catarina e do Município de Blumenau, pela liberação das doses da vacina para o vírus da hepatite B;

À CAPES e CNPq pela concessão de bolsas e apoio financeiro;

A todos os voluntários, pela disponibilidade e colaboração fundamentais à concretização deste trabalho. Meu sincero agradecimento!

RESUMO

A susceptibilidade à infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) e necessidade de doses de reforço da vacina entre indivíduos que apresentam níveis séricos do anticorpo contra o antígeno de superfície (anti-HBs) inferiores a 10 UI/L após a imunização primária permanecem indefinidas. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a resposta anamnésica ao desafio *in vitro* e *in vivo* com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) em indivíduos vacinados. Foram analisadas as propriedades antigênicas da proteína vacinal HBsAg recombinante em sistema de cultura, e realizada a padronização do ensaio *in vitro* de proliferação de linfócitos frente à estimulação com o antígeno vacinal. Dentro das condições experimentais ideais pré-estabelecidas, foi realizada a análise *in vitro* da resposta anamnésica à exposição ao HBsAg recombinante em amostras de voluntários que receberam o esquema completo (3 doses) de vacinação contra o HBV. A resposta anamnésica ao estímulo *in vivo* foi analisada pela determinação dos títulos séricos de anti-HBs após o reforço da vacina. O antígeno vacinal HBsAg recombinante estimulou a proliferação linfocitária em culturas de células de indivíduos vacinados. Os maiores índices de proliferação foram verificados em suspensões na concentração de 4×10^6 células/mL, estimuladas com 50 ng/mL de HBsAg recombinante durante 3 dias. As respostas humorais ao desafio antigênico *in vitro* não se correlacionaram significativamente com os níveis séricos do anticorpo. Uma resposta *in vitro* de anticorpos de alta avidéz foi verificada em 60,0%, 40,0% e 66,7% dos indivíduos que apresentaram níveis séricos de anti-HBs indetectáveis, <10 UI/L e ≥ 10 UI/L, respectivamente. Na análise *in vivo* da memória imunológica ao HBV, a proporção de indivíduos que apresentaram uma resposta humoral anamnésica à dose unitária de reforço foi de 63,0%. O índice de participantes que apresentaram títulos do anticorpo ≥ 10 UI/L em 4 meses, 1 ano e 2 anos decorridos da administração de uma dose desafio foi de 66,7%, 50,0% e 70,0%, respectivamente. Todos os indivíduos que receberam três doses apresentaram títulos séricos de anti-HBs ≥ 10 UI/L 2 anos após a revacinação, sendo que em 80,0% dos casos foram verificados níveis do anticorpo acima de 100 UI/L. Os resultados observados neste estudo sugerem a persistência da memória imunológica para o HBV em indivíduos vacinados que apresentam títulos séricos de anti-HBs inferiores a 10 UI/L ou indetectáveis.

Palavras-chave: vírus da hepatite B, vacina, antígeno HBsAg recombinante, memória imunológica, resposta anamnésica *in vitro*, resposta anamnésica *in vivo*.

ABSTRACT

The susceptibility to hepatitis B virus (HBV) infection and the need for booster doses among individuals with antibody titers to surface antigen (anti-HBs) less than 10IU/L after primary immunization remain undefined. In this study, the aim was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* anamnestic response to the hepatitis B surface antigen (HBsAg) challenge in vaccinated individuals. The antigenic properties of the recombinant HBsAg protein vaccine were analyzed in a culture system in order to standardize the *in vitro* lymphocyte proliferation assay. Under the optimal experimental conditions, the *in vitro* anamnestic response to the recombinant HBsAg exposure were evaluated in samples from volunteers who had received the standard (three-dose) HBV vaccination schedule. The *in vivo* anamnestic response to the antigen stimulation was assessed by the quantification of serum anti-HBs levels after booster vaccination. The recombinant HBsAg stimulated lymphocyte proliferation in cultured cells from vaccinated individuals. The highest levels of proliferation were observed in suspensions stimulated at a concentration of 4×10^6 cells/mL with 50 ng/mL of recombinant HBsAg for 3 days. The humoral responses to the *in vitro* antigen challenge were not significantly correlated with serum antibody levels. An *in vitro* antibody response of high avidity was found in 60.0%, 40.0% and 66.7% of the individuals who showed undetectable anti-HBs, anti-HBs <10 IU/L and anti-HBs ≥ 10 IU/L, respectively. In the *in vivo* analysis of the immunological memory to HBV, the proportion of individuals who showed an anamnestic humoral response to the single booster dose was 63.0%. The index of participants who showed antibody titers ≥ 10 IU/L 4 months, 1 year and 2 years after the administration of one challenge dose was 66.7%, 50.0% and 70.0%, respectively. All subjects who had received three booster doses showed serum anti-HBs ≥ 10 IU/L 2 years after revaccination, and in 80.0% of cases antibody levels were above 100 IU/L. The results from this study suggest the persistence of immunological memory to HBV in vaccinated individuals who showed serum anti-HBs of less than 10 IU/L or undetectable antibody.

Keywords: hepatitis B virus, vaccine, recombinant HBsAg antigen, immunological memory, *in vitro* anamnestic response, *in vivo* anamnestic response.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação da estrutura genômica do vírus da hepatite B. Fonte: Mahoney (1999).....26
- Figura 2: Reconhecimento do antígeno por linfócitos T CD8+ e T CD4+. Fonte: Adaptado de Zajac e Harrington (2008).....31
- Figura 3: Geração de plasmócitos de longa duração nos centros germinativos. Fonte: Adaptado de Kuehl e Bergsagel (2002).....33
- Figura 4: Análise comparativa entre as respostas proliferativas de linfócitos ao estímulo com diferentes concentrações de PHA (1% - 10% v/v). Suspensões estimuladas na densidade de 4×10^5 células/mL durante 3 dias.....52
- Figura 5: Respostas linfoproliferativas ao estímulo com diferentes concentrações do antígeno HBsAg recombinante em relação ao controle basal. Suspensões estimuladas na densidade de 4×10^5 células/mL com diferentes concentrações de HBsAg durante 3 dias (A), 7 dias (B) e 14 dias (C).....54
- Figura 6: Respostas linfoproliferativas ao estímulo com diferentes concentrações do antígeno HBsAg recombinante em relação ao controle basal. Suspensões estimuladas na densidade de 4×10^6 células/mL com diferentes concentrações de HBsAg durante 3 dias (A), 7 dias (B) e 14 dias (C).....55
- Figura 7: Médias das respostas linfoproliferativas ao estímulo com diferentes concentrações do HBsAg recombinante entre o grupo de indivíduos com níveis detectáveis do anticorpo anti-HBs no soro de acordo a idade. Suspensões na concentração de 4×10^5 células/mL estimuladas durante 3 dias (A), 7 dias (B) e 14 dias (C). Suspensões na concentração de 4×10^6 células/mL estimuladas durante 3 dias (D), 7 dias (E) e 14 dias (F).....58

Figura 8: Comparação entre as respostas linfoproliferativas dos grupos soronegativo e soropositivo para o anticorpo anti-HBs. Suspensões na concentração de 4×10^6 células/mL estimuladas com 50 ng/mL e 1,0 µg/mL de HBsAg recombinante e PHA a 1% durante 3 dias.....59

Figura 9: Respostas linfoproliferativas médias para o estímulo com o HBsAg recombinante e PHA. Suspensões na concentração de 4×10^6 células/mL estimuladas com 50 ng/mL de HBsAg e PHA a 10% durante 3 dias. Dados representados como média e desvio padrão.....60

Figura 10: Resposta de anticorpos de indivíduos vacinados ao desafio *in vitro* com o antígeno HBsAg recombinante, detectado pela metodologia de ELISA no sobrenadante da cultura celular. Títulos de anti-HBs secretados *in vitro* representados graficamente de acordo com os títulos de anti-HBs no soro (A). Comparação dos títulos de anti-HBs secretados *in vitro* entre os três grupos de indivíduos vacinados (B).....62

Figura 11: Resposta de anticorpos de indivíduos vacinados ao desafio *in vitro* com o antígeno HBsAg recombinante, detectado pela metodologia de ELISA no sobrenadante da cultura celular. Resultados dos testes de avides dos anticorpos secretados *in vitro* representados graficamente de acordo com os níveis de anti-HBs no soro (A). Comparação dos resultados dos testes de avides dos anticorpos secretados *in vitro* entre os três grupos de indivíduos vacinados (B).....64

Figura 12: Títulos pós-reforço do anticorpo anti-HBs em relação ao tempo transcorrido entre o estímulo antigênico secundário e análise sorológica representados graficamente de acordo com o número de doses de reforço da vacina.....67

Figura 13: Distribuição da população de acordo com os níveis pós-reforço de anti-HBs. Percentual de indivíduos quanto aos títulos do anticorpo após 4 meses (A) e 1 ano (B) decorridos da dose unitária de revacinação.....69

Figura 14: Distribuição da população de acordo com os níveis pós-reforço de anti-HBs. Percentual de indivíduos quanto aos títulos do anticorpo após 2 anos decorridos da dose unitária de revacinação (A) e do esquema de 3 doses de reforço (B).....70

Figura 15: Títulos pós-reforço de anti-HBs em função do tempo transcorrido entre a vacinação primária e a revacinação. Análise dos níveis séricos do anticorpo após 4 meses (A) e 1 ano (B) decorridos da dose unitária de revacinação.....73

Figura 16: Títulos pós-reforço de anti-HBs em função do tempo transcorrido entre a vacinação primária e a revacinação. Análise dos níveis séricos do anticorpo após 2 anos decorridos da dose unitária de revacinação (A) e do esquema de 3 doses de reforço (B).....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Unidades de Saúde participantes da pesquisa e distribuição dos voluntários.....	40
Tabela 2: Distribuição dos voluntários conforme sexo, idade e títulos séricos de anti-HBs.....	47
Tabela 3: Titulação da fitohemaglutinina.....	51
Tabela 4: Resposta linfoproliferativa ao estímulo com o HBsAg recombinante e PHA no grupo de indivíduos vacinados com níveis detectáveis do anticorpo anti-HBs no soro.....	56
Tabela 5: Resposta humoral ao desafio antigênico <i>in vitro</i> entre os três grupos de indivíduos vacinados.....	65
Tabela 6: Resposta humoral ao desafio antigênico <i>in vivo</i> em indivíduos vacinados com títulos séricos de anti-HBs inferiores a 10 UI/L.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do <i>core</i> do vírus da hepatite B
Anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno <i>e</i> do vírus da hepatite B
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
CD4	<i>Cluster</i> de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster</i> de diferenciação 8
CGs	Centros germinativos
CO ₂	Dióxido de carbono
CXCR5	Receptor de quimiocinas CXCR5
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	Densidade óptica
dsRNA	Ácido ribonucleico de dupla fita
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immunospot assay</i>
ESF	Estratégia Saúde da Família
gp96	Glicoproteína 96
HBcAg	Antígeno do <i>core</i> do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno <i>e</i> vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HLA	Antígeno leucocitário humano
IA	Índice de avidéz
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
L	Litro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
M	Molar
MEM-Eagle	<i>Minimum essential Eagle's medium</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Solução salina
NK	Células <i>natural killer</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia polimerase
PHA	Fitohemaglutinina
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
SPSS	<i>Statistical package for the social sciences</i>
ssRNA	Ácido ribonucleico de fita simples
SUS	Sistema único de saúde
TFH	Células T auxiliares foliculares
TLRs	Receptores do tipo Toll
Th1	Célula T auxiliar do tipo 1
Th2	Célula T auxiliar do tipo 2
TLR	Receptor do tipo Toll
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UI	Unidade internacional
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 VÍRUS DA HEPATITE B.....	25
1.1.1 Vacina recombinante.....	28
1.2 IMUNIDADE.....	29
1.2.1 Resposta imune inata e adaptativa.....	29
1.2.2 Memória imunológica.....	31
1.3 IMUNIDADE PARA O VÍRUS DA HEPATITE B.....	35
1.4 HIPÓTESE DE TRABALHO.....	36
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 ANÁLISE <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DA RESPOSTA HUMORAL AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO SECUNDÁRIO EM INDIVÍDUOS VACINADOS.....	39
3.1.1 População de estudo.....	39
3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	40
3.3 FLUXOGRAMA.....	40
3.3.1 Voluntários sem revacinação contra o HBV.....	41
3.3.2 Voluntários com revacinação contra o HBV.....	42
3.4 REVACINAÇÃO.....	42
3.5 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	43
3.6 TÍTULOS SÉRICOS DO ANTICORPO ANTI-HBS.....	43
3.7 CULTURA CELULAR.....	43
3.7.1 Antígeno vacinal recombinante.....	44
3.7.2 Ensaio de redução do azul de tetrazólio (MTT).....	45
3.7.2.1 Análise dos resultados.....	45

3.8 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS FRENTE À ESTIMULAÇÃO COM O ANTÍGENO VACINAL HBSAG RECOMBINANTE EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS VACINADOS.....	46
3.9 ANÁLISE <i>IN VITRO</i> DA RESPOSTA HUMORAL AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO SECUNDÁRIO EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS VACINADOS.....	48
3.9.1 Estímulo antigênico <i>in vitro</i>.....	48
3.9.2 Índice de avidéz do anticorpo anti-HBs secretado no sobrenadante da cultura celular.....	48
3.9.2.1 Análise dos resultados.....	49
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	49
4 RESULTADOS.....	51
4.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS FRENTE À ESTIMULAÇÃO COM O ANTÍGENO VACINAL HBSAG RECOMBINANTE EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS VACINADOS.....	51
4.2 ANÁLISE <i>IN VITRO</i> DA RESPOSTA HUMORAL AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO SECUNDÁRIO EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS VACINADOS.....	60
4.3 ANÁLISE <i>IN VIVO</i> DA RESPOSTA HUMORAL AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO SECUNDÁRIO EM INDIVÍDUOS VACINADOS.....	66
5 DISCUSSÃO.....	75
5.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS FRENTE À ESTIMULAÇÃO COM O ANTÍGENO VACINAL HBSAG RECOMBINANTE EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS VACINADOS.....	75
5.2 ANÁLISE <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DA RESPOSTA HUMORAL AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO SECUNDÁRIO EM INDIVÍDUOS VACINADOS.....	76
6 SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	81
7 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	85

APÊNDICE 1 – Resultados dos ensaios de padronização do teste de proliferação de linfócitos frente à estimulação <i>in vitro</i> com o antígeno vacinal HBsAg recombinante – valores de absorbância do teste e controle basal.....	103
APÊNDICE 2 – Resultados dos ensaios de padronização do teste de proliferação de linfócitos frente à estimulação <i>in vitro</i> com o antígeno vacinal HBsAg recombinante – respostas linfoproliferativas ao estímulo com diferentes concentrações de HBsAg e PHA.....	109
APÊNDICE 3 – Artigo publicado 1.....	117
APÊNDICE 4 – Artigo publicado 2.....	119
ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.....	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS DA HEPATITE B

A hepatite B, doença infecciosa causada pelo HBV (vírus da hepatite B), representa um problema global de saúde pública. Cerca de 600.000 pessoas morrem anualmente devido às conseqüências das formas aguda e crônica da doença. O risco de morte por complicações relacionadas aumenta entre os portadores crônicos do vírus, estimados em mais de 240 milhões em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013).

A transmissão do HBV ocorre através do contato com sangue ou fluidos corporais infectados. O vírus é transmitido por via perinatal, através da transfusão de sangue ou hemoderivados, pelo contato sexual, uso de drogas injetáveis e exposição percutânea ou parenteral à materiais contaminados, com elevado risco de infecção ocupacional entre profissionais de saúde (NEAIGUS et al., 2007; DEUFFIC-BURBAN et al., 2011; BURNETT et al., 2011; GORGOS 2013; UMAR et al., 2013).

O HBV é um vírus de cadeia dupla e DNA circular pertencente à família *Hepadnaviridae* (BILL e SUMMERS, 2004). As três proteínas do envelope viral são codificadas por uma única fase de leitura aberta do código genético. Esta organização define os três domínios proteicos (pré-S1, pré-S2 e S) (POISSON, 1997). O antígeno de superfície do vírus (HBsAg) é codificado pelo gene S, e a proteína do *core* (HBcAg) e o antígeno *e* (HBeAg) pelo gene C. Dois genes da região pré-S (pré-S1 e pré-S2) codificam o sítio de ligação ao receptor da célula hospedeira. O genoma do HBV é composto ainda pelo gene P, que codifica a DNA polimerase, e pelo gene X (Figura 1), que codifica uma proteína ativadora associada ao desenvolvimento do câncer hepático através da integração do DNA viral ao cromossomo do hospedeiro, que pode ocorrer durante a infecção aguda ou crônica (GITLIN, 1997; BILL e SUMMERS, 2004).

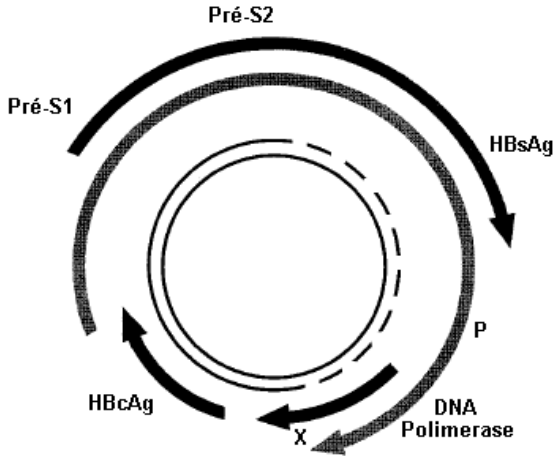


Figura 1: Representação da estrutura genômica do vírus da hepatite B.
Fonte: Mahoney (1999).

O HBsAg é um antígeno caracterizado pelo determinante *a* e por quatro subtipos de determinantes específicos, *d*, *y*, *w*, *r*. Estas variações antigênicas estabeleceram uma divisão inicial em quatro grupos principais, *adw*, *adr*, *ayw* e *ayr*. Com base na divergência da sequência genômica, o HBV é atualmente classificado em dez genótipos (A-J). Os genótipos do HBV apresentam características distintas de distribuição nas diferentes regiões do mundo, e estão relacionados com a progressão da doença e resultado do tratamento. No entanto, os anticorpos formados contra o determinante antigênico *a*, epítipo imunodominante comum a todos os subtipos ou genótipos do HBV, fornece proteção cruzada contra a infecção por todos os grupos do vírus (MICHEL e TIOLLAIS; 2010; MILOSEVIC et al., 2013).

Os métodos diagnósticos, perspectivas de prevenção e monitoramento da terapia foram revolucionados com o isolamento do antígeno HBsAg. A partir da purificação da proteína foram estabelecidos marcadores de infecção e imunidade, além da metodologia para a detecção do HBV DNA e determinação da carga viral em amostras clínicas através da reação em cadeia polimerase (PCR) (MENG et al., 2009; DUDDEMPUDI e BERNSTEIN, 2014).

Nas células infectadas pelo HBV, o HBsAg é produzido em excesso e secretado no sangue, sendo o primeiro marcador da infecção. O antígeno é também utilizado na produção de vacinas contra a doença,

e a presença de anticorpos específicos (anti-HBs) é um indicador de infecção passada ou desenvolvimento da resposta imunológica à vacinação (MAHONEY, 1999; KRAJDEN et al., 2005).

O HBeAg, marcador de replicação viral, é secretado precocemente durante o ciclo de replicação do HBV (LANG et al., 2011). O anticorpo para o antígeno (anti-HBe) é um indicador importante no monitoramento de pacientes infectados e da terapia medicamentosa (LOK e McMAHON, 2007). No entanto, devido à frequência de mutantes do HBeAg resultante de alterações na região promotora do *core* ou pré-*core*, a soroconversão não pode ser utilizada como único parâmetro na avaliação dos níveis de replicação, da eliminação do vírus ou infectividade, sendo necessária a quantificação do HBV DNA (DANCYGIER, 2010).

Embora o HBcAg não seja detectado no soro durante a infecção aguda ou crônica, o desenvolvimento de anticorpos contra o antígeno do *core* viral (anti-HBc) pode ser verificado na fase inicial da infecção, persistindo por longos períodos após a resolução do processo (WIDJAJA et al., 1996).

A infecção crônica pelo HBV é determinada pela persistência do antígeno HBsAg no soro por mais de seis meses. No entanto, é importante ressaltar que, em alguns casos, o *clearance* espontâneo do HBsAg pode se estender por períodos superiores. Contudo, na resolução de processos agudos a negatização do antígeno viral ocorre em um intervalo máximo de um ano após a infecção (LOK e McMAHON, 2001).

Entre as complicações relacionadas à infecção crônica pelo HBV está o aumento do risco de desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) (YANG et al, 2011; PENG et al., 2012). O risco de progressão parece ser maior em indivíduos que apresentem persistência do HBeAg ou positividade para o HBV DNA, sugestivos de altos níveis de replicação viral (IELUZZI et al., 2014), ou em pacientes que tiveram uma reativação da replicação do vírus após a soroconversão do HBeAg (DUDDEMPUDI e BERNSTEIN, 2014).

A vacinação é a principal forma de prevenção da transmissão do HBV. No Brasil, a vacina contra a hepatite B é disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para recém-nascidos, crianças e jovens até 21 anos de idade, profissionais da saúde, indivíduos imunocomprometidos e pessoas pertencentes a grupos de risco. Para recém-nascidos, recomenda-se a administração de uma dose nas primeiras 12 horas após o parto, seguida de duas ou três doses

adicionais da vacina monovalente ou combinada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012)

1.1.1 Vacina recombinante

A partícula completa do HBV (partícula de Dane), isolada primariamente do plasma humano, mede 43 nm e é formada por uma molécula circular de DNA de 2×10^6 daltons. Diferentes fragmentos virais foram purificadas do plasma de indivíduos infectados, incluindo a fração não infecciosa de 22 nm composta essencialmente pelo HBsAg. Esta partícula foi inicialmente utilizada no desenvolvimento de vacinas contra a doença (HITZEMAN et al., 1983).

No entanto, o avanço da engenharia genética e síntese de proteínas em sistemas heterólogos permitiu o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a hepatite B capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (MURRAY et al., 1989), a partir do antígeno expresso em espécies como *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula polymorpha* (MIYANOHARA et al., 1983; EMINI et al., 1986; YAMAGUCHI et al., 1998; BIAN et al., 2010). Neste processo, a fração genômica do HBV que codifica o HBsAg é incorporada em células hospedeiras através de um vetor de clonagem específico, sob o controle de um promotor constitutivo. Após o período de crescimento adequado, as células hospedeiras são rompidas e o HBsAg é purificado (EMINI et al., 1986). O produto genético da técnica de recombinação apresenta similaridade com os fragmentos virais purificados do plasma de indivíduos infectados (MIYANOHARA et al., 1983), embora existam diferenças nas cadeias polipeptídicas da estrutura original e do antígeno recombinante (YAMAGUCHI et al., 1998).

O aperfeiçoamento da tecnologia com base nas células de *Hansenula polymorpha* aponta para os diversos benefícios que a aplicação biotecnológica desta levedura pode trazer nos processos de desenvolvimento de vacinas recombinantes. Os novos subsídios metodológicos incluem promotores e locais de integração (GELLISSSEN e VEENHUIS, 2001). Entre as vantagens da utilização desta levedura na produção de vacinas contra a hepatite B destacam-se o aumento na atividade imune de linfócitos T auxiliares (Th1 e Th2) e nas respostas de anticorpos (BIAN et al., 2010). Além disso, a codificação de proteínas imunomoduladoras, como a gp96, age como potente adjuvante no estímulo da resposta de linfócitos T citotóxicos através da capacidade de ligação a peptídeos específicos do HBV e apresentação cruzada do antígeno (LI et al., 2011).

Em uma avaliação conduzida por Li e colaboradores (2013), o regime de imunização contra o HBV constituído de duas doses da vacina produzida em células de *Hansenula polymorpha* estimulou respostas imunológicas semelhantes às verificadas após três doses da formulação contendo o antígeno expresso em leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* (LI et al., 2013). Estudos comprovam também a imunogenicidade clínica e a segurança da vacina produzida a partir de leveduras de *Hansenula polymorpha* em recém-nascidos, adolescentes e adultos (LUNA et al., 2009; TREGNAGHI et al., 2010; MORAES et al., 2010).

1.2 IMUNIDADE

1.2.1 Resposta imune inata e adaptativa

O sistema imune inato, a primeira linha de defesa do hospedeiro, é mediado por componentes físicos, como os epitélios, por uma cascata de proteínas constitutivas (sistema complemento e outros mediadores inflamatórios) e por respostas celulares que envolvem fagócitos (monócitos, macrófagos, neutrófilos) e células *natural killer* (NK) (NETEA et al., 2011; ABBAS et al., 2012). O desenvolvimento da memória imunológica envolve a imunidade adaptativa, caracterizada pela especificidade ao antígeno como resultado do processo de seleção clonal de linfócitos através de um mecanismo conhecido como rearranjo da informação genética (AKIRA et al., 2006).

A detecção de agentes virais pelo sistema imune inato ocorre pela interação com uma classe de moléculas conhecidas como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). O material genético viral é composto de DNA ou RNA codificando os componentes estruturais, enzimas de síntese e de replicação. Vários componentes estruturais, incluindo o DNA viral, o RNA de dupla fita (dsRNA), o RNA de fita simples (ssRNA) e glicoproteínas de superfície são reconhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores do tipo Toll (TLRs) ou outros PRRs (BOEHME e COMPTON, 2004; AKIRA et al, 2006).

Os TLRs são uma classe de PRRs que detectam PAMPs a partir de uma ampla gama de patógenos (IWASAKI, 2012). São expressos principalmente por células chave do sistema imunológico inato: macrófagos e células dendríticas. Entre os membros do conjunto de TLRs, o reconhecimento de nucleotídeos virais envolve os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9. Os receptores TLR3, TLR7 e TLR9 são

expressos por células dendríticas convencionais, sendo os TLRs 7 e 9 expressos também por células dendríticas plasmocitóides, que apresentam uma via de sinalização especializada para a produção de grandes quantidades de interferon (IFN) tipo I (STETSON e MEDZHITOV, 2006; XAGORARI e CHLICHLIA, 2008). O TLR8 é expresso por células dendríticas mielóides e monócitos/macrófagos. A ativação do TLR8 resulta na indução de citocinas inflamatórias, tais como IL-12 e TNF- α (CERVANTES et al., 2012).

Entre as citocinas e quimiocinas produzidas por diversos tipos celulares nas infecções virais, os IFNs representam a principal família de proteínas envolvidas na resposta imune do hospedeiro (KOYAMA et al., 2008). Os IFNs são comumente agrupados em duas classes: IFNs tipo I (IFN- α , IFN- β e IFN- ω), envolvidos na resposta antiviral, e IFN tipo II (IFN- γ). O IFN- α e IFN- β são componentes da resposta imune inata rapidamente secretados durante infecções virais, fornecendo o sinal para a ativação da resposta imune adaptativa (SAMUEL 2001; LE BON e TOUGH, 2002)

A indução do sistema inato é fundamental para o estabelecimento de respostas imunes adaptativas (AOSHI et al., 2011). As células T são ativadas pela interação de seus receptores com peptídeos antigênicos complexados com as moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade). A detecção do antígeno por linfócitos T ocorre pelo reconhecimento de peptídeos ligados à fenda da molécula de MHC. A face distal da membrana do complexo peptídeo-MHC, que é apresentada à célula T, é constituída por uma superfície plana formada, principalmente, por alfa hélices do MHC ao redor do peptídeo central (GOLDRATH e BEVAN, 1999).

As proteínas do MHC de classe I, expressas na superfície de células nucleadas, são codificadas pelos genes HLA-A, HLA-B e HLA-C, e estão associadas à β_2 -microglobulina (Figura 2). As moléculas do MHC de classe I estão envolvidas na apresentação de antígenos às células T citotóxicas. Três isotipos diferentes (HLA-DR, HLA-DQ e HLA -DP) codificam as moléculas MHC de classe II, expressas em linfócitos B e macrófagos (MEDEIROS et al., 1993; BAUDEAU et al., 1994; VAN LITH et al., 2010). As proteínas MHC de classe II estão ligadas a apresentação de antígenos às células T auxiliares e são induzíveis pelo estímulo da resposta inata, como a ativação dos TLRs. A imunidade adaptativa humoral é mediada por anticorpos produzidos por plasmócitos que se desenvolvem a partir de células B sob o estímulo de linfócitos T e de outras células, como as células dendríticas (BONILLA e OETTGEN, 2010).

Nas respostas humorais os linfócitos B ativados passam a secretar anticorpos, proteínas denominadas imunoglobulinas (Igs). Os anticorpos circulam na corrente sanguínea e permeiam outros fluidos corporais, ligando-se ao antígeno específico que desencadeou sua produção (ALBERTS et al., 2002). Nas respostas humorais dependentes de linfócitos T, a secreção de anticorpos direcionados a um agente infeccioso requer a indução de células T auxiliares através da ativação de células T CD4+ específicas para peptídeos do patógeno. As respostas de anticorpos para antígenos T-dependentes ocorrem quando interações cognatas (populações de células T e B que reconhecem o mesmo determinante antigênico) são estabelecidas. O auxílio cognato é comumente utilizado no desenvolvimento de vacinas como estratégia para potencializar a resposta imune e induzir uma memória duradoura (JANEWAY et al., 2001; MORSE et al., 2012; APOSTOLICO, 2013).

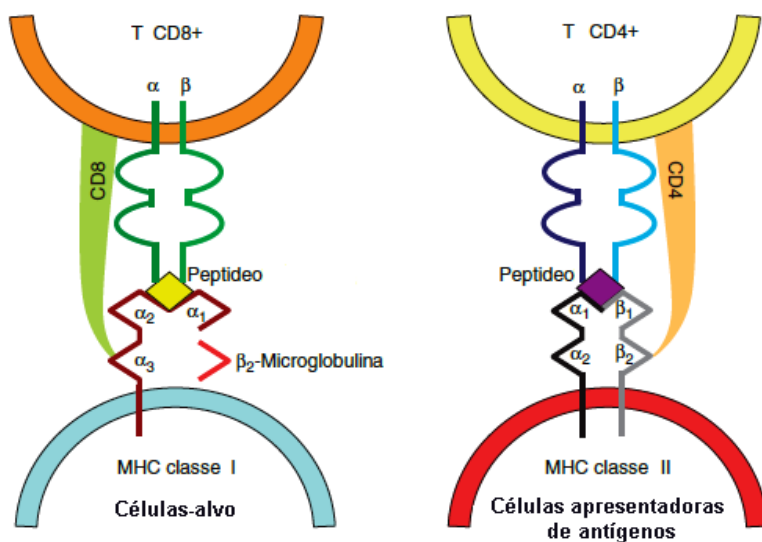


Figura 2: Reconhecimento do antígeno por linfócitos T CD8+ e T CD4+.

Fonte: Adaptado de Zajac e Harrington (2008).

1.2.2 Memória imunológica

As respostas imunes humorais secundárias são induzidas rapidamente, ativam a secreção de anticorpos de maior afinidade e são constituídas predominantemente por anticorpos do tipo IgG. A resposta acelerada é o resultado da frequência de células B antígeno-específicas e de células T auxiliares CD4+. Em geral, antígenos T-independentes induzem respostas imunológicas de memória de curta duração (AHMED e GRAY, 1996).

A resposta imune primária gera uma população de plasmócitos pré-centro germinativo, que são tipicamente de vida curta e secretam anticorpos do tipo IgM, podendo produzir também outros isotipos de Igs. Estas células são encontradas principalmente na borda entre a zona das células T/B da polpa vermelha do baço, ou nos cordões medulares dos linfonodos. Durante uma resposta primária, os anticorpos de baixa afinidade secretados por plasmócitos de vida curta representam a linha de defesa inicial contra o agente imunogênico, enquanto células B secretoras de anticorpos de alta avidéz (plasmócitos de longa duração) são geradas no processo de maturação de afinidade nos centros germinativos (Figura 3) (KUEHL e BERGSAGEL, 2002; WOLS, 2005).

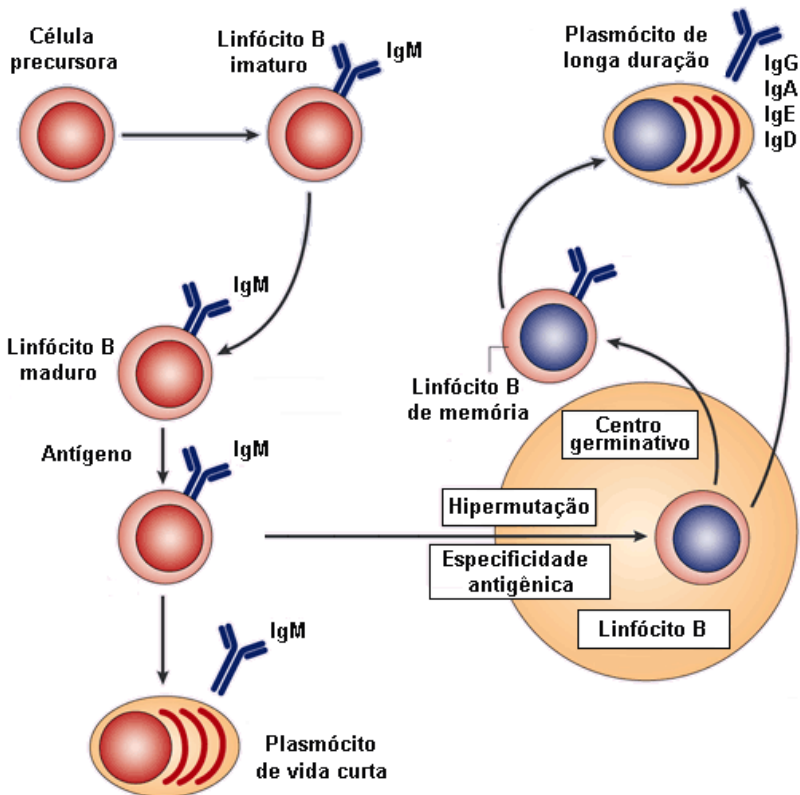


Figura 3: Geração de plasmócitos de longa duração nos centros germinativos.

Fonte: Adaptado de Kuehl e Bergsagel (2002).

Centros germinativos são estruturas microanatômicas que se desenvolvem em órgãos linfóides secundários em resposta ao estímulo antigênico, sendo o sítio de mutação somática e mudança de classe de imunoglobulinas por recombinação. Suas características histológicas sugerem uma alta taxa de divisão celular, elemento essencial para o desenvolvimento e seleção de linfócitos B que expressam Igs de alta afinidade (KLEIN e DALLA-FAVERA, 2008; VICTORIA et al., 2012). A migração de células B ativadas aos microambientes distintos que

favorecem sua diferenciação em plasmócitos de longa duração é mediada pela expressão de receptores quimiotáticos. Nestes locais, o mecanismo de mutação e seleção clonal resulta na geração de linfócitos B capazes de secretar anticorpos com alta afinidade de ligação ao antígeno. Este processo está associado à quebra das cadeias de DNA e troca de nucleotídeos nas regiões variáveis das imunoglobulinas (BELTMAN et al., 2011; GATTO e BRINK, 2010).

Estas reações ocorrem em locais morfologicamente distintos, denominados zona escura e zona clara, embora existam visões conflitantes na literatura sobre a acepção funcional destas regiões (BELTMAN et al., 2011). A zona escura aparece nas proximidades da região rica em células T, e é formada principalmente por centroblastos que se dividem rapidamente. No pólo oposto do centro germinativo, a zona clara é rica em células dendríticas foliculares, centrócitos e macrófagos de corpos tingíveis que fagocitam restos celulares (MCHEYZER-WILLIAMS e AHMED, 1999).

As células dendríticas foliculares se desenvolvem a partir de células da parede vascular, diferindo funcionalmente de células dendríticas convencionais, de origem hematopoiética. A ativação celular por células dendríticas ocorre através da apresentação de antígenos via molécula MHC, ao passo que as células dendríticas foliculares apresentam antígenos não processados na forma de imunocomplexos. Além disso, a atividade de quimiocinas, moléculas de adesão e fatores tróficos permitem que células dendríticas foliculares modulem as respostas das células B e o microambiente local (AGUZZI et al., 2014). As células dendríticas foliculares são importantes para a seleção clonal de células B de alta afinidade geradas nos centros germinativos, bem como para a indução e manutenção da memória imunológica (GATTO e BRINK, 2010). Como os títulos de anticorpos específicos diminuem ao longo dos anos, acredita-se que as células dendríticas foliculares, consideradas “reservatórios de antígenos”, tenham a função de estimular linfócitos B de memória através da liberação do antígeno e, assim, repovoar as populações de plasmócitos (SLIFKA e AHMED, 1998).

Nos centros germinativos, a divisão de células B é restrita à zona escura, enquanto a interação entre linfócitos T e B ocorre na zona clara (KIM et al., 2013). As células T CD4⁺ são fundamentais para o desenvolvimento dos centros germinativos, sendo as células T auxiliares foliculares (TFH) uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ envolvidos na diferenciação dos linfócitos B. A expressão de receptores de quimiocinas, como o CXCR5, permite a migração de TFH para os folículos ricos em linfócitos B, provendo sinais essenciais para o início

das reações nos centros germinativos (YUSUF et al., 2010). A modulação das respostas de linfócitos B por TFH na zona clara facilita a migração celular para a zona escura, que é acompanhada por uma expansão clonal de células B (KIM et al., 2013). Depois deste processo, os linfócitos B deixam os centros germinativos como células de memória (KLEIN et al., 2003).

Os linfócitos B de memória persistem em um número substancial por pelo menos oito semanas após o desafio antigênico, podem expandir-se rapidamente durante as respostas secundárias e diferenciam-se em plasmócitos. Ao fim da reação nos centros germinativos, originam-se os plasmablastos e plasmócitos de longa duração (DILILLO et al., 2008). A re-exposição ao antígeno induz a ativação de células B específicas nas regiões ricas em células T e B do baço ou linfonodos. A expansão clonal de células B é rápida e massiva em regiões ricas em células T, com uma frequência maior de células secretoras de anticorpos em relação à induzida em respostas imunes primárias (MCHEYZER-WILLIAMS e AHMED, 1999).

1.3 IMUNIDADE PARA O VÍRUS DA HEPATITE B

O HBV não é diretamente citopático, e a patogênese associada à infecção pelo vírus envolve uma complexa interação com o sistema imunológico do hospedeiro. A hepatite B é iniciada por uma resposta imune celular específica para o antígeno, e o *clearance* viral depende da destruição de hepatócitos infectados por células T, além da inativação viral intracelular por citocinas inflamatórias (LI et al., 2014a).

Entre portadores crônicos do HBV, observa-se uma diminuição na ativação e indução da proliferação de células T por células dendríticas, e uma frequência diminuída de células T CD4⁺ e T CD8⁺ específicas para o vírus. Na resolução do processo infeccioso, a produção de citocinas antivirais promove a eliminação dos hepatócitos infectados sem lesão tecidual extensiva. No entanto, baixos níveis destas citocinas estão relacionados à incapacidade de controle do quadro infeccioso e consequente evolução para a doença crônica (BERTOLETTI et al., 2009; KOSINSKA et al., 2010). Além disso, mecanismos de escape do vírus contra a resposta imune dificultam o *clearance* do HBV, levando à imunotolerância (LI et al., 2014a).

Embora o papel da imunidade adaptativa na resolução da infecção pelo HBV esteja estabelecido, a contribuição da resposta imune inata permanece controversa. A deficiência de células dendríticas na ativação de linfócitos T, no estímulo da proliferação celular e indução da

imunidade adaptativa resulta em respostas indetectáveis ou fracas de linfócitos Th1 em portadores crônicos do vírus. Acredita-se que um mecanismo de supressão antígeno-induzido esteja relacionado ao comprometimento da função de células dendríticas e ao desenvolvimento da hepatite B crônica (KOSINSKA et al., 2010; LI et al., 2014b).

A imunidade mediada por linfócitos B e produção de anticorpos tem papel fundamental no controle da infecção pelo HBV, sendo a imunoprevenção o principal instrumento na prevenção da disseminação do vírus e desenvolvimento de complicações relacionadas à doença crônica (BERTOLETTI et al., 2009; KOSINSKA et al., 2010; OSTHOFF et al., 2014). Embora a soroproteção tenha sido primariamente definida como o desenvolvimento de títulos de anti-HBs ≥ 10 UI/L, depois da conclusão do esquema de vacinação as concentrações do anticorpo podem diminuir, atingindo níveis inferiores ou indetectáveis (HAMMITT et al., 2007).

No entanto, sugere-se que o declínio do anticorpo não implicaria na perda da proteção e que, em indivíduos vacinados saudáveis, a memória imunológica para o HBsAg poderia persistir mesmo na ausência de níveis detectáveis de anti-HBs. A persistência de células de memória geradas em resposta à série primária de imunização permitiria uma resposta anamnésica à re-exposição ao vírus, resultando na rápida produção de anticorpos para o HBV (ZANETTI et al., 2005; HAMMITT et al., 2007; LEURIDAN e VAN DAMME, 2011). Contudo, a persistência da memória imunológica, susceptibilidade à infecção pelo vírus e necessidade de doses de reforço da vacina permanecem em discussão (LEURIDAN e VAN DAMME, 2011).

1.4 HIPÓTESE DE TRABALHO

A hipótese que orienta esta tese é de que entre indivíduos vacinados com títulos séricos do anticorpo anti-HBs inferiores a 10 UI/L ou indetectáveis, a proteção contra a infecção pelo HBV está relacionada à presença de células de memória geradas na série primária de imunização, as quais seriam capazes de produzir uma resposta anamnésica à re-exposição ao antígeno.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a memória imunológica para o vírus da hepatite B em indivíduos vacinados através da análise da resposta humoral anamnésica *in vitro* e *in vivo* ao desafio com o antígeno de superfície do vírus.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as propriedades antigênicas *in vitro* da proteína vacinal HBsAg recombinante;
- b) Estudar a influência de variáveis como densidade celular, concentração do antígeno e tempo de incubação na proliferação linfocitária;
- c) Comparar as respostas humorais anamnésicas ao estímulo antigênico *in vitro* entre indivíduos vacinados que apresentam títulos de anti-HBs <10 UI/L e ≥ 10 UI/L;
- d) Analisar a resposta humoral anamnésica ao desafio secundário *in vivo* em indivíduos vacinados que apresentam títulos de anti-HBs <10 UI/L;
- e) Fornecer dados que possam contribuir para as decisões relativas à necessidade de doses de reforço da vacina contra a hepatite B.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA RESPOSTA HUMORAL AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO SECUNDÁRIO EM INDIVÍDUOS VACINADOS

3.1.1 População de estudo

A amostra foi constituída de participantes da pesquisa “Prevalência dos marcadores das hepatites B e C em adolescentes de Blumenau”, que apresentaram títulos do anticorpo anti-HBs inferiores a 10 UI/L após a vacinação. Neste estudo, conduzido entre crianças e adolescentes atendidos em Unidades de Saúde do município de Blumenau, Santa Catarina, amostras sorológicas foram coletadas de 393 voluntários com idade entre 10 e 15 anos, no período de outubro de 2007 a setembro de 2008, e testados marcadores de imunidade e infecção pelo vírus da hepatite B. A soropositividade do HBsAg foi de 0,76% e do anti-HBc total foi de 1,02%. Títulos de anti-HBs abaixo de 10 UI/L foram verificados em 50,38% dos participantes, sendo que os voluntários que não apresentaram níveis detectáveis do anticorpo representaram 10,43% da população estudada (LIVRAMENTO, 2009).

Para a avaliação *in vitro* e *in vivo* da memória imunológica para o vírus da hepatite B foram recrutados participantes do estudo que apresentaram títulos de anti-HBs inferiores a 10 UI/L ou indetectáveis, com e sem revacinação contra o HBV. Além disso, para análise e comparações foram selecionados voluntários vacinados com níveis séricos de anti-HBs iguais ou superiores a 10 UI/L. Foram incluídas amostras de enfermeiros, médicos e agentes das Unidades de Saúde participantes da pesquisa (Tabela 1).

Tabela 1: Unidades de Saúde participantes da pesquisa e distribuição dos voluntários.

Unidade de Saúde	Número de participantes	Bairro	Região
ESF Afonso Balsini	10	Velha Pequena	Oeste
ESF Edemar Winckler	4	Asilo	Centro
ESF Hasso Muller	7	Tribess	Leste
ESF Jackson Roberto Carl	14	Itoupava Central	Norte
ESF Orlando Margarida	9	Itoupava Norte	Norte
ESF Walter Reiter	10	Velha	Oeste
ESF Willian Schurmann	4	Itoupava Central	Norte

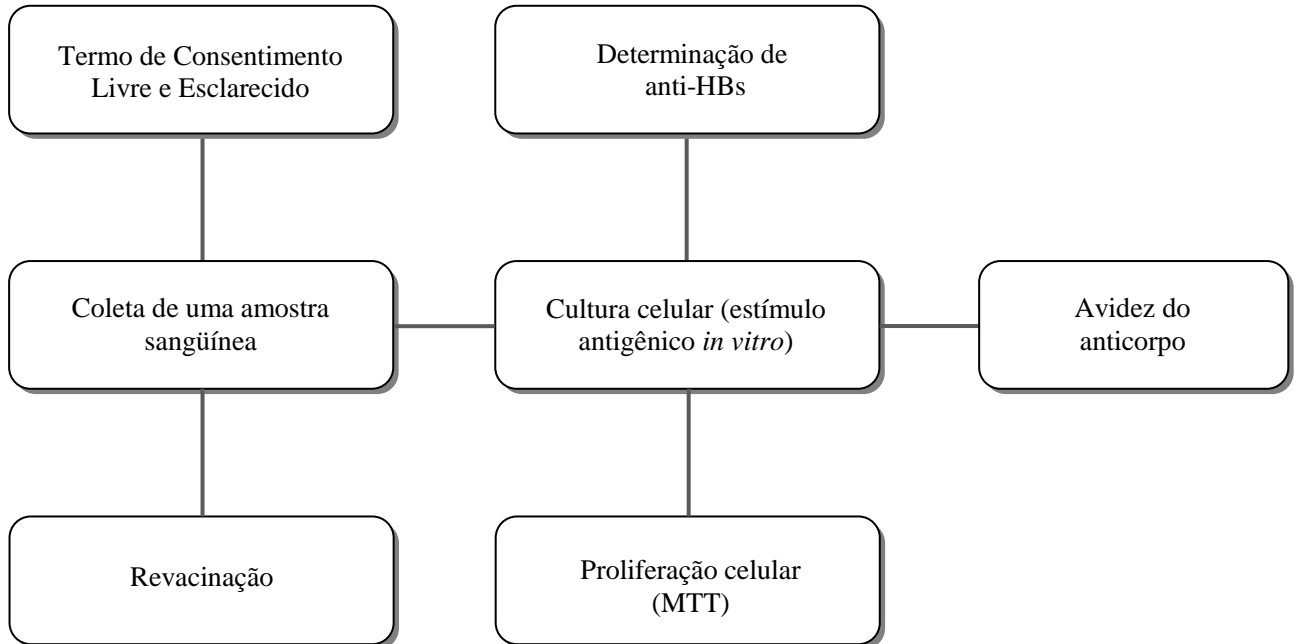
Abreviação: ESF = Estratégia Saúde da Família

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

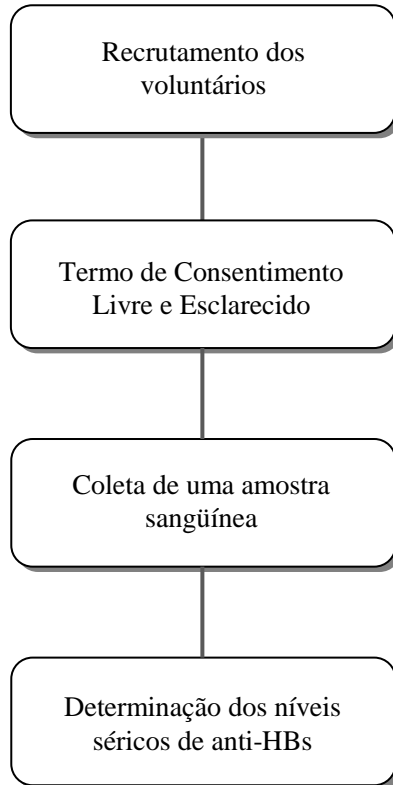
As amostras biológicas foram coletadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por todos os participantes, pais ou representantes legais. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, Protocolo número 1000/2010 (**Anexo 1**).

3.3 FLUXOGRAMA

3.3.1 Voluntários sem revacinação contra o HBV



3.3.2 Voluntários com revacinação contra o HBV



3.4 REVACINAÇÃO

A dose de reforço da vacina contra o vírus da hepatite B foi aplicada com a cooperação do Setor de Imunização da Secretaria Municipal de Saúde de Blumenau. A vacina foi administrada por via intramuscular na região deltóide, conforme recomendação do Ministério da Saúde (2006), por profissionais responsáveis pela imunização nas Unidades de Saúde participantes da pesquisa.

3.5 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Com a autorização da Secretaria Municipal de Saúde de Blumenau foi solicitada, junto à coordenação de cada Unidade de Saúde, a permissão para a realização da pesquisa. Aos participantes, pais ou representantes legais foram entregues a Carta de Esclarecimento e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e acordado o dia para a realização da coleta do material biológico. As amostras sanguíneas foram coletadas por venopunção nas Instituições de Saúde elegidas para a pesquisa. Para avaliação *in vitro* da resposta anamnésica ao desafio antigênico secundário foram coletadas amostras de participantes sem revacinação contra o vírus da hepatite B. Para a análise *in vivo* da memória imunológica ao HBV foram selecionados voluntários revacinados.

3.6 TÍTULOS SÉRICOS DO ANTICORPO ANTI-HBS

Para a determinação dos níveis séricos de anti-HBs foram coletados 3 mL de sangue em tubos à vácuo contendo gel separador BD Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey, Estados Unidos). As amostras foram identificadas no momento da coleta, e após a separação do soro foram armazenadas em freezer a -20 °C.

A análise do marcador foi realizada através de ensaio imunoenzimático (Biokit, Barcelona, Espanha). Foram distribuídos 50 µL de soro nos poços de reação e adicionados 50 µL de conjugado enzimático em todas as cavidades. As placas foram cobertas com o selador e homogeneizadas gentilmente durante 30 segundos. Após incubação por 60 minutos a 37°C, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem, e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz com 100 µL de solução cromogênica (TMB- tetrametilbenzidina) e peróxido de hidrogênio. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de solução de parada. A densidade óptica a 450/630nm foi determinada por leitor de microplacas (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Áustria).

Os voluntários foram classificados como soronegativos (títulos indetectáveis de anti-HBs no soro) de acordo com o limite mínimo de detecção do kit (1,02 UI/L).

3.7 CULTURA CELULAR

Foram coletados 10 mL de sangue venoso dos voluntários em tubos estéreis heparinizados BD Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey, Estados Unidos), e centrifugados a 200 g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Os ensaios de cultura celular foram então realizados em câmara de fluxo laminar.

As células mononucleares do sangue periférico foram isoladas por separação em gradiente de densidade com o reagente Ficoll-Hypaque (Sigma–Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) (BOYUM, 1968). Após a centrifugação, a interface sobrenadante-sedimento (contendo as células mononucleares) foi aspirada e diluída a 1:2 com tampão salina fosfato estéril (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,2-7,4). Esta suspensão foi colocada lentamente sobre a solução Ficoll-Hypaque, formando duas fases distintas. Procedeu-se nova centrifugação (800 g, durante 15 minutos à temperatura ambiente) e a camada de células mononucleares formada sobre o Ficoll-Hypaque foi aspirada. As células foram lavadas com salina 0,9% estéril e centrifugadas a 200 g por 5 minutos, para a retirada do Ficoll-Hypaque. Uma nova lavagem com salina 0,9% estéril seguida de centrifugação a 80 g por 5 minutos foi realizada para a remoção das plaquetas.

O sedimento celular foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura DMEM [Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Grand Island, Nova York, Estados Unidos)], suplementado com 10% de soro bovino fetal, L-glutamina 200 mM, HEPES 10 mM, 110 mg/mL de piruvato de sódio, 50 U/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina. Em seguida, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer, sendo avaliada a viabilidade celular pelo teste de exclusão com azul de Tripán (Gibco, Grand Island, Nova York, Estados Unidos). Somente foram utilizadas suspensões celulares com índice de viabilidade igual ou superior a 90%.

Após o ajuste da concentração celular, as suspensões foram preparadas em microplacas de 96 poços, de fundo chato, estéreis e com tampa (TPP®, Suíça). As placas foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar (REVCO® Elite™ II, Thermo Scientific, Estados Unidos).

3.7.1 Antígeno vacinal recombinante

As células mononucleares foram estimuladas *in vitro* com a vacina recombinante contra a hepatite B VrHB-IB. Esta vacina

monovalente é produzida pelo Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), e é disponibilizada em unidades públicas de saúde do país. A vacina VrHB-IB contém partículas purificadas de HBsAg produzida pela tecnologia do DNA recombinante em células de levedura (*Hansenula polymorpha*), e é formulada com 25 µg/mL de antígeno HBsAg e hidróxido de alumínio como adjuvante (LUNA et al., 2009; MORAES et al., 2010).

3.7.2 Ensaio de redução do azul de tetrazólio (MTT)

A proliferação celular foi determinada pelo ensaio de redução do azul de tetrazólio [MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), conforme proposto por Mosmann (1983).

O teste de redução do MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo determinado por espectrofotometria, sendo a absorbância diretamente proporcional ao número de células vivas. Quando incubado com células viáveis, o MTT, um substrato de cor amarelo-pálida, é convertido em um composto formazan que apresenta coloração azul-escuro. Nesta reação, o MTT sofre redução pela desidrogenase mitocondrial, sendo a quantidade formada do composto formazan proporcional a atividade enzimática e a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Foram adicionados quatro horas antes do término do experimento 10 µL de MTT a 5 mg/mL em NaCl 0,9% em cada poço. Ao final do período de incubação adicionou-se 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 1% para a dissolução dos cristais de formazan. A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro de microplacas a 570 nm (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Áustria) (DENIZOT e LANG, 1986).

3.7.2.1 Análise dos resultados

O índice de proliferação, expresso em porcentagem, foi determinado a partir dos valores de absorbância do controle basal (células mononucleares incubadas em meio de cultura sem estímulo antigênico) e valores de absorbância do teste (MANOSROI et al., 2003; RISCO et al., 2003):

$$\% \text{ proliferação} = \frac{\text{DO teste} - \text{DO controle basal}}{\text{DO controle basal}} \times 100$$

Um índice positivo de proliferação reflete o efeito linfoproliferativo do composto adicionado ao teste enquanto o resultado negativo corresponde ao efeito citotóxico do composto (MANOSROI et al., 2003; RISCO et al., 2003).

3.8 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO *IN VITRO* DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS FRENTE À ESTIMULAÇÃO COM O ANTÍGENO VACINAL HBSAG RECOMBINANTE EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS VACINADOS

Para a titulação da fitohemaglutinina (PHA), lectina presente em *Phaseolus vulgaris* com atividade mitogênica para linfócitos *in vitro* (NOWELL, 1960), células mononucleares foram preparadas em suspensões na concentração de 4×10^5 células/mL (conforme descrito na seção 3.7), e estimuladas com diferentes doses (1% - 10% v/v) de PHA (Gibco, Grand Island, Nova York, Estados Unidos) durante 3 dias.

As respostas proliferativas para o estímulo com diferentes doses do antígeno vacinal HBsAg recombinante foram analisadas em amostras de voluntários saudáveis que receberam o esquema padrão constituído de 3 doses da vacina contra a hepatite B. Dez indivíduos vacinados soropositivos para o anticorpo anti-HBs (6 mulheres e 4 homens com idades entre 14 - 65 anos) e cinco voluntários vacinados soronegativos (3 mulheres e 2 homens com idades entre 14 - 47 anos) foram selecionados para a pesquisa (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos voluntários conforme sexo, idade e títulos séricos de anti-HBs.

Voluntário	Sexo	Idade (anos)	Anti-HBs sérico (UI/L)
Soropositivo			
1	M	15	2,2
2	F	61	6,8
3	F	22	8,8
4	F	65	9,0
5	M	14	10,0
6	F	19	15,2
7	F	27	38,2
8	F	29	51,2
9	M	57	217,1
10	M	22	551,8
Soronegativo			
1	M	14	Indetectável
2	M	15	Indetectável
3	F	16	Indetectável
4	F	18	Indetectável
5	F	47	Indetectável

Abreviação: F = feminino, M = masculino.

Foram preparadas, a partir de cada amostra, suspensões de células mononucleares nas densidades de 4×10^5 células/mL e 4×10^6 células/mL em placas de cultura celular de 96 poços (conforme descrito na seção 3.7). Com base na metodologia proposta por Wang et al. (2004), as suspensões foram estimuladas com diferentes concentrações do HBsAg recombinante (50 ng/mL, 100 ng/mL, 300 ng/mL, 1,0 µg/mL e 1,5 µg/mL), durante 3 dias, 7 dias e 14 dias. Como controle positivo de proliferação de cada amostra, suspensões celulares foram estimuladas com fitohemaglutinina a 1% (v/v). Para cada amostra, culturas de controle basal foram feitas por incubação das células em meio de cultura sem estimulação antigênica. A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (conforme descrito na seção 3.7.2) e os

resultados de proliferação de linfócitos foram apresentados como índices de proliferação.

3.9 ANÁLISE *IN VITRO* DA RESPOSTA HUMORAL AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO SECUNDÁRIO EM AMOSTRAS INDIVÍDUOS VACINADOS

3.9.1 Estímulo antigênico *in vitro*

Células mononucleares foram preparadas em placas de cultura de 96 poços (conforme descrito na seção 3.7), na densidade de 4×10^6 células/mL, e estimuladas com 50 ng/mL da proteína vacinal HBsAg recombinante durante 3 dias. Como controle positivo de proliferação de cada amostra, suspensões celulares foram estimuladas com fitohemaaglutinina a 10% (v/v). Para cada amostra, culturas de controle basal foram feitas por incubação das células em meio de cultura sem estimulação antigênica. A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (conforme descrito na seção 3.7.2) e os resultados de proliferação de linfócitos foram apresentados como índices de proliferação. Amostras do sobrenadante foram também separadas para a quantificação do anticorpo anti-HBs através de ensaio imunoenzimático (Biokit, Barcelona, Espanha) e determinação do índice de avidéz.

3.9.2 Índice de avidéz do anticorpo anti-HBs secretado no sobrenadante da cultura celular

O índice de avidéz do anticorpo anti-HBs secretado em sistema de cultura após 3 dias de estimulação foi avaliado utilizando o kit ELISA [*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Biokit, Barcelona, Espanha)] modificado, ao qual um passo de incubação com uréia foi introduzido.

As placas foram incubadas com 100 μ L de amostras dos sobrenadantes das culturas celulares durante 1 hora a 37 °C e, em seguida, lavadas quatro vezes com solução de lavagem. A fileira A foi incubada com 100 μ L/poço de solução caotrópica [agente de dissociação de uréia 8M em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,05% Tween 20, pH 7,2], e a fileira B foi incubada com 100 μ L/poço de PBS-Tween 20 sem uréia. Após 30 minutos de incubação a 37 °C, as placas foram lavadas com solução de lavagem. Cem microlitros de conjugado enzimático foram adicionados a cada poço. Depois de 30

minutos a 37 °C, as placas foram lavadas e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 100 µL de solução cromogênica (TMB- tetrametilbenzidina) e peróxido de hidrogênio. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de solução de parada. A densidade óptica a 450/630nm foi determinada por leitor de microplacas (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Áustria).

3.9.2.1 Análise dos resultados

Expresso em porcentagem, o índice de avidéz (IA), medida que reflete a força de interação multivalente entre antígeno-anticorpo (HARRIS et al., 2007), foi determinado pela razão entre os valores da densidade óptica das amostras tratadas com uréia e a densidade óptica das amostras não tratadas:

$$IA = \frac{\text{DO das amostras tratadas com uréia}}{\text{DO das amostras não tratadas}} \times 100$$

Nos experimentos, índices inferiores a 30% foram considerados de baixa avidéz, e iguais ou superiores a 30% de alta avidéz (YAMADA et al., 2011; NAMUJUU et al., 2011).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Aplicou-se o teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) e Bonferroni para comparação de dados com distribuição normal. A correlação entre os parâmetros foi analisada através da regressão linear de Pearson. Para dados que não apresentaram normalidade de distribuição, foram aplicados os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. O valor de $p < 0,05$ foi adotado para a significância estatística. Foi utilizado o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0 para o tratamento dos resultados.

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO *IN VITRO* DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS FRENTE À ESTIMULAÇÃO COM O ANTÍGENO VACINAL HBSAG RECOMBINANTE EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS VACINADOS

Os resultados dos ensaios de titulação da PHA estão representados na Tabela 3 e Figura 4.

Tabela 3: Titulação da fitohemaglutinina.

Amostra	Índice de proliferação (%)			
	PHA 1%	PHA 2%	PHA 5%	PHA 10%
Voluntário 1	17,0	25,2	32,8	100,3
Voluntário 2	22,3	35,4	51,4	78,1
Voluntário 3	11,0	18,2	25,7	65,9
Voluntário 4	22,5	29,1	30,2	76,4
Voluntário 5	28,2	40,4	59,1	93,3
Voluntário 6	11,3	27,6	30,4	82,0
Voluntário 7	5,8	8,4	21,8	58,2

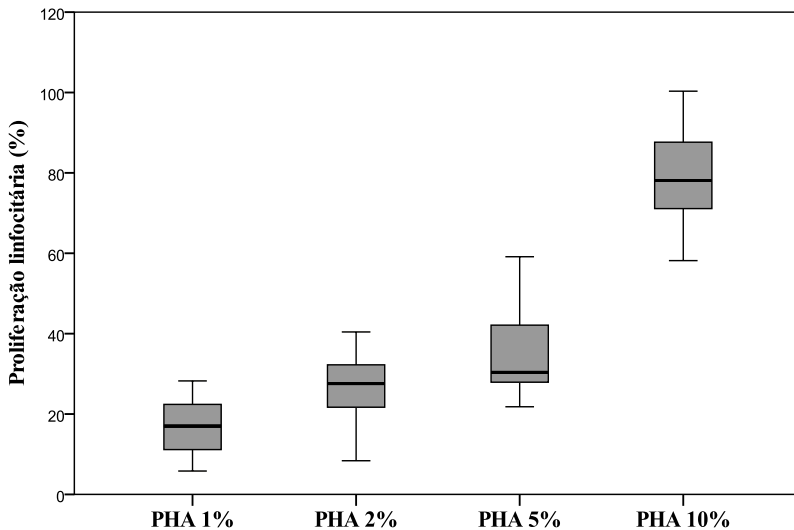


Figura 4: Análise comparativa entre as respostas proliferativas de linfócitos ao estímulo com diferentes concentrações de PHA (1% - 10% v/v). Suspensões estimuladas na densidade de 4×10^5 células/mL durante 3 dias.

Nos testes de padronização do ensaio de proliferação de linfócitos frente à estimulação com o antígeno vacinal recombinante, a PHA foi utilizada na concentração de 1% (v/v).

As respostas linfoproliferativas ao estímulo com diferentes concentrações do HBsAg recombinante entre participantes com títulos detectáveis de anti-HBs no soro foram determinadas a partir dos valores de absorvância do teste e do controle basal, e estão representadas graficamente na Figura 5 e Figura 6.

As respostas linfoproliferativas médias para o HBsAg recombinante observadas em ambas as densidades celulares foram significativamente mais elevadas em 3 dias de cultura ($p < 0,001$), com menor variabilidade entre as amostras. Um efeito anti-proliferativo em relação ao controle basal foi verificado em 14 dias de estímulo com a proteína recombinante. Em 3 dias de cultura, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as respostas ao desafio com as diferentes concentrações do HBsAg recombinante (50 ng/mL a 1,5 µg/mL). No entanto, em 7 dias e 14 dias o índice de proliferação ao estímulo com 50

ng/mL do antígeno recombinante foi significativamente mais elevado (Tabela 4).

Em 3 dias de estimulação, suspensões cultivadas a uma concentração de 4×10^6 células/mL apresentaram maiores médias de respostas proliferativas para o HBsAg recombinante em relação às sementeiras na densidade de 4×10^5 células/mL ($p < 0,001$). No entanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as respostas linfoproliferativas para a PHA (Tabela 4).

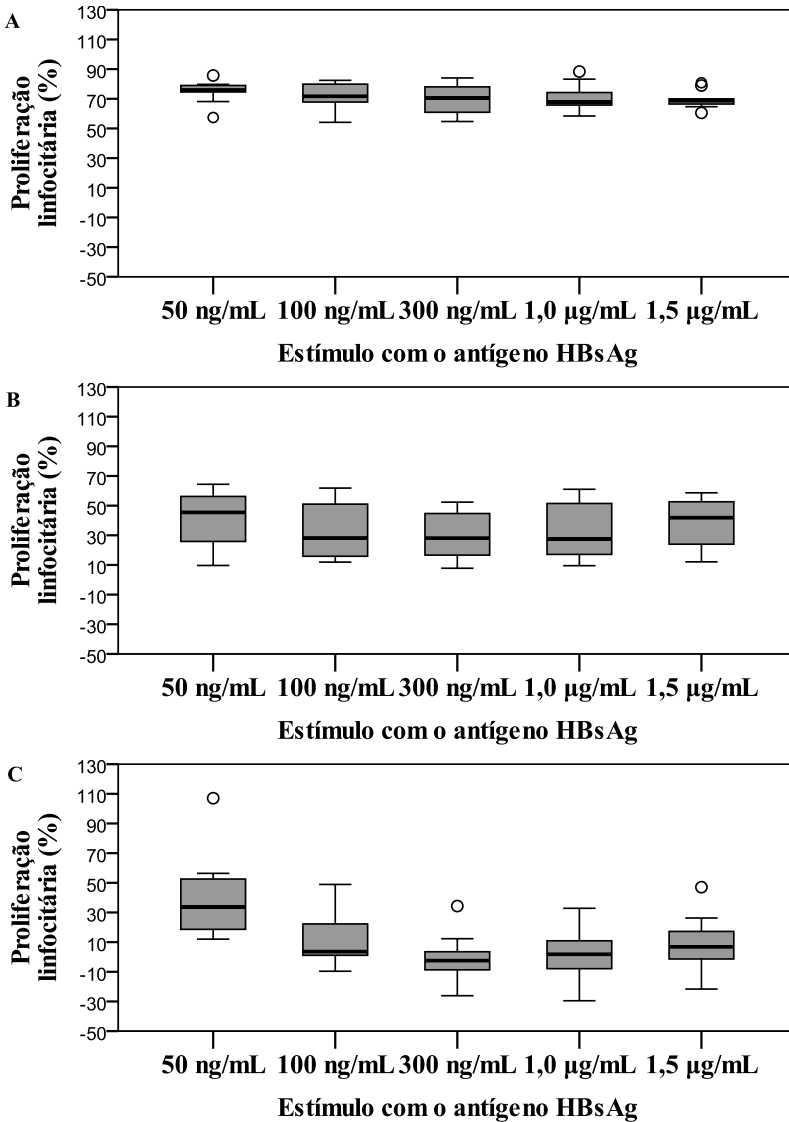


Figura 5: Respostas linfoproliferativas ao estímulo com diferentes concentrações do antígeno HBsAg recombinante em relação ao controle basal. Suspensões estimuladas na densidade de 4×10^5 células/mL com diferentes concentrações de HBsAg durante 3 dias (A), 7 dias (B) e 14 dias (C).

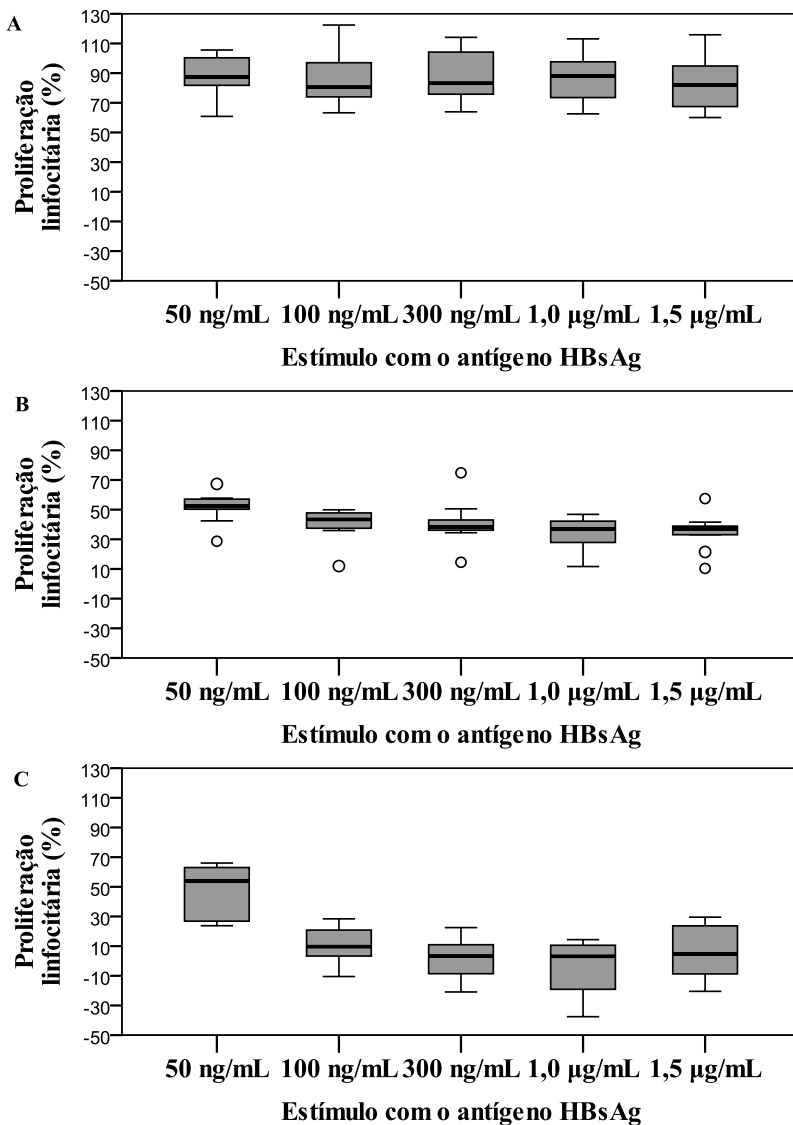


Figura 6: Respostas linfoproliferativas ao estímulo com diferentes concentrações do antígeno HBsAg recombinante em relação ao controle basal. Suspensões estimuladas na densidade de 4×10^6 células/mL com diferentes concentrações de HBsAg durante 3 dias (A), 7 dias (B) e 14 dias (C).

Tabela 4: Resposta linfoproliferativa ao estímulo com o HBsAg recombinante e PHA no grupo de indivíduos vacinados com níveis detectáveis do anticorpo anti-HBs no soro.

HBsAg	% Proliferação de linfócitos (Média – Intervalo de Confiança)											
	4×10 ⁵ células/mL						4×10 ⁶ células/mL					
	3 dias	IC 95%	7 dias	IC 95%	14 dias	IC 95%	3 dias	IC 95%	7 dias	IC 95%	14 dias	IC 95%
50 ng/mL	74,7	69,3–80,1	41,5 ^{a*}	28,5–54,6	41,0 ^{a**}	21,2–60,9	87,6 ^b	77,0–98,1	51,3 ^{a**}	44,0–58,6	47,4 ^{a**}	34,7–60,0
100 ng/mL	71,6	65,2–78,0	32,4	18,9–45,8	9,7	-3,1–22,5	85,5	73,1–97,9	40,2	32,3–48,2	10,9	1,9–19,9
300 ng/mL	69,6	61,9–77,4	29,8	18,9–40,7	-0,3	-11,6–11,0	86,8	74,8–98,9	40,7	29,9–51,5	2,0	-8,0–12,0
1,0 µg/mL	71,1	64,7–77,6	33,4	19,7–47,1	1,7	-10,1–13,6	85,5	74,5–96,5	34,7	27,3–42,0	-4,8	-17,9–8,4
1,5 µg/mL	69,6	65,3–74,0	38,3	26,4–50,2	9,5	-3,9–23,0	82,8	70,1–95,6	35,1	26,3–44,0	5,9	-6,4–18,2
PHA 1%	8,4	5,6–11,2	2,7	-1,4–6,8	-32,2	-43,0–-21,4	16,4	1,9–30,8	10,1	0,01–20,2	-38,7	-43,1–-34,2

^a Comparação entre a resposta linfoproliferativa para o estímulo com diferentes concentrações do HBsAg recombinante:

* $p < 0,01$ ** $p < 0,001$

^b Comparação da resposta linfoproliferativa média para o estímulo com diferentes concentrações do HBsAg recombinante entre ambas as densidades celulares em 3 dias de estimulação: $p < 0,001$

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as respostas linfoproliferativas detectadas em culturas de células de indivíduos com níveis séricos de anti-HBs detectáveis inferiores a 10 UI/L e de voluntários com níveis do anticorpo ≥ 10 UI/L. Além disso, a análise de regressão linear mostrou que não houve uma correlação significativa entre a idade dos participantes e as respostas dos ensaios *in vitro* de proliferação de linfócitos (Figura 7).

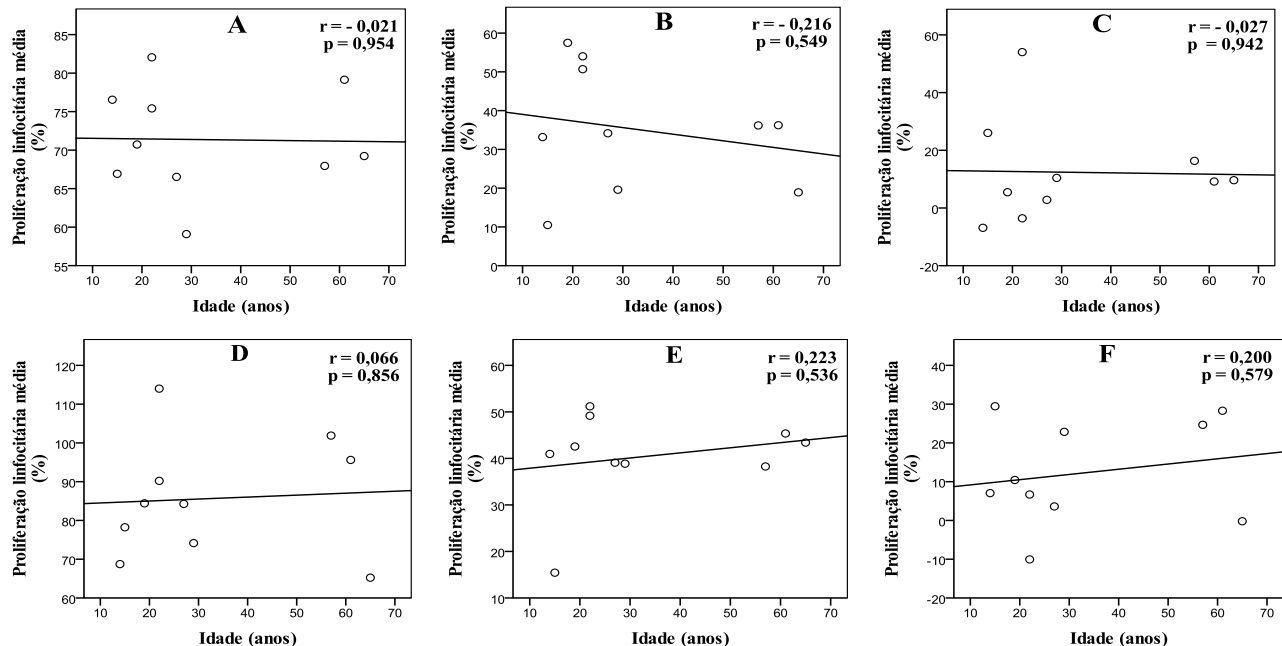


Figura 7: Médias das respostas linfoproliferativas ao estímulo com diferentes concentrações do HBsAg recombinante entre o grupo de indivíduos com níveis detectáveis do anticorpo anti-HBs no soro de acordo a idade. Suspensões na concentração de 4×10^5 células/mL estimuladas durante 3 dias (A), 7 dias (B) e 14 dias (C). Suspensões na concentração de 4×10^6 células/mL estimuladas durante 3 dias (D), 7 dias (E) e 14 dias (F).

Dentro das condições ideais de ensaio pré-estabelecidas, foi realizada a análise da resposta linfoproliferativa à exposição ao HBsAg recombinante em culturas de células de indivíduos vacinados soronegativos para o anticorpo anti-HBs. As suspensões foram estimuladas a uma concentração de 4×10^6 células/mL com 50 ng/mL e 1,0 µg/mL de HBsAg recombinante durante 3 dias. Todos os indivíduos com títulos indetectáveis do anticorpo apresentaram resposta proliferativa ao desafio com o antígeno recombinante. A análise comparativa mostrou que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos soronegativo e soropositivo no que concerne aos índices de proliferação linfocitária a partir do estímulo com o HBsAg recombinante. Além disso, as respostas linfoproliferativas para a PHA foram semelhantes em culturas de células de indivíduos soronegativos e soropositivos (Figura 8).

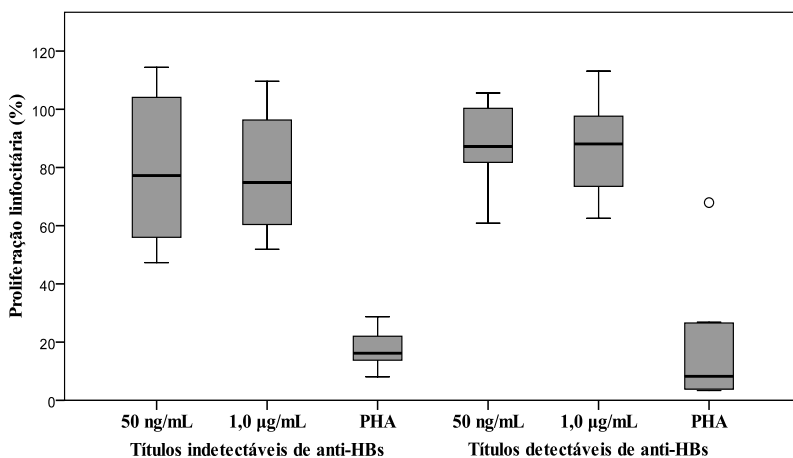


Figura 8: Comparação entre as respostas linfoproliferativas dos grupos soronegativo e soropositivo para o anticorpo anti-HBs. Suspensões na concentração de 4×10^6 células/mL estimuladas com 50 ng/mL e 1,0 µg/mL de HBsAg recombinante e PHA a 1% durante 3 dias.

Na análise *in vitro* da resposta humoral ao estímulo com a proteína vacinal, as suspensões foram preparadas na densidade de 4×10^6 células/mL e estimuladas com 50 ng/mL de HBsAg recombinante durante 3 dias, conforme as condições ideais determinadas nos ensaios de padronização. Além disso, optou-se pelo aumento da concentração da PHA para 10% (v/v).

4.2 ANÁLISE *IN VITRO* DA RESPOSTA HUMORAL AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO SECUNDÁRIO EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS VACINADOS

A avaliação da resposta anamnésica *in vitro* ao desafio antigénico foi realizada entre voluntários que receberam o esquema padrão constituído de 3 doses da vacina contra a hepatite B 13-18 anos antes dos testes, conforme verificado no documento de vacinação. Foram incluídas nas análises amostras de trinta voluntários saudáveis (24 mulheres e 6 homens), com idade entre 13 e 60 anos. Os indivíduos foram classificados de acordo com o estado vacinal contra o HBV: grupo I, níveis indetectáveis de anti-HBs no soro ($n = 10$), grupo II, níveis séricos de anti-HBs detectáveis, porém inferiores a 10 UI/L ($n = 15$) e grupo III, anti-HBs sérico ≥ 10 IU/L ($n = 5$).

A respostas linfoproliferativas médias para o estímulo com 50 ng/mL de HBsAg recombinante e PHA a 10% entre os três grupos estão representadas na Figura 9.

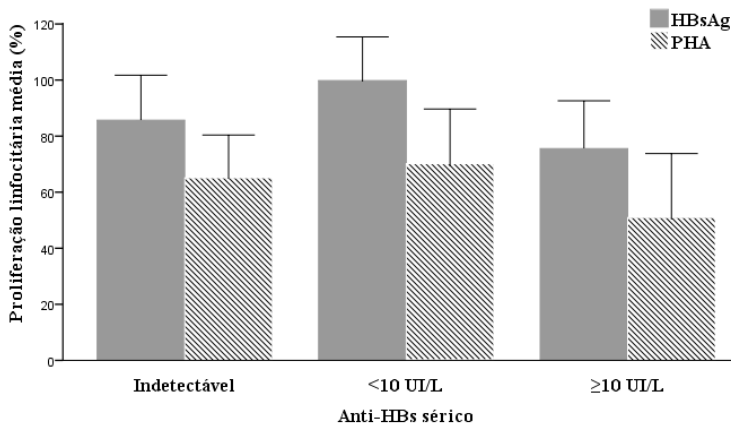


Figura 9: Respostas linfoproliferativas médias para o estímulo com o HBsAg recombinante e PHA. Suspensões na concentração de 4×10^6 células/mL estimuladas com 50 ng/mL de HBsAg e PHA a 10% durante 3 dias. Dados representados como média e desvio padrão.

Níveis detectáveis de anti-HBs foram observados no sobrenadante de culturas de células de 27 voluntários (Figura 10A). Os títulos de anticorpos detectados em culturas de células de participantes do grupo I foram significativamente mais baixos ($p < 0,05$) do que os

verificados entre indivíduos do grupo II. No entanto, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na comparação das concentrações de anti-HBs detectadas em culturas celulares de indivíduos dos grupos I e III, ou na comparação entre indivíduos dos grupos II e III (Figura 10B). Além disso, a análise de regressão linear mostrou que os níveis de anti-HBs secretados em meio de cultura não se correlacionaram significativamente com os títulos séricos do anticorpo ($r = -0,041$ $p = 0,829$).

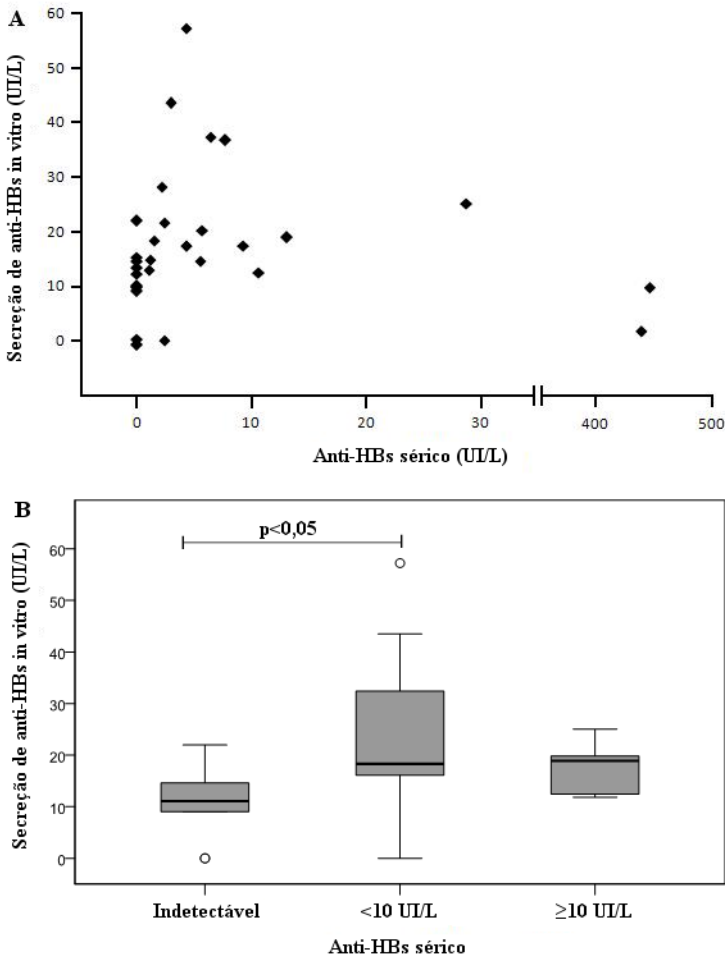


Figura 10: Resposta de anticorpos de indivíduos vacinados ao desafio *in vitro* com o antígeno HBsAg recombinante, detectado pela metodologia de ELISA no sobrenadante da cultura celular. Títulos de anti-HBs secretados *in vitro* representados graficamente de acordo com os títulos de anti-HBs no soro (A). Comparação dos títulos de anti-HBs secretados *in vitro* entre os três grupos de indivíduos vacinados (B).

Os índices de avides de anticorpos secretados em meio de cultura foram variáveis (Figura 11A). No entanto, a análise de variância revelou que a diferença entre os valores dos índices de avides verificados nas amostras dos três grupos de voluntários não foi significativa ($p > 0.05$) (Figura 11B). A proporção de indivíduos dos grupos I, II e III que apresentaram respostas de anticorpos de alta avides ao desafio antigênico *in vitro* foi de 60,0%, 40,0% e 66,7%, respectivamente. Índices de avides semelhantes foram observados em culturas de células de indivíduos do grupo II e do grupo III (médias de $33,2\% \pm 22,7$ e $33,7\% \pm 18,9$ $p = 0,964$, respectivamente) (Tabela 5). Não houve correlação significativa entre os índices de avides de anticorpos secretados em sistema de cultura e os títulos séricos de anti-HBs ($r = -0,177$ $p = 0,377$).

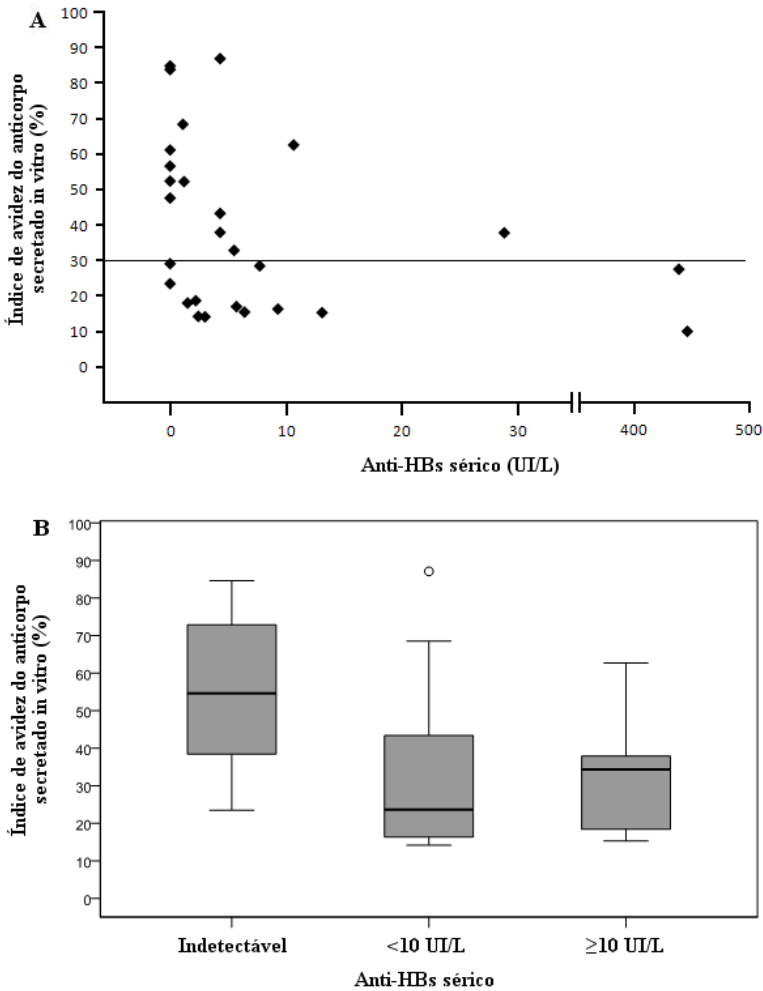


Figura 11: Resposta de anticorpos de indivíduos vacinados ao desafio *in vitro* com o antígeno HBsAg recombinante, detectado pela metodologia de ELISA no sobrenadante da cultura celular. Resultados dos testes de avidéz dos anticorpos secretados *in vitro* representados graficamente de acordo com os níveis de anti-HBs no soro (A). Comparação dos resultados dos testes de avidéz dos anticorpos secretados *in vitro* entre os três grupos de indivíduos vacinados (B).

Tabela 5: Resposta humoral ao desafio antigênico *in vitro* entre os três grupos de indivíduos vacinados.

Anti-HBs sérico (grupo)	Tempo decorrido entre a vacinação primária e a realização dos testes (anos)		Secreção de anti-HBs <i>in vitro</i>	Títulos de anti-HBs secretados <i>in vitro</i> (UI/L)		Índice de avides do anticorpo secretado <i>in vitro</i> (%)		Índice de avides $\geq 30\%$
	Média	IC 95%	n (%)	Média	IC 95%	Média	IC 95%	n (%)
Indetectável	15,7	14,4 – 17,0	8/10 (80,0)	10,6	5,8 – 15,4	55,0	36,3 – 73,7	6/10 (60,0)
<10 UI/L	15,9	14,7 – 17,0	14/15 (93,3)	23,8	15,9 – 31,8	33,2	20,1 – 46,3	6/15 (40,0)
≥ 10 UI/L	16,8	14,6 – 19,0	5/5 (100)	17,6	10,8 – 24,5	33,7	10,2 – 57,2	3/5 (66,7)

Abreviação: IC = intervalo de confiança

4.3 ANÁLISE *IN VIVO* DA RESPOSTA HUMORAL AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO SECUNDÁRIO EM INDIVÍDUOS VACINADOS

A resposta anamnésica ao desafio antigênico *in vivo* foi analisada em 32 voluntários (22 mulheres e 10 homens) com idade entre 13 e 47 anos, que apresentaram níveis séricos do anticorpo anti-HBs inferiores a 10 UI/L após a vacinação primária.

Os indivíduos foram classificados de acordo com o tempo transcorrido entre o reforço da vacina contra a hepatite B e análise sorológica dos níveis de anti-HBs: grupo I, 4 meses (n = 9), grupo II, 1 ano (n = 8) e grupo III, 2 anos (n = 15). O grupo III foi subdividido de acordo com o número de doses de reforço: 1 dose (n = 10) e 3 doses (n = 5). Todos os participantes dos grupos I e II receberam 1 dose de reforço da vacina.

A Figura 12 representa a resposta humoral em função do tempo decorrido entre o reforço e análise sorológica de acordo com o número de doses adicionais à vacinação primária.

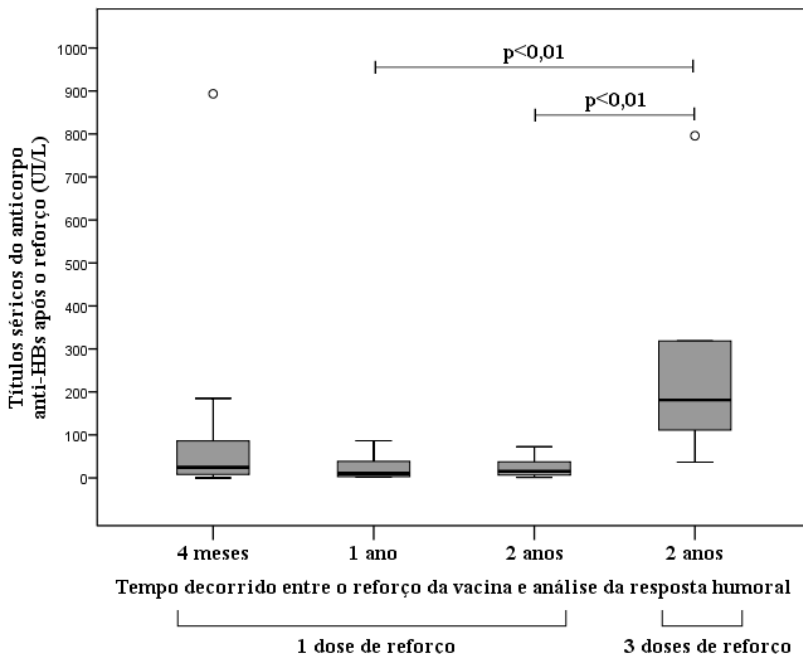


Figura 12: Títulos pós-reforço do anticorpo anti-HBs em relação ao tempo transcorrido entre o estímulo antigênico secundário e análise sorológica representados graficamente de acordo com o número de doses de reforço da vacina.

Não houve diferença estatística entre os títulos de anticorpos pós-reforço apresentados pelos grupos de voluntários que receberam 1 dose de reforço vacinal ($p > 0,05$). Além disso, os títulos de anti-HBs verificados 4 meses após a administração de 1 dose da vacina não diferiram significativamente ($p > 0,05$) daqueles apresentados 2 anos após a série de reforço constituída de 3 doses. Por outro lado, os níveis séricos de anticorpos verificados entre indivíduos que receberam 3 doses de reforço e tiverem amostras coletadas 2 anos após o estímulo secundário foram significativamente mais elevados ($p < 0,01$) do que aqueles verificados 1 e 2 anos após a administração de 1 dose da vacina (Figura 12).

A proporção de indivíduos que apresentaram níveis séricos de anti-HBs iguais ou superiores a 10 UI/L após a administração de 1 dose de reforço da vacina foi de 63,0%. Quando analisados de acordo com

tempo transcorrido entre o estímulo antigênico secundário e análise sorológica, o índice de participantes que apresentaram títulos do anticorpo ≥ 10 UI/L em 4 meses, 1 ano e 2 anos decorridos da administração de 1 dose de reforço foi de 66,7%, 50,0% e 70,0%, respectivamente.

Após 4 meses decorridos da dose unitária de revacinação, títulos de anticorpos superiores a 100 UI/L foram verificados em 22,2% dos indivíduos (Figura 13A). No entanto, não foram verificadas concentrações de anti-HBs superiores a 100 UI/L no período de 1 e 2 anos após o estímulo secundário com 1 dose da vacina (Figura 13B e Figura 14A).

Todos os indivíduos que receberam 3 doses de reforço apresentaram títulos séricos de anti-HBs ≥ 10 UI/L 2 anos após a revacinação, sendo que em 80,0% dos casos foram verificados níveis do anticorpo acima de 100 UI/L (Figura 14B). As respostas humorais ao desafio antigênico *in vivo* apresentadas pelos grupos de voluntários podem ser visualizadas na Tabela 6.

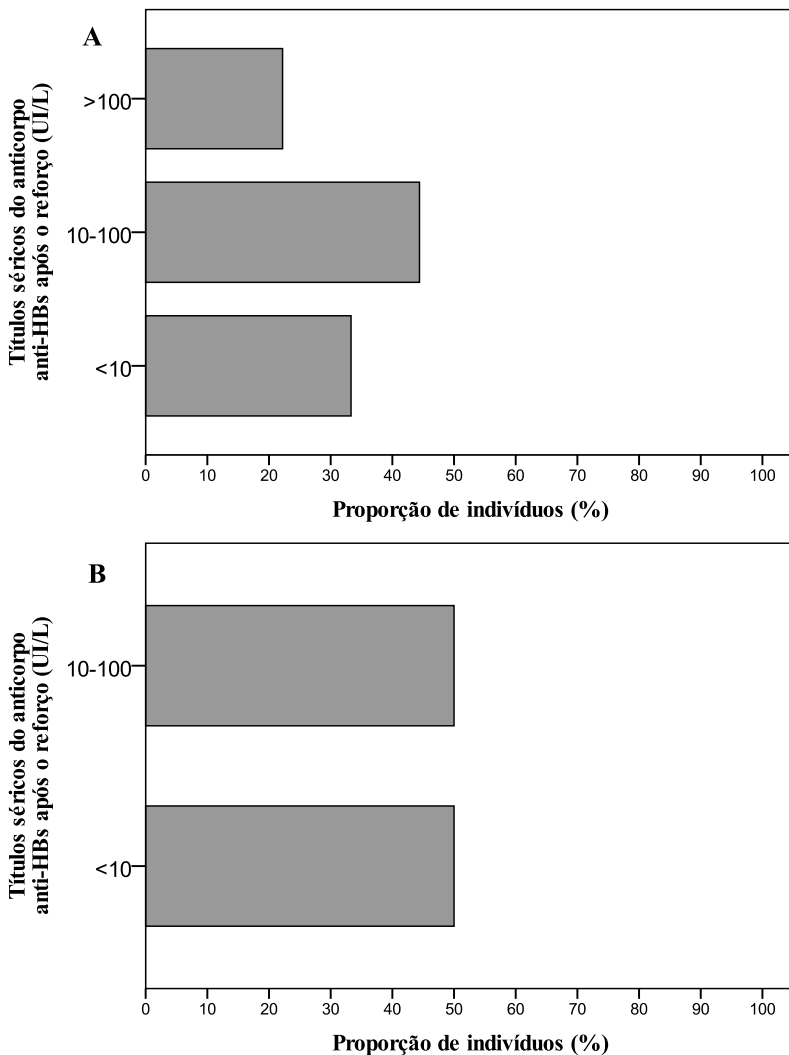


Figura 13: Distribuição da população de acordo com os níveis pós-reforço de anti-HBs. Percentual de indivíduos quanto aos títulos do anticorpo após 4 meses (A) e 1 ano (B) decorridos da dose unitária de revacinação.

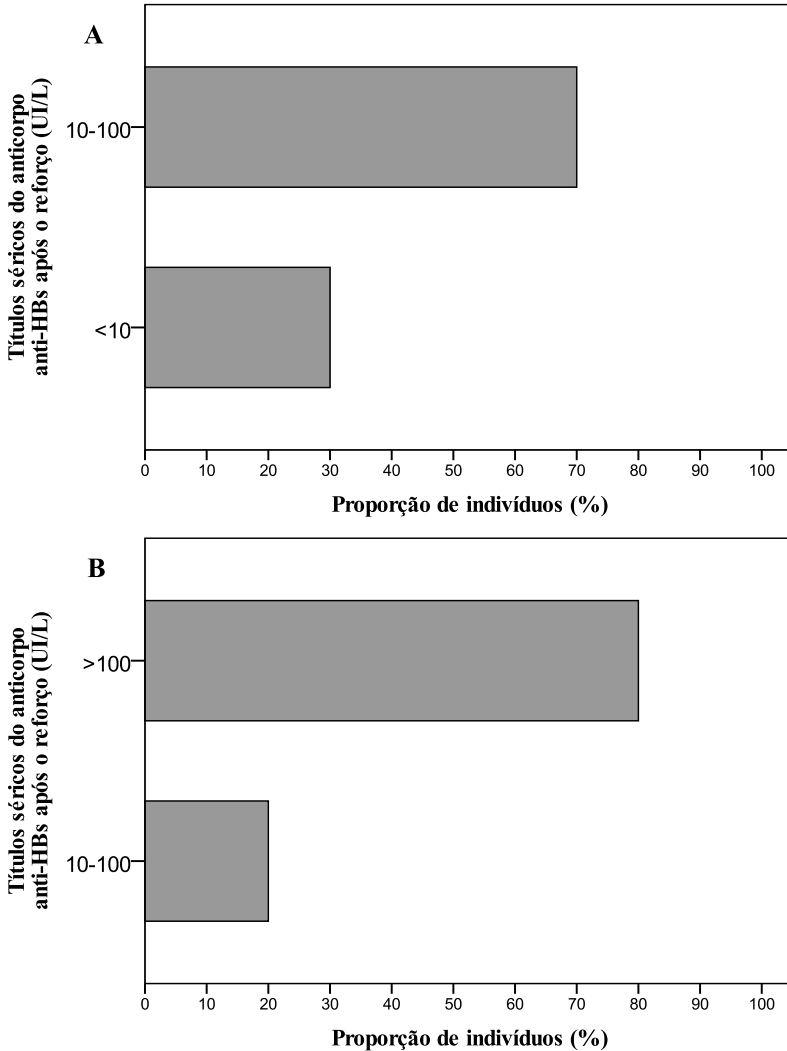


Figura 14: Distribuição da população de acordo com os níveis pós-reforço de anti-HBs. Percentual de indivíduos quanto aos títulos do anticorpo após 2 anos decorridos da dose unitária de revacinação (A) e do esquema de 3 doses de reforço (B).

Tabela 6: Resposta humoral ao desafio antigênico *in vivo* em indivíduos vacinados com títulos séricos de anti-HBs inferiores a 10 UI/L.

Número de doses de reforço da vacina	Tempo transcorrido entre o reforço da vacina e análise sorológica dos níveis de anti-HBs	Títulos de anticorpos pós-reforço (UI/L)*	Títulos de anticorpos pós-reforço ≥ 10 UI/L	Títulos de anticorpos pós-reforço ≥ 100 UI/L
			n (%)	n (%)
1 dose	4 meses	142,1 (\pm 287,9)	6/9 (66,7)	2/9 (22,2)
1 dose	1 ano	24,0 (\pm 29,6)	4/8 (50,0)	0/8 (-)
1 dose	2 anos	25,7 (\pm 25,9)	7/10 (70,0)	0/10 (-)
3 doses	2 anos	288,7 (\pm 301,9)	5/5 (100)	4/5 (80,0)

* Dados apresentados como média e desvio padrão.

As respostas de anticorpos em função do tempo decorrido entre a vacinação primária e o reforço estão representadas graficamente na Figura 15 e na Figura 16. As diferenças entre os níveis pós-reforço de anti-HBs em relação ao tempo transcorrido entre o estímulo antigênico primário e secundário não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$).

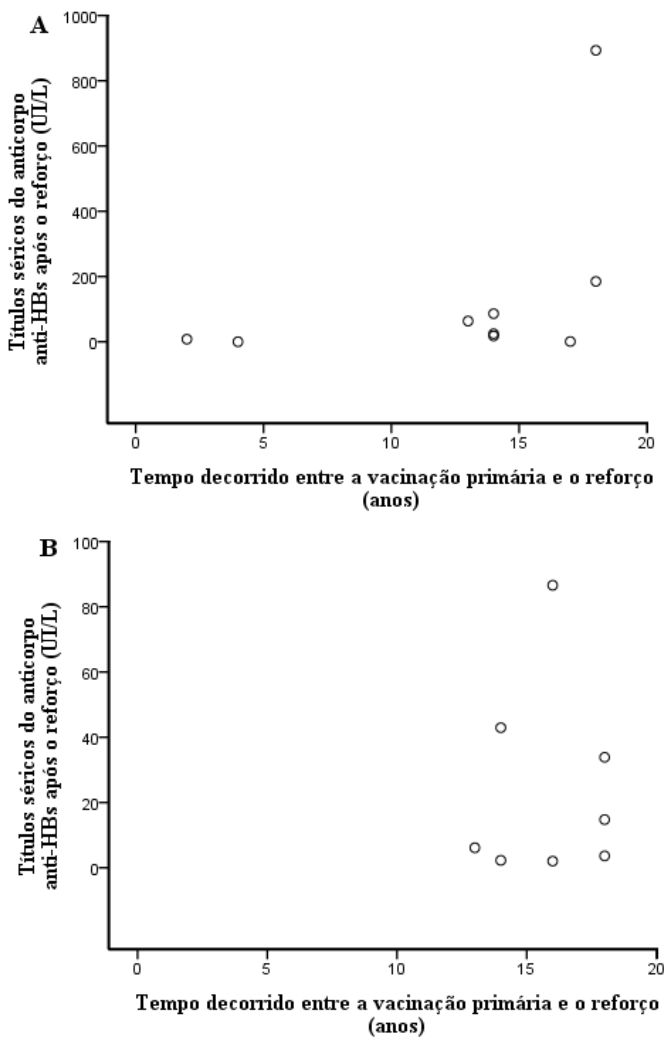


Figura 15: Títulos pós-reforço de anti-HBs em função do tempo transcorrido entre a vacinação primária e a revacinação. Análise dos níveis séricos do anticorpo após 4 meses (A) e 1 ano (B) decorridos da dose unitária de revacinação.

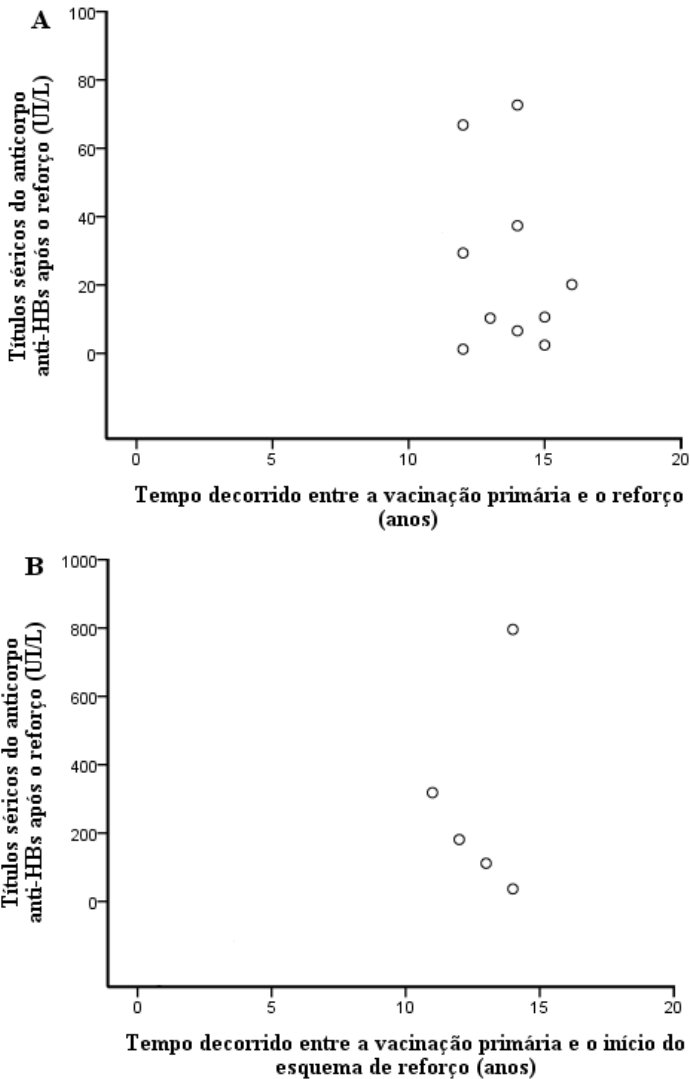


Figura 16: Títulos pós-reforço de anti-HBs em função do tempo transcorrido entre a vacinação primária e a revacinação. Análise dos níveis séricos do anticorpo após 2 anos decorridos da dose unitária de revacinação (A) e do esquema de 3 doses de reforço (B).

5 DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO *IN VITRO* DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS FRENTE À ESTIMULAÇÃO COM O ANTÍGENO VACINAL HBsAg RECOMBINANTE EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS VACINADOS

Vários estudos foram realizados com o intuito de estimular a resposta proliferativa de linfócitos *in vitro* com o antígeno HBsAg (DE GAST et al., 1973; FERNAN et al., 1989; FERRARI et al., 1989; CUPPS et al., 1993; WANG et al., 2004, DESOMBERE et al., 2005, VANDEPAPELIÈRE et al., 2008, CAROLLO et al., 2013). No entanto, apesar da disponibilidade da proteína HBsAg altamente purificada, dos avanços nas técnicas de cultura de linfócitos e do advento e uso generalizado da vacina, o desenvolvimento de um ensaio linfoproliferativo para avaliação da resposta imune ao HBV é um procedimento complexo (LEROUX-ROELS et al., 1994).

Neste trabalho, respostas linfoproliferativas ao estímulo com o antígeno vacinal HBsAg recombinante puderam ser detectadas em sistema de cultura, apesar dos baixos níveis séricos do anticorpo anti-HBs. Estes resultados são consistentes com outros estudos (DE GAST et al., 1973; LEROUX-ROELS et al., 1994; WANG et al., 2004; DESOMBERE et al., 2005; VANDEPAPELIÈRE et al., 2008; NYSTRÖM et al., 2008; BES et al., 2012; CAROLLO et al., 2013).

Os resultados observados no presente estudo demonstraram que as respostas para o antígeno recombinante em ambas as densidades celulares foram maiores em 3 dias, com menor variabilidade entre as amostras. Os índices de proliferação em 7 e 14 dias de estímulo com a proteína recombinante apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa, tendo efeito anti-proliferativo em relação ao controle basal em 14 dias de cultura. Os resultados mostraram também que suspensões na concentração de 4×10^6 células/mL estimuladas durante 3 dias apresentaram as maiores respostas de proliferação para o HBsAg recombinante. Além disso, em 3 dias de cultura não houve diferença nas respostas linfoproliferativas para o desafio com diferentes doses do antígeno viral (50 ng/mL a 1,5 µg/mL). Em 7 e 14 dias, porém, o índice de proliferação para 50 ng/mL de HBsAg recombinante foi significativamente mais elevado.

Em um estudo conduzido por Wang et al. (2004), as condições ideais para a proliferação de linfócitos foram observadas em culturas

estimuladas na concentração de 4×10^5 células/poço, com 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de HBsAg durante 6 dias. Estes resultados corroboram achados anteriores (LEROUX-ROELS et al., 1994). Em outro inquérito, células mononucleares do sangue periférico foram estimuladas na densidade de 2×10^5 células/poço, com 0,1, 1,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de HBsAg durante 4 dias. As respostas proliferativas aumentaram com o aumento da dose do antígeno, de 18,68 para 28,09 e 52,27, respectivamente (VANDEPAPELIÈRE et al., 2008).

Inúmeros fatores podem influenciar os resultados dos ensaios *in vitro* de proliferação de linfócitos como a geometria dos poços, qualidade do meio de cultura e do soro adicionado, preparação do antígeno e seu grau de pureza, técnicas de isolamento de linfócitos e condições de ensaio *in vitro* (HANSON et al., 1984; WANG et al., 2004). Além disso, a fase de diferenciação, resposta aos fatores de crescimento e citocinas, bem como a resposta à sinais de apoptose podem influenciar a sobrevivência dos linfócitos em ensaios de cultura (BELMONTE et al., 2009).

No presente estudo, a análise comparativa da proliferação linfocitária entre culturas estimuladas com o HBsAg e PHA (Figura 9) sugere uma atividade mitogênica do antígeno recombinante. Análises cinéticas anteriores apontam características semelhantes entre o HBsAg e PHA na indução da proliferação e secreção de IFN- γ e IL-2 em culturas celulares de portadores assintomáticos do HBsAg, de doadores imunes e de indivíduos soronegativos para os marcadores de imunidade ou infecção pelo HBV (HELLSTRÖM et al., 1985; SYLVAN e HELLSTRÖM, 1989; SYLVAN e HELLSTRÖM, 1990). Estes dados sugerem uma ativação mitogênica *in vitro* de linfócitos induzida pelo estímulo com o antígeno de superfície do vírus.

Os resultados aqui reportados constituem uma ferramenta importante no desenvolvimento de um sistema adequado para a avaliação da resposta imune ao HBsAg em indivíduos vacinados, e podem contribuir para a determinação da necessidade de doses de reforço da vacina após a imunização primária.

5.2 ANÁLISE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA RESPOSTA HUMORAL AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO SECUNDÁRIO EM INDIVÍDUOS VACINADOS

A detecção de células B de memória é um procedimento difícil, devido a falta de métodos e reagentes que permitam a discriminação confiável da especificidade celular para o antígeno. Por conseqüência, a

relação chave entre o número de células B e quantidade de anticorpos no soro permanece indefinida (WARD et al., 2008). Os métodos de avaliação da frequência de linfócitos B de memória após a vacinação contra o vírus da hepatite B envolvem, principalmente, a técnica de análise ELISPOT (WISMANS et al., 1989; BAUER et al., 2006; TUAILLON et al., 2006; WARD et al., 2008; VALATS et al., 2010; ROSADO et al., 2011). Contudo, a determinação dos níveis circulantes e atividade protetora de populações celulares específicas para o antígeno representa um desafio na vacinologia (WARD et al., 2008).

No presente estudo, os resultados obtidos com a técnica de ELISA permitiram a análise *in vitro* da resposta humoral anamnésica à exposição secundária ao HBsAg. A proteína recombinante estimulou a produção de anticorpos em culturas de células de indivíduos com títulos séricos de anti-HBs inferiores a 10 UI/L ou indetectáveis. Além disso, uma resposta de anticorpos de alta afinidade foi observada no sobrenadante de culturas celulares de participantes de todos os grupos, 13-18 anos após a vacinação primária. Não houve diferença estatística entre os índices de avides de anticorpos verificados no sobrenadante de culturas celulares de indivíduos com níveis de anti-HBs <10 UI/L e ≥ 10 UI/L. Em conjunto, estes dados sugerem que não sejam necessárias doses de reforço da vacina para a elevação do anticorpo à títulos ≥ 10 UI/L.

As células B de memória são caracterizadas pela capacidade de secreção de anticorpos com maior afinidade ao antígeno do que os produzidos por plasmócitos primários, como consequência de uma mutação somática na sua imunoglobulina expressa (MCHEYZER-WILLIAMS et al., 2000). A proliferação de células B induzida pela exposição antigênica primária ativa um mecanismo pelo qual mutações são introduzidas em regiões variáveis rearranjadas e sequências adjacentes. O resultado deste processo é o aumento da afinidade das moléculas de anticorpo específicas para o antígeno (BEREK et al., 1991). Como a geração de linfócitos B de memória envolve um processo de maturação de afinidade dos receptores que se estende durante vários meses após o fim da reação no centro germinativo, os anticorpos com elevada afinidade de ligação ao antígeno são encontrados quando o tempo necessário para a maturação tenha decorrido após a ativação. Neste sentido, o índice de avides do anticorpo representa um fator de distinção entre respostas imunes primárias e de memória (SIEGRIST, 2008).

Os anticorpos de alta avides produzidos *in vitro* após a exposição antigênica demonstram que uma resposta humoral de memória contra o

HBV foi induzida pela sensibilização com o HBsAg (GOLDBLATT et al., 1998; JOSEPH et al., 2001; LEE et al., 2003; Alam et al., 2013). Estes resultados indicam a proteção a longo prazo contra a infecção pelo HBV, apesar das baixas concentrações séricas de anticorpos. No entanto, haja vista que a frequência de células de memória pode diminuir ao longo do tempo, estudos adicionais são necessários para a avaliação da duração da memória imunológica para o HBV e tempo para a administração de doses de reforço da vacina.

Os resultados deste trabalho sugerem a manutenção da memória imunológica contra o vírus da hepatite B em 40,0% e 60,0% dos indivíduos vacinados com níveis séricos de anti-HBs inferiores a 10 UI/L ou indetectáveis, respectivamente. Os dados do presente estudo demonstraram também que as respostas imunes humorais ao desafio antigênico *in vitro* não se correlacionaram com os níveis séricos do anticorpo. Estes resultados estão em conformidade com observações anteriores (LEYENDECKERS et al., 1999; ROSADO et al., 2011). No entanto, investigações *in vivo* da resposta imune ao desafio secundário com o HBsAg mostraram uma correlação positiva entre os títulos pré-reforço de anti-HBs e a resposta anamnésica humoral (SU et al., 2007; ZANETTI et al., 2005; ELDESOKY et al., 2009).

No presente estudo, uma resposta anamnésica humoral *in vivo*, definida como o aumento da concentração sérica de anti-HBs a nível igual ou superior a 10 UI/L em um período de 10-28 dias após a dose de reforço (FITZSIMONS et al., 2013), foi verificada em 63,0% dos participantes que receberam uma dose desafio da vacina. Todos os participantes que receberam três doses apresentaram níveis séricos do anticorpo ≥ 10 UI/L após o estímulo secundário.

A proporção de voluntários que apresentaram títulos de anti-HBs ≥ 10 UI/L no período de 4 meses, 1 ano ou 2 anos após a administração de uma dose de reforço foi de 66,7%, 50,0% e 70,0%, respectivamente. Todavia, níveis do anticorpo superiores a 100 UI/L foram detectados apenas em amostras coletadas 4 meses após a dose unitária de revacinação ou entre indivíduos que receberam três doses adicionais. Os títulos pós-reforço de anti-HBs aumentaram significativamente com a administração de três doses da vacina. Não foram verificadas diferenças estatísticas nos níveis do anticorpo em relação ao tempo transcorrido entre a imunização primária e secundária.

Análises anteriores da resposta anamnésica ao reforço da vacina sugerem a persistência da memória imunológica contra a infecção pelo HBV. A proporção de indivíduos que desenvolveram títulos de anti-HBs ≥ 10 UI/L variou de 51,0% a 97,0% com a administração de uma dose de

reforço (ZANETTI et al., 2005; LU et al., 2006; HAMMITT et al., 2007; McMAHON et al., 2009; POOVORAWAN et al., 2010) e 100% após o esquema adicional constituído de 3 doses (ZANETTI et al., 2005).

Em uma avaliação conduzida por MacMahon e colaboradores (2009), 77,0% dos voluntários responderam à dose desafio com o aumento sérico do anticorpo a níveis ≥ 10 UI/L em 14 dias, atingindo a proporção de 81,0% em 60 dias. Entre os participantes que tiveram amostras analisadas 1 ano após a administração da dose de reforço, este índice diminuiu para 41,0% (McMAHON et al., 2009).

Embora ensaios clínicos realizados no início da década de 80 sugiram a necessidade de um nível mínimo de anticorpos (≥ 10 UI/L) para a proteção contra a infecção pelo HBV, a relação entre as concentrações séricas de anti-HBs e a manutenção da imunidade permanece indefinida (McMahon et al., 2009). Desde a introdução da vacinação contra o vírus, muitas investigações epidemiológicas foram realizadas para avaliar a imunidade a longo prazo para o HBV e a necessidade de doses reforço. Os resultados têm demonstrado níveis do anticorpo anti-HBs abaixo de 10 UI/L entre populações vacinadas (LU et al., 2004; ZANETTI et al., 2005; CHONGSRISAWAT et al., 2006). No Estado de Santa Catarina, a proporção de crianças e adolescentes vacinados que apresentam níveis séricos do anticorpo < 10 UI/L varia entre 33,5% – 51,4% (VOIGT et al., 2010; LIVRAMENTO et al., 2011; TONIAL et al., 2011; SCARAVELI et al., 2011; BRANCO, 2011). No entanto, é importante ressaltar que a implementação da vacinação universal contra a hepatite B tem reduzido significativamente a prevalência do HBsAg (AL-FALEH et al., 1999; CHONGSRISAWAT et al., 2006; TOSUN et al., 2011).

A suscetibilidade à infecção pelo HBV entre indivíduos vacinados com baixos níveis séricos de anti-HBs que não apresentam evidências de respostas anamnéticas ao desafio antigênico permanece indefinida. Nestes grupos, a análise e acompanhamento epidemiológico podem fornecer subsídios para a confirmação do declínio da frequência de infecção e incidência da doença, constituindo um instrumento de avaliação da imunidade a longo prazo contra o vírus da hepatite B (BONANNI et al., 2003; FITZSIMONS et al., 2011).

Os dados verificados no presente estudo demonstraram que não houve diferença nas respostas humorais *in vitro* ao desafio antigênico secundário entre os grupos de indivíduos com níveis de anti-HBs < 10 UI/L e ≥ 10 UI/L. Diante dos resultados observados no presente trabalho, sugere-se a persistência da memória imunológica para o HBV em

indivíduos vacinados que apresentam títulos séricos de anti-HBs inferiores a 10 UI/L ou indetectáveis. Estes dados podem contribuir substancialmente para as decisões relativas à necessidade de doses de reforço da vacina para a manutenção dos níveis do anticorpo anti-HBs acima de 10 UI/L.

6 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- O antígeno vacinal HBsAg recombinante estimulou a proliferação linfocitária em culturas de células de indivíduos vacinados;
- Os maiores índices de proliferação foram verificados em suspensões estimuladas na concentração de 4×10^6 células/mL com 50 ng/mL de HBsAg recombinante durante 3 dias;
- A análise comparativa da proliferação linfocitária entre culturas estimuladas com o HBsAg e PHA sugere uma atividade mitogênica do antígeno recombinante;
- As respostas imunes humorais ao desafio antigênico *in vitro* não se correlacionaram com os níveis séricos do anticorpo;
- Não houve diferença estatística entre os valores dos índices de avidade de anticorpos secretados no sobrenadante de culturas celulares de indivíduos com níveis de anti-HBs <10 UI/L e ≥ 10 UI/L;
- Respostas humorais anamnéticas *in vivo* foram observadas em 63,0% dos participantes que receberam uma dose desafio da vacina e em todos os voluntários que receberam três doses;
- O índice de participantes que apresentaram títulos do anticorpo ≥ 10 UI/L em 4 meses, 1 ano e 2 anos decorridos da administração de uma dose desafio foi de 66,7%, 50,0% e 70,0%, respectivamente;
- Os títulos séricos pós-reforço de anti-HBs aumentaram significativamente com a administração de três doses da vacina;
- Não foram verificadas diferenças estatísticas nos níveis séricos do anticorpo em relação ao tempo transcorrido entre a imunização primária e secundária.

7 CONCLUSÕES

- Os resultados verificados no presente estudo sugerem a persistência da memória imunológica para o HBV em indivíduos vacinados que apresentam níveis séricos do anticorpo anti-HBs inferiores a 10 UI/L ou indetectáveis, indicando a proteção a longo prazo contra a infecção pelo vírus;
- Visto que não foram verificadas diferenças nas respostas humorais *in vitro* ao desafio antigênico secundário entre os grupos de indivíduos com níveis de anti-HBs <10 UI/L e ≥ 10 UI/L, sugere-se que não sejam necessárias doses de reforço da vacina para a elevação do anticorpo à concentrações ≥ 10 UI/L;
- A susceptibilidade à infecção e necessidade de doses de reforço da vacina entre indivíduos com baixos títulos séricos de anti-HBs que não apresentam evidências de respostas anamnéticas permanece indefinida. Nestes grupos, estudos de acompanhamento soropidemiológicos representam ferramentas importantes de análise da imunidade para o HBV;
- Haja vista que a frequência de células de memória pode diminuir ao longo do tempo, estudos adicionais são necessários para a avaliação da duração da memória imunológica para o HBV e tempo para a administração de doses de reforço da vacina.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7a Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- AGUZZI, A.; KRANICH, J.; KRAUTLER, N.J. Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. **Trends in Immunology**, v. 35, p. 105–113, 2014.
- AHMED, R.; GRAY, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. **Science**, v. 272, p. 54–60, 1996.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801, 2006.
- ALAM, M.M.; ARIFUZZAMAN, M.; AHMAD, S.M.; HOSEN, M.I.; RAHMAN, M.A.; RASHU, R.; SHEIKH, A.; RYAN, E.T.; CALDERWOOD, S.B.; QADRI, F. Study of avidity of antigen-specific antibody as a means of understanding development of long-term immunological memory after vibrio cholerae O1 infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, p. 17–23, 2013.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th Edition. New York: Garland Science, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21070/>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2013.
- AL-FALEH, F. Z.; AL-JEFFRI, M.; RAMIA, S.; AL-RASHED, R.; ARIF, M.; REZEIG, M.; AL-TORAIF, I.; BAKHSH, M.; MISHKHA, A.; MAKKI, O.; AL-FREIHI, H.; MIRDA, S.; ALJUMA, A.; YASIN, T.; AL-SWAILEM, A.; AYOOLA, A. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in Saudi children 8 years after a mass hepatitis B vaccination programme. **Journal of Infection**, v. 38, p. 167–170, 1999.
- AOSHI, T.; KOYAMA, S.; KOBIYAMA, K.; AKIRA, S.; ISHII, K.J. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. **Current Opinion in Virology**, v. 1, p. 226–232, 2011.

APOSTOLICO, J.S. **Influência da imunização inicial com a vacina codificando epítomos para linfócitos T CD4+ do HIV na resposta imune direcionada a proteína env**, 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BAUDEAU, C.; DELARUE, F.; HÉ, C.J.; NGUYEN, G.; ADIDA, C.; PERALDI, M.N.; SRAER, J.D.; RONDEAU, E. Induction of MHC class II molecules HLA-DR, -DP and -DQ and ICAM 1 in human podocytes by gamma-interferon. **Experimental Nephrology**, v. 2, p. 306–312, 1994.

BAUER, T.; JILG, W. Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. **Vaccine**, v. 24, p. 572–577, 2006.

BELMONTE, L.; PARODI, C.; BASTÓN, M.; CORAGLIA, A.; FELIPPO, M.; BARÉ, P.; MALBRÁN, A.; RUIBAL-ARES, B.; BRACCO, M.M.E. Increased lymphocyte viability after non-stimulated peripheral blood mononuclear cell (PBMC) culture in patients with X-linked lymphoproliferative disease (XLP). **Clinical Immunology**, v. 133, p. 86–94, 2009.

BELTMAN, J.B.; ALLEN, C.D.; CYSTER, J.G.; DE BOER, R.J. B cells within germinal centers migrate preferentially from dark to light zone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 8755–8760, 2011.

BEREK, C.; BERGER, A.; APEL, M. Maturation of the immune response in germinal centers. **Cell**, v. 67, p. 1121–1129, 1991.

BERTOLETTI, A.; TAN, A. T.; GEHRING, A. J. HBV-Specific Adaptive Immunity. **Viruses**, v. 1, p. 91–103, 2009.

BES, M.; VARGAS, V.; PIRON, M.; CASAMITJANA, N.; ESTEBAN, J.I.; VILANOVA, N.; PINACHO, A.; QUER, J.; PUIG, L.; GUARDIA, J.; SAULEDA, S. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. **Journal of Hepatology**, v. 56, p. 765–774, 2012.

BIAN, G.; CHENG, Y.; WANG, Z.; HU, Y.; ZHANG, X.; WU, M.; CHEN, Z.; SHI, B.; SUN, S.; SHEN, Y.; CHEN, E.J.; YAO, X.; WEN, Y.; YUAN, Z. Whole recombinant *Hansenula polymorpha* expressing hepatitis B virus surface antigen (yeast-HBsAg) induces potent HBsAg-specific Th1 and Th2 immune responses. **Vaccine**, v. 28, p. 187–194, 2010.

BILL, C.A.; SUMMERS, J. Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 11135-11140, 2004.

BOEHME, K.W.; COMPTON, T. Innate sensing of viruses by Toll-like receptors. **Journal of Virology**, v. 78, p. 7867–7873, 2004.

BONANNI, P.; PESAVENTO, G.; BECHINI, A.; TISCIONE, E.; MANNELLI, F.; BENUCCI, C.; NOSTRO, A. L. Impact of universal vaccination programmes on the epidemiology of hepatitis B: 10 years of experience in Italy. **Vaccine**, v. 18, p. 685–691, 2003.

BONILLA, F.A.; OETTGEN, H.C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S33–S40, 2010.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 97, p. 7, 1968.

BRANCO, F. R. P. **Prevalência dos marcadores sorológicos das hepatites B e C em adolescentes de Lages**, 2011. Dissertação (Mestrado em Farmácia – Análises Clínicas), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

BURNETT, R.J.; FRANÇOIS, G.; MPHABLELE, M.J.; MUREITHI, J.G.; AFRICA, P.N.; SATEKGE, M.M.; MOKONOTO, D.M.; MEHEUS, A.; VAN SPRUNDEL, M. Hepatitis B vaccination coverage in healthcare workers in Gauteng Province, South Africa. **Vaccine**, v. 29, p. 4293–4297, 2011.

CAROLLO, M.; PALAZZO, R.; BIANCO, M.; PANDOLFI, E.; CHIONNE, P.; FEDELE, G.; TOZZI, A.E.; CARSETTI, R.; ROMANÒ, L.; AUSIELLO, C.M. Hepatitis B specific T cell immunity induced by primary vaccination persists independently of the protective serum antibody level. **Vaccine**, v. 31, p. 506–513, 2013.

CERVANTES, J.L.; WEINERMAN, B.; BASOLE, C.; SALAZAR, J.C. TLR8: the forgotten relative revindicated. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 9, p. 434–438, 2012.

CHONGSRISAWAT, V.; YOOCHAROEN, P.; THEAMBOONLERS, A.; THARMAPHORNPILAS, P.; WARINSATHIEN, P.; SINLAPARATSAMEE, S.; PAUPUNWATANA, S.; CHAIEAR, K.; KHWANJAIPANICH, S.; POOVORAWAN, Y. Hepatitis B seroprevalence in Thailand: 12 years after hepatitis B vaccine integration into the national expanded programme on immunization. **Tropical Medicine and International Health**, v. 2, p. 1496–1502, 2006.

CUPPS, T.R.; TIBBLES, J.; HURNI, W.M.; MILLER, W.J.; ELLIS, R.W.; MILICH, D.; WETTER, N. *In vitro* T cell immune responses to the PreS2 antigen of the hepatitis B virus envelope protein in PreS2+S vaccine recipients. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 3353–3360, 1993.

DANCYGIER H. **Clinical hepatology; principles and practice of hepatobiliary diseases**. New York: Springer, p. 695, 2010.

DE GAST, G.C.; HOUWEN, B.; NIEWEG, H.O. Specific lymphocyte stimulation by purified heat-inactivated hepatitis B antigen. **British Medical Journal**, v. 4, p. 707–709, 1973.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271–277, 1986.

DESOMBERE, I.; CAO, T.; GIJBELS, Y.; LEROUX-ROELS, G. Non-responsiveness to hepatitis B surface antigen vaccines is not caused by defective antigen presentation or a lack of B7 co-stimulation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 140, p. 126–137, 2005.

DEUFFIC-BURBAN, S.; DELAROCQUE-ASTAGNEAU, E.; ABITEBOUL, D.; BOUVET, E.; YAZDANPANAH, Y. Blood-borne viruses in health care workers: prevention and management. **Journal of Clinical Virology**, v. 52, p. 4–10, 2011.

DiLILLO, D.J.; HAMAGUCHI, Y.; UEDA, Y.; YANG, K.; UCHIDA, J.; HAAS, K.M.; KELSOE, G.; TEDDER, T.F. Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 361–371, 2008.

DUDDEMPUDI, A.T.; BERNSTEIN, D.E. Hepatitis B and C. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 30, p. 149–167, 2014.

ELDESOKY, A.; MOSAAD, Y.; ZAKRIA, Y.; HAMDY, S. Protective immunity after hepatitis B vaccination. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 10, p. 68–71, 2009.

EMINI, E.A.; ELLIS, R.W.; MILLER, W.J.; MCALEER, W.J.; SCOLNICK, E.M.; GERETY, R.J. Production and immunological analysis of recombinant hepatitis B vaccine. **Journal of Infection**, v. 13, p. 3–9, 1986.

FERNAN, A.; CAYZER, C.J.; COOKSLEY, W.G. HBsAg-induced antigen-specific T and B lymphocyte response in chronic hepatitis B virus carriers and immune individuals. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 76, p. 222–226, 1989.

FERRARI, G.; PENNA, A.; BERTOLETTI, A.; CAVALLI, A.; VALLI, A.; SCHIANCHI, C.; FIACCADORI, F. The preS1 antigen of hepatitis B virus is highly immunogenic at T cell level in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 84, p. 1314–1319, 1989.

FITZSIMONS, D.; HENDRICKX, G.; VORSTERS, A.; VAN DAMME, P. Hepatitis B vaccination: a completed schedule enough to control HBV lifelong? Milan, Italy, 17-18 November 2011. **Vaccine**, v. 31, p. 584–590, 2013.

GATTO, D.; BRINK, R. The germinal center reaction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, p. 898–907, 2010.

GELLISSEN, G.; VEENHUIS, M. The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: its use in fundamental research and as a cell factory. **Yeast**, v. 18, p. i–iii, 2001

GITLIN, N. Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 1500–1506, 1997.

GOLDBLATT, D.; VAZ, A.R.; MILLER, E. Antibody avidity as a surrogate marker of successful priming by *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines following infant immunization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 1112–1115, 1998.

GOLDRATH, A.W.; BEVAN, M.J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. **Nature**, v. 402, p. 255–262, 1999.

GORGOS, L. Sexual transmission of viral hepatitis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 27, p. 811–836, 2013.

HAMMITT, L. L.; HENNESSY, T. W.; FIORE, A. E.; ZANIS, C.; HUMMEL, K. B.; DUNAWAY, E.; BULKOW, L.; McMAHON, B. J. Hepatitis B immunity in children vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine beginning at birth: a follow-up study at 15 years. **Vaccine**, v. 25, p. 6958–6964, 2007.

HANSON, R.G.; HOOFNAGLE, J.H.; MINUK, G.Y.; PURCELL, R.H.; GERIN, J.L. Cell-mediated immunity to hepatitis B surface antigen in man. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 57, p. 257–264, 1984.

HARRIS, S.L.; TSAO, H.; ASHTON, L.; GOLDBLATT, D.; FERNSTEN, P. Avidity of the immunoglobulin G response to a *Neisseria meningitidis* group C polysaccharide conjugate vaccine as measured by inhibition and chaotropic enzyme-linked immunosorbent assays. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 397–403, 2007.

HELLSTRÖM, U.B.; SYLVAN, S.P.E.; LUNDBERGH, P. Regulatory functions of T and accessory-cells for hepatitis B surface antigen induced specific antibody production and proliferation of human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. **Journal of Clinical and Laboratory Immunology**, v. 16, p. 173–181, 1985.

HITZEMAN, R.A.; CHEN, C.Y.; HAGIE, F.E.; PATZER, E.J.; LIU, C.C.; ESTELL, D.A.; MILLER, J.V.; YAFFE, A.; KLEID, D.G.; LEVINSON, A.D.; OPPERMAN, H. Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 2745–2763, 1983.

IELUZZI D; COVOLO L; DONATO F; FATTOVICH G. Progression to cirrhosis, hepatocellular carcinoma and liver-related mortality in chronic hepatitis B patients in Italy. **Digestive and Liver Disease**, v. 46, p. 427–432, 2014.

IWASAKI, A. A virological view of innate immune recognition. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, p. 177–196, 2012.

JANEWAY, C.A.JR.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. Immunobiology: **The immune system in health and disease**. 5th Edition. Garland Science, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27142/>>. Acesso em: 21 de dezembro de 2013.

JOSEPH, H.; MILLER, E.; DAWSON, M.; ANDREWS, N.; FEATHERS, I.; BORROW, R. Meningococcal serogroup A avidity indices as a surrogate marker of priming for the induction of immunologic memory after vaccination with a meningococcal A/C conjugate vaccine in infants in the United Kingdom. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 661–662, 2001.

KIM, Y.U.; LIU, X.; TANAKA, S.; TRAN, D.Q; CHUNG Y. Regulation of Germinal Center Reactions by B and T Cells. **Antibodies**, v. 2, p. 554–586, 2013.

KLEIN, U.; TU, Y.; STOLOVITZKY, G.A.; KELLER, J.L.; HADDAD, J.JR.; MILJKOVIC, V.; CATTORETTI, G.; CALIFANO, A.; DALLA-FAVERA, R. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 2639–2644, 2003.

KLEIN, U.; DALLA-FAVERA, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. **Nature Reviews**, v. 8, p. 22–33, 2008.

KOSINSKA, A.D.; ZHANG, E.; LU, M.; ROGGENDORF, M. Therapeutic vaccination in chronic hepatitis B: preclinical studies in the Woodchuck. **Hepatitis Research and Treatment**, v. 2010, 17 p., 2010.

KOYAMA, S.; ISHII, K.J.; COBAN, C.; AKIRA, S. Innate immune response to viral infection. **Cytokine**, v. 43, p. 336–341, 2008.

KRAJDEN, M.; MCNABB, G.; PETRIC, M. The laboratory diagnosis of hepatitis B virus. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 16, p. 65–72, 2005.

KUEHL, W.M.; BERGSAGEL, P.L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 175–187, 2002.

LANG, T.; LO, C.; SKINNER, N.; LOCARNINI, S.; VISVANATHAN, K.; MANSELL, A. The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. **Journal of Hepatology**, v. 55, p. 762–769, 2011.

LE BON, A.; TOUGH, D.F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 432–436, 2002.

LEE, L.H.; FRASCH, C.E.; FALK, L.A.; KLEIN, D.L.; DEAL, C.D. Correlates of immunity for pneumococcal conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 21, p. 2199–2205, 2003.

LEROUX-ROELS, G.; VAN HECKE, E.; MICHELSEN, W.; VOET, P.; HAUSER, P.; PETRE, J. Correlation between *in vivo* humoral and *in vitro* cellular immune responses following immunization with hepatitis B surface antigen (HBsAg) vaccines. **Vaccine**, v. 12, p. 812–815, 1994.

LEURIDAN, E.; VAN DAMME, P. Hepatitis B and the need for a booster dose. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, p. 68–75, 2011.

LEYENDECKERS, H.; ODENDAHL, M.; LÖHNDORF, A.; IRSCH, J.; SPANGFORT, M.; MILTENYI, S.; HUNZELMANN, N.; ASSENMACHER, M.; RADBRUCH, A.; SCHMITZ, J. Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. **European Journal of Immunology**, v. 29, p. 1406–1417, 1999.

LI, Y.; SONG, H.; LI, J.; WANG, Y.; YAN, X.; ZHAO, B.; ZHANG, X.; WANG, S.; CHEN, L.; QIU, B.; MENG, S. Hansenula polymorpha expressed heat shock protein gp96 exerts potent T cell activation activity as an adjuvant. **Journal of Biotechnology**, v. 151, p. 343–349, 2011.

LI, J.; ZHANG, D.; MA, R.; YANG, X.; WANG, X.; LI, C.; ZHANG, S.; XUE, H.; ZHAO, K.; ZHUANG, H. Preclinical evaluation of a two-dose vaccination schedule of recombinant Hansenula polymorpha hepatitis B vaccine in animals. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 9, p. 736–743, 2013.

LI, P.; TAN, H.; XU, D.; YIN, F.; CHENG, Y.; ZHANG, X.; LIU, Y.; WANG, F. Effect and mechanisms of curdlan sulfate on inhibiting HBV infection and acting as an HB vaccine adjuvant. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 446–455, 2014a.

LI, Q.; LU, F.; DENG, G.; WANG, K. Modeling the effects of covalently closed circular DNA and dendritic cells in chronic HBV infection. **Journal of Theoretical Biology**, v. 357, p. 1–9, 2014b.

LIVRAMENTO, A. **Prevalência dos marcadores das hepatites B e C em adolescentes de Blumenau**, 2009. Dissertação (Mestrado em Farmácia – Análises Clínicas), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

LIVRAMENTO, A.; CORDOVA, C. M. M.; SCARAVELI N. G.; TONIAL G. C.; SPADA C.; TREITINGER A. Anti-HBs levels among children and adolescents with complete immunization schedule against hepatitis B virus. A cross-sectional study in Blumenau, State of Santa Catarina, Brazil, 2007-2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 412–415, 2011.

LOK, A.S.; McMahon, B.J. Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 34, 1225–1241, 2001.

LOK, A.S.; McMahon, B.J. Chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 45, p. 507–539, 2007.

LU, C.Y.; CHIANG, B.L.; CHI, W.K.; CHANG, M.H.; NI, Y.H.; HSU, H.M.; TWU, S.J.; SU, I.J.; HUANG, L.M.; LEE, C.Y. Waning immunity to plasma-derived hepatitis B vaccine and the need for boosters 15 years after neonatal vaccination. **Hepatology**, v. 40, p. 1415–1420, 2004.

LU, S. N.; CHEN, C. H.; CHEN, T. M.; LEE, P. L.; WANG, J. H.; TUNG, H. D.; HUNG, C. H.; LEE, C. M.; CHANGCHIEN, C. S. Hepatitis B virus infection in adolescents in a rural township – 15 years subsequent to mass hepatitis B vaccination in Taiwan. **Vaccine**, v. 24, p. 759-765, 2006.

LUNA, E.J.; MORAES, J.C.; SILVEIRA, L.; SALINAS, H.S. Efficacy and safety of the Brazilian vaccine against hepatitis B in newborns. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 1014–1020, 2009.

MAHONEY, F.J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 351–366, 1999.

MANOSROI, A.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A.; MANOSROI, J. *Immunomodulatory activities of Clausena excavata* Burm. f. wood extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 155–160, 2003.

McHEYZER-WILLIAMS, M.G.; AHMED, R. B cell memory and the long-lived plasma cell. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, p. 172–179, 1999.

McHEYZER-WILLIAMS, L.J.; COOL, M.; McHEYZER-WILLIAMS, M.G. Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel B220⁺ memory B cell compartment. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, p. 1149–1166, 2000.

McMAHON, B. J.; DENTINGER, C. M.; BRUDEN, D.; ZANIS, C.; PETERS, H.; HURLBURT, D.; BULKOW, L.; FIORE, A. E.; BELL, B. P.; HENNESSY, T. W. Antibody levels and protection after hepatitis B vaccine: results of a 22-year follow-up study and response to a booster dose. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, p.1390–1396, 2009.

MEDEIROS, L.J.; GELB, A.B.; WOLFSON, K.; DOGGETT, R.; MCGREGOR, B.; COX, R.S.; HORNING, S.J.; WARNKE, R.A. Major histocompatibility complex class I and class II antigen expression in diffuse large cell and large cell immunoblastic lymphomas. Absence of a Correlation between Antigen Expression and Clinical Outcome. **American Journal of Pathology**, v. 143, p. 1086–1097, 1993.

MENG S, ZHAN S, LI J. Nuclease-resistant double-stranded DNA controls or standards for hepatitis B virus nucleic acid amplification assays. **Virology Journal**, v. 6:226, 7 p., 2009.

MICHEL, M.L.; TIOLLAIS, P. Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential. **Pathologie Biologie**, v. 58, p. 288–295, 2010.

MILOSEVIC, I.; DELIC, D.; LAZAREVIC, I.; PAVLOVIC, I.P.; KORAC, M.; BOJOVIC, K.; JEVTOVIC, D. The significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes for the disease and treatment outcome among patients with chronic hepatitis B in Serbia. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, p. 54–58, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A, B, C, D, E de hepatites para comunicadores**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Série F. Comunicação e Educação em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 24 p., 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual dos centros de referência para imunobiológicos especiais**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **DST/AIDS e hepatites virais**. Núcleo de Comunicação: Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, p. 3, 2012.

MIYANOHARA, A.; TOH-E, A.; NOZAKI, C.; HAMADA, F.; OHTOMO, N.; MATSUBARA, K. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, p. 1–5, 1983

MORSE, K.; NORIMINE, J.; PALMER, G.H.; SUTTEN, E.L.; BASZLER, T.V.; BROWN, W.C. Association and evidence for linked recognition of type IV secretion system proteins VirB9-1, VirB9-2, and VirB10 in *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 80, p. 215–227, 2012.

MORAES, J.C.; LUNA, E.J.; GRIMALDI, R.A. Immunogenicity of the Brazilian hepatitis B vaccine in adults. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, p. 353–359, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MURRAY, K.; STAHL, S.; ASHTON-RICKARDT, P.G. Genetic engineering applied to the development of vaccines. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 324, p. 461–476, 1989.

NAMUJU, P.B.; HEDMAN, L.; HEDMAN, K.; BANURA, C.; MBIDDE, E.K.; KIZITO, D.; BYARUHANGA, R.N.; MUWANGA, M.; KIRNBAUER, R.; SURCEL, H.M.; LEHTINEN, M. Low avidity of human papillomavirus (HPV) type 16 antibodies is associated with increased risk of low-risk but not high-risk HPV type prevalence. **BMC Research Notes**, v. 6, p. 170, 2011.

NEAIGUS, A.; GYARMATHY, V.A.; MILLER, M.; FRAJZYNGIER, V.; ZHAO, M.; FRIEDMAN, S.R.; DES JARLAIS, D.C. Injecting and sexual risk correlates of HBV and HCV seroprevalence among new drug injectors. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 89, p. 234–243, 2007.

NETEA, M.G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J.W. Trained immunity: a memory for innate host defense. **Cell Host and Microbe**, v. 9, p. 355–361, 2011.

NOWELL, P.; C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Research**, v. 20, p. 462–466, 1960.

NYSTRÖM, J.; CARDELL, K.; BJÖRNSDOTTIR, T.B.; FRYDEN, A.; HULTGREN, C.; SÄLLBERG, M. Improved cell mediated immune responses after successful re-vaccination of non-responders to the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) vaccine using the combined hepatitis A and B vaccine. **Vaccine**, v. 26, p. 5967–5972, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Hepatitis B**. Fact sheet n. 204, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>>. Acesso em: 10 de novembro de 2013.

OSTHOFF, M.; IRUNGU, E.; NGURE, K.; MUGO, N.; THOMAS, K.K.; BAETEN, J.M.; EISEN, D.P. Mannose-binding lectin and ficolin-2 do not influence humoral immune response to hepatitis B vaccine. **Vaccine**, *In Press*, 2014.

PENG, C.Y.; CHIEN, R.N.; LIAW, Y.F. Hepatitis B virus-related decompensated liver cirrhosis: benefits of antiviral therapy. **Journal of Hepatology**, v. 57, p. 442–450, 2012.

POISSON, F.; SEVERAC, A.; HOURIOUX, C.; GOUDEAU, A.; ROINGEARD, P. Both Pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. **Virology**, v. 228, p. 115–120, 1997.

POOVORAWAN, Y.; CHONGSRISAWAT, V.; THEAMBOONLERS, A.; BOCK, H.L.; LEYSSEN, M.; JACQUET, J.M. Persistence of antibodies and immune memory to hepatitis B vaccine 20 years after infant vaccination in Thailand. **Vaccine**, v. 28, p. 730–736, 2010.

RISCO, E.; GHIA, F.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; ALVAREZ, E.; CANIGUERAL, S. Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. **Planta Medica**, v. 69, p. 785–794, 2003.

ROSADO, M.M.; SCARSELLA, M.; PANDOLFI, E.; CASCIOLI, S.; GIORDA, E.; CHIONNE, P.; MADONNE, E.; GESUALDO, F.; ROMANO, M.; AUSIELLO, C.M.; RAPICETTA, M.; ZANETTI, A.R.; TOZZI, A.; CARSETTI, R. Switched memory B cells maintain specific memory independently of serum antibodies: the hepatitis B example. **European Journal of Immunology**, v. 41, p. 1800–1808, 2011.

SAMUEL, C.E. Antiviral actions of interferons. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 778–809, 2001.

SCARAVELI, N. G.; PASSOS, A. M.; VOIGT, A. R.; LIVRAMENTO, A.; TONIAL, G.; TREITINGER, A.; SPADA, C. Seroprevalence of hepatitis B and hepatitis C markers in adolescents in Southern Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 753–758, 2011.

SIEGRIST, C.A. **Vaccine immunology**. General aspects of vaccination. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. 5th Edition. Saunders Elsevier, p. 17–36, 2008.

SLIFKA, M.K.; AHMED, R. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 252–258, 1998.

STETSON, D.B.; MEDZHITOV, R. Type I interferons in host defense. **Immunity**, v. 25, p. 373–381, 2006.

SU, F.H.; CHENG, S.H.; LI, C.Y.; CHEN, J.D.; HSIAO, C.Y.; CHIEN, C.C.; YANG, Y.C.; HUNG, H.H.; CHU, F.Y. Hepatitis B seroprevalence and anamnestic response amongst Taiwanese young adults with full vaccination in infancy, 20 years subsequent to national hepatitis B vaccination. **Vaccine**, v. 25, p. 8085–8090, 2007.

SYLVAN, S.P.E.; HELLSTRÖM, U.B. Characterization of HBsAg induced interleukin-2 secretion in chronic asymptomatic carriers of HBsAg. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 78, p. 207–213, 1989.

SYLVAN, S.P.E.; HELLSTRÖM, U.B. HBsAg-induced interferon-gamma secretion in T cells from asymptomatic HBsAg carriers and HB-immune donors *in vitro*. **Immunology**, v. 70, p. 197–202, 1990.

TONIAL, G. C.; PASSOS A. M.; LIVRAMENTO, A.; SCARAVELI N. G.; BATSCHAUER A. P.; BUENO E. C.; LARGURA A.; SPADA C.; TREITINGER A. Hepatitis B marker seroprevalence and vaccination coverage in adolescents in the city of Itajaí, State of Santa Catarina, southern Brazil, in 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 416–419, 2011.

TOSUN, S.; DEVECI, S.; KAPLAN, Y.; KASIRGA, E. Should a booster dose be administered in children after mass immunization for hepatitis B? **Hepatitis Monthly**, v. 11, p. 440–444, 2011.

TREGNAGHI, M.W.; VOELKER, R.; SANTOS-LIMA, E.; ZAMBRANO, B. Immunogenicity and safety of a novel yeast *Hansenula polymorpha*-derived recombinant hepatitis B candidate vaccine in healthy adolescents and adults aged 10–45 years. **Vaccine**, v. 28, p. 3595–3601, 2010.

TUAILLON, E.; TABAA, Y.A.; PETITJEAN, G.; HUGUET, M.F.; PAJEAUX, G.; FONDERE, J.M.; PONSEILLE, B.; DUCOS, J.; BLANC, P.; VENDRELL, J.P. Detection of memory B lymphocytes specific to hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) from HBsAg-vaccinated or HBV-immunized subjects by ELISPOT assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 315, p. 144–152, 2006.

UMAR, M.; HAMAMA-TUL-BUSHRA; UMAR, S.; KHAN, H.A. HBV perinatal transmission. **International Journal of Hepatology**. v. 2013, 7 p., 2013.

VALATS, J.C.; TUAILLON, E.; FUNAKOSHI, N.; HOA, D.; BRABET, M.C.; BOLLORÉ, K.; DUCOS, J.; VENDRELL, J.P.; BLANC, P. Investigation of memory B cell responses to hepatitis B surface antigen in health care workers considered as non-responders to vaccination. **Vaccine**, v. 28, p. 6411–6416, 2010.

VANDEPAPELIÈRE, P.; HORSMANS, Y.; MORIS, P.; VAN MECHELEN, M.; JANSSENS, M.; KOUT-SOUKOS, M.; VAN BELLE, P.; CLEMENT, F.; HANON, E.; WETTENDORFF, M.; GARÇON, N.; LEROUX-ROELS, G. Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. **Vaccine**, v. 26, p. 1375–1386, 2008.

VAN LITH, M.; MCEWEN-SMITH, R.M.; BENHAM, A.M. HLA-DP, HLA-DQ, and HLA-DR have different requirements for invariant chain and HLA-DM. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 40800–40808, 2010.

VICTORA, G.D.; DOMINGUEZ-SOLA, D.; HOLMES, A.B.; DEROUBAIX, S.; DALLA-FAVERA, R.; NUSSENZWEIG, M.C. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. **Blood**, v. 120, p. 2240–2248, 2012.

VOIGT, A. R.; STRAZER NETO, M.; SPADA, C.; TREITINGER, A. Seroprevalence of hepatitis B and hepatitis C markers among children and adolescents in the south Brazilian region – metropolitan area of Florianopolis, Santa Catarina. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 60–65, 2010.

WANG, R.X.; BOLAND, G.J.; VAN HATTUM, J.; DE GAST, G.C. Long-term persistence of T cell memory to HBsAg after hepatitis B vaccination. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, p. 260–263, 2004.

WARD, S.M.; PHALORA, P.; BRADSHAW, D.; LEYENDECKERS, H.; KLENERMAN, P. Direct *ex vivo* evaluation of long-lived protective antiviral memory B cell responses against hepatitis B virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, p. 813–817, 2008.

WIDJAJA, S.; SIMON, S.; ALI, S.; LISTIAWAN, I.; WIDYASTUTI, A.; KURNIAWATI, S.; DEPLA, E.; YAP S.H.. Concomitant findings of anti-HBc as a sole marker for hepatitis B virus infection and elevated serum transaminases are associated with a high prevalence of hepatitis C virus infection. **International Hepatology Communications**, v. 5, p. 112–121, 1996.

WISMANS, P.J.; VAN HATTUM, J.; DE GAST, G.C.; ENDEMAN, H.J.; POEL, J.; STOLK, B.; MAIKOE, T.; MUDDE, G.C. The spot-ELISA: a sensitive *in vitro* method to study the immune response to hepatitis B surface antigen. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 78, p. 75–79, 1989.

WOLS, H.A.M. **Plasma cells**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons Ltd, 2005.

XAGORARI, A.; CHLICHLIA, K. Toll-like receptors and viruses: induction of innate antiviral immune responses. **The Open Microbiology Journal**, v. 2, p. 49–59, 2008.

YAMADA, H.; NISHIKAWA, A.; YAMAMOTO, T.; MIZUE, Y.; YAMADA, T.; MORIZANE, M.; TAIRAKU, S.; NISHIHARA, J. Prospective study of congenital toxoplasmosis screening with use of IgG avidity and multiplex nested PCR methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2552–2556, 2011.

YAMAGUCHI, M.; SUGAHARA, K.; SHIOSAKI, K.; MIZOKAMI, H.; TAKEO, K. Fine structure of hepatitis B virus surface antigen produced by recombinant yeast: comparison with HBsAg of human origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 165, p. 363–367, 1998.

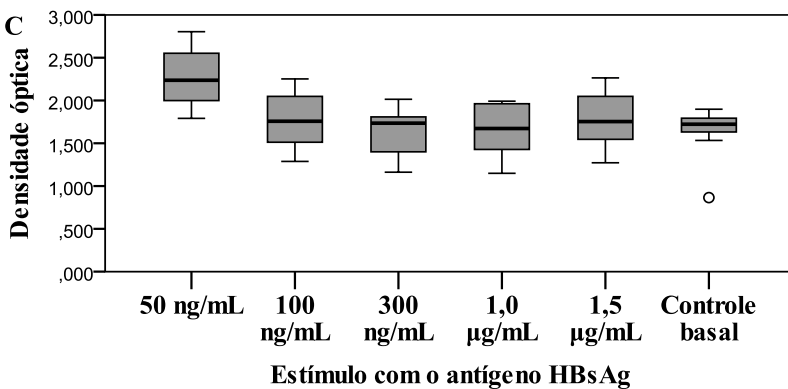
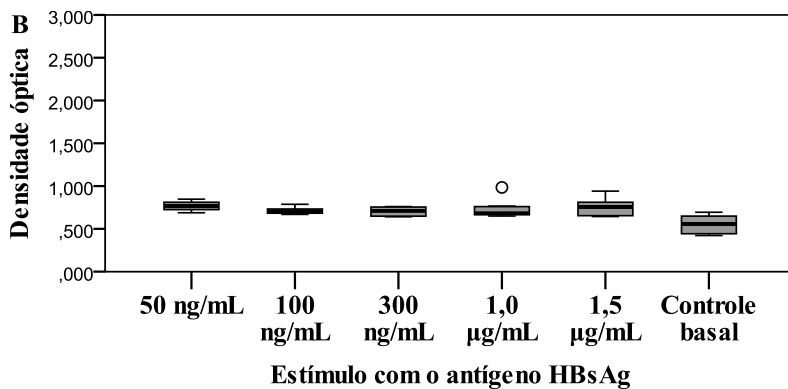
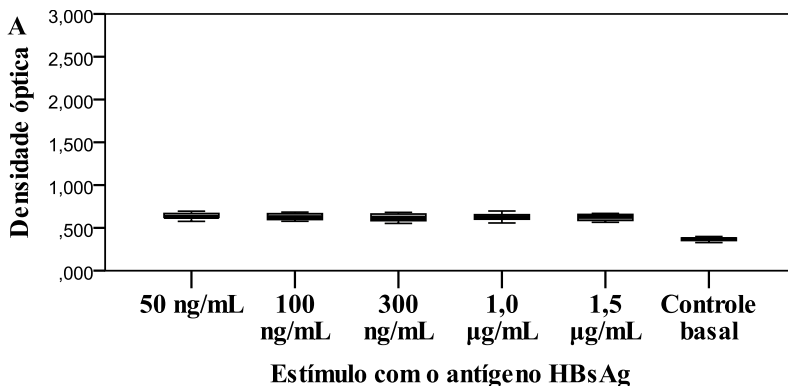
YANG, H.I.; YUEN, M.F.; CHAN, H.L.; HAN, K.H.; CHEN, P.J.; KIM, D.Y.; AHN, S.H.; CHEN, C.J.; WONG, V.W.; SETO, W.K.; REACH-B WORKING GROUP. Risk estimation for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B (REACH-B): development and validation of a predictive score. **Lancet Oncology**, v. 12, p. 568–574, 2011.

YUSUF, I.; KAGEYAMA, R.; MONTICELLI, L.; JOHNSTON, R.J.; DITORO, D.; HANSEN, K.; BARNETT, B.; CROTTY, S. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). **The Journal of Immunology**, v. 185, p. 190–202, 2010.

ZAJAC, A.J.; HARRINGTON, L.E. Immune response to viruses: cell-mediated immunity. **Encyclopedia of Virology**, 3th Edition, v. 3, p. 70–77, 2008.

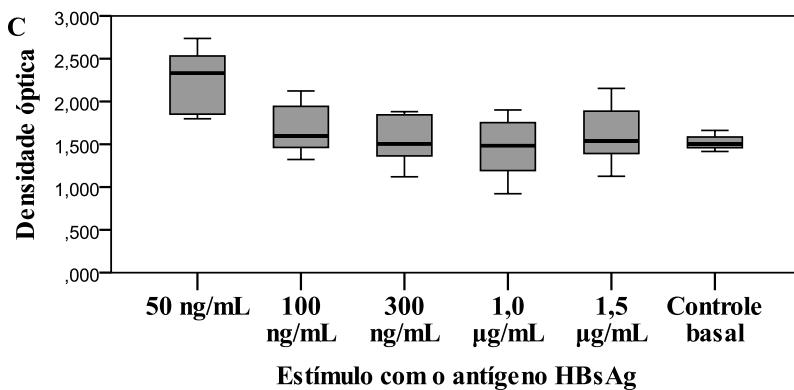
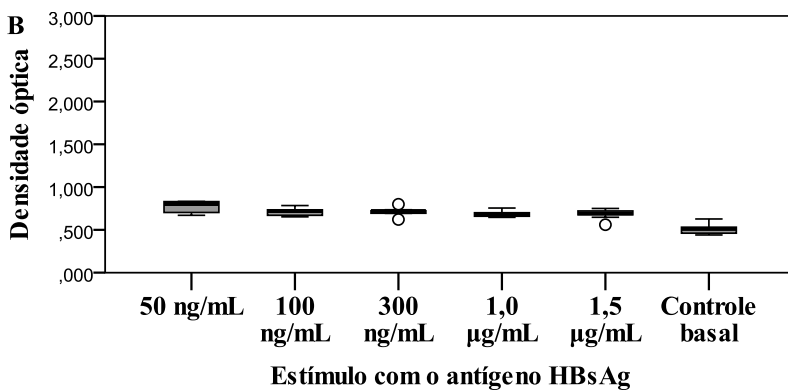
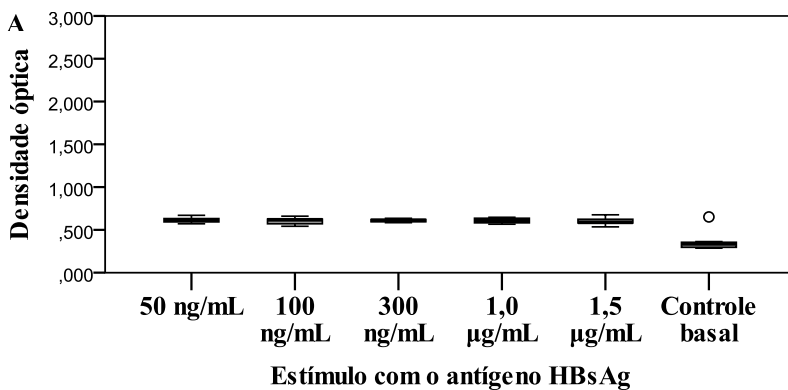
ZANETTI, A. R.; MARIANO, A.; ROMANÒ, L.; D'AMELIO, R.;
CHIRONNA, M.; COPPOLA, R. C.; CUCCIA, M.; MANGIONE, R.;
MARRONE, F.; NEGRONE, F. S.; PARLATO, A.; ZAMPARO, E.;
ZOTTI, C.; STROFFOLINI, T.; MELE, A. Long-term immunogenicity
of hepatitis B vaccination and policy for booster: an Italian multicentre
study. **Lancet**, v. 366, p.1379–1384, 2005.

APÊNDICE 1 – Resultados dos ensaios de padronização do teste de proliferação de linfócitos frente à estimulação *in vitro* com o antígeno vacinal HBsAg recombinante – valores de absorbância do teste e controle basal



Notas: Valores de absorvância de culturas celulares de indivíduos com níveis detectáveis do anticorpo anti-HBs no soro determinada em espectrofotômetro de microplacas a 570 nm. Suspensões estimuladas na densidade de 4×10^5 células/mL com diferentes doses de HBsAg e

culturas de controle basal (incubação das células em meio de cultura sem estimulação antigênica). **(A)** 3 dias de cultura, **(B)** 7 dias de cultura e **(C)** 14 dias de cultura.



Notas: Valores de absorvância de culturas celulares de indivíduos com níveis detectáveis do anticorpo anti-HBs no soro determinada em espectrofotômetro de microplacas a 570 nm. Suspensões estimuladas na densidade de 4×10^6 células/mL com diferentes doses de HBsAg e

culturas de controle basal (incubação das células em meio de cultura sem estimulação antigênica). (**A**) 3 dias de cultura, (**B**) 7 dias de cultura e (**C**) 14 dias de cultura.

APÊNDICE 2 – Resultados dos ensaios de padronização do teste de proliferação de linfócitos frente à estimulação *in vitro* com o antígeno vacinal HBsAg recombinante – respostas linfoproliferativas ao estímulo com diferentes concentrações de HBsAg e PHA

Voluntário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo	F	F	F	M	M	F	M	M	F	F
Idade (anos)	27	22	19	22	15	61	57	14	29	65
Anti-HBs sérico (UI/L)	38,17	8,78	15,20	551,80	2,19	6,82	217,06	10,00	51,16	9,02
Proliferação (%)										
50 ng/mL HBsAg	75,94	74,59	74,86	79,73	76,33	75,60	78,97	85,71	57,39	68,13
100 ng/mL HBsAg	68,60	82,43	67,80	80,00	62,53	79,87	69,60	77,67	54,13	73,62
300 ng/mL HBsAg	54,68	84,05	74,08	74,21	55,49	78,04	64,48	83,63	60,90	67,03
1000 ng/mL HBsAg	65,56	88,37	68,32	74,21	73,80	83,23	66,19	65,77	58,39	67,58
1500 ng/mL HBsAg	67,84	80,81	68,58	68,94	66,47	78,96	60,51	69,94	64,66	69,78
PHA 1%	7,84	5,67	8,30	3,60	10,42	13,41	7,38	16,36	5,76	5,40

Proliferação linfocitária em suspensões cultivadas na densidade de 4×10^5 células/mL, estimuladas com diferentes concentrações de HBsAg e PHA 1% durante 3 dias. Abreviaturas: F= feminino, M= masculino.

Voluntário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo	F	F	F	M	M	F	M	M	F	F
Idade (anos)	27	22	19	22	15	61	57	14	29	65
Anti-HBs sérico (UI/L)	38,17	8,78	15,20	551,80	2,19	6,82	217,06	10,00	51,16	9,02
Proliferação (%)										
50 ng/mL HBsAg	46,00	56,20	63,03	64,39	9,65	25,85	50,80	44,82	29,51	24,96
100 ng/mL HBsAg	34,60	51,01	61,84	58,73	13,40	15,87	23,52	32,48	11,92	20,49
300 ng/mL HBsAg	29,60	44,69	52,36	51,24	7,78	24,38	27,62	28,31	15,44	16,64
1000 ng/mL HBsAg	30,40	51,46	57,58	47,39	9,51	61,04	20,32	24,68	17,12	14,94
1500 ng/mL HBsAg	30,20	50,11	52,60	48,29	12,10	54,00	58,64	35,57	24,00	17,56
PHA 1%	-7,40	0,22	-4,26	2,04	-1,29	9,49	7,48	7,25	6,57	6,93

Proliferação linfocitária em suspensões cultivadas na densidade de 4×10^5 células/mL, estimuladas com diferentes concentrações de HBsAg e PHA 1% durante 7 dias. Abreviaturas: F= feminino, M= masculino.

Voluntário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo	F	F	F	M	M	F	M	M	F	F
Idade (anos)	27	22	19	22	15	61	57	14	29	65
Anti-HBs sérico (UI/L)	38,17	8,78	15,20	551,80	2,19	6,82	217,06	10,00	51,16	9,02
Proliferação (%)										
50 ng/mL HBsAg	18,63	17,64	30,85	107,05	56,38	12,02	48,77	52,54	30,18	36,47
100 ng/mL HBsAg	2,96	-8,94	2,41	48,90	25,59	22,27	1,13	-9,62	7,90	4,33
300 ng/mL HBsAg	1,72	-10,41	-8,67	34,33	12,32	-2,11	3,52	-26,12	-4,74	-2,72
1000 ng/mL HBsAg	-7,89	-12,50	1,89	32,83	9,53	10,91	11,66	-29,52	1,58	-0,99
1500 ng/mL HBsAg	-1,36	-3,67	0,84	47,05	26,26	2,78	16,56	-21,63	17,22	11,10
PHA 1%	-30,20	-38,66	-35,61	2,42	-38,70	-37,36	-42,51	-43,99	-13,64	-43,58

Proliferação linfocitária em suspensões cultivadas na densidade de 4×10^5 células/mL, estimuladas com diferentes concentrações de HBsAg e PHA 1% durante 14 dias. Abreviaturas: F= feminino, M= masculino.

Voluntário	1	2	2	4	5	6	7	8	9	10
Sexo	F	F	F	M	M	F	M	M	F	F
Idade (anos)	27	22	19	22	15	61	57	14	29	65
Anti-HBs sérico (UI/L)	38,17	8,78	15,20	551,80	2,19	6,82	217,06	10,00	51,16	9,02
Proliferação (%)										
50 ng/mL HBsAg	85,87	104,48	81,76	88,65	95,90	100,33	105,59	60,84	83,73	68,87
100 ng/mL HBsAg	78,38	122,41	82,64	97,01	73,97	92,90	98,25	75,77	63,25	70,79
300 ng/mL HBsAg	75,79	114,13	84,41	89,55	81,28	106,41	104,19	66,76	81,92	63,91
1000 ng/mL HBsAg	86,45	113,10	89,70	89,85	70,17	97,63	97,90	73,52	74,39	62,53
1500 ng/mL HBsAg	94,81	115,86	83,52	85,97	69,88	80,74	103,49	66,76	67,46	60,05
PHA 1%	26,80	67,93	4,70	3,58	8,47	10,47	26,57	3,38	8,13	3,85

Proliferação linfocitária em suspensões cultivadas na densidade de 4×10^6 células/mL, estimuladas com diferentes concentrações de HBsAg e PHA 1% durante 3 dias. Abreviaturas: F= feminino, M= masculino.

Voluntário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo	F	F	F	M	M	F	M	M	F	F
Idade (anos)	27	22	19	22	15	61	57	14	29	65
Anti-HBs sérico (UI/L)	38,17	8,78	15,20	551,80	2,19	6,82	217,06	10,00	51,16	9,02
Proliferação (%)										
50 ng/mL HBsAg	42,43	50,98	52,49	52,27	28,70	67,33	50,28	54,07	57,08	57,74
100 ng/mL HBsAg	37,45	46,38	45,33	48,18	11,96	47,78	38,22	35,92	41,39	49,90
300 ng/mL HBsAg	43,02	74,83	50,54	41,13	14,51	39,71	36,15	36,11	36,67	34,41
1000 ng/mL HBsAg	36,85	42,23	42,95	46,81	11,64	35,68	27,87	39,81	26,08	37,09
1500 ng/mL HBsAg	35,65	41,57	21,47	57,45	10,36	36,29	38,79	38,88	33,08	37,85
PHA 1%	11,75	-3,50	-13,66	-8,63	18,02	17,74	10,16	17,22	28,35	23,51

Proliferação linfocitária em suspensões cultivadas na densidade de 4×10^6 células/mL, estimuladas com diferentes concentrações de HBsAg e PHA 1% durante 7 dias. Abreviaturas: F= feminino, M= masculino.

Voluntário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo	F	F	F	M	M	F	M	M	F	F
Idade (anos)	27	22	19	22	15	61	57	14	29	65
Anti-HBs sérico (UI/L)	38,17	8,78	15,20	551,80	2,19	6,82	217,06	10,00	51,16	9,02
Proliferação (%)										
50 ng/mL HBsAg	33,15	26,84	26,61	23,76	64,68	55,27	63,00	66,03	52,55	61,79
100 ng/mL HBsAg	6,57	-0,89	12,81	-10,49	27,73	28,39	20,83	4,59	16,21	3,31
300 ng/mL HBsAg	-7,52	-0,27	9,57	-11,10	10,95	22,49	6,65	-8,59	18,67	-20,90
1000 ng/mL HBsAg	-19,11	3,28	2,88	-37,57	14,38	11,60	9,14	-18,09	10,59	-24,78
1500 ng/mL HBsAg	4,94	4,45	0,28	-14,88	29,54	23,73	23,69	-8,72	16,21	-20,48
PHA 1%	-33,42	-39,52	-34,50	-45,76	-26,47	-48,06	-40,85	-40,59	-40,94	-36,93

Proliferação linfocitária em suspensões cultivadas na densidade de 4×10^6 células/mL, estimuladas com diferentes concentrações de HBsAg e PHA 1% durante 14 dias. Abreviaturas: F= feminino, M= masculino.

APÊNDICE 3 – Artigo publicado 1

Journal of Virological Methods 193 (2013) 572–578



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet



In vitro lymphocyte stimulation by recombinant hepatitis B surface antigen: A tool to detect the persistence of cellular immunity after vaccination



Andréa do Livramento^a, Janaína Sampaio^b, Júnia Schultz^c,
Keila Zaniboni Siqueira Batista^c, Arício Treitinger^d,
Caio Maurício Mendes de Cordova^b, Celso Spada^{d,*}

^a Post-Graduation Program in Pharmacy, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^b Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Regional University of Blumenau, University Campus, Blumenau, Santa Catarina, Brazil

^c Department of Natural Sciences, Exact and Natural Sciences Center, Regional University of Blumenau, University Campus, Blumenau, Santa Catarina, Brazil

^d Department of Clinical Analysis, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Immune Memory Response Induced In Vitro by Recombinant Hepatitis B Surface Antigen Challenge 13–18 Years After Primary Vaccination

Andréa do Livramento,¹ Júnia Schultz,² Keila Zaniboni Siqueira Batista,² Arício Treitinger,³ Caio Maurício Mendes de Cordova,⁴ and Celso Spada^{3*}

¹Post-Graduation Program in Pharmacy, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

²Department of Natural Sciences, Exact and Natural Sciences Center, Regional University of Blumenau, University Campus, Blumenau, Santa Catarina, Brazil

³Department of Clinical Analysis, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

⁴Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Regional University of Blumenau, University Campus, Blumenau, Santa Catarina, Brazil

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pré-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 1000

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GE/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvam seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

APROVADO

PROCESSO: 1000 **FR:** 367094

TÍTULO: Avaliação da imunidade humoral e celular para o vírus da hepatite B em adolescentes vacinados

AUTOR: Celso Spada, Andréa do Livramento

FLORIANÓPOLIS, 27 de Setembro de 2010.

Coordenador do CEPSH/UFSC

Prof. Washington Portela de Souza
Coordenador do CEP/PRPe/UFSC