



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

CHANDRA CHIAPPIN CARDOSO

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE CIRCULANTES E  
DE CITOCINAS PLASMÁTICAS DE PACIENTES COM CIRROSE  
HEPÁTICA**

FLORIANÓPOLIS

2020



Chandra Chiappin Cardoso

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE CIRCULANTES E DE  
CITOCINAS PLASMÁTICAS DE PACIENTES COM CIRROSE HEPÁTICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em  
Farmácia da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de doutor em  
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Maria Cláudia Santos da Silva  
Coorientador: Prof. Dr. Leonardo de Lucca  
Schiavon

Florianópolis

2020

## Ficha de identificação da obra

Cardoso, Chandra Chiappin

Avaliação das células do sistema imune circulantes e de citocinas plasmáticas de pacientes com cirrose hepática / Chandra Chiappin Cardoso ; orientadora, Maria Cláudia Santos Silva, coorientador, Leonardo de Lucca Schiavon, 2020.

219 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Cirrose hepática. 3. Sistema imune. 4. Citometria de fluxo. I. Silva, Maria Cláudia Santos . II. Schiavon, Leonardo de Lucca . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Chandra Chiappin Cardoso

**Avaliação das Células do Sistema Imune Circulantes e de Citocinas Plasmáticas de Pacientes com Cirrose Hepática**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Roberto José de Carvalho Filho, Dr.  
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Rodolfo Patussi Correia, Dr.  
Albert Einstein - Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

---

Prof. Dr.(a) Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Coordenador(a) do Programa

---

Prof. Dr.(a) Maria Cláudia Santos da Silva  
Orientador(a)

Florianópolis, 2020.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste Doutorado.

Aos meus pais, ao meu noivo e à minha família, por todo incentivo na realização de mais uma etapa da minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva e ao meu coorientador, Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon. Obrigada pelos ensinamentos, incentivo e confiança depositada.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar esta tese.

À chefia e aos colegas da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas pelo apoio e compreensão, em especial às minhas amigas e colegas Camila Matiollo, Íris M. S. Pirath e Heloísa Z. Costa. É um imenso prazer compartilhar o dia a dia com vocês! Um agradecimento especial também à equipe do Setor de Coleta do Laboratório.

À toda a equipe do Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia do HU-UFSC pelo auxílio na seleção de pacientes e coleta de dados clínicos, em especial à Dra. Vivian S. Menegassi, que me recebeu todas às quintas-feiras por um ano em seu consultório no ambulatório da cirrose.

Aos meus colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH), em especial à Carolina H. J. Pereira, que me ajudou no processamento das amostras.

À doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Rosângela M. Gonçalves pela ajuda com os experimentos de dosagens de citocinas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia UFSC e demais órgãos. Aos coordenadores, professores e secretários, que contribuíram para a minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho. Um agradecimento especial às Professoras Cláudia Regina dos Santos e Ana Carolina Rabello de Moraes.

E principalmente, aos pacientes e seus familiares, que consentiram em participar da pesquisa.

A colaboração de todos foi fundamental! Obrigada!





## RESUMO

A cirrose é consequência de uma agressão hepática crônica. Durante a progressão da doença, existe um desequilíbrio importante no sistema imune, denominado disfunção imune associada à cirrose (DIAC). Os objetivos deste estudo foram desenvolver e validar um painel de oito cores de anticorpos monoclonais para detectar e analisar as células do sistema imune circulantes de pacientes com cirrose hepática e avaliar as concentrações de citocinas plasmáticas nesse grupo de indivíduos. Para isso, foram incluídos pacientes com descompensação aguda (DA) da cirrose hospitalizados na Emergência do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU UFSC), pacientes com cirrose estável (CE) em acompanhamento ambulatorial e controles saudáveis (CS). Amostras de sangue periférico com o anticoagulante EDTA/K3 foram processadas e os equipamentos FACS Canto II e XE 2100 foram utilizados. A dosagem de citocinas plasmáticas foi realizada pelo kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA). Os resultados foram comparados a dados clínicos e laboratoriais. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Depois de desenvolvido e validado, o painel de anticorpos monoclonais foi utilizado para avaliar as células do sistema imune circulantes de 39 pacientes DA, 29 pacientes CE e 30 CS. Os pacientes cirróticos diferem dos CS por apresentarem linfopenia importante e uma razão de células T CD4<sup>+</sup>/ T CD8<sup>+</sup> aumentada. No compartimento de células B, observou-se a presença de maiores quantidades de células B naïve e menores de B de memória CD27<sup>+</sup>. Foram observadas maiores porcentagens de monócitos CD62L<sup>+</sup> e menor expressão de HLA-DR na superfície dos monócitos clássicos (cMo). Concentrações mais elevadas de IL-6 e IL-10 foram encontradas em pacientes cirróticos. Quando os pacientes cirróticos foram comparados, o grupo DA apresentou maiores porcentagens de neutrófilos e de neutrófilos imaturos, além de linfopenia pronunciada. Dentre os linfócitos T, houve aumento de células T CD8<sup>+</sup> efetoras terminais e de células T regulatórias de memória. Além disso, houve aumento de cMo e diminuição de células dendríticas (DCs) circulantes. Dentro do compartimento B, o grupo DA apresentou maiores porcentagens de células B *class-switched* (CS) CD27<sup>neg</sup> e de plasmablastos. Hepatopatia avançada e complicações clínicas foram associadas a alterações nos subtipos de células B (maior quantidade de células de memória) e de monócitos (aumento de cMo), além de diminuição importante de DCs. A síndrome ACLF foi associada ao aumento de neutrófilos, de células B CS, de IL-6 e de IL-10; e à diminuição de DCs. Pela análise de regressão logística, os parâmetros IL-10, células B CS e CS CD27<sup>neg</sup> foram independentemente associados à ACLF. No ponto de corte de 4,7%, as células CS CD27<sup>neg</sup> foram capazes de prever ACLF. A análise da probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes do grupo DA mostrou que, dentro do compartimento monocítico, as porcentagens de cMo maiores que 90%, de monócitos intermediários (iMo) menores ou iguais a 5,7%, e de macrófagos tissulares (TiMas) menores que 8,6% foram capazes de prever mortalidade em 90 dias. Enquanto que porcentagens de células B transicionais, dentro do compartimento B, menores que 1,3% foram capazes de prever mortalidade em 365 dias. Pela análise dos resultados do presente estudo, é possível concluir que células circulantes e citocinas de pacientes com cirrose estão alteradas quando comparados a indivíduos saudáveis, e que essas alterações apresentam fenótipos distintos em pacientes com doença estável e avançada. A compreensão da deficiência imunológica da cirrose hepática e a detecção de biomarcadores podem permitir o desenvolvimento de melhores abordagens terapêuticas e a detecção de pacientes que provavelmente se beneficiariam de imunoterapia.

**Palavras-chave:** Cirrose hepática. Sistema imune. Citometria de fluxo.



## ABSTRACT

Liver cirrhosis is caused by chronic liver injury. The condition may lead to an imbalance of the immune system called cirrhosis-associated immune dysfunction (CAID). The aim of this study was to design and validate an eight-color panel to detect and analyze the immune cells of patients with cirrhosis, and to evaluate pro and anti-inflammatory cytokines levels. This study included 39 consecutive adult patients with acute decompensation (AD) of cirrhosis hospitalized at the University Hospital of the Federal University of Santa Catarina, cirrhotic patients with stable disease (SC), and healthy controls (HC). Whole blood samples collected with EDTA/K3 were processed and analyzed by FACS Canto II and XE 2100 equipments. Moreover, the measurement of plasma cytokine levels was performed using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) kit. All the results acquired in this study were correlated with clinical and laboratorial variables. *P* values  $\leq 0.05$  were considered of statistical significance. The eight-color antibody panel was used to evaluate the immune cells of a total of 39 AD, 29 SC, and 30 HC. Cirrhotic patients differ from HC due to significant lymphopenia, and an increased T CD4<sup>+</sup>/TCD8<sup>+</sup> ratio. Considering B cells, both SC and AD groups had higher percentages of naïve B cells and lower frequencies of CD27<sup>+</sup> memory B cells than the control. Besides that, cirrhotic patients had more CD62L<sup>+</sup> monocytes and their classical monocytes (cMo) express lower levels of HLA-DR. Higher levels of IL-6 and IL-10 were detected in both SC and AD groups. When cirrhotic patients were compared, the AD group presented higher quantities of neutrophils and immature neutrophils, and a profound lymphopenia. Considering T cells, AD had more terminal effector T CD8<sup>+</sup> cells and an important increase in memory T regulatory cells. Moreover, AD had more cMo and less dendritic cells (DCs) than SC. Considering B cells, AD presented higher percentages of class-switched (CS) CD27<sup>neg</sup> B cells and plasmablasts. Advanced liver disease and clinical complications were associated with alterations in B cells (more memory B cells) and in monocytes (more cMo), besides with lower DCs counts. ACLF syndrome was associated with an increase in neutrophils, in CS B cells, in IL-6 and IL-10, and with a reduction of DCs. Logistic regression analysis showed that IL-10, B cells CS and CS CD27<sup>neg</sup> were independently associated with ACLF. At the cutoff of 4.7%, CS CD27<sup>neg</sup> were able to predict ACLF. The analysis of the Kaplan-Meier survival probability of AD patients showed that, within monocyte compartment, the percentages of cMo greater than 90%, intermediate monocytes (iMo) equal to or lower than 5.7%, and tissular macrophages (TiMas) lower than 8.6% were able to predict mortality in 90 days. While percentages of transitional B cells, within B-cell compartment, lower than 1.3% were able to predict mortality within 365 days. Through the analysis of the results of the present study, it is possible to conclude that circulating cells and cytokines of patients with cirrhosis are altered when compared to healthy individuals, and that these alterations show different phenotypes in patients with stable and advanced disease. The understanding of the immune deficiency of liver cirrhosis and the detection of useful biomarkers may allow the development of improved therapeutic approaches and the detection of patients that most likely would benefit from immunotherapy.

**Keywords:** Cirrhosis. Immune system. Flow cytometry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização anatômica do fígado.....	34
Figura 2 - Unidade funcional do fígado. ....	35
Figura 3 - Composição celular do fígado. ....	38
Figura 4 - História natural da doença hepática crônica. ....	43
Figura 5 - Evolução natural da cirrose hepática. ....	46
Figura 6 - Ascite e síndrome hepatorenal.....	49
Figura 7 - Fenótipo inflamatório e imunodeficiente da cirrose hepática.....	55
Figura 8 - Inflamação associada à cirrose hepática. ....	57
Figura 9 – Fenótipo dos principais subtipos de células B circulantes. ....	67
Figura 10 - Subtipos de células B circulantes classificados de acordo com a sua maturação..	69
Figura 11 - Subtipos de monócitos circulantes e as teorias de diferenciação e de migração. ..	71
Figura 12 - Exemplo de titulação de anticorpo monoclonal.....	81
Figura 13 - Exemplo de controle FMO. ....	82
Figura 14 - Marcação das células B (CD19 <sup>+</sup> ) com dois procedimentos: PBMC e múltiplas lavagens com PBS BSA 0,2%. ....	84
Figura 15 - Histogramas de distribuição das sete populações de esferas em função de suas diferentes intensidades de fluorescência.....	90
Figura 16 - Visão geral da estratégia experimental. ....	93
Figura 17 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 1 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável. ....	97
Figura 18 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 2 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável. ....	99
Figura 19 - CD62L <i>versus</i> CD45RA e CCR7 (CD197) <i>versus</i> CD45RA para identificar os subtipos de células T naïve, memória central, memória efetora e efetora terminal CD45RA <sup>+</sup> . ....	100
Figura 20 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 3 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável. ....	101
Figura 21 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 4 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável. ....	102
Figura 22 - Comparação entre CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>fraco</sup> e CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD127 <sup>fraco</sup> para identificar as células T reg. Fusão de arquivos de dez indivíduos saudáveis.....	102

Figura 23 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 5 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável. ....	103
Figura 24 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 6 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável. ....	104
Figura 25 - Pacientes com cirrose hepática incluídos no estudo. ....	105
Figura 26 – Principais motivos de internação dos pacientes hospitalizados com descompensação aguda da cirrose. ....	108
Figura 27 - Celularidade relativa das amostras. ....	109
Figura 28 - Celularidade absoluta das amostras. ....	111
Figura 29 - Distribuição dos subtipos de linfócitos T pela expressão de CD4, CD8 e TCR GD nos grupos do estudo. ....	112
Figura 30 - Distribuição dos linfócitos T de acordo com a maturação. ....	113
Figura 31 - Expressão de CD28 nos linfócitos T. ....	114
Figura 32 - Expressão de CD57 nos linfócitos T. ....	115
Figura 33 – Quantidades relativas de células T regulatórias. ....	116
Figura 34 - Quantidades relativas e absolutas dos subtipos de células B. ....	118
Figura 35 - Comparação do compartimento de células B entre os grupos do estudo pela análise viSNE e <i>heatmap</i> . ....	119
Figura 36 - Quantidades relativas de células NK e do compartimento NKT. ....	120
Figura 37 - Quantidades relativas de neutrófilos maduros e imaturos e a expressão de CD62L. ....	121
Figura 38 - Quantidades relativas dos subtipos de monócitos nos grupos do estudo. ....	123
Figura 39 - Expressão de HLA-DR nos subtipos de monócitos. ....	125
Figura 40 - Expressão de CD62L nos monócitos. ....	126
Figura 41 - Valores relativos e absolutos de células dendríticas. ....	127
Figura 42 - Dosagem de citocinas plasmáticas. ....	128
Figura 43 - Células imune circulantes e as categorias do escore MELD. ....	133
Figura 44 - Células imune circulantes e as categorias do escore Child-Pugh A, B e C. ....	134
Figura 45 - Subtipos de monócitos em pacientes cirróticos com e sem ascite. ....	135
Figura 46 - Células imune circulantes em pacientes cirróticos com e sem encefalopatia hepática. ....	137
Figura 47 - Células imune circulantes em pacientes cirróticos descompensados com e sem ACLF. ....	141

Figura 48 - Curva ROC das porcentagens de células B CS CD27 <sup>neg</sup> para a predição de ACLF entre pacientes com descompensação aguda da cirrose. ....	143
Figura 49 – Concentrações plasmáticas de IL-6 de pacientes cirróticos de acordo com os escores de Child-Pugh e de MELD. ....	144
Figura 50 - Curvas ROC das porcentagens dos subtipos de monócitos para a predição de mortalidade em 90 dias entre pacientes com descompensação aguda da cirrose. ....	148
Figura 51 - Sobrevivência cumulativa em 90 dias de pacientes hospitalizados por descompensação aguda da cirrose de acordo com os subtipos de monócitos. ....	149
Figura 52 - Curva ROC da razão N/L para a predição de mortalidade em 90 dias entre pacientes com descompensação aguda da cirrose. ....	150
Figura 53 - Sobrevivência cumulativa em 90 dias de pacientes hospitalizados por descompensação aguda da cirrose de acordo com a razão N/L. ....	151
Figura 54 - Curva ROC das porcentagens das células B transicionais para a predição de mortalidade em 365 dias entre pacientes com descompensação aguda da cirrose. ....	153
Figura 55 - Sobrevivência cumulativa em 365 dias de pacientes hospitalizados por descompensação aguda da cirrose de acordo com as células B transicionais. ....	154





## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escore CLIF-SOFA.....	47
Quadro 2 - Classificação de Child-Pugh. ....	53
Quadro 3 - Alterações associadas à inflamação observadas nas células do sistema imune circulantes em pacientes cirróticos. ....	58
Quadro 4 - Alterações associadas à imunodeficiência observadas nas células do sistema imune circulantes em pacientes cirróticos. ....	59
Quadro 5 - Comparação de algumas alterações no sistema imune no fenótipo pró-inflamatório e imunodeficiente da cirrose. ....	60
Quadro 6 - Citocinas abordadas no presente estudo e sua função predominante.....	73
Quadro 7 - Composição do painel de anticorpos.....	95



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de células a serem salvas no software de aquisição por tubo. ....	83
Tabela 2 - Volume de amostra de acordo com a contagem de linfócitos e de leucócitos. ....	83
Tabela 3 - Intensidade de fluorescência mediana (IFMed) e coeficiente de variação (CV) do Tubo 1 (arquivo de 30 controles saudáveis) comparados aos resultados de avaliação de qualidade do tubo LST do Euroflow. ....	98
Tabela 4 - Características dos pacientes com cirrose estável e com descompensação aguda da cirrose incluídos no estudo. ....	107
Tabela 5 - Distribuição dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> e razão T CD4 <sup>+</sup> / T CD8 <sup>+</sup> . ....	112
Tabela 6 - Subtipos de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> que apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos do estudo. ....	114
Tabela 7 - Expressão da molécula HLA-DR pelos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> . ....	116
Tabela 8 - Células T reg de memória nos grupos do estudo. ....	117
Tabela 9 - Neutrófilos imaturos dos grupos do estudo. ....	122
Tabela 10 - Subtipos de monócitos nos grupos do estudo. ....	123
Tabela 11 - Correlação de variáveis do sistema imune com variáveis laboratoriais de pacientes com cirrose hepática. ....	130
Tabela 12 - Correlação dos resultados das células imune circulantes e a pontuação dos escores MELD e Child-Pugh de pacientes com cirrose hepática. ....	132
Tabela 13 - Células imune circulantes em pacientes cirróticos de acordo com a presença de ascite e de encefalopatia hepática. ....	136
Tabela 14 - Quantidades das células imune circulantes em pacientes cirróticos internados por descompensação aguda com e sem a presença de hemorragia digestiva alta. ....	140
Tabela 15 – Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com descompensação aguda da cirrose diagnosticados ou não com ACLF. ....	142
Tabela 16 - Concentrações plasmáticas das citocinas IL-6 e IL-10 em pacientes cirróticos classificados de acordo com os escores prognósticos, complicações clínicas e ACLF. ....	145
Tabela 17 - Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com descompensação aguda da cirrose de acordo com a sobrevida em 90 dias. ....	147
Tabela 18 - Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com descompensação aguda da cirrose de acordo com a sobrevida em 365 dias. ....	152



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACLF Insuficiência Hepática Crônica Agudizada  
AF647 Alexa Fluor 647  
ALT Alanina Aminotransferase  
APC Aloficocianina  
APCH7 Aloficocianina H7  
APCs Células Apresentadoras de Antígenos  
AR Ascite Refratária  
AST Aspartato Aminotransferase  
BAFF Fator de Ativação de Células B  
BCR Receptor de Células B  
BHE Barreira Hemato-Encefálica  
BM B de Memória  
BN B Naïve  
B reg B Regulatória  
BSA Albumina do Soro Bovino  
BV421 Brilliant Violet 421  
CBA Cytometric Bead Array  
cDCs Células Dendríticas Clássicas  
CEPSH Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos  
CF Citometria de Fluxo  
CG Centro Germinativo  
CHC Carcinoma Hepatocelular  
CHE Células Hepáticas Estreladas  
CK Células de Kupffer  
CM Memória Central  
cMo Monócitos Clássicos  
CMP Progenitor Mieloide Comum  
CMV Citomegalovírus  
CS-BM Do inglês, *Class Switched*-BM  
CTLA4 Proteína Antígeno-4 Associado ao Linfócito T Citotóxico  
CV Coeficiente de Variação

CVID Imunodeficiência Comum Variável  
DAMPs Padrões Moleculares Associados ao Dano  
DCs Células Dendríticas  
DIAC Disfunção Imune Associada à Cirrose  
DM Diabetes Mellitus  
EBV Vírus Epstein-Barr  
EDTA/K3 Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético/Tripotássico  
EH Encefalopatia Hepática  
EHNA Esteato-Hepatite Não Alcoólica  
ELISA Ensaio de Imunoabsorção Enzimática  
EM Efetora de Memória  
EMRA Efetora Terminal CD45RA<sup>+</sup>  
EROs Espécies Reativas de Oxigênio  
FiO<sub>2</sub> Fração de Oxigênio Inspirado  
FITC Isotiocianato de Fluoresceína  
FMO Do inglês, *Fluorescence Minus One*  
GALT Tecido Linfoide Associado ao TGI  
GGT Gama Glutamiltransferase  
GM-CSF Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos  
GMP Progenitor de Neutrófilos e Monócitos  
HBV Vírus da Hepatite B  
HCV Vírus da Hepatite C  
HIV Vírus da Imunodeficiência Humana  
HLA Antígeno Leucocitário Humano  
HP Hipertensão Portal  
HR Do inglês, *Hazard Ratio*  
HU UFSC Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina  
IC Intervalo de Confiança  
IFM Intensidade de Fluorescência Média  
IFMed Intensidade de Fluorescência Mediana  
IFN Interferon  
Ig Imunoglobulina  
IL Interleucina

IM Índice de Marcação  
iMo Monócitos Intermediários  
iNKT NKT Invariantes  
ITU Infecções do Trato Urinário  
LEVE Ligadura Elástica de Varizes Esofágicas  
LES Lupus Eritematoso Sistêmico  
Lin Linhagem  
LNM Linfonodos Mesentéricos  
LSEC Células do Endotélio Sinusoidal  
LST Do inglês, *Lymphoid Screening Tube*  
LPS Lipopolissacarídeos  
MAIT Células T Invariantes Associadas à Mucosa  
MALT Tecidos Linfóides Associados à Mucosa  
MCP-1 Proteína Quimiotática de Monócitos tipo 1  
mDCs Células Dendríticas Mielóides  
MDP Progenitor de Monócitos e DCs  
MELD Do inglês, *Model for End-Stage Liver Disease*  
MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade  
MO Medula Óssea  
Mo-DCs Células Dendríticas Derivadas de Monócitos  
N Naïve  
ncMo Monócitos Não-Clássicos  
NK Do inglês, *Natural Killer*  
NS-BM Do inglês, *Non Switched-BM*  
OD Do inglês, *Odds Ratio*  
OMS Organização Mundial da Saúde  
PacB Pacific Blue  
PacO Pacific Orange  
PAMPs Padrões Moleculares Associados a Patógenos  
PaO2 Pressão Parcial de Oxigênio Arterial  
PBE Peritonite Bacteriana Espontânea  
PBMC Células Mononucleares do Sangue Periférico  
PBS Tampão Fosfato-Salino

PCR Proteína C Reativa  
PD-1 Proteína de Morte Programada 1  
pDCs Células Dendríticas Plasmocitoides  
PD-L1 Ligante da Proteína de Morte Programada 1  
PE Ficoeritrina  
PECy7 Ficoeritrina Cy7  
PerCP Cy5-5 Peridina-Clorofila-Proteína  
PGE2 Prostaglandina E2  
PVP Pressão Venosa Portal  
RANTES Proteína Regulada por Ativação, Expressa e Secretada por Células T Normais  
ROC Do inglês, *Receiver Operating Characteristics*  
RNI Razão Normalizada Internacional  
RRPs Receptores de Reconhecimento de Padrões  
SER Sistema Retículo Endotelial  
SHR Síndrome Hepatorrenal  
SP Sangue Periférico  
SpO2 Oximetria de Pulso  
SUS Sistema Único de Saúde  
TAP Tempo e Atividade da Protrombina  
Tc Células T Citotóxicas  
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TCR Receptor de Células T  
TCR AB Receptor de Células T Alpha Beta  
TCR GD Receptor de Células T Gamma Delta  
TGI Trato Gastrointestinal  
TGF Fator de Crescimento Transformador  
Th Células T Auxiliadoras  
TiMas Macrófagos Tissulares  
TIPs Do inglês, *Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt*  
TLRs Do inglês, *Toll-Like Receptors*  
TNF Fator de Necrose Tumoral  
T reg T Regulatórias  
TSLT Taxa de Sobrevida Livre de Transplante



USG Ultrassonografia

UTI Unidade de Terapia Intensiva

VE Varizes Esofágicas

VPN Valor Preditivo Negativo

VPP Valor Preditivo Positivo



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>33</b>
2.1	FÍGADO.....	33
2.1.1	Anatomia hepática.....	33
2.1.2	Função hepática.....	35
2.1.3	O fígado como um órgão imunológico.....	36
2.1.3.1	Imunidade inata .....	36
2.1.3.2	Imunidade adaptativa .....	39
2.1.3.3	Imunotolerância e ativação.....	40
2.2	CIRROSE HEPÁTICA .....	41
2.2.1	Causas e epidemiologia .....	44
2.2.2	Evolução natural da cirrose.....	45
2.2.3	Complicações da cirrose hepática .....	47
2.2.3.1	Varizes esofágicas .....	47
2.2.3.2	Ascite.....	48
2.2.3.3	Infecções.....	49
2.2.3.4	Encefalopatia hepática.....	50
2.2.3.5	Outras complicações.....	51
2.2.4	Prognóstico da cirrose.....	52
2.2.4.1	Escore Child-Pugh.....	52
2.2.4.2	Escore MELD.....	53
2.3	CIRROSE E O SISTEMA IMUNE.....	54
2.3.1	Alterações imune locais e sistêmicas associadas à inflamação .....	56
2.3.2	Alterações imune associadas à imunodeficiência .....	58
2.3.3	DIAC como alvo terapêutico .....	61

2.4	CÉLULAS IMUNE CIRCULANTES .....	62
2.4.1	<b>Neutrófilos</b> .....	<b>63</b>
2.4.2	<b>Linfócitos T</b> .....	<b>63</b>
2.4.3	<b>Linfócitos B</b> .....	<b>66</b>
2.4.4	<b>Células NK e NKT</b> .....	<b>69</b>
2.4.5	<b>Monócitos e células dendríticas</b> .....	<b>70</b>
2.5	CITOCINAS .....	72
2.6	A CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAR O SISTEMA IMUNE .....	74
2.7	JUSTIFICATIVA .....	75
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>77</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	77
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	77
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>79</b>
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	79
4.2	DESENHO E VALIDAÇÃO DO PAINEL DE ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	79
4.3	POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM .....	84
4.4	PROCEDIMENTOS E VARIÁVEIS EM ESTUDO .....	86
4.5	PROTOSCOLOS DE MARCAÇÃO E AQUISIÇÃO DE AMOSTRAS (IMUNOFENOTIPAGEM) .....	87
4.6	DOSAGEM DE CITOCINAS (CBA) .....	90
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	91
4.8	ASPECTOS ÉTICOS .....	92
4.9	VISÃO GERAL DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL .....	92
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>95</b>
5.1	PARTE 1 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO PAINEL DE ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	95
5.2	PARTE 2 – AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS IMUNE CIRCULANTES E DE CITOCINAS PLASMÁTICAS DE PACIENTES COM CIRROSE HEPÁTICA .....	105

5.2.1	Características da casuística.....	105
5.2.2	Celularidade total .....	109
5.2.3	Linfócitos T .....	111
5.2.4	Células B.....	117
5.2.5	NK e NKT.....	120
5.2.6	Neutrófilos.....	121
5.2.7	Monócitos .....	122
5.2.8	Células dendríticas .....	126
5.2.9	Citocinas.....	128
5.2.10	Relação das variáveis do sistema imune e laboratoriais .....	130
5.2.11	Relação das variáveis do sistema imune e clínicas .....	131
5.2.12	Relação das variáveis do sistema imune e ACLF .....	140
5.2.13	Relação das variáveis do sistema imune e mortalidade .....	146
6	CONCLUSÕES .....	157
7	PERSPECTIVAS.....	159
	REFERÊNCIAS .....	161
	APÊNDICE A – Instrumento de Coleta de Dados do Grupo Emergência .....	181
	APÊNDICE B – Instrumento de Coleta de Dados do Grupo Ambulatório.....	187
	APÊNDICE C – Questionário aplicado aos controles saudáveis .....	193
	APÊNDICE D – Protocolo de marcação de superfície e intracitoplasmática (fator de transcrição).....	195
	APÊNDICE E – Protocolo de separação das células mononucleares (PBMC) .....	199
	APÊNDICE F – Protocolo de marcação de citocinas (CBA).....	201
	APÊNDICE G – Informações técnicas dos reagentes .....	203
	APÊNDICE H – Custo do painel proposto. ....	205
	APÊNDICE I – Frequências das células imune circulantes caracterizadas por cada tubo em 30 controles saudáveis. ....	207
	APÊNDICE J – Frequências das células imune circulantes nos grupos do estudo.....	209
	ANEXO A - Certificado de Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) .....	213
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	215

<b>ANEXO C – Produção científica e participação em eventos. ....</b>	<b>219</b>
--	------------

## 1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, as doenças hepáticas são responsáveis por aproximadamente 2 milhões de mortes por ano, sendo metade delas devido a complicações clínicas da cirrose hepática e a outra metade em decorrência de hepatite viral ou de carcinoma hepatocelular (ASRANI et al., 2019). No Brasil, entre os anos de 2010 e 2018 essas doenças foram responsáveis por uma média de 10 mil óbitos por ano, desses, 9,3 mil foram devido à cirrose hepática (Sistema de Informações Hospitalares do SUS - SIH/SUS, 2019).

Políticas de saúde promovidas pelo governo brasileiro e pela Sociedade Brasileira de Hepatologia, como as campanhas de testes rápidos para hepatites B e C, a conscientização do consumo de bebidas alcoólicas e a vacinação para hepatite B, têm ganhado importância e espaço nos últimos anos a fim de tentar reduzir a incidência de doenças hepáticas crônicas. Todavia, apesar desses esforços, as doenças hepáticas continuam representando um importante problema de saúde pública em função das complicações clínicas associadas, que levam a altas taxas de internação e à elevada taxa de mortalidade (BLATT, 2011; CASTELO et al., 2007).

A cirrose hepática é consequência de uma agressão hepática crônica, que leva à fibrose tecidual difusa com transformação nodular e perda da arquitetura e da função normal do fígado (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008). Durante sua evolução, o sistema imune é profundamente afetado e esse desequilíbrio está altamente associado a complicações clínicas, à gravidade da doença e à mortalidade. A cirrose hepática em estágios iniciais é marcada por um perfil inflamatório sistêmico, e em estágios mais avançados é caracterizada por apresentar perfil imunodeficiente. Essa disfunção do sistema imune em pacientes cirróticos é denominada disfunção imune associada à cirrose (DIAC). Estudos recentes têm ressaltado a importância de se detectar a DIAC, em especial a imunodeficiência, pois a última favorece o desenvolvimento de complicações clínicas mais graves, como infecções bacterianas (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014; IRVINE et al., 2019; NOOR; MANORIA, 2017; SIPEKI et al., 2014). Além disso, a DIAC tem sido o foco de estudos utilizando a imunoterapia para tratar pacientes com cirrose avançada, a fim de estimular o sistema imune e torná-lo responsivo, ou abrandar as consequências de um perfil imune exageradamente inflamatório nos casos em que ocorre insuficiência hepática crônica agudizada (ACLF) (DUAN et al., 2013; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar células imune circulantes e citocinas de pacientes cirróticos atendidos no ambulatório e internados na emergência do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU UFSC). O presente trabalho faz parte de um projeto maior desenvolvido nesse hospital com pacientes cirróticos, cujo principal objetivo é a identificação de biomarcadores específicos que possam auxiliar na detecção de subgrupos de pacientes cirróticos com maior risco de desenvolver complicações e de evoluir a óbito (AMARAL, 2018; DA SILVA, 2018; FISCHER, 2016).



## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 FÍGADO**

#### **2.1.1 Anatomia hepática**

O fígado é o maior órgão do organismo de um indivíduo adulto, pesa cerca de 1,5 kg e recebe dupla irrigação sanguínea: 1) pela veia porta, responsável por 80% do suprimento e que irriga o órgão com sangue pobre em oxigênio, e 2) pela artéria hepática, que supre o fígado com sangue rico em oxigênio (NEMETH; BAIRD; O'FARRELLY, 2009; RODÉS et al., 2007). A veia porta é derivada da veia esplênica e da veia mesentérica superior e inferior. Portanto, recebe o sangue que drena da circulação esplâncnica para o fígado. O sangue portal é rico tanto em nutrientes quanto em antígenos alimentares e patógenos. A localização estratégica do fígado e da veia porta em contato com a parte superior do intestino sugere a importante função de eliminar as bactérias que porventura atravessam a mucosa intestinal (KUBES; JENNE, 2018).

Ao entrar no fígado, o sangue oriundo da veia porta e o sangue da artéria hepática se misturam e fluem pelos sinusoides, onde a velocidade do fluxo e a pressão sanguínea diminuem. Essa redução do fluxo sanguíneo facilita o contato das células de Kupffer (CK) e das células do endotélio sinusoidal (LSEC) com os antígenos, como patógenos e moléculas, que são eliminados. Após passar por essa depuração, o sangue sai do fígado pelas veias hepáticas (KUBES; JENNE, 2018) (Figura 1).

Figura 1 - Organização anatômica do fígado.

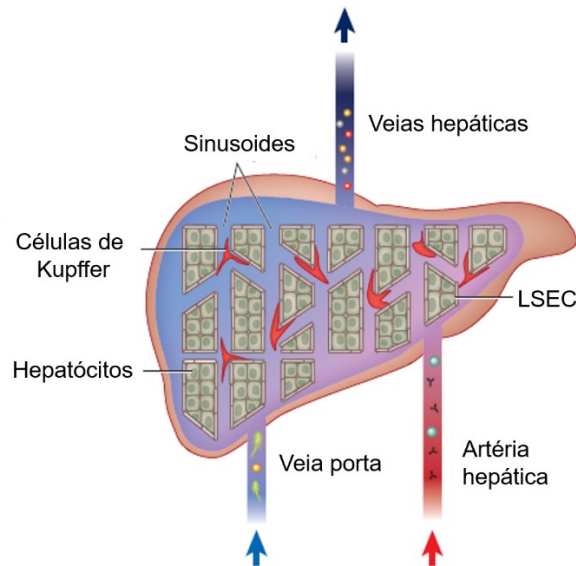
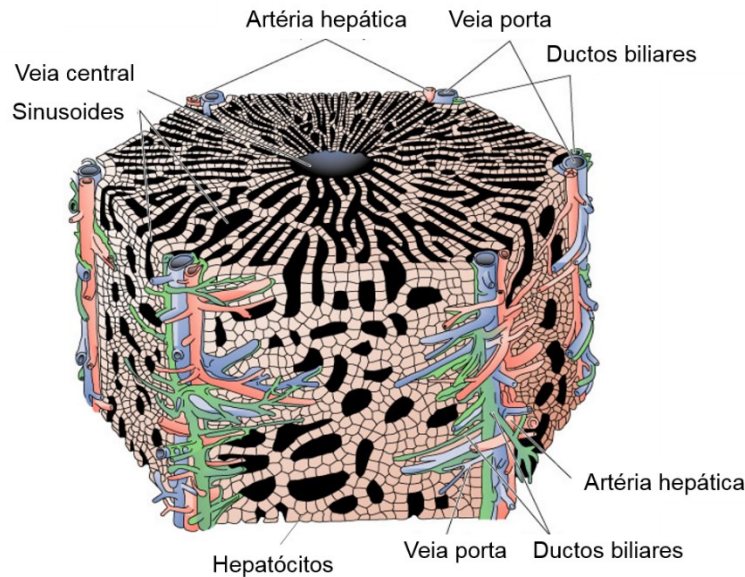


Figura esquemática da organização anatômica do fígado. Ao entrar no fígado, o sangue oriundo da veia porta e o sangue da artéria hepática se misturam e fluem pelos sinusoides, onde ocorre depuração de patógenos e de moléculas. Após passar por essa depuração, o sangue sai do fígado pela veia hepática. LSEC: células do endotélio sinusoidal. Fonte (adaptada): KUBES; JENNE, 2018.

Existem diferentes tipos de células no fígado, tais como: os hepatócitos, que constituem cerca de 70% da população celular, as LSEC, as CK, os linfócitos intra-hepáticos e as células hepáticas estreladas (CHE) (RACANELLI; REHERMANN, 2006). Os hepatócitos se organizam em placas hepatocelulares orientadas radialmente que formam unidades chamadas lóbulos hepáticos. As placas hepatocelulares podem ser consideradas as unidades funcionais do fígado. Associada à formação das placas, outra característica anatômica importante desse órgão é a organização dos vasos formados pela tríade portal, sinusoides e veia central. A tríade portal é composta por terminações da veia porta e da artéria hepática, além de um ducto biliar que coleta a bile produzida pelos hepatócitos. Os sinusoides são capilares que levam o sangue da periferia para o centro dos lóbulos, até a veia central, a qual drena o sangue à veia hepática e à veia cava inferior (RODÉS et al., 2007) (Figura 2).

Figura 2 - Unidade funcional do fígado.



A figura mostra um lóbulo hepático, a unidade funcional do fígado. As triades portais terminais (artéria hepática, veia porta e ductos biliares) estão presentes em cada ângulo e liberam ramos para as laterais do lóbulo. As lâminas únicas de hepatócitos, rodeadas por sinusoides, são alinhadas radialmente em direção a uma vênula hepática central. Fonte (adaptada): MISODOR, 2019.

### 2.1.2 Função hepática

O fígado é considerado um dos órgãos centrais do metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídios e compostos exógenos (NEMETH; BAIRD; O'FARRELLY, 2009). Adicionalmente, o fígado sintetiza a maior parte das proteínas circulantes no plasma, como albumina, fatores da coagulação, proteínas do complemento e proteínas de fase aguda; além de estar envolvido no metabolismo e eliminação da bilirrubina (RODÉS et al., 2007). A produção abundante de proteínas que ocorre no fígado é considerada a chave para seu importante papel metabólico (NEMETH; BAIRD; O'FARRELLY, 2009). Por exemplo, a albumina apresenta múltiplas funções como a ligação e o transporte de substâncias, a regulação da função endotelial, além de possuir propriedades antioxidantes e de atuar na regulação da resposta inflamatória (IRVINE et al., 2019).

O fígado também exerce um importante papel imunológico, pois está estrategicamente posicionado para funcionar como uma barreira entre nosso organismo e as toxinas e antígenos presentes no sangue oriundo do trato gastrointestinal (TGI), exercendo a função de depuração

sanguínea. Em seguida, exerce a função de imunotolerância ou de resposta imune (KUBES; JENNE, 2018).

### **2.1.3 O fígado como um órgão imunológico**

Como citado anteriormente, o fígado recebe continuamente grandes quantidades de sangue que vêm do TGI pela veia porta. Assim, uma função importante desse órgão é depurar toxinas, antígenos exógenos e agentes infecciosos. Devido ao contato antigênico contínuo, o fígado deve tolerar a carga imunológica que recebe, a fim de evitar ativação imune exagerada; e por outro lado, deve ser vigilante e ativar o sistema imune quando necessário (INVERNIZZI, 2013). O conceito de que o fígado é um órgão imunotolerante surgiu no âmbito dos transplantes hepáticos alogênicos, pois são melhor tolerados e apresentam menos rejeição do que transplantes alogênicos de outros órgãos, como de rins. A ideia é fortalecida pelo fato de que pacientes transplantados de fígado respondem bem a doses muito baixas de imunossuppressores e podem até mesmo ter o tratamento suspenso (INVERNIZZI, 2013; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016).

A própria organização estrutural do fígado têm implicações importantes na sua função imune, tal como o diâmetro pequeno dos sinusoides com ocorrência frequente de estase, que aumenta o tempo de contato dos linfócitos com as células apresentadoras de antígenos (APCs), e a camada de LSEC com fenestrações e espaços intercelulares, que facilita o extravasamento dos linfócitos até o compartimento subendotelial, chamado espaço de Disse, e hepatócitos subjacentes (RACANELLI; REHERMANN, 2006; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016).

#### **2.1.3.1 Imunidade inata**

O fígado é considerado um órgão crucial para a imunidade inata, pois sintetiza todas as proteínas de fase aguda e a maioria dos componentes do sistema do complemento, das proteínas antimicrobianas, dos fatores de crescimento e das citocinas. Os hepatócitos são as células mais envolvidas na produção desses mediadores inflamatórios, exercendo papel imunológico além de metabólico. Além disso, em condições inflamatórias, os hepatócitos podem expressar

complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e se tornar APCs (KUBES; JENNE, 2018; NEMETH; BAIRD; O'FARRELLY, 2009; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016). Os colangiócitos são células que revestem os canais biliares, expressam diversos receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), produzem citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Ou seja, são a primeira linha de defesa contra patógenos que invadem os canais biliares (NEMETH; BAIRD; O'FARRELLY, 2009).

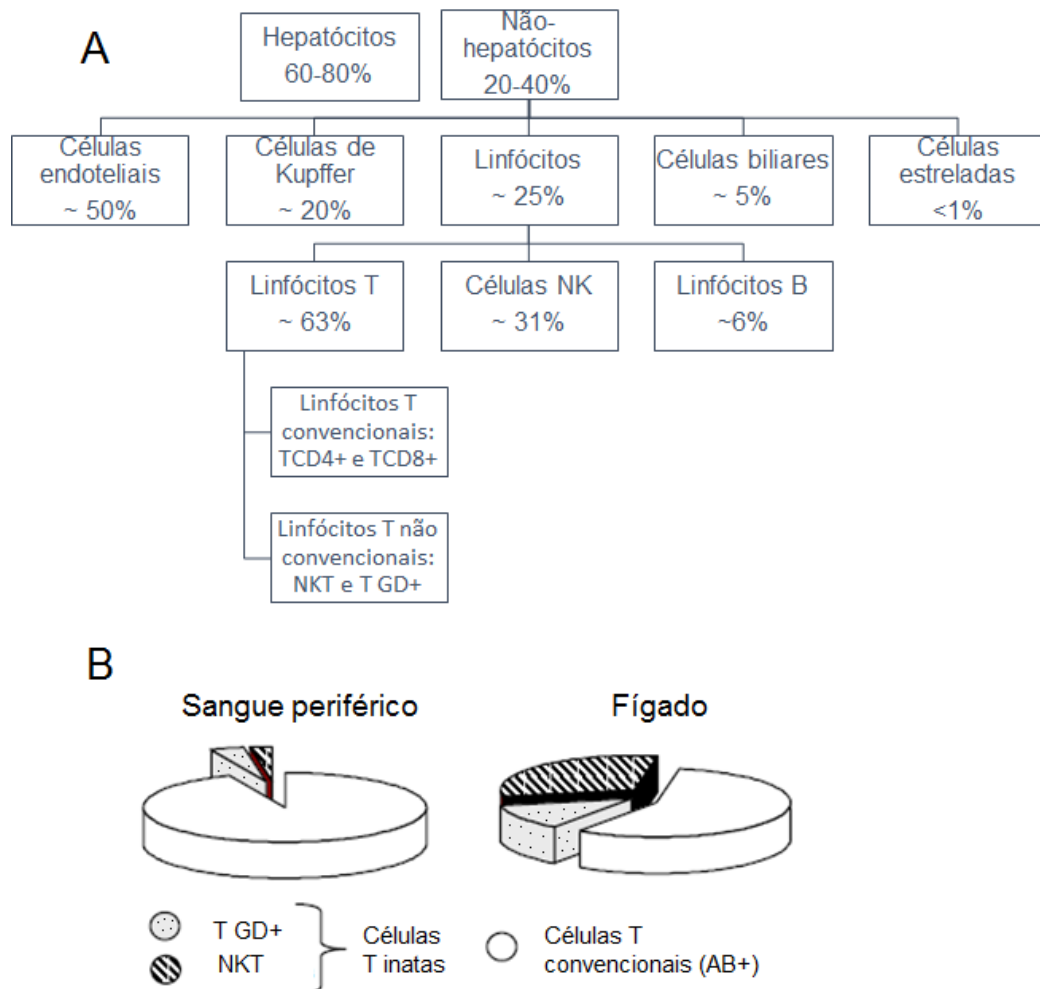
Além disso, o fígado apresenta um sistema retículo endotelial (SER) hepático organizado e com características únicas, formado pelas CK e pelas LSEC (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014). As CK são macrófagos residentes que representam de 20 a 30% da população celular hepática não-parenquimal. Apresentam alta capacidade fagocitária e se localizam em posição estratégica no lado luminal da camada de LSEC para eliminar as endotoxinas e fagocitar microorganismos na condição do fluxo sanguíneo. O acúmulo de CK no lúmen do sinusóide pode bloquear o fluxo sanguíneo, o que gera estase e aumenta o tempo de contato dos linfócitos com as APCs. As CK também são responsáveis pela fagocitose de hepatócitos apoptóticos no espaço de Disse (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014; INVERNIZZI, 2013; RACANELLI; REHERMANN, 2006; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016). Adicionalmente, as CK liberam citocinas importantes para a diferenciação, proliferação e migração de outras células, além de citocinas que induzem imunotolerância. É importante destacar a liberação de fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-10, os quais diminuem a expressão de MHC-II nas LSEC e nas células dendríticas (DCs), e inibem a ativação de células T (RACANELLI; REHERMANN, 2006).

Os neutrófilos são raramente encontrados no parênquima hepático, mas em condições de infecção e/ou inflamação podem ser atraídos por citocinas liberadas pelas CK, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e leucotrienos, em seguida exercem sua atividade fagocítica de bactérias extracelulares (NEMETH; BAIRD; O'FARRELLY, 2009; RACANELLI; REHERMANN, 2006).

Os linfócitos presentes no parênquima hepático são distintos da contrapartida circulante, tanto em função quanto em fenótipo, com maior frequência de células com alta capacidade de vigilância e de defesa, como as células *natural killer* (NK), NKT, T TCR gama-delta (T GD<sup>+</sup>) e células T invariantes associadas à mucosa (INVERNIZZI, 2013; NEMETH; BAIRD; O'FARRELLY, 2009; QUECK et al., 2018; RACANELLI; REHERMANN, 2006). A Figura 3

mostra a composição celular de um fígado saudável e as diferenças entre a população linfocitária do fígado e da circulação periférica.

Figura 3 - Composição celular do fígado.



Painel A: Composição celular de um fígado saudável. Os números indicam a frequência estimada relativo ao total de células hepáticas. Painel B: Diferenças entre o componente de linfócitos T presentes na circulação periférica e no fígado. Fonte (adaptado): NEMETH; BAIRD; O'FARRELY, 2009; RACANELLI; REHERMANN, 2006.

O fígado apresenta a maior população de células NK do organismo (KUBES; JENNE, 2018). A população de células NK hepáticas se destaca por ser constituída 50% por células NK  $CD56^{++}$ , enquanto que esse subtipo representa uma porcentagem muito pequena no sangue periférico (SP) (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016). As NK  $CD56^{++}$  são naïve e mais imaturas, são grandes produtoras de citocinas, apresentam papel citotóxico apenas quando ativadas e podem ter atividade imunorregulatória (POLI et al., 2009).

As células NK varrem o tecido hepático em busca de infecções e de alterações teciduais. Diferente de outras células, elas reconhecem a perda de expressão de MHC-I por células tumorais ou por células infectadas por vírus. Quando a célula NK entra em contato com uma célula que, de forma aberrante, não expressa MHC-I não ocorre a ativação de receptores de inibição, o que gera um sinal de ativação da célula NK com a liberação de grânulos citotóxicos contendo granzima e perforina e, como consequência, ocorre a morte da célula alvo (KUBES; JENNE, 2018).

### 2.1.3.2 Imunidade adaptativa

O fígado também exerce função crucial na regulação homeostática da função imune, pois é um sítio onde ocorre indução de resposta imune adaptativa mediada por APCs e por linfócitos T (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014). No entanto, a geração de uma resposta imune adaptativa integrada não é uma forte característica desse órgão (KUBES; JENNE, 2018).

As principais APCs do fígado são as CK, as LSEC e as DCs intra-hepáticas. Essas células são capazes de apresentar antígenos via MHC-II, como por exemplo o antígeno leucocitário humano (HLA)-DR, para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (SHERWOOD, 2018). As DCs hepáticas apresentam predominantemente fenótipo mais imaturo e se localizam ao redor das veias centrais e dos canais portais, podem ser tanto mieloides (mDCs), também chamadas de clássicas (cDCs), quanto plasmocitoides (pDCs). As DCs hepáticas em estado basal apresentam menor capacidade de ativar linfócitos T, mas sob certas condições podem estimular uma forte resposta T (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014; RACANELLI; REHERMANN, 2006; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016).

Linfócitos T convencionais reconhecem antígenos peptídicos (XIAO; CAI, 2017). Os peptídeos de patógenos intracelulares são apresentados via MHC-I, pois todas as células nucleadas do organismo apresentam essa molécula em sua superfície. O antígeno é apresentado no contexto de MHC-I para os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, que são citotóxicos e levam a célula infectada à apoptose (RACANELLI; REHERMANN, 2006). Dentre os linfócitos T convencionais, predominam no fígado os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T ativados e de memória (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016). Ao contrário dos linfócitos T TCR alfa-beta (T AB<sup>+</sup>), os T GD<sup>+</sup> não dependem da apresentação de antígenos via MHC e reconhecem antígenos não-

peptídicos. Em razão dessa característica, essas células T são consideradas uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa (QUECK et al., 2018). Além disso, cerca de 20 a 45% dos linfócitos T intra-hepáticos são denominadas células T invariantes associadas à mucosa (MAIT). Células MAIT expressam um TCR semi-invariante e reconhecem pequenos metabólitos da vitamina B (derivados de bactérias e fungos) via MHC-I (VOILLET et al., 2018; XIAO; CAI, 2017).

Embora menos frequentes, as NKT invariantes (iNKT) têm sido descritas como as células que mais contribuem para as respostas imune no fígado. Essas células têm características em comum com as células MAIT, mas em vez de metabólitos da vitamina B, reconhecem lipídios (sintéticos, próprios e mibrobianos). Tanto as células iNKT quanto as MAIT são células T não-convencionais que podem ser ativadas de maneira TCR-independente, e quando ativadas produzem citocinas e moléculas citotóxicas, como TNF- $\alpha$ , granzima e perforina. Essas células são consideradas tipo-inatas pois compartilham características das imunidades inata e adaptativa, e geram a chamada memória inata, muito importante no fígado, onde há frequente exposição a vetores virais recorrentes (KUBES; JENNE, 2018; XIAO; CAI, 2017).

Os linfócitos B representam apenas 8% dos linfócitos intra-hepáticos. Entre os subtipos, se destaca o linfócito B CD5<sup>+</sup>, também conhecido como célula B1 e considerado uma célula B tipo-inata mais imatura (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016). Os linfócitos B1, podem ser ativados de uma forma T-independente e produzem anticorpos IgM de baixa afinidade. Acredita-se que essa célula desempenha papel imunorregulatório, pois libera IL-10, porém esse dado não foi investigado no parênquima hepático (NEMETH; BAIRD; O'FARRELLY, 2009). Sob determinadas condições, como em um fígado infectado pelo vírus da hepatite C (HCV), pode ocorrer o desenvolvimento de regiões chamadas folículos linfoides intraportais, que exercem o papel do centro germinativo dos órgãos linfoides e onde os linfócitos B entram em contato com APCs e linfócitos T, são ativados, se diferenciam e proliferam (RACANELLI; REHERMANN, 2006).

### 2.1.3.3 Imunotolerância e ativação

Em condições fisiológicas, o fígado apresenta um meio rico em citocinas com concentrações basais de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, as quais foram



liberadas como produto de processos fisiológicos (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016). As concentrações das citocinas permanecem em equilíbrio: a concentração constitutiva de IL-10 (anti-inflamatória) é mais alta que a de IL-12 (pró-inflamatória). Essa característica é em parte responsável pela diminuição da ativação das células T por APCs, e conseqüentemente, pela característica de tolerância imune do fígado. Outro mecanismo sugerido é a produção de ligante da proteína de morte programada 1 (PD-L1) pelas LSEC, que induz tolerância de células T (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014).

A perda do equilíbrio entre a tolerância e a ativação imune está associada à patogênese de diversas doenças. Em processos inflamatórios crônicos, como hepatite crônica, a frequente ativação do sistema imune leva à injúria tecidual, que com o tempo, acaba não sendo reparada corretamente. Isso induz o desenvolvimento de doenças como fibrose hepática, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC). Por outro lado, quando ocorre perda da tolerância imune no fígado, pode haver o desenvolvimento de doenças autoimunes, como a hepatite autoimune e cirrose biliar primária, nas quais ocorre autoagressão contra os hepatócitos e colangiócitos, respectivamente (INVERNIZZI, 2013).

Na inflamação associada à doença hepática crônica, há a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). PAMPs são derivados principalmente do aumento da permeabilidade intestinal e incluem lipopolissacarídeos (LPS) e flagelina; enquanto que os DAMPs são derivados de hepatócitos necróticos e incluem ATP, ácido úrico, cristais de colesterol, fragmentos de DNA e ácidos graxos (WREE; MARRA, 2016). Os PAMPs e DAMPs são reconhecidos por RRs como os receptores *Toll-Like* (TLRs) presentes nas CK e nas CHE (TRIANAFYLLOU et al., 2018). Em pacientes com doença hepática avançada, há alterações importantes na barreira intestinal, o que leva a um aumento importante do fluxo de bactérias do intestino ao fígado, com conseqüente inflamação hepática e sistêmica (QUECK et al., 2018).

## 2.2 CIRROSE HEPÁTICA

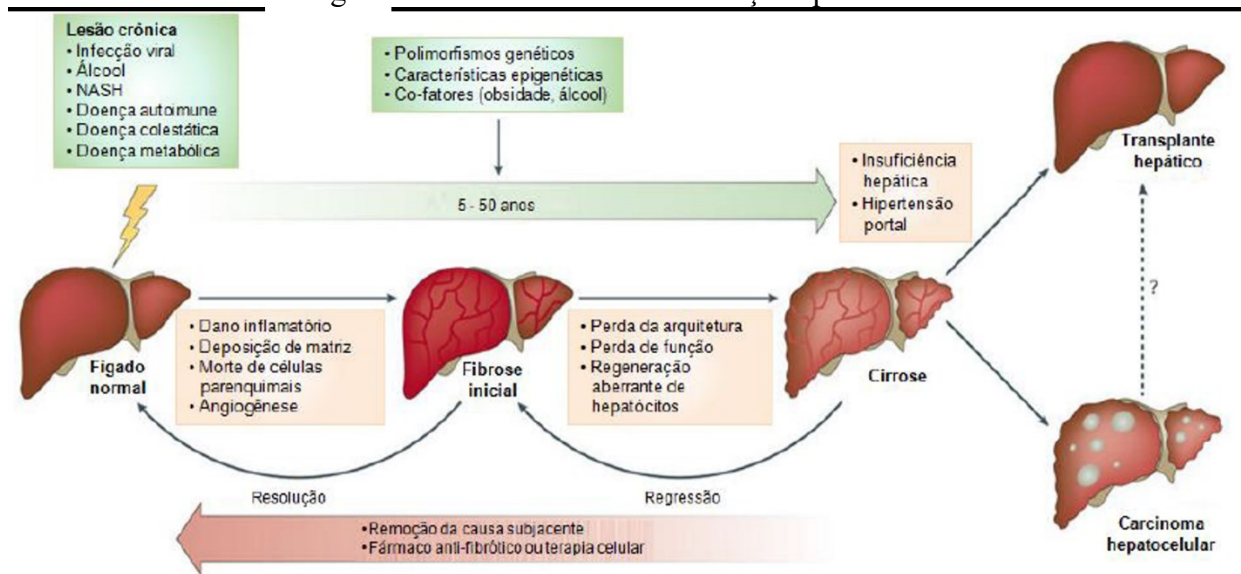
A definição de cirrose hepática foi descrita em 1978 por um grupo em colaboração com a Organização Mundial da Saúde (OMS) como um processo difuso caracterizado por fibrose e pela transformação da arquitetura tecidual hepática normal em nódulos

estruturalmente anormais (ANTHONY et al., 1978). Assim, para a classificação histológica de cirrose é necessário haver nódulos, mas não é necessário haver alterações vasculares. Todavia, essas alterações representam um componente importante para a patofisiologia e progressão da doença (RODÉS et al., 2007).

As alterações histológicas encontradas na cirrose hepática são causadas por uma agressão hepática crônica, que leva à fibrogênese, à regeneração nodular difusa envolta por septos fibrosos, à extinção do parênquima e à perda ou distorção de estruturas do tecido (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008; TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). No fígado, a fibrose é caracterizada por deposição de matriz extracelular, já a cirrose é considerada o estágio avançado da fibrose hepática. Nesse estágio, há perpetuação da resposta normal de cicatrização de injúrias em resposta a uma fibrogênese anormal, com produção e deposição de tecido conectivo (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

Os principais mecanismos de progressão de fibrose à cirrose hepática são: 1) Presença de agente etiológico que causa lesão hepática, tais como álcool, HCV e vírus da hepatite B (HBV); 2) Apoptose e necrose de hepatócitos, levando à diminuição da massa de hepatócitos no fígado; 3) Inflamação, associada ao aumento da permeabilidade vascular e migração celular; 4) Ativação e transformação das CHE em miofibroblastos; 5) Alteração nos componentes da matriz extracelular, como a troca da matriz rica em colágeno tipo IV por matriz rica em colágeno tipo I, associado à inflamação e à fibrose; e 6) Angiogênese: liberação de fatores angiogênicos em resposta à hipóxia parenquimal que leva ao desenvolvimento de vasos dentro do tecido fibrótico (Figura 4) (RODÉS et al., 2007).

Figura 4 - História natural da doença hepática crônica.



A doença hepática crônica é caracterizada por uma agressão hepática crônica, seguida de fibrogênese, regeneração nodular difusa envolta por septos fibrosos, extinção do parênquima e perda das estruturas do tecido, além da distorção da arquitetura vascular hepática. O estágio avançado da fibrose hepática é denominado cirrose, que por sua vez pode evoluir para o desenvolvimento de um carcinoma hepatocelular ou para a necessidade de um transplante hepático, uma vez que existe insuficiência hepática. Por outro lado, se a causa da fibrose inicial for eliminada, pode ocorrer a sua resolução. Além disso, se houver a conduta clínica correta e adesão do paciente, pode haver a regressão da cirrose, porém, não a sua resolução. Resolução: reversão completa da arquitetura anormal do fígado a próximo do normal. Regressão: melhora da fibrose sem que ocorra a reversão.

Fonte: AMARAL, 2018; adaptado de PELLICORO et al., 2014.

Quando a progressão da fibrose à cirrose hepática é acompanhada de distorção da arquitetura vascular hepática, ocorre aumento da resistência ao fluxo sanguíneo portal (TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). A resistência intra-hepática ao fluxo portal e o aumento do fluxo sanguíneo portal levam à hipertensão portal (HP), que é definida pela pressão venosa portal (PVP) superior a 5 mmHg (BITTENCOURT; ZOLLINGER; LOPES, 2017). Devido à distorção da arquitetura vascular hepática, ocorre vasodilatação arterial periférica, principalmente na circulação esplâncnica. A vasodilatação leva à diminuição da volemia, que por sua vez aciona sistemas vasoconstritores compensatórios. Dessa forma, ocorre aumento de fluxo arterial para a circulação portal, que contribui para a HP e para o aumento da resistência intra-hepática. O desenvolvimento da HP é a causa inicial das principais complicações da cirrose, tais como: varizes esofágicas, ascite, infecções e encefalopatia hepática (BERNARDI; CARACENI, 2018).

### 2.2.1 Causas e epidemiologia

As principais causas da cirrose hepática são as infecções por HCV e HBV, etilismo e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). Em países desenvolvidos, o agente etiológico mais comum é o HCV e o álcool, enquanto que na África subsaariana e grande parte da Ásia é o HBV (SCHWARTZ; REINUS, 2012; TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). A EHNA está emergindo como uma causa cada vez mais importante, sobretudo nos países mais industrializados, como resultado do aumento das taxas de obesidade (WILLIAMS, 2006). O aumento de incidência de EHNA também tem sido observado no Brasil, onde 40% da população têm sobrepeso e 13% das mulheres e 8,9% dos homens são obesos (NADER; DE MATTOS; BASTOS, 2014).

Estudos prévios realizados no HU UFSC observaram que as causas mais comuns de cirrose nos pacientes atendidos nesse hospital é HCV e álcool, responsáveis cada um por cerca de 30 a 40% dos casos, já HBV e EHNA foram responsáveis por cerca de 5% e 3% dos casos, respectivamente. Foi comum nessas casuísticas a presença de dois fatores etiológicos concomitantes, como HCV e álcool (AMARAL, 2018; DA SILVA, 2018; FISCHER, 2016).

Algumas causas menos comuns da cirrose incluem: doenças autoimunes (cirrose biliar primária, colangite esclerosante, hepatite autoimune), doenças genéticas (doença de Wilson, hemocromatose, deficiência de alfa-1-antitripsina), toxinas, fármacos e alterações vasculares (LEFTON; ROSA; COHEN, 2009).

A incidência e prevalência de cirrose não está bem estabelecida e é, provavelmente, maior do que a relatada devido à falta de diagnóstico nos estágios mais iniciais e assintomáticos. Na França, um estudo estimou a prevalência em 0,3% da população, enquanto que estudos no Reino Unido e na Suécia estimaram uma incidência anual de 14,5 e de 15,3 casos a cada 100.000 indivíduos, respectivamente (BLACHIER et al., 2013).

No mundo, as doenças hepáticas são responsáveis por cerca de 2 milhões de mortes por ano, metade devido a complicações de cirrose hepática e a outra metade por hepatites virais e CHC. Assim, globalmente, a cirrose é a 11ª causa mais comum de óbito. Mais de 50% dos óbitos relacionados à cirrose tem associação ao consumo de álcool (ASRANI et al., 2019). Na Europa, a cirrose hepática é responsável por cerca de 170 mil mortes por ano, com uma grande variação entre os países. Dentre os países europeus, a Hungria se destaca pelas maiores taxas

de mortalidade. A estimativa é que aproximadamente 0,1% dos homens húngaros morrem por complicações da cirrose todos os anos (BLACHIER et al., 2013).

No Brasil, as doenças hepáticas ocupam a 8ª posição na lista das principais causas de óbito. Entre 2001 e 2009, as doenças hepáticas foram responsáveis por 308.290 óbitos, desses, cerca de 42% foram associados à cirrose hepática e com maior expressão na região Sudeste do país. No ano de 2015, a cirrose associada a etilismo levou a óbito 18.923 brasileiros (MELO et al., 2017; NADER; DE MATTOS; BASTOS, 2014). Além disso, dados brasileiros mostram que o número de admissões hospitalares devido a doenças hepáticas tem aumentado significativamente e que a cirrose foi a principal causa de hospitalização e mortalidade entre as doenças hepáticas. Entre os anos de 2001 a 2010, ocorreram 853.571 internações hospitalares devido a esse grupo de doenças (NADER; DE MATTOS; BASTOS, 2014).

Na região litorânea de Santa Catarina (SC), existe uma grande concentração de casos de hepatite C, o que contribui para a maior incidência de cirrose causada por HCV. No geral, a taxa catarinense de hepatite C é de 17,8/100 mil habitantes, superando a média nacional, que é de 12,6. No ano de 2017, a cirrose (CID-10 K74) e a doença alcoólica do fígado (CID-10 K70) foram responsáveis por 474 mortes no estado de SC, e em 2018, por 525 mortes (DIVE, 2020).

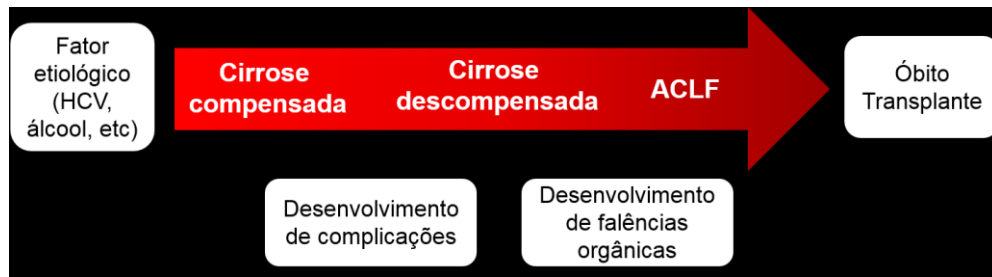
O impacto econômico mundial gerado pelas doenças hepáticas é alto, pois gera altos custos com internações, procedimentos hospitalares, medicamentos, cirurgias e transplantes. Um grande número de pacientes portadores de doenças hepáticas são candidatos a realizar transplante hepático, o qual é o segundo transplante de órgão sólido mais realizado no mundo, atrás apenas do renal. No ano de 2015, foram realizados 27.867 transplantes de fígado no mundo (ASRANI et al., 2019).

### **2.2.2 Evolução natural da cirrose**

A cirrose hepática pode ser dividida em duas fases ou estágios clínicos, uma assintomática, denominada cirrose compensada, seguida por uma fase marcada pelo desenvolvimento de complicações, denominada cirrose descompensada. As sobrevidas dos pacientes nas duas etapas da doença são muito diferentes: na cirrose compensada é de 12 anos, enquanto que na cirrose descompensada é de apenas dois anos (ASRANI; KAMATH, 2013; D'AMICO; GARCIA-TSAO; PAGLIARO, 2006; D'AMICO et al., 2018; D'AMICO, 2014).

Pacientes com cirrose compensada geralmente apresentam uma qualidade de vida aceitável, não apresentam sintomas e podem permanecer nessa fase por muitos anos (D'AMICO et al., 2018), todavia apresentam lesões hepáticas e a HP pode progredir discretamente (ARROYO et al., 2016).

Figura 5 - Evolução natural da cirrose hepática.



A ocorrência de complicações clínicas, tais como varizes esofágicas, ascite, icterícia e encefalopatia hepática, marcam a iminência da cirrose descompensada. O desenvolvimento de falências orgânicas, como falência hepática, renal e cerebral ou alterações importantes de coagulação são características da síndrome chamada insuficiência hepática crônica agudizada (ACLF). Fonte (adaptado): BERNARDI; CARACENI, 2018.

Atualmente, a cirrose não é mais considerada uma doença irreversível. Pacientes com cirrose descompensada podem regredir para cirrose compensada ou até mesmo para uma fase pré-cirrótica. Por outro lado, pacientes com cirrose descompensada podem evoluir para uma condição caracterizada pela deterioração aguda de órgãos, a ACLF (ARROYO et al., 2016). A ACLF foi recentemente caracterizada pelo estudo CANONIC (2013) como o desenvolvimento simultâneo de descompensação aguda (ascite, encefalopatia hepática e/ou hemorragia gastrointestinal) e de falência única ou múltipla de órgãos envolvendo fígado, rins, cérebro, coagulação, circulação e/ou pulmões (ARROYO, 2019; MOREAU et al., 2013). Um fator precipitante comum da ACLF são as infecções bacterianas. Além disso, essa síndrome está presente em 25 a 40% dos pacientes internados com cirrose descompensada e, mais frequentemente, acomete pacientes com média de idade entre 50 a 55 anos. Seu diagnóstico é de grande relevância clínica, pois está associado a mau prognóstico com baixa taxa de sobrevivência livre de transplante (TSLT) (ARROYO, 2019). Para classificar a falência orgânica, utiliza-se o escore de CLIF-SOFA (Quadro 1), que inclui as variáveis bilirrubina, creatinina, encefalopatia hepática, razão normatizada internacional (RNI), pressão arterial média e razão pressão parcial de oxigênio arterial (PaO<sub>2</sub>) / fração de oxigênio inspirado (FiO<sub>2</sub>) ou oximetria de pulso (SpO<sub>2</sub>)

/ FiO<sub>2</sub>. Os pacientes podem ser classificados em ACLF ausente, grau 1, grau 2 ou grau 3, de acordo com número de órgãos em falência (MOREAU et al., 2013).

Quadro 1 - Escore CLIF-SOFA.

Órgão/Sistema	0	1	2	3	4
Fígado (Bilirrubina, mg/dL)	<1,2	≥1,2 a <2,0	≥2,0 a <6,0	≥6,0 a <12	≥12,0
Rim (Creatinina, mg/dL)	<1,2	≥1,2 a <2,0	≥2,0 a <3,5	≥3,5 a <5	≥5,0
			ou hemodiálise		
Cérebro (Grau de EH)	Ausente	I	II	III	IV
Coagulação (RNI)	<1,1	≥1,1 a <1,25	≥1,25 a <1,5	≥1,5 a <2,5	≥2,5 ou plaquetas ≤20.000/mm <sup>3</sup>
Circulação (PAM, mmHg)	≥70	<70	Dopamina ≤5 ou Dobutamina ou Terlipressina	Dopamina >5 ou E ≤0,1 ou NE ≤0,1	Dopamina >15 ou E >0,1 ou NE >0,1
Pulmão (PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ou SpO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> )	>400 >512	>300 a ≤400 >357 a ≤512	>200 a ≤300 >214 a ≤357	>100 a ≤200 >89 a ≤214	≤100 ≤89

O escore vai de 0 a 24. As áreas em cinza indicam os critérios para disfunção de órgãos. EH: encefalopatia hepática; RNI: relação normatizada internacional; E: epinefrina; NE: norepinefrina; PAM: pressão arterial média; PaO<sub>2</sub>: pressão parcial de oxigênio arterial; FiO<sub>2</sub>: fração de oxigênio inspirado; SpO<sub>2</sub>: oximetria de pulso.

Fonte (adaptado): MOREAU et al., 2013.

## 2.2.3 Complicações da cirrose hepática

### 2.2.3.1 Varizes esofágicas

Geralmente, a HP torna-se clinicamente importante e se associa ao desenvolvimento de varizes esofágicas (VE) quando a PVP está acima de 10 mmHg. A formação das VE é a primeira consequência clínica relevante da HP na cirrose. Existem estratégias terapêuticas para prevenir o aparecimento ou a progressão e rompimento das VE, como o uso de beta-bloqueadores não-seletivos e ligadura elástica de varizes esofágicas (LEVE), isolados ou combinados, de acordo com o tamanho e grau das VE. O uso de beta-bloqueadores é altamente recomendado na prática clínica, pois eles reduzem a pressão portal; assim, além de prevenir as VE e o sangramento por gastropatia secundária à HP, também melhoram o fluxo sanguíneo na mucosa intestinal

atenuando a permeabilidade intestinal e diminuindo os níveis de LPS bacterianos circulantes (BERNARDI; CARACENI, 2018; TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014).

#### 2.2.3.2 Ascite

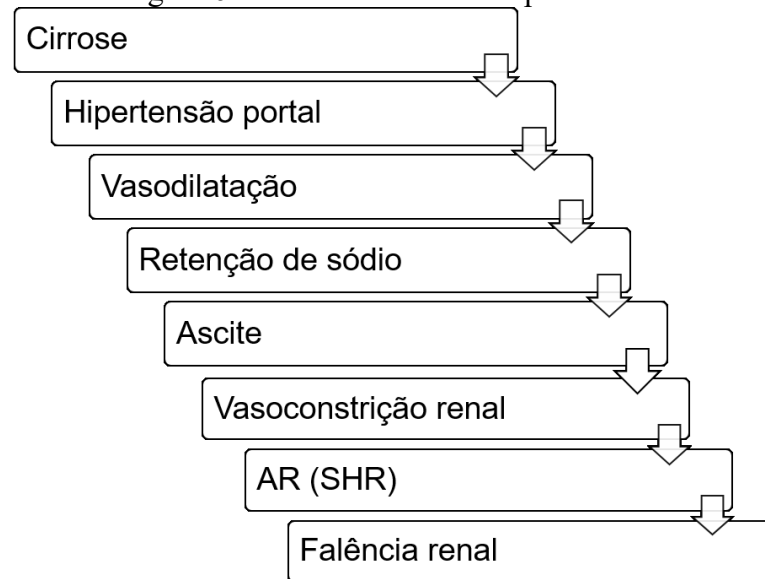
A HP e a vasodilatação esplâncnica são os principais mecanismos causadores da ascite, complicação clínica comum em pacientes portadores de cirrose (TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). Cerca de 60% dos pacientes com diagnóstico de cirrose terão pelo menos um episódio de ascite em até dez anos após o diagnóstico (POSE; CARDENAS, 2017).

Conforme a cirrose progride, o controle homeostático do organismo ativa fatores vasoconstritores e antinatriuréticos, o que leva à retenção de água e sal. O fluido retido se acumula na cavidade peritoneal devido à alta pressão portal (TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). A ascite pode ser classificada como graus 1, 2 e 3 e ascite refratária (AR). Pacientes com ascite grau 1 devem ser orientados a realizar dieta hipossódica e evitar consumo de bebidas alcoólicas. Enquanto que pacientes com ascite grau 2 devem, além de realizar a dieta, receber tratamento diurético via oral. Pacientes com ascite grau 3 e AR, além do uso de diuréticos, podem ser submetidos à paracentese. A paracentese deve ser acompanhada de reposição de albumina, a fim de evitar síndrome circulatória pós-paracentese (ANGELI, et al., 2018; GINES et al., 2010; POSE; CARDENAS, 2017). Além disso, em pacientes com AR pode-se realizar um procedimento chamado TIPS (do inglês, *Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt*), que é a inserção de um desvio da veia porta à veia cava, que alivia os sintomas da ascite e das VE (THALHEIMER et al., 2009; TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014).

Os mesmos eventos causadores da ascite associados à vasoconstrição e à falência renal podem levar ao desenvolvimento da síndrome hepatorenal (SHR), a qual geralmente afeta pacientes com AR. A SHR tipo 1 é caracterizada por uma rápida piora da função renal, enquanto a SHR tipo 2 tem um curso mais lento e menos agressivo (TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014) (Figura 6).



Figura 6 - Ascite e síndrome hepatorenal.



O esquema mostra a relação da ascite com a síndrome hepatorenal e os eventos envolvidos. AR: ascite refratária; SHR: síndrome hepatorenal. Fonte (adaptado): TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014.

### 2.2.3.3 Infecções

As infecções bacterianas são comuns em pacientes cirróticos, e podem ser o gatilho para o desenvolvimento de manifestações clínicas mais graves como sangramento gastrointestinal, hiponatremia, falência renal e encefalopatia hepática. Além disso, comumente levam a internações prolongadas e recorrentes e a aumento de gastos hospitalares (BHATTACHARYA et al., 2019; JALAN; FERNANDEZ et al., 2014).

Devido à disfunção hepática, há um aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas em pacientes cirróticos. A diminuição da motilidade intestinal, o crescimento bacteriano aumentado e a maior permeabilidade intestinal aumentam a taxa de translocação bacteriana da microbiota intestinal aos linfonodos mesentéricos (TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). O organismo desses pacientes apresenta dificuldade em combater esses patógenos, pois há diminuição da atividade bactericida e de opsonização, perda de função de células do sistema imune, diminuição da atividade fagocítica do SRE e da quimiotaxia, redução do número de CK, além de baixas concentrações séricas de proteínas do complemento (THALHEIMER et al., 2005). As infecções mais comuns em pacientes cirróticos são: peritonite bacteriana espontânea (PBE), infecções do trato urinário (ITU), pneumonia e infecções de pele (THALHEIMER et al., 2005; TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). A PBE é

diagnosticada se a contagem de neutrófilos no líquido ascítico for maior que 250/uL (GINES et al., 2010). A sepse é uma complicação comum da cirrose descompensada que pode levar à imunodeficiência por um mecanismo de *feedback* negativo do organismo, cujo efeito é prejudicial e pode custar a vida do paciente (ARVANITI et al., 2010; HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013).

As estratégias terapêuticas para as infecções associadas à cirrose incluem: antibióticos por via endovenosa, albumina e propranolol, o qual atua na melhora da motilidade intestinal (GINES et al., 2010; THALHEIMER et al., 2005; TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). Estudos recentes observaram que há um desequilíbrio na microbiota intestinal de cirróticos, com um aumento de bactérias das famílias Enterobacteriaceae, Enterococcaceae e Streptococcaceae e diminuição das famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae. Assim, a fim de buscar o equilíbrio da microbiota, sugere-se para o manejo desses pacientes: evitar uso desnecessário de antibióticos, evitar uso de inibidores de bomba de prótons, consumir alimentos fermentados (ricos em probióticos naturais) e cuidar da higiene oral (BAJAJ, 2019).

#### 2.2.3.4 Encefalopatia hepática

A encefalopatia hepática (EH) é uma complicação comum da cirrose e uma das mais graves e debilitantes (VILSTRUP et al., 2014), sendo altamente associada a menores tempos de sobrevivência (TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). É definida como uma disfunção cerebral causada por insuficiência hepática e/ou desvio portossistêmico que se manifesta como anormalidades neurológicas ou psiquiátricas que vão desde alterações subclínicas, a tonturas e, até mesmo, a estado de coma. Assim, a EH nem sempre é diagnosticada corretamente, fato que gera variações nas taxas de incidência e prevalência e em estudos clínicos (VILSTRUP et al., 2014).

A classificação da EH deve ser feita de acordo com a doença causadora da EH (ex: cirrose), com os sintomas, com o tempo dos sintomas e com fatores precipitantes (ex: sangramento gastrointestinal) (BAJAJ, 2010, 2018). De acordo com a severidade dos sintomas, pode ser classificada pelos critérios de West-Haven em: EH mínima e grau I (assintomáticas), graus II, III e IV (sintomáticas) (BAJAJ, 2010; VILSTRUP et al., 2014). É estimado que de 30 a 45% dos pacientes com disfunção hepática apresentam EH sintomática (BAJAJ, 2010).

Acredita-se que a desregulação da homeostase da amônia tenha papel central na patogênese da EH. Diversos órgãos estão envolvidos da homeostase da amônia, como fígado, intestino, rins e músculo esquelético. Algumas alterações nesses órgãos observadas em pacientes cirróticos, tais como alteração da motilidade intestinal, disbiose, aumento de translocação bacteriana, sarcopenia, disfunção renal, desvio portossistêmico, disfunção e inflamação hepática, levam ao acúmulo de amônia, tanto por aumento de produção quanto por diminuição de excreção (BAJAJ, 2015; WRIGHT et al., 2011). A amônia passa pela barreira hematoencefálica (BHE), em seguida, os astrócitos utilizam a amônia para formar glutamina. A taxa de captação de amônia é diretamente proporcional à concentração de amônia nas artérias. Assim, quando a captação de amônia aumenta, ocorre acúmulo de glutamina no cérebro, o que leva a inchaço dos astrócitos, à ativação da micróglia e à disfunção neuronal (BAJAJ, 2015; WRIGHT et al., 2011).

As opções terapêuticas para EH visam a reduzir a produção de amônia, a aumentar a fixação ou excreção de amônia ou à ação neurológica direta. O tratamento da EH sintomática é realizado em nível intestinal com lactulose (dissacarídeo não absorvido) ou rifaximina (antibiótico não absorvido), e extra-luminal, com opções como L-ornitina-L-aspartato, acilcarnitina, acarbose e albumina intravenosa (BAJAJ, 2010, 2018; TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014; VILSTRUP et al., 2014).

#### 2.2.3.5 Outras complicações

Além das complicações da cirrose supracitadas, existem outras complicações que são mais raras ou que vão ser menos abordadas no presente estudo. Hipertensão portopulmonar e síndrome hepatopulmonar, caracterizadas por vasoconstrição e vasodilatação pulmonar anormal, respectivamente, são complicações raras da cirrose que ocorrem como consequência da HP. A icterícia não obstrutiva é um sinal clínico comum em pacientes com cirrose em estágios mais avançados, e ocorre pela falha na excreção da bilirrubina, uma vez que o fígado cirrótico não consegue metabolizá-la e transportá-la corretamente na bile até os canais biliares a fim de ser excretada pelo TGI (RODÉS et al., 2007).

Além disso, a cirrose pode contribuir para o desenvolvimento de CHC (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008). O CHC pode se desenvolver em qualquer estágio da cirrose e tem sido

diagnosticado com uma taxa anual mundial de mais de 500 mil novos casos. Estudos mostram que o CHC é a principal causa de morte associada ao fígado em pacientes com a doença hepática estável. Pacientes com cirrose causada por HCV e HBV, do sexo masculino e com idade mais avançada apresentam maiores riscos de desenvolver o CHC (BOSCH et al., 2004; FATTOVICH et al., 2004). Recomenda-se realizar ultrassonografia (USG) a cada seis meses, a fim de detectar CHC em estágios iniciais e tumores de pequeno tamanho (TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). A imunoterapia tem ganhado importância no tratamento do CHC, em primeiro lugar devido à alta taxa de falha terapêutica de outros tipos de terapias e, em segundo lugar, ao papel importante que mecanismos imunológicos apresentam durante o desenvolvimento e crescimento do tumor. Nesse âmbito, pode-se citar ensaios clínicos com inibidores de *checkpoint* imunológicos, como inibidores da via PD-1-PD-L1 e inibidores da proteína antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) (MAKAROVA-RUSHER et al., 2015). Estudo de Calderaro e colaboradores (2016) observou que a expressão de PD-L1 nas células de CHC está associada à gravidade do tumor, sugerindo que o uso da imunoterapia com inibidores da via PD-1-PD-L1 poderia ser eficiente nas formas mais graves de CHC.

#### 2.2.4 Prognóstico da cirrose

Quando se diagnostica um paciente com cirrose hepática, é de grande importância estabelecer a gravidade e o prognóstico da doença. Os dois principais modelos utilizados na avaliação do prognóstico da cirrose são os escores de Child-Pugh (CHILD; TURCOTTE, 1964; PUGH et al., 1973) e o MELD (do inglês, *Model for End-Stage Liver Disease*) (KAMATH et al., 2001; MALINCHOC et al., 2000; WIESNER et al., 2003). No entanto, esses escores apresentam algumas limitações e não avaliam disfunção imune. Assim, em alguns casos podem não estratificar o paciente conforme sua condição clínica real.

##### 2.2.4.1 Escore Child-Pugh

O escore de Child-Pugh é a classificação mais utilizada para avaliar severidade da doença e estimar prognóstico de pacientes cirróticos. Esse escore avalia cinco variáveis, duas clínicas (ascite e EH) e três laboratoriais: bilirrubina, albumina e RNI. As categorias de

pacientes correspondem à somatória dos pontos de cada variável: A (5 a 6 pontos), B (7 a 9 pontos) e C (10 a 15 pontos) (DURAND; VALLA, 2005) (Quadro 2).

Quadro 2 - Classificação de Child-Pugh.

Parâmetros	Pontuação		
	1	2	3
Bilirrubina total (mg/dL)	<2	2 - 3	>3
Albumina sérica (g/dL)	>3,5	2,8-3,5	<2,8
RNI	<1,7	1,71 - 2,20	>2,20
Ascite	Nenhuma	Leve	Intensa
Encefalopatia hepática	Nenhuma	Grau 1 - 2 (ou suprimida com medicação)	Grau 3 - 4 (ou refratária)

Classificação Child-Pugh A: 5 a 6 pontos, B: 7 a 9 pontos e C: 10 a 15 pontos. RNI: razão normalizada internacional. Fonte (adaptado): PUGH et al.,1974.

As limitações do escore incluem: a albumina, que pode estar alterada em casos de sepse e ascite, e a bilirrubina, em casos de insuficiência renal, hemólise e sepse. Além disso, o escore não avalia função renal (creatinina) (DURAND; VALLA, 2005). Apesar das limitações, não há dúvidas de que o Child-Pugh é uma ferramenta útil na prática clínica, e deve ser avaliado em conjunto com outros escores, como o MELD (KOK; ABRALDES, 2019).

#### 2.2.4.2 Escore MELD

O escore de MELD foi desenvolvido com o objetivo de prever a sobrevivência de pacientes após a realização do procedimento TIPS (MALINCHOC et al., 2000). Depois de sofrer algumas modificações a fim de ser utilizado para classificar pacientes elegíveis a transplante e prever mortalidade em 90 dias, o atual MELD é calculado pela seguinte fórmula:  $9.57 \log_e(\text{creatinina mg/dl}) + 3.78 \log_e(\text{bilirrubina mg/dl}) + 11.2 \log_e(\text{RNI}) + 6.43$ . (KAMATH; KIM; GROUP, 2007). Um grupo de pesquisadores demonstrou que a incorporação da dosagem de sódio sérico (Na) ao escore MELD melhorou a acurácia em prever a mortalidade. Assim, surgiu o MELD-Na que é igual ao valor do MELD + 1.59 (135 - Na) (BIGGINS et al., 2006). O valor de MELD e MELD-Na podem ser obtidos de forma simples utilizando aplicativos para *smartphones* ou por meio de websites especializados (MD CALC).

Em relação ao Child-Pugh, o MELD apresenta as seguintes vantagens: não apresenta variáveis clínicas (que podem ser subjetivas) e contém pesos distintos para as variáveis (peso

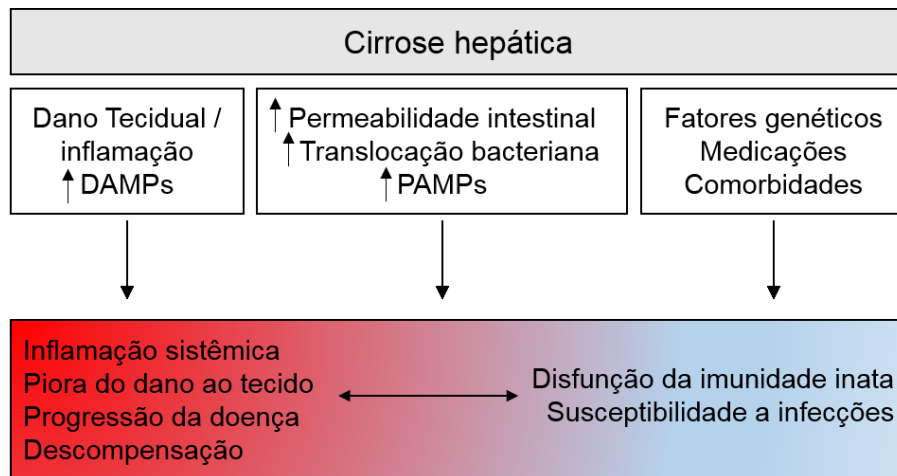
maior para creatinina e para RNI e menor para bilirrubina). Algumas desvantagens são: 1) não existem valores definidos de ponto de corte para classificar pacientes em categorias, como o Child-Pugh, e 2) necessita o uso de computação para seu cálculo (DURAND; VALLA, 2005). Pode-se destacar que um estudo que avaliou 256 pacientes com hemorragia aguda por varizes demonstrou que os pacientes com MELD maior que 18 após sangramento agudo apresentaram risco aumentado de ter outro episódio de sangramento dentro de cinco dias e de ir a óbito em seis semanas. Assim, valor de MELD maior que 18 poderia ser considerado como ponto de corte de gravidade de doença hepática (BAMBHA et al., 2009).

### 2.3 CIRROSE E O SISTEMA IMUNE

O desenvolvimento da cirrose hepática impede o papel homeostático do fígado na resposta imune. O dano ao SRE compromete o papel de vigilância imune, e a síntese proteica reduzida, envolvida na imunidade inata e nos RRP, diminui a atividade das células fagocíticas. Assim, o curso da cirrose está associado a diversos níveis de disfunção imune, causando a síndrome denominada DIAC. A DIAC é caracterizada por alterações tanto das funções imune inata quanto adaptativa e por apresentar tanto fenótipo pró-inflamatório quanto imunodeficiente (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014; SIPEKI et al., 2014) (Figura 7).

A inflamação sistêmica está presente nos estágios mais iniciais da doença (cirrose compensada e cirrose estável com ascite). É marcada por ativação de células imune circulantes e aumento de níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias, como resultado da ativação imune persistente por DAMPs e PAMPs (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014). A inflamação sistêmica pode piorar algumas complicações clínicas da cirrose, como distúrbio hemodinâmico e dano renal (IRVINE et al., 2019).

Figura 7 - Fenótipo inflamatório e imunodeficiente da cirrose hepática.



Como resultado da ativação imune persistente por DAMPs e PAMPs, a inflamação sistêmica está presente nos estágios mais iniciais da cirrose e é marcada por ativação de células imune circulantes e aumento de níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias. O maior contato com PAMPs é considerado um passo importante para a troca do fenótipo pró-inflamatório para imunodeficiente, quando ocorre uma exaustão do sistema imune. DAMPs: Padrões moleculares associados ao dano; PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos. Fonte (adaptado): IRVINE et al, 2019.

Por outro lado, na cirrose avançada (cirrose descompensada) ocorre aumento dos distúrbios homeostáticos no TGI, com alterações no microbioma, redução da motilidade intestinal e aumento do crescimento bacteriano e da permeabilidade intestinal. O maior contato com patógenos intestinais é considerado um passo importante para a troca do fenótipo pró-inflamatório para imunodeficiente (IRVINE et al., 2019) (Figura 7). Já a reprogramação do sistema imune que ocorre em pacientes com ACLF, assemelha-se à imunopatologia da sepse: uma resposta inflamatória inicial com aumento importante de citocinas (tempestade de citocinas), seguida de um desequilíbrio na resposta imune para um perfil fenotípico que dificulta o combate ao patógeno (IRVINE et al., 2019; NOOR; MANORIA, 2017).

A caracterização da DIAC pode ser realizada pelo estudo das principais populações de células circulantes, o grau de ativação, o estágio de diferenciação e as atividades fagocítica, citotóxica e de produção de citocinas, além da concentração sérica de citocinas, de proteínas do complemento e de imunoglobulinas (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014).

### 2.3.1 Alterações imune locais e sistêmicas associadas à inflamação

Ativação persistente da imunidade inata devido à infecção crônica, dano tecidual, abuso no consumo de álcool ou acúmulo de gordura no fígado leva a características clássicas da inflamação hepática. Hepatócitos necróticos liberam DAMPs que ativam hepatócitos vizinhos, CHE e células imune residentes; que por sua vez, liberam mediadores inflamatórios que recrutam leucócitos dos sinusoides e transformam as CHE em miofibroblastos. Os miofibroblastos hepáticos ficam constantemente ativados, diminuindo sua senescência e apoptose, e liberam grandes quantidades de matriz extracelular. A proteína quimiotática de monócitos tipo 1 (MCP-1) e a proteína regulada por ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES) estimulam a fibrogênese, enquanto que IL-10 e IFN- $\gamma$  exercem o efeito contrário. Macrófagos inflamatórios, derivados de monócitos, que foram recrutados para o parênquima hepático, também promovem fibrose (BATALLER; BRENNER, 2005; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016).

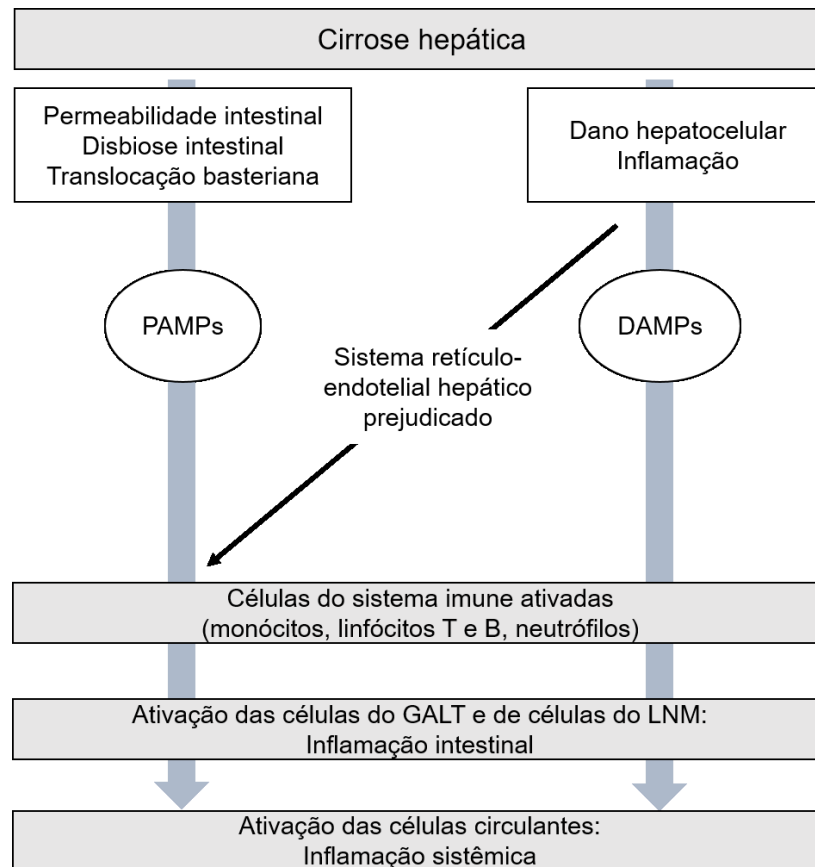
A fibrose sinusoidal e septal associadas com o aparecimento de desvios portossistêmicos, além da redução de CK que ocorre em pacientes cirróticos, comprometem a função do SRE, levando à diminuição da eliminação de patógenos e a maiores riscos de infecções (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014). Além disso, a perda da capacidade de depuração de substâncias também causa o acúmulo de células sanguíneas senescentes, como plaquetas e hemácias, de moléculas bioativas (como hormônios e fatores de crescimento), de citocinas e de componentes da cascata de coagulação. Em seguida, esses componentes endógenos acumulados podem extravasar para a circulação e causar um meio inflamatório sistêmico (IRVINE et al., 2019).

O tecido linfoide associado ao TGI (GALT) também é profundamente afetado no curso da cirrose. O GALT é a primeira barreira contra antígenos e patógenos que vêm do TGI. Os linfonodos mesentéricos (LNM) fazem parte do GALT e agem induzindo imunidade e tolerância, enquanto que as áreas efetoras estão distribuídas ao longo da lâmina própria e do epitélio da mucosa. O constante estímulo do GALT pela alteração da homeostase intestinal leva ao aumento de monócitos ativados, de DCs e de linfócitos no intestino e nos linfonodos. Por sua vez, essas células ativadas aumentam a concentração de citocinas pró-inflamatórias na



lâmina própria, o que favorece o aumento da permeabilidade intestinal, gerando um ciclo vicioso (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014) (Figura 8).

Figura 8 - Inflamação associada à cirrose hepática.



Ativação persistente da imunidade inata leva à inflamação hepática. Com o sistema retículo-endotelial hepático prejudicado, o estímulo por PAMPs é sentido de forma mais profunda pelo organismo. Assim, a inflamação e a ativação constantes do sistema imune em nível hepático e de GALT leva à inflamação sistêmica. PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; DAMPs: padrões moleculares associados ao dano; GALT: tecido linfóide associado ao TGI; LNM: linfonodo mesentérico. Fonte (adaptado): ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014.

A inflamação e a ativação do sistema imune em nível hepático e de GALT leva à inflamação sistêmica, a qual é caracterizada, de forma geral, por aumento da concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias e de células imune circulantes com fenótipo de ativação (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014). O Quadro 3 mostra algumas evidências de inflamação sistêmica encontradas na cirrose descritas na literatura.

Quadro 3 - Alterações associadas à inflamação observadas nas células do sistema imune circulantes em pacientes cirróticos.

<b>Alteração</b>	<b>Referências</b>
Neutrófilos com potencial oxidativo aumentado, mas com capacidade fagocítica diminuída.	TRITTO et al., 2011
Relação neutrófilos/linfócitos aumentada (ponto de corte com significado clínico: maior que 8,9).	CAI et al., 2017 DENG et al., 2019
Fenótipos de ativação: aumento de expressão de CD11b em neutrófilos e de HLA-DR, CD80 e CD86 em monócitos. Aumento de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> .	ALBILLOS et al., 2004 FIUZA et al., 2002
Aumento da concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-18, IFN- $\gamma$ .	ALBILLOS et al., 2004 DIRCHWOLF et al., 2016 LEMMERS et al., 2009

### 2.3.2 Alterações imune associadas à imunodeficiência

O defeito na síntese hepática apresenta consequências sistêmicas apenas em estágios mais avançados da cirrose, devido à grande reserva proteica que existe no fígado. Quando observado, o defeito é resultado da diminuição das concentrações de proteínas do complemento, de proteínas de fase aguda e de fatores da coagulação, e da diminuição da expressão de RRP, o que leva à redução da capacidade de opsonização de microorganismos e a alterações de coagulação (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014). A diminuição da síntese de trombopoietina e o defeito na eliminação e renovação de plaquetas causa uma das alterações hematológicas mais comuns em pacientes cirróticos: a plaquetopenia (IRVINE et al., 2019).

Mesmo no estágio de imunodeficiência, o GALT permanece em estado de ativação, com aumento de monócitos e de linfócitos ativados (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014). Já em nível sistêmico, diversas alterações na frequência, atividade e fenótipo de células imune circulantes foram descritas na literatura (Quadro 4).

Quadro 4 - Alterações associadas à imunodeficiência observadas nas células do sistema imune circulantes em pacientes cirróticos.

Subtipo celular	Alteração	Efeito/relação
Neutrófilos	↓ fagocitose e quimiotaxia ↑ potencial oxidativo	↓ fagocitose de bactérias
Monócitos	↑ frequência (não-clássicos) ↓ fagocitose ↓ expressão de HLA-DR	↓ fagocitose de bactérias ↑ mortalidade
Linfócitos B	↓ frequência ↓ B de memória (CD27 <sup>+</sup> )	↓ opsonização de bactérias ↓ resposta a vacinas e a infecções
Linfócitos T	↓ frequência ↓ T <i>naïve</i> e de memória	↓ resposta antigênica T-dependente
Células T Regulatórias	↑ frequência	Complicações referentes a infecções
Células NK	↑ ou ↓ frequência ↓ atividade citotóxica	↓ citotoxicidade

Fonte (adaptado): ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014.

Como pode ser observado, as alterações encontradas nos neutrófilos de pacientes com cirrose no estágio de inflamação e de imunodeficiência são bastante semelhantes, com aumento do potencial oxidativo, avaliado pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), mas com diminuição da capacidade fagocítica (FIUZA et al., 2000; MOOKERJEE et al 2007; TRITTO et al., 2011).

Diversos estudos observaram disfunção monocítica na imunodeficiência associada à cirrose, o que leva a defeitos na quimiotaxia, na fagocitose e na produção de enzimas lisossômicas. A diminuição da expressão de HLA-DR na superfície dos monócitos, já descrita em pacientes com ACLF e com sepse, foi observada também em pacientes com cirrose descompensada e está associada a pior prognóstico e alta mortalidade (BERRES et al., 2009; NOOR; MANORIA, 2017). Além da diminuição da expressão de HLA-DR, estudos constataram que existe uma troca na frequência dos subtipos de monócitos circulantes, com aumento dos subtipos não-clássicos em pacientes com doença hepática crônica quando comparados a controles saudáveis. Esse resultado foi associado a um aumento da ativação das CHE, expressão de citocinas pró-inflamatórias e progressão clínica (ZIMMERMANN et al., 2010). Os subtipos de monócitos e suas funções estão descritos a seguir na Seção 2.4 Células Imune Circulantes.

Alguns estudos observaram diminuição nos valores relativos e absolutos de linfócitos B circulantes em pacientes cirróticos. Doi et al. (2012) descreveram que as células B de

memória CD27<sup>+</sup> estão reduzidas no SP de pacientes com cirrose, independentemente da etiologia, e que essa redução foi associada ao aumento de susceptibilidade a infecções bacterianas. Os linfócitos B1 também parecem ser afetados e encontram-se diminuídos em pacientes com cirrose por álcool (COOK et al., 1996; LASO et al., 1996).

Na circulação periférica de pacientes cirróticos existe linfopenia de linfócitos T, a qual se reflete na linfopenia encontrada no exame do hemograma. McGovern et al. (2007) descreveram que em pacientes com cirrose avançada soronegativos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) existe diminuição da contagem absoluta de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, mas que não se reflete nos valores relativos (MCGOVERN et al., 2007). Outro estudo observou que em pacientes infectados por HCV, a razão TCD4<sup>+</sup> / TCD8<sup>+</sup> foi inversamente proporcional ao grau de fibrose hepática (FEUTH et al., 2014). Além disso, a depleção de linfócitos T parece ser mais pronunciada no compartimento naíve do que no de memória (LARIO et al., 2013). Por outro lado, foram encontradas maiores frequências de células T regulatórias (T reg) em pacientes cirróticos quando comparados a controles saudáveis. Ainda com relação às células T, foi detectada menor expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD28, em pacientes com cirrose hepática (MÁRQUEZ et al., 2009).

As células citotóxicas NK também são afetadas pela doença hepática. Com relação à cirrose por álcool, observou-se aumento relativo de NK, porém com perda de função citotóxica e baixa resposta a estímulo de citocinas (LASO et al., 1997). Já em pacientes com cirrose descompensada causada por HBV, observou-se diminuição das frequências das células NK associada à perda da função celular (JIANG et al., 2020).

Em resumo, o Quadro 5 mostra as diferenças entre as citocinas e expressão de HLA-DR no fenótipo pró-inflamatório e imunodeficiente da DIAC.

Quadro 5 - Comparação de algumas alterações no sistema imune no fenótipo pró-inflamatório e imunodeficiente da cirrose.

	Fenótipo	
	Pró-inflamatório	Imunodeficiente
Citocinas pró-inflamatórias (ex: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ )	↑↑	↑
Citocinas anti-inflamatórias (ex: IL-10, TGF $\beta$ )	↑	↑↑
Expressão de HLA-DR	↑	↓

Fonte (adaptado): ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014.

Pode-se observar que mesmo no estágio de imunodeficiência há aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias; porém, trata-se de um aumento discreto quando comparado ao encontrado no estágio pró-inflamatório.

### **2.3.3 DIAC como alvo terapêutico**

A busca por novos tratamentos para melhorar a sobrevida de pacientes com descompensação aguda da cirrose é uma necessidade e tem sido foco de estudos recentes (BERNARDI; CARACENI, 2018). Assim, o conhecimento do sistema imune do paciente cirrótico pode auxiliar os clínicos na tomada de decisões para estabelecer a melhor estratégia terapêutica, prever complicações clínicas, atrasar a progressão da doença e diminuir mortalidade, principalmente nos casos de cirrose descompensada e ACLF (SIPEKI et al., 2014). Além de aumentar os riscos de infecções, a DIAC também está envolvida com piores respostas à vacinação, o que também é uma constante preocupação quando se trata de pacientes cirróticos (ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014).

Atualmente, considera-se a DIAC como um promissor alvo terapêutico, tanto com o uso de estratégias anti-inflamatórias nos estágios iniciais quanto de imuno-ativadoras nos estágios avançados (IRVINE et al., 2019). Eroglu et al. (2002) testaram o tratamento com o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) em ratos cirróticos e observaram melhora da regeneração hepática. Além disso, estudos clínicos, principalmente com pacientes com ACLF apresentaram bons resultados utilizando fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), o qual renovou o suprimento de leucócitos, melhorou a função das células imune já existentes, aumentou as quantidades de DCs e de linfócitos T circulantes, melhorou a função hepática e diminuiu a frequência de infecções (DUAN et al., 2013; GARG et al., 2012; KHANAM et al., 2014). Por outro lado, o uso de G-CSF em pacientes com cirrose sem ACLF apresentou resultados discordantes e pode estar associado a eventos adversos (NEWSOME et al., 2018). Nesses casos, a recomendação permanece sendo o uso de suplementação com albumina e de antibioticoterapia profilática, que, contudo, eleva os riscos de resistência bacteriana (O'BRIEN et al., 2014).

A suplementação com albumina em pacientes cirróticos já é comumente utilizada na prática clínica para regular o volume sanguíneo, mas sua função imunomodulatória tem sido

explorada mais recentemente. A albumina atua na função endotelial, mantendo a permeabilidade capilar normal (BERNARDI; CARACENI, 2018). Estudos mostraram que a função monocítica pode ser recuperada com a suplementação de albumina por reduzir a biodisponibilidade de prostaglandina E2 (PGE2). Pacientes cirróticos têm concentrações séricas elevadas de PGE2, que parece impedir a produção de TNF induzida por LPS. Ou seja, a hipoalbuminemia e o aumento sérico de PGE2 são fatores importantes na DIAC que podem ser atenuados com uma estratégia terapêutica simples (O'BRIEN et al., 2014).

Estudos recentes têm avaliado as células do sistema imune como alvo terapêutico, a fim de inibir mecanismos regulatórios e melhorar a depuração de patógenos ou de células tumorais (ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016). Um exemplo é o estudo clínico de fase II com o Tremelimumab, que bloqueia a CTLA4 de linfócitos T citotóxicos e impede a sua função, em pacientes com HCV e CHC. Normalmente, quando essa proteína se liga às moléculas CD80 e CD86 das células APCs emite um sinal inibitório de ativação. Após o tratamento anti-CTLA4, observou-se melhores respostas antiviral e antitumoral (SANGRO et al., 2013). Recentemente, foi detectada uma população de DCs imunorregulatória que expressa CTLA4 e que parece estar aumentada no SP de pacientes com CHC, assim, o tratamento anti-CTLA4 poderia beneficiar esse grupo de pacientes (HAN et al., 2014). Todavia, esses dados ainda estão sendo investigados e apresentam resultados discordantes (TANOUE; KAPLAN, 2016).

Adicionalmente, estudo clínico de fase I recente avaliou o tratamento com infusão de macrófagos em pacientes com cirrose hepática. Nove pacientes com cirrose hepática compensada foram submetidos a leucoaférese a fim de colher monócitos circulantes. Em seguida, *ex vivo*, os monócitos foram separados das células mononucleares e diferenciados em macrófagos. Os pacientes receberam infusão de  $10^7$ ,  $10^8$  ou  $10^9$  macrófagos autólogos. Após um ano de acompanhamento, todos os pacientes permaneceram vivos e livres de transplante, além de terem apresentado melhoras nas medidas de fibrose hepática (MORONI et al., 2019).

## 2.4 CÉLULAS IMUNE CIRCULANTES

O sistema imune é composto por uma variedade de tipos celulares que desempenham diferentes papéis, como fagocitose, apresentação de antígenos, toxicidade celular, sinalização e

imunotolerância. A distribuição e a quantidade de células do sistema imune no SP pode variar entre indivíduos, de acordo com idade, habitat, exposições a antígenos e características genéticas (BLANCO et al., 2018; BRODIN; DAVIS, 2017; CARR et al., 2016; RUDOLF-OLIVEIRA et al., 2015).

#### **2.4.1 Neutrófilos**

Os neutrófilos constituem a maior parte dos leucócitos no SP e são componentes importantes da imunidade inata. São células que apresentam característica fagocitária com tempo curto de meia vida. Além disso são muito reativas com elevada capacidade de proliferação que, se recebem estímulo inflamatório, evadem o endotélio vascular e migram para os tecidos (SHERWOOD, 2018). Sua função fagocítica está associada a mecanismos oxidativos, como a produção de EROs, e não oxidativos, como a liberação de proteases de seus grânulos (HONG, 2017).

Os neutrófilos circulantes no SP são células no seu estágio final de diferenciação, porém, em casos de infecção ou processos inflamatórios, devido ao aumento do recrutamento dessas células a partir da medula óssea (MO), pode ser detectada a presença de neutrófilos imaturos circulantes. Com relação à expressão de moléculas de superfície, os neutrófilos maduros podem ser diferenciados dos imaturos principalmente pela expressão de CD16 (Fc $\gamma$ RIII) (CHERIAN et al., 2010).

#### **2.4.2 Linfócitos T**

Os linfócitos T representam cerca de 75% do total de linfócitos na circulação periférica (SHERWOOD, 2018). São células maduras que deixaram o timo e estão prontas para exercerem suas funções, ou seja, expressam um receptor de células T (TCR) funcional. Os linfócitos T reconhecem antígenos processados e apresentados pelas células APCs pelas moléculas MHC-I e II, as quais são reconhecidas pelo TCR. Em 95% dos linfócitos T, o TCR é formado pelas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  (AB), e na pequena porcentagem restante, pelas cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  (GD) (MESQUITA et al., 2010). O TCR apresenta diversas características semelhantes ao receptor de células B (BCR), pois é composto por duas cadeias peptídicas da superfamília das imunoglobulinas, com

uma região variável e uma constante, formadas por recombinação gênica. O processo de recombinação gênica dá origem a TCR diversos e complexos, que participam de maneiras diferentes de diversas funções no sistema imune (MESQUITA et al., 2010; SHERWOOD, 2018).

Os linfócitos T que expressam o antígeno de superfície CD4 são chamados de células T auxiliaadoras (Th, do inglês, *T helper*), as quais podem ser subdivididas em Th1, Th2 e Th17 de acordo com fatores de transcrição que possuem e as citocinas que produzem. Mais recentemente, foram incluídos dois subtipos: Th9 e Th22. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> interagem com a MHC-II das APCs. Por outro lado, os linfócitos T que expressam o antígeno de superfície CD8, chamados T citotóxicos (Tc), interagem com a MHC-I das APCs ou de outras células, como por exemplo, de hepatócitos infectados por HBV ou de células tumorais. De acordo com o estímulo das APCs, os linfócitos T proliferam e se diferenciam em diferentes subtipos de linfócitos T (GEGINAT et al., 2013; SHERWOOD, 2018).

No SP, os linfócitos T podem ser divididos em quatro estágios de diferenciação de acordo com a expressão de alguns antígenos, como CD27, CCR7 (CD197), CD62L (L-selectina), CD45RA e CD45RO. As células T naïve (N) são linfócitos T que recém deixaram o timo, atingiram a circulação periférica e apresentam o fenótipo CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD45RO<sup>neg</sup> CD62L<sup>+</sup>. Os linfócitos T de memória central (CM) são caracterizados por baixa capacidade efetora, mas alto potencial de expansão, que rapidamente gera grandes quantidades de células T efetoras. Do ponto de vista fenotípico, as CM são CD45RA<sup>neg</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>, ou seja, expressam os receptores de direcionamento para o linfonodo (CCR7 e CD62L), como as células T N, e produzem IL-2. Linfócitos T de memória que perdem a expressão de CCR7 e CD62L, e que apresentam o seguinte fenótipo CD27<sup>neg</sup> CD45RA<sup>neg</sup> CD45RO<sup>+</sup>, são chamados T efetores de memória (EM), os quais produzem IFN- $\gamma$ . Os linfócitos T EM são recrutados do SP para tecidos não linfoides em caso de inflamação. Por exemplo, em casos de inflamação hepática, grandes quantidades de linfócitos T EM TCR AB<sup>+</sup> são recrutados para o tecido hepático. Em circunstâncias de inflamação acentuada e de acordo com a expressão de receptores, os linfócitos T EM podem migrar para linfonodos reacionais. Adicionalmente, há o subtipo de célula T efetora terminal CD45RA<sup>+</sup> (EMRA), que apresenta o fenótipo CD27<sup>neg</sup> CD45RO<sup>neg</sup> CD62L<sup>neg</sup>, volta a expressar os domínios do CD45 (CD45RA<sup>+</sup>), tem baixo potencial de expansão e alta capacidade citotóxica. Após a resposta primária, algumas células



T de memória permanecem circulantes por tempo indeterminado a fim de proteger o organismo de um segundo contato, tornando-se capazes de organizar uma resposta efetora rápida e específica (AHLERS; BELYAKOV, 2010; GEGINAT et al., 2013; SALLUSTO et al., 2000).

Enquanto o TCR interage com o MHC e gera o primeiro sinal de ativação, o receptor CD28 das células T interage com os receptores CD80 e CD86 das APCs, fornecendo o segundo sinal de ativação (BERNARD; LAMY; ALBERTI, 2002). Em células T N, o CD28 é constitutivamente expresso, o estímulo antigênico persistente faz com que os linfócitos T CM CD28<sup>+</sup> CD57<sup>neg</sup> recém-diferenciados se transformem em células terminais CD28<sup>neg</sup> CD57<sup>neg</sup>, ou após estímulos antigênicos adicionais, células terminais CD28<sup>neg</sup> CD57<sup>+</sup>. Assim, a expressão do glicopéptido CD57 indica ativação imune persistente de células T terminais que não apresentam mais capacidade proliferativa (KARED et al., 2016; STRIOGA; PASUKONIENE; CHARACIEJUS, 2011). Além disso, em condições basais, os linfócitos T expressam apenas MHC-I, mas em determinadas condições estimulatórias, podem expressar MHC-II, como o HLA-DR, o qual tem sido utilizado atualmente como um marcador tardio de ativação de células T (REVENFELD et al., 2016).

Como citado anteriormente, de acordo com fatores de transcrição definidores de linhagem, estímulos recebidos por citocinas e, conseqüentemente, citocinas que produzem e moléculas de superfície que expressam, as células Th podem ser classificadas em subtipos com funções distintas. Um desses subtipos são as células T reg, as quais expressam o fator de transcrição FoxP3, recebem estímulo por fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e expressam constitutivamente em sua superfície a molécula CD25. Além disso, essas células apresentam como características a baixa expressão de CD127 e a elevada expressão de CTLA4 na sua superfície. De acordo com a expressão de CD45RA, podem ser divididas em dois subtipos: T reg naïve ou latente (CD45RA<sup>+</sup>) e T reg de memória ou ativada (CD45RA<sup>neg</sup>), as quais constituem a maior parte dessa população celular (GEGINAT et al., 2013; MIYARA et al., 2009; SANTEGOETS et al., 2015). O FoxP3 é indispensável para que ocorra uma resposta imune regulatória efetiva, suas funções modeladoras foram mais profundamente estudadas a partir do conhecimento da deficiência genética no gene *FOXP3*, que leva ao desenvolvimento de doenças autoimunes com deficiência de T reg e conseqüente perda da tolerância periférica (GEORGIEV; CHARBONNIER; CHATILA, 2019).

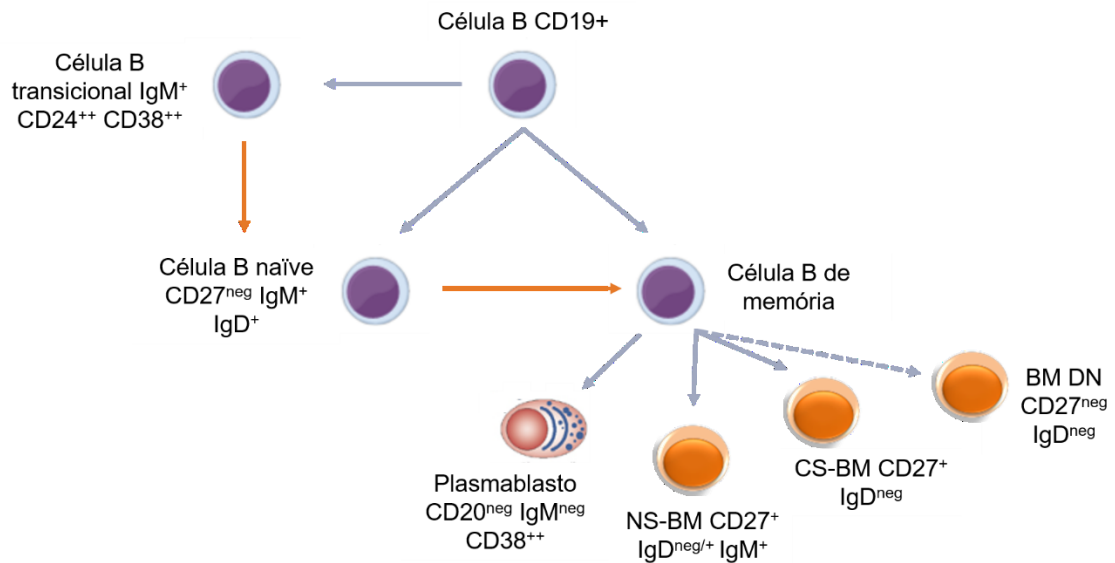
### 2.4.3 Linfócitos B

Os linfócitos B têm origem na MO e atingem o SP na forma de linfócitos B maduros naïve, os quais representam cerca de 60 a 70% dos linfócitos B circulantes e cujo BCR é formado por dois isotipos: IgD e IgM. Nos órgãos linfoides secundários e nos tecidos linfoides associados à mucosa (MALT), os linfócitos B naïve (BN) se diferenciam em células de memória ou efectoras (PEREZ-ANDRES et al., 2010).

Na zona clara do centro germinativo (CG) dos órgãos linfoides, as células BN podem entrar em contato com antígenos apresentados por APCs, como as DCs, e gerar uma resposta imunológica de Th. Hoje, sabe-se que, além das DCs, as próprias células B podem exercer função de apresentação de antígenos através da molécula MHC-II de sua superfície para os Th, sem haver a interação com DCs (HONG et al., 2018). A interação das BN com as Th se dá através da ligação do CD40 das células B com o CD40L das Th. Após esses contatos, a célula B se torna ativa e migra para a zona escura do CG. Resumidamente, na zona escura as células sofrem expansão clonal, hipermutação somática e recombinação de troca de classes de imunoglobulina (Ig) a fim de lograr alta afinidade entre o BCR e o antígeno. Esses processos levam à proliferação de células específicas para o antígeno gerando células B de memória (BM). Por outro lado, caso a BN não encontre antígeno nos órgãos linfoides, retorna ao SP como BN, onde circula por um determinado tempo até entrar em apoptose (HONG et al., 2018; PEREZ-ANDRES et al., 2010; SHANKLAND; ARMITAGE; HANCOCK, 2012).

Após o contato antigênico nos órgãos linfoides, as células BM retornam ao SP, onde representam cerca de 20 a 30% dos linfócitos B circulantes. Cerca de metade das BM sofreram troca de classes de Ig no CG e não expressam mais IgD nem IgM, e sim outras classes de Ig, como IgG ou IgA, denominadas *class switched*-BM (CS-BM). Enquanto que a outra metade das BM ainda coexpressa IgD e IgM ou apenas IgM, chamadas *unswitched* ou *non switched*-BM (NS-BM) (PEREZ-ANDRES et al., 2010). Atualmente, sabe-se que as células NS-BM estão associadas a uma resposta imune tipo-inata, à ativação do sistema complemento e à resposta rápida contra bactérias encapsuladas (BLANCO et al., 2018) (Figura 9).

Figura 9 – Fenótipo dos principais subtipos de células B circulantes.



As células B transicionais são consideradas células mais imaturas, em um estágio entre a célula B imatura e a B naíve (BN). As células BN são células maduras que migram para os órgãos linfoides onde podem entrar em contato com antígenos e se tornarem células B de memória (BM). Há três principais subtipos de BM: NS-BM, CS-BM e CS-BM CD27<sup>neg</sup>. O último estágio de diferenciação das células B são os plasmablastos e plasmócitos, que são células secretoras de anticorpos. NS-BM: *non-switched* B memória; CS-BM: *class switched* B memória; BM DN: B de memória duplo negativa (CD27<sup>neg</sup>); neg: ausência de expressão; +: expressão moderada; ++: expressão forte. Fontes (adaptado): PEREZ-ANDRES et al., 2010; BLANCO et al., 2018.

Cerca de 96% das células BM apresentam a molécula CD27<sup>+</sup> em sua superfície, a qual está expressa em células que tiveram contato com antígenos proteicos em uma resposta T-dependente. Por outro lado, de 1 a 4% das células BM sofreram troca de classes (CS-BM), porém não expressam CD27, as quais podem ser denominadas BM duplo-negativas (DN) por serem CD27<sup>neg</sup> IgD<sup>neg</sup>. Acredita-se que essas células entraram em contato com antígenos polissacarídeos, de uma maneira T independente, fora do CG. Dessa forma, a expressão de CD27 em células B não necessariamente é sinônimo de células de memória, e sim de interação com células T (BERKOWSKA et al., 2011; FECTEAU; CÔTÉ; NÉRON, 2006; QIAN et al., 2010). Além da diferente expressão de CD27, um estudo realizado por Obukhanich e Nussenzweig (2006) descreveu que as células BM originadas a partir de resposta T-dependente e T-independente diferem fenotipicamente no contexto da expressão de outros antígenos, como CD21 e CD23, os quais também podem auxiliar na distinção desses dois tipos de resposta.

Os plasmablastos representam o último estágio de diferenciação das células B e representam apenas de 1 a 3% das células B circulantes. São células formadas a partir das

células BM e que atingem o SP no seu caminho do tecido linfóide à MO, ao MALT, ou a tecidos inflamados, onde buscam nichos para completar sua maturação a plasmócitos. Os plasmócitos são células terminais que não possuem mais capacidade de multiplicar e que secretam grandes quantidades de anticorpos antígeno-específicos. Os plasmablastos podem ser identificados no SP pela expressão forte e homogênea de CD38, expressão fraca mas homogênea de CD19 e expressão heterogênea de CD20 (PEREZ-ANDRES et al., 2010; SHERWOOD, 2018).

Além dos subtipos de células B supracitados, sabe-se que existe uma pequena porcentagem (2 a 4%) de células B imaturas circulantes. Acredita-se que essas células possam escapar da MO durante o processo de seleção negativa, quando as células B portadoras de um receptor BCR autorreativo são eliminadas. Um dos subtipos de células B imaturas é conhecido como B1 e pode ser identificado fenotipicamente pela expressão de CD5, expressão fraca de CD21 e forte de CD81. Além das B1, em algumas condições pode-se encontrar no SP células B com expressão homogênea de CD38 e expressão mais fraca de CD45 e de CD20, as quais também são células B imaturas (PEREZ-ANDRES et al., 2010).

Além disso, existe um subtipo de célula B funcionalmente imatura, em um estágio entre a célula B imatura e a BN, denominada célula B transicional que pode ser encontrada no SP. Essas células estão em transição entre a MO e outros tecidos, como o baço, e são caracterizadas fenotipicamente pela expressão de IgM com coexpressão forte de CD24 e de CD38, além da ausência de expressão de CD27. Estudos observaram que a expansão desse compartimento de células B pode ser detectada em condições de imunodeficiência, quando ocorre bloqueio no desenvolvimento das células B, como em alguns tipos de imunodeficiência comum variável (CVID) (CUSS et al., 2006; SALZER; SACK; FUCHS, 2019; SIMS et al., 2005).

Figura 10 - Subtipos de células B circulantes classificados de acordo com a sua maturação.

Compartimento pré-naïve ou B imaturas	Compartimento pré-CG ou B naïve	Compartimento pós-CG
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células B1 (CD5<sup>+</sup>)</li> <li>• Células B imaturas (CD38<sup>+</sup>)</li> <li>• Células B transicionais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células B naïve</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células B de memória (NS-BM, CS-BM, BM DN)</li> <li>• Plasmablastos</li> </ul>

NS-BM: non-switched B memória; CS-BM: class switched B memória; BM DN: B de memória duplo negativa; +: expressão moderada. Fonte: a autora.

A classificação das células B transicionais foi complicada pela descoberta de outro subtipo de célula B, que compartilha o fenótipo CD24<sup>++</sup> CD38<sup>++</sup>: as células B com ação regulatória (B reg). Dessa forma, parte das células B classificadas como transicionais podem ser na verdade células B reg. É importante destacar que a identificação de B reg requer, além da marcação de superfície de proteínas como CD24 e CD38, a marcação intracelular de fatores de transcrição e a marcação funcional de produção de citocinas (SANZ et al., 2019). Essas células representam cerca de 1% das células B circulantes e têm como característica a inibição da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados. Essas células liberam IL-10, IL-35 e TGF- $\beta$  (do inglês, *transforming growth factor*), induzem T reg e inibem Th1 e Th17. Assim, seu principal papel é manter a imunotolerância (BLAIR et al., 2010; FLORES-BORJA et al., 2013; MARTIN et al., 2016; ROSSER; MAURI, 2015).

#### 2.4.4 Células NK e NKT

Como citado anteriormente na Seção 2.1.3.1, as células NK são células da imunidade inata que reconhecem células tumorais ou infectadas por partículas virais com alterações na expressão de moléculas de superfície, como a ausência de MHC-I (KUBES; JENNE, 2018; SHERWOOD, 2018) No SP, existem dois subtipos de células NK: 1) o subtipo CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>, mais frequente (90% das células NK), mais maduro e com alta capacidade citotóxica e 2) o subtipo CD56<sup>++</sup> CD16<sup>-/+fraco</sup>, menos frequente (10% das células NK), mais imaturo, com menor capacidade citotóxica e grande produtor de citocinas, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 (CALIGIURI, 2008; POLI et al., 2009).

Enquanto as células NK podem ser identificadas no SP pela expressão de CD56<sup>+/++</sup> e CD16<sup>-/+</sup> e ausência de CD3, as células NKT coexpressam CD56<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>. As células NKT são invariantes (iNKT), ou seja, apresentam um TCR único, composto predominantemente por cadeias V $\alpha$ 24Ja18 e V $\beta$ 11. Além disso, apresentam fenótipo de ativação ou memória e medeiam a resposta imune inata e adaptativa, além de apresentar funções antitumorais (PAPAMICHAIL et al., 2004). Estudo conduzido por Lee e colaboradores (2002) observou que as células NKT CD4<sup>+</sup> e NKT CD4<sup>neg</sup> CD8<sup>neg</sup> apresentam características distintas, como a produção de citocinas diferentes. A primeira produz IL-4 e IL-13, associadas ao desenvolvimento de Th2, enquanto a segunda produz IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , associadas à diferenciação de Th1. As células iNKT representam apenas 0,01 a 1,0% do total de células T do SP, assim, no compartimento CD56<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> o que se observa é uma soma de células iNKT (menos frequentes) e células T com expressão de CD56 (mais frequentes), as quais foram descritas como células efectoras (MONTROYA et al., 2007; VAN ACKER et al., 2017).

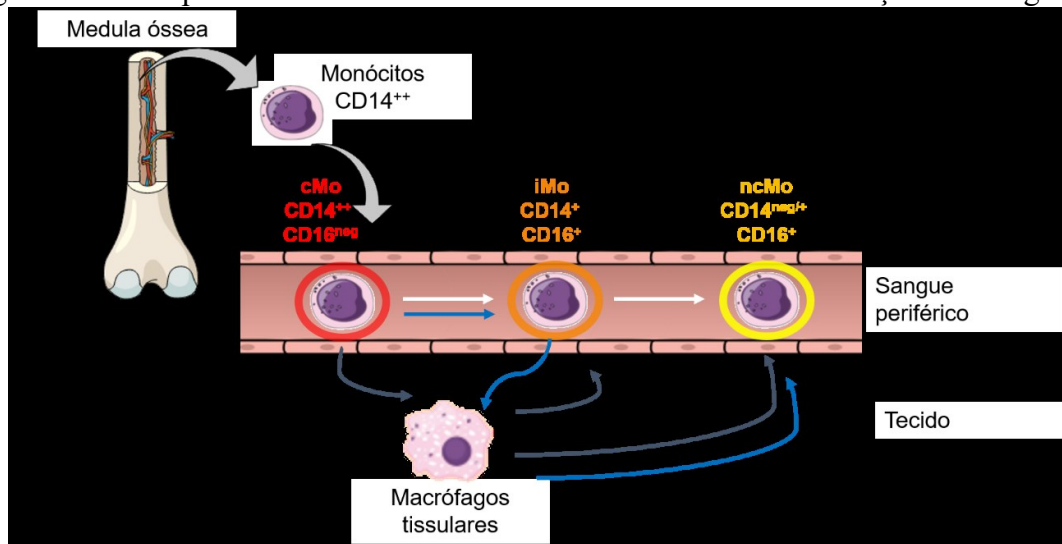
#### 2.4.5 Monócitos e células dendríticas

Os monócitos são células mieloides da imunidade inata que têm origem de um progenitor mielóide comum (CMP) na MO. O CMP dá origem a dois outros progenitores: progenitor de neutrófilos e de monócitos (GMP) e progenitor de monócitos e de DCs (MDP). Acredita-se que os monócitos e macrófagos são produzidos a partir de ambos GMP e MDP. Por outro lado, acredita-se que as cDCs, pDCs e as células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) têm origem exclusivamente a partir do MDP. Até o momento, esses dados foram confirmados em camundongos, mas não em humanos (WOLF et al., 2019).

Os monócitos circulantes podem ser divididos em três subtipos de acordo com sua função e expressão fenotípica: 1) monócitos clássicos (cMo) CD14<sup>++</sup> CD16<sup>neg</sup>, 2) monócitos intermediários (iMo) CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> e 3) monócitos não-clássicos (ncMo) CD14<sup>neg/+fraco</sup> CD16<sup>+</sup> (LAMBERT; SACK, 2017; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). No estado basal, reservas de cMo são mantidas na MO e alguns sítios extra medulares, como o baço. Em casos de inflamação ou infecção, os cMo são recrutados desses sítios ao SP e, em seguida, aos tecidos inflamados, onde se diferenciam em macrófagos ou em mo-DCs. As mo-DCs atuam nos tecidos e não retornam ao SP, ou seja, são células exclusivamente teciduais (KAPELLOS et al., 2019;

ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). Por outro lado, iMo e ncMo, também chamados de macrófagos tissulares (TiMas), são células que têm origem do cMo e que podem ser encontradas na circulação periférica. Além disso, sabe-se que a diferenciação ocorre de forma linear, de cMo para iMo e, posteriormente, para ncMo. Porém, ainda não está claro se essas células são formadas a partir do cMo na circulação (teoria da diferenciação), nos tecidos (teoria da migração), ou parte na circulação (cMo a iMo) e parte nos tecidos (iMo a ncMo) (DAMASCENO et al., 2019; PATEL et al., 2017; TAK et al., 2017) Testes realizados *in vitro* mostraram que cMo isolados do SP podem se diferenciar em iMo após estímulos recebidos com TGF- $\beta$  e IL-10 (LIASKOU et al., 2013) (Figura 11).

Figura 11 - Subtipos de monócitos circulantes e as teorias de diferenciação e de migração.



Os cMo são células fagocitárias que atuam em condições inflamatórias. A teoria da migração (setas cinzas) sugere que essas células escapam da circulação com o auxílio de moléculas de adesão e migram para os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos tissulares. Nos tecidos, realizam a fagocitose de patógenos e, em seguida, retornam à circulação periférica como iMo e ncMo. Esses dois últimos têm como principais funções a apresentação de antígenos e a reparação tecidual, respectivamente. Por outro lado, a teoria da diferenciação (setas brancas) sugere que os iMo e ncMo são células originadas a partir dos cMo, linearmente, por estímulos recebidos dentro da circulação, sem a necessidade de passar pelos tecidos. Uma mistura das duas teorias (setas azuis) sugere a diferenciação de cMo em iMo dentro da circulação. Em seguida, os iMo migram para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos e retornam à circulação como ncMo. cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos. Neg: ausência de expressão; +: expressão moderada; ++: expressão forte. Fontes: DAMASCENO et al., 2019; PATEK et al., 2017; TAK et al., 2017.

Os cMo são células importantes para a resposta contra patógenos, uma vez que têm alta capacidade de adesão ao endotélio vascular (pela expressão da molécula CD62L), de migração e de fagocitose. Os iMo são considerados como um estágio intermediário entre cMo e ncMo, são os menos frequentes no SP e são caracterizados pela elevada expressão de

moléculas MHC-II HLA-DR; assim, estão envolvidos com a função de processamento e apresentação de antígenos, além de migração transendotelial. Já os ncMo são especializados em fagocitose mediada por fatores do complemento e por receptores de Ig (FcR), migração transendotelial e respostas antivirais (KAPELLOS et al., 2019). Os ncMo são menos proliferativos e permanecem na circulação por mais tempo, além disso, apresentam funções menos inflamatórias que os cMo e iMo, como a remoção de restos celulares e o reparo do endotélio durante a homeostase (WOLF et al., 2019).

As DCs circulantes podem ser classificadas como cDCs e pDCs. As cDCs podem ser divididas em dois subtipos: cDC1 (CD141<sup>+</sup>) e cDC2 (CD1c<sup>+</sup>). Os três subtipos de DCs têm como principal característica a forte expressão de MHC-II HLA-DR, o que sugere que sua principal função é a apresentação de antígenos às células Th. Além disso, podem detectar desequilíbrios homeostáticos, secretar citocinas e fatores de crescimento e realizar apresentação de antígenos capturados no meio extracelular via MHC-I às células Tc, a qual é uma habilidade única das DCs (CLARK et al., 2018; O'KEEFFE; MOK; RADFORD, 2015; PATENTE et al., 2018; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010).

As cDCs são definidas como CD11c<sup>++</sup> CD123<sup>neg</sup>. As cDC1 têm importante papel na apresentação de antígenos capturados no meio extracelular via MHC-I a Tc, atuando na imunidade antiviral e antitumoral. Por outro lado, as cDC2 atuam na apresentação de antígenos à células Th e subsequente diferenciação aos subtipos Th1, Th2, Th17 e T reg (CLARK et al., 2018; O'KEEFFE; MOK; RADFORD, 2015; PATENTE et al., 2018). As pDCs, definidas como CD11c<sup>neg</sup> CD123<sup>+</sup>, são células extremamente importantes em infecções virais pois secretam grandes quantidades de IFN tipo I ( $\alpha/\beta$ ) por estímulo dos TLRs 7 e 9. Além disso, as pDCs parecem ter papel importante em infecções fúngicas por *Aspergillus fumigatus*, em doenças autoimunes e inflamatórias crônicas e na tolerância imune (O'KEEFFE et al., 2019).

## 2.5 CITOCINAS

As citocinas são mediadores solúveis da resposta inflamatória e fazem parte dos mecanismos da imunidade inata. Geralmente são polipeptídeos e glicoproteínas de tamanho menor ou igual a 40 kDa. Em condições normais, as citocinas são produzidas em quantidades mínimas ou até mesmo ausentes; porém, de acordo com o estímulo indutor, são produzidas,



liberadas e atuam de forma transitória. Essas moléculas podem ter função predominante pró- ou anti-inflamatória. Além disso, diferentes citocinas podem ter a mesma função (ação redundante) e a mesma citocina pode ter múltiplas ações e atuar em diferentes células-alvo (ação pleiotrópica). Ainda, células de diferentes origens podem produzir a mesma citocina (CRUVINEL et al., 2010; KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019; THOMSON; LOTZE, 2003). As citocinas abordadas no presente estudo estão descritas no Quadro 6.

Quadro 6 - Citocinas abordadas no presente estudo e sua função predominante.

Citocina	Função predominante
IL-2	Predominantemente pró-inflamatória. Relacionada à proliferação, sobrevivência e diferenciação de linfócitos T.
IL-4	Predominantemente anti-inflamatória. Promove a troca de fenótipo Th1 para Th2 e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS. Exerce papel imunoregulador.
IL-6	Predominantemente pró-inflamatória. Envolvida com a resposta de fase aguda, com a quimiotaxia de neutrófilos, com o recrutamento de monócitos e com a produção de anticorpos.
IL-10	Predominantemente anti-inflamatória. Inibe a produção de citocinas e promove conversão de fenótipo de linfócitos de Th1 em Th2.
IL-17	Predominantemente pró-inflamatória. Causa a expansão e recrutamento de monócitos e neutrófilos, além de participar de reações inflamatórias em conjunto com TLR, IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ .
IFN- $\gamma$	Predominantemente pró-inflamatória. Papel importante antiviral. Estimula a atividade de células NK e a diferenciação de Th1.
TNF- $\alpha$	Predominantemente pró-inflamatória. Considerada uma proteína de fase aguda capaz de induzir febre, apoptose e inflamação e de inibir proliferação tumoral e replicação viral.

Fontes: DIRCHWOLF et al., 2016; THOMSON; LOTZE, 2003.

As IL-2, IL-6 e IL-17 têm como característica predominante a atividade pró-inflamatória. A ação mais conhecida da IL-2 é estimular a proliferação de linfócitos T em resposta a antígenos, tanto de linfócitos Tc quanto de T reg; dessa forma, a IL-2 controla a amplificação da resposta imune mediada por células T. A IL-6 é liberada em resposta a infecções e a danos teciduais, tem ação importante em estimular linfócitos B a produzir anticorpos, na ativação e diferenciação de linfócitos T e na indução de proteínas de fase aguda. Em conjunto com a IL-3, a IL-6 atua na proliferação de progenitores hematopoiéticos, ou seja, induz a hematopoese. Enquanto isso, a IL-17 é caracterizada por estimular a liberação de outras citocinas e por sua ação pleiotrópica. Além disso, estudos descobriram que a IL-17 induz a maturação de precursores de DCs (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014; THOMSON; LOTZE, 2003).

Por outro lado, as IL-4 e IL-10 têm atividade predominante anti-inflamatória. A IL-4 atua em diversos subtipos celulares, como em linfócitos B e T, em células NK e em células mieloides, atua como um importante regulador da resposta imune. A IL-10 inibe a produção de

citocinas por linfócitos T, por monócitos/macrófagos e por neutrófilos, além de ter ação imunossupressora associada à liberação de mediadores imune, à apresentação de antígenos e à fagocitose (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019; THOMSON; LOTZE, 2003).

A citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  tem grande importância para o controle de microorganismos intracelulares, por isso é considerada um marcador de proteção. Já o TNF- $\alpha$  também é uma citocina pró-inflamatória, com ação pleiotrópica. Primeiramente descrito como uma proteína com ação antitumoral, o TNF- $\alpha$  ganhou importância devido a sua função em promover inflamação sistêmica e sobrevivência celular com efeitos biológicos diversos em monócitos/macrófagos, em neutrófilos e em linfócitos (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019; THOMSON; LOTZE, 2003).

## 2.6 A CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAR O SISTEMA IMUNE

A imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) é uma ferramenta amplamente utilizada para a identificação, a quantificação e a caracterização de células normais, reativas e neoplásicas (PEDREIRA et al., 2013; VAN DONGEN; ORFAO, 2012). Esse método avalia individualmente células em suspensão em relação à expressão de antígenos celulares específicos (CRAIG; FOON, 2008). Além disso, é considerada altamente específica, pois identifica diferentes populações celulares pela avaliação de diversos antígenos simultaneamente, e é muito sensível, pois pode detectar pequenas quantidades dessas populações. A avaliação de diferentes populações celulares simultaneamente é a principal vantagem do método, também denominada de análise multiparamétrica. Outra vantagem é a alta velocidade de processamento (DE TUTE, 2011).

A CF é uma ferramenta bastante consolidada para o diagnóstico de neoplasias hematológicas (CRAIG; FOON, 2008). Nos últimos anos, a CF tem ganhado proeminência na área da Imunologia, tanto para o diagnóstico de imunodeficiências (ABRAHAM; AUBERT, 2016; KANEGANE et al., 2018; VAN DONGEN et al., 2019) quanto para avaliação e acompanhamento do perfil imunológico de pacientes (FINAK et al., 2016; MAECKER; MCCOY; NUSSENBLATT, 2012; STREITZ et al., 2013). Recentemente, um estudo avaliou a CF como uma ferramenta promissora para monitorar as alterações do sistema imune induzidas pela sepse (MONNERET; VENET, 2016). Além disso, o estudo recomenda utilizar esse

método em amostras de pacientes com outras condições clínicas em que há uma resposta inflamatória exacerbada e que podem desenvolver infecções, como insuficiência hepática aguda, pancreatite e queimaduras (MONNERET; VENET, 2016). No âmbito dos transplantes hepáticos, a CF tem sido citada como um instrumento importante para monitorar infecções oportunistas, rejeição do enxerto e medição da imunossupressão (MAGUIRE et al., 2014; SOOD; TESTRO, 2014).

Adicionalmente, a utilização da CF para a dosagem de citocinas séricas ou plasmáticas tem grande vantagem sobre o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), pois utiliza apenas 50 uL de amostra biológica e permite a dosagem de diferentes citocinas simultaneamente (LENG et al., 2008).

## 2.7 JUSTIFICATIVA

Atualmente, o Serviço de Gastroenterologia do HU UFSC é referência estadual para o tratamento de portadores de cirrose hepática, com número mensal de atendimentos ambulatoriais gerais acima de 1.000 pacientes e cerca de 130 internações anuais por complicações da cirrose. Geralmente, após o primeiro episódio de descompensação da cirrose, as complicações tendem a se acumular e a sobrevida dos pacientes diminui consideravelmente. Nesse contexto, os gastos para o Sistema Único de Saúde (SUS) são muito elevados, pois o tempo de internação frequentemente é longo, em muitos casos é necessária a internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), diversos pacientes adquirem infecções hospitalares graves e muitos necessitam de transplante hepático. Um estudo realizado na Universidade Federal de Minas Gerais demonstrou que durante o período entre 2001 e 2011 o gasto médio por transplante hepático foi de R\$57.043,00. Além disso, o gasto médio com internações hospitalares sem transplante variou de R\$816,07 em 2001 a R\$2.248,18 em 2011 (QUEIROZ, 2016). Outro estudo brasileiro, realizado em Fortaleza (Ceará), observou que o custo médio do transplante hepático foi de US\$ 20.605,01 (PORTELA et al., 2010).

Quando se diagnostica um paciente com cirrose hepática, é de grande importância estabelecer o grau e o prognóstico da doença. Os dois principais modelos utilizados na avaliação do prognóstico da cirrose são os escores de Child-Pugh e MELD. Esses escores apresentam algumas limitações, além de serem insatisfatórios quando se separa os pacientes com cirrose

compensada e descompensada (D'AMICO; GARCIA-TSAO; PAGLIARO, 2006). Por isso, estudos recentemente concluídos (AMARAL et al., 2018; DA SILVA et al., 2018; FISCHER et al., 2017; MATIOLLO et al, 2020) no HU UFSC avaliaram o significado prognóstico de algumas proteínas e moléculas presentes no soro de pacientes com cirrose hepática, a fim de caracterizar um bom biomarcador de fácil acesso que ajude a orientar a conduta terapêutica. Como citado anteriormente, estudos relataram alterações nas populações celulares circulantes em pacientes cirróticos, e alguns deles relacionaram essas alterações ao prognóstico dos pacientes, a maiores taxas de mortalidade e à agressividade da doença. Assim, ressalta-se a importância da avaliação das células imune circulantes e de citocinas nos pacientes com cirrose, a fim de se obter novos parâmetros que avaliem prognóstico e que sejam adequados à rotina laboratorial, de fácil acesso e cujos resultados possam ser obtidos com agilidade.

Nesse sentido, recentemente, alguns grupos de pesquisa padronizaram painéis de anticorpos monoclonais para o monitoramento imune pela metodologia de CF. Finak et al. (2016) padronizaram um painel de oito cores com o qual pode-se identificar as populações de células T, B, DCs, monócitos, NK, Th1, Th2 e Th17. Esse painel foi desenhado para placas de 96 poços com a utilização de reagentes liofilizados. Outro estudo, conduzido por Streitz et al (2013), padronizou um painel de nove cores utilizando reagentes líquidos a fim de avaliar as mesmas populações celulares. No entanto, nenhum dos dois painéis poderia ser aplicado no HU UFSC, pois trabalhamos com painéis de no máximo oito cores e com reagentes líquidos. Dessa forma, é de grande interesse o desenvolvimento e a validação de um painel de oito cores com reagentes líquidos para o monitoramento imune.

De acordo com o exposto, a hipótese do nosso grupo é de que o sistema imune dos pacientes com cirrose hepática apresenta alterações importantes que podem estar associadas a maiores riscos de desenvolver complicações clínicas graves, como infecções bacterianas, e que essas alterações podem ser detectadas, na circulação sanguínea periférica, de forma prática e ágil pela técnica de CF. O estudo do perfil imune desses pacientes fornece dados para a identificação de biomarcadores associados a subgrupos de pacientes cirróticos de maior risco e que poderiam se beneficiar de imunoterapia.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a importância das células do sistema imune circulantes e de citocinas plasmáticas como biomarcadores para a avaliação prognóstica em pacientes com cirrose hepática.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar um painel de oito cores de anticorpos monoclonais para avaliação das células do sistema imune presentes em sangue periférico pela técnica de CF;
- Avaliar as quantidades absolutas e relativas de populações celulares circulantes, tais como subtipos de células T, B e NK, DCs, monócitos e neutrófilos, de três grupos de indivíduos: pacientes em descompensação aguda da cirrose (DA), pacientes com cirrose estável (CE) e controles saudáveis (CS);
- Avaliar as concentrações plasmáticas das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos grupos de indivíduos DA, CE e CS;
- Investigar a relação entre as quantidades das populações celulares circulantes e das citocinas plasmáticas com variáveis laboratoriais e clínicas;
- Investigar a associação entre as quantidades das populações celulares circulantes e das citocinas plasmáticas com prognóstico e gravidade da doença hepática.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo observacional transversal com componente prospectivo.

### 4.2 DESENHO E VALIDAÇÃO DO PAINEL DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

O primeiro objetivo específico do presente estudo foi desenhar e validar um painel de anticorpos monoclonais para detectar as principais populações de células do sistema imune circulantes, utilizando a técnica de CF de oito cores. A ideia da criação desse painel foi impulsionada pelo fato de não haver na literatura um painel de anticorpos validado com a capacidade de fluorocromos do Setor de Marcadores Celulares do HU UFSC e utilizando anticorpos monoclonais na forma de reagentes líquidos, como citado anteriormente (Seção 2.7). Assim, foram selecionados anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos recomendados por estudos prévios (BUREL et al., 2017; FINAK et al., 2016; MAECKER; MCCOY; NUSSENBLATT, 2012; STREITZ et al., 2013; VAN DONGEN et al., 2012) para compor um painel em que cada tubo apresenta uma função específica e reconhece populações celulares diferentes.

Para validar um painel de anticorpos monoclonais multicolor é recomendada a realização de procedimentos e testes a fim de diminuir as interferências entre os fluorocromos e confirmar a eficácia de marcação e reconhecimento dos antígenos a serem estudados (BAUMGARTH; ROEDERER, 2000; KALINA et al., 2012; PERFETTO; CHATTOPADHYAY; ROEDERER, 2004; WANG; HOFFMAN, 2017). Para a realização desses testes foram utilizadas um total de dez amostras de SP com EDTA/K3 de indivíduos saudáveis recrutados da equipe do HU UFSC e seis amostras de pacientes com leucopenia atendidos no Serviço de Quimioterapia do mesmo hospital. Esses indivíduos receberam esclarecimentos sobre a pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

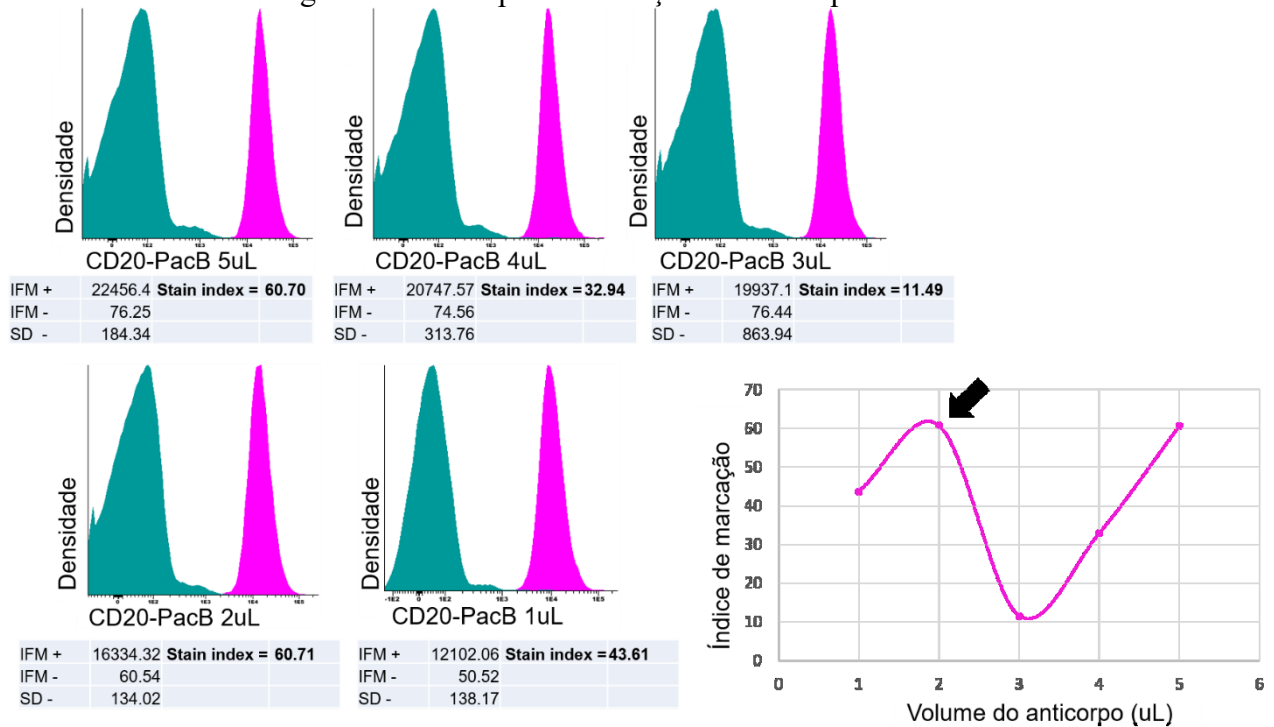
Os fluorocromos e clones dos anticorpos monoclonais foram selecionados a fim de obter a melhor sensibilidade e especificidade em reconhecer antígenos presentes em pequenas quantidades nas células. Anticorpos que se ligam a antígenos que sabidamente são expressos

em menores quantidades nas células foram escolhidos conjugados a fluorocromos que emitem fluorescências mais fortes, enquanto anticorpos que se ligam a antígenos que são expressos em altas quantidades nas células foram selecionados conjugados a fluorocromos que emitem fluorescências mais fracas. Quando mais de um clone de anticorpo monoclonal foi recomendado, foram realizados testes a fim de selecionar o melhor clone para identificar e classificar as populações celulares de interesse.

Os anticorpos monoclonais foram titulados para se obter a concentração que fornece o sinal mais forte para a população positiva e o sinal mais fraco para a negativa, ou seja, a melhor separação entre o sinal positivo e negativo, utilizando o cálculo do índice de marcação (IM), cuja fórmula é intensidade de fluorescência média (IFM) da população celular positiva para o marcador em estudo subtraída da IFM da população negativa, dividido pelo dobro do desvio padrão da população negativa. O volume de anticorpo utilizado foi aquele que forneceu o maior número como resultado de IM, como pode ser observado no exemplo da Figura 12.



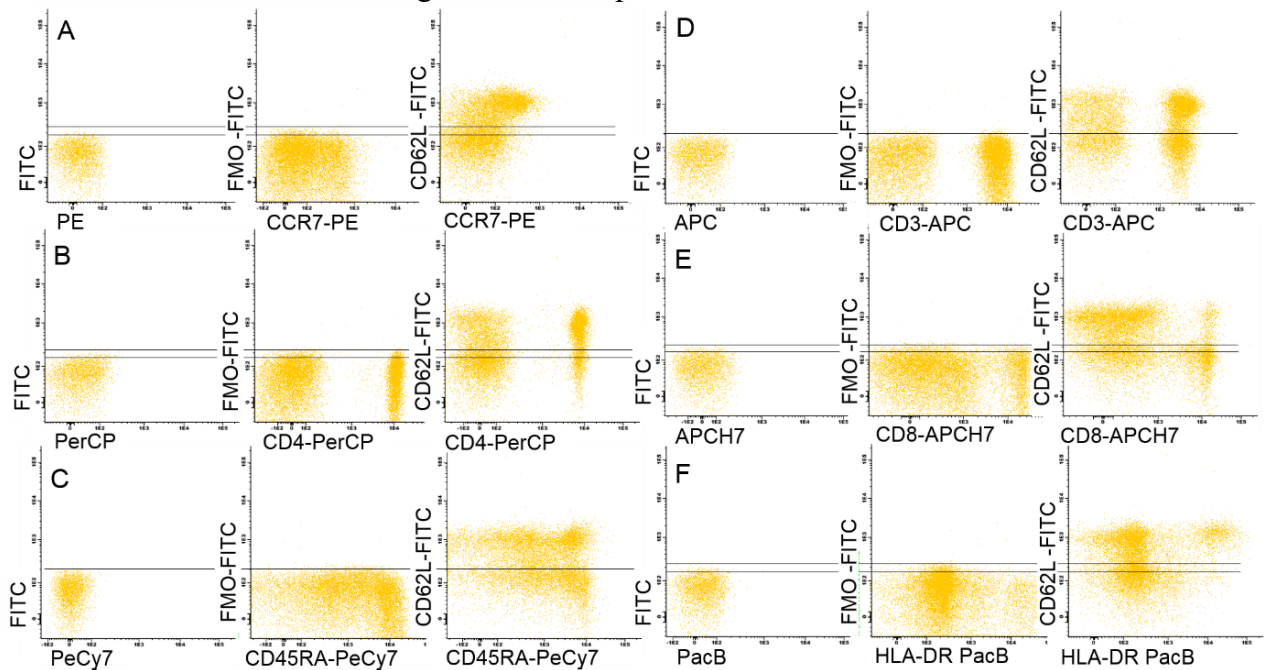
Figura 12 - Exemplo de titulação de anticorpo monoclonal.



O anticorpo CD20 conjugado ao fluorocromo Pacific Blue (PacB) foi testado nos seguintes volumes: 5uL (volume indicado na bula do fabricante), 4uL, 3uL, 2uL e 1uL. Os picos em verde escuro representam os linfócitos negativos para CD20, e em rosa, os linfócitos B maduros, que são positivos para CD20. O índice de marcação (do inglês, *stain index*) é calculado da seguinte forma: intensidade de fluorescência média (IFM) da população celular positiva subtraída da IFM da população negativa, dividido pelo dobro do desvio padrão (SD) da população negativa. O maior resultado, que no exemplo foi 60,71, representa a melhor separação entre a população positiva e negativa e seleciona o volume escolhido (2 uL) para ser utilizado nas futuras marcações. A titulação foi realizada para todos os anticorpos utilizados no estudo. No momento da troca de lote do mesmo anticorpo, o volume definido pela titulação foi testado para avaliação da qualidade de marcação. Fonte: a autora.

Após definido o clone e o volume de anticorpo a ser utilizado, foram realizados os controles FMO (do inglês, *Fluorescence Minus One*). O controle FMO assegura que a combinação de anticorpos e fluorocromos não interfira na marcação de cada antígeno e permite a determinação de pontos de corte entre a população celular positiva e negativa para determinados marcadores. A Figura 13 mostra o exemplo de FMO de um marcador utilizado neste trabalho. Células do SP foram marcadas com todos os anticorpos monoclonais presentes em determinado tubo do painel, exceto um. Esse canal vazio foi avaliado com relação a interferências provenientes principalmente de fluorescências vizinhas, ou seja, que são reconhecidas em comprimentos de onda vizinhos.

Figura 13 - Exemplo de controle FMO.



Controle FMO do anticorpo CD62L conjugado a FITC. Interferência de PE (A), PerCP (B), PeCy7 (C), APC (D), APCH7 (E) e PacB (F) no canal FITC sem a adição de nenhum anticorpo (primeiro gráfico), com a adição de todos anticorpos exceto um (FMO) (segundo gráfico) e com adição de todos os anticorpos (terceiro gráfico). As linhas representam a diferença da marcação do tubo sem adição de nenhum anticorpo da marcação quando todos anticorpos estão presentes exceto um (no exemplo CD62L-FITC). Quanto maior o espaço entre as duas linhas, maior a interferência. A linha superior representa o real ponto de corte da população negativa e da positiva no terceiro gráfico. Em alguns casos, as linhas se sobrepõe (quando não há interferência). O controle FMO foi realizado para os anticorpos de interesse do estudo e para todas as fluorescências (Pacific-Orange não está representado no gráfico). Fonte: a autora.

Ao longo da validação do painel também foram utilizados controles internos positivos e negativos de marcação para estabelecer pontos de corte e a eficácia da marcação. Além de controles de compensação para calibrar o citômetro de fluxo especificamente para o painel. O espectro de emissão de alguns fluorocromos sofre sobreposição, por isso torna-se necessário realizar uma correção matemática dos dados coletados pelos detectores. Essa correção é denominada compensação e retira a interferência da sobreposição espectral. (PERFETTO; CHATTOPADHYAY; ROEDERER, 2004). A compensação foi calculada automaticamente pelo citômetro de fluxo, e após calculada, foi aplicada a todos os experimentos.

Para lograr uma análise de qualidade, foram definidas as quantidades ideais de células a serem avaliadas para conseguir classificar os subtipos celulares de interesse e detectar populações celulares de baixa frequência, como as DCs. Assim, foram definidos valores mínimos e máximos de células a serem salvas em cada tubo, a fim de se obter homogeneidade

no momento da análise, independente da leucometria ou distribuição celular de cada indivíduo (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantidade de células a serem salvas no software de aquisição por tubo.

<b>Tubo</b>	<b>Células a serem salvas no software de aquisição</b>
<b>1 (triagem)</b>	200.000 leucócitos totais (CD45 <sup>+</sup> )
<b>2, 3 e 4 (linfócitos T)</b>	40.000 a 100.000 células CD3 <sup>+</sup> ( <i>stopping gate</i> )
<b>5 (linfócitos B)</b>	10.000 a 50.000 células CD19 <sup>+</sup> ( <i>stopping gate</i> )
<b>6 (DCs)</b>	500.000 a 1.000.000 leucócitos totais (CD45 <sup>+</sup> )

DCs: células dendríticas. *Stopping gate*: ferramenta do software Infinicyt que permite parar a aquisição quando alcançar certo número de determinado subtipo celular (exemplo, células CD3<sup>+</sup>), mas que salva todas as células para futura análise.

Também foi definido o volume ideal de SP a ser processado e marcado com os anticorpos a fim de alcançar as quantidades mínimas de células demonstradas na Tabela 1. Para este fim, foram testados diferentes volumes de SP de indivíduos saudáveis e de pacientes com leucopenia do Serviço de Quimioterapia do HU UFSC e, dessa forma, foram determinados os volumes ideais de amostra para seguir a marcação e identificar com segurança e qualidade os subtipos celulares avaliados pelos tubos 2, 3, 4 e 6 (Tabela 2).

Tabela 2 - Volume de amostra de acordo com a contagem de linfócitos e de leucócitos.

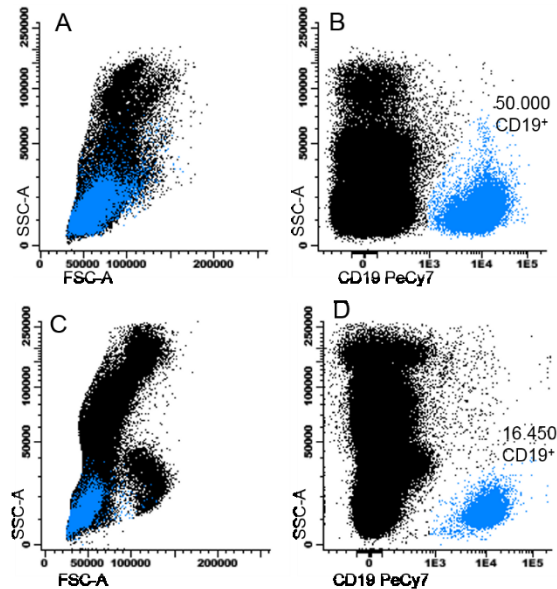
<b>Tubos 2, 3 e 4 (linfócitos T)</b>		<b>Tubo 6 (DCs)</b>	
Contagem absoluta de linfócitos (/mm <sup>3</sup> )	Volume de amostra (μL)	Contagem absoluta de leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	Volume de amostra (μL)
<1.000	300	<4.000	300
1.000–1.500	280	4.000–5.000	280
1.501–2.500	250	5.001–7.000	250
>2.500	200	>7.000	200

DCs: células dendríticas.

Para a análise do Tubo 1, não foi necessário concentrar um grande número de células, pois se trata de um tubo de triagem que classifica os principais subtipos celulares circulantes. Por outro lado, para a análise do Tubo 5, é necessária a concentração de células B, as quais em diversas condições clínicas podem estar diminuídas. Além disso, para a marcação do Tubo 5 é necessária a realização de uma técnica para remover interferentes, principalmente IgG livre, para uma boa marcação de imunoglobulinas. Esse procedimento pode ser feito pela separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ou por lavagens da amostra com tampão fosfato-salino (PBS) com albumina do soro bovino (BSA) a 0,2%. Dessa forma, houve

a necessidade de realizar o teste pelas duas técnicas para definir qual forneceria o melhor resultado (Figura 14).

Figura 14 - Marcação das células B (CD19<sup>+</sup>) com dois procedimentos: PBMC e múltiplas lavagens com PBS BSA 0,2%.



O teste foi realizado com amostra leucopênica a fim de definir a utilização da separação de células mononucleares por densidade (PBMC) (A e B) ou múltiplas lavagens da amostra com PBS BSA 0,2% (C e D), uma vez que a marcação de imunoglobulinas na superfície das células B requer a eliminação de interferentes da amostra. Como pode ser observado, a separação com PBMC foi mais eficaz em concentrar maior número de células B. No painel B, com PBMC, pode-se observar que foram salvos 50.000 eventos CD19<sup>+</sup>, e ainda havia amostra no tubo para ser analisada; enquanto que o painel D mostra que com as múltiplas lavagens apenas 16.450 eventos CD19<sup>+</sup> foram salvos utilizando todo o conteúdo do tubo. A qualidade de marcação das imunoglobulinas IgD e IgM apresentaram resultados semelhantes com as duas técnicas (dado não mostrado).

Fonte: a autora.

Amostras de sangue total leucopênicas foram processadas para definir a utilização da separação de células mononucleares por densidade ou múltiplas lavagens da amostra com PBS BSA 0,2%. Como pode ser observado na Figura 14, a marcação de PBMC foi mais eficaz em concentrar maior número de células B do que a marcação da amostra lavada; dessa forma, foi a técnica escolhida para a avaliação das células B nesse estudo.

#### 4.3 POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM

Na segunda etapa do estudo, foram considerados elegíveis para o grupo de pacientes com descompensação aguda da cirrose (DA) os pacientes hospitalizados no HU UFSC devido

a complicações da cirrose hepática no período entre janeiro de 2018 e dezembro de 2018. A DA foi definida como uma piora rápida da cirrose hepática com a presença de complicações clínicas. Os participantes foram incluídos consecutivamente logo após a internação no Serviço de Emergência do HU UFSC.

Foram consideradas complicações da doença hepática crônica para inclusão neste estudo: ascite, EH, hemorragia digestiva alta secundária à HP, síndrome hepatorenal e infecções bacterianas. O diagnóstico de cirrose hepática foi estabelecido por histologia (quando disponível), ou pela combinação dos resultados de exames de imagem e laboratoriais e da avaliação clínica.

Foram considerados critérios de inclusão: idade superior a 18 anos e diagnóstico de cirrose hepática. Como critérios de exclusão foram considerados as internações não relacionadas a complicações da cirrose hepática, diagnóstico duvidoso de cirrose, infecções pelo HIV, infecções atuais pelo vírus Epstein-barr (EBV) e pelo citomegalovírus (CMV), neoplasias malignas sólidas e hematológicas (exceto câncer de pele), uso de terapia imunossupressora, portadores de doenças autoimunes e pacientes com CHC (MAZZAFERRO; et al., 2011).

A EH foi diagnosticada e graduada de acordo com os critérios de West Haven (FERENCI et al., 2002). Essas escalas utilizam parâmetros exclusivamente clínicos. Para a avaliação da gravidade da doença hepática foram utilizados os modelos MELD o escore de Child-Pugh. A definição de ACLF foi feita conforme os critérios do consórcio EASL-CLIF. Os pacientes foram classificados em ACLF ausente, grau 1, grau 2 ou grau 3, de acordo com número de órgãos em falência. Os critérios para falência orgânica foram definidos tendo como base o escore CLIF-SOFA, o qual inclui as variáveis bilirrubina, creatinina, EH, RNI, pressão arterial média e relação SaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> (MOREAU et al., 2013).

A presença da infecção PBE foi detectada pela avaliação da cultura e da citologia do líquido ascítico dos pacientes internados por descompensação aguda da cirrose. O resultado da citologia foi considerado positivo para PBE quando a contagem de neutrófilos no líquido ascítico foi maior que 250/uL.

Foram considerados elegíveis para o grupo de pacientes com cirrose estável (CE) os pacientes em acompanhamento ambulatorial no HU UFSC. A CE foi definida como pacientes com cirrose hepática em acompanhamento ambulatorial sem descompensação aguda naquele

momento. Nesse grupo de pacientes, foram considerados critérios de inclusão: idade superior a 18 anos e diagnóstico de cirrose hepática. Como critérios de exclusão foram considerados diagnóstico duvidoso de cirrose, infecção por HIV, infecção atual por EBV e CMV, neoplasias malignas sólidas e hematológicas (exceto câncer de pele), uso de terapia imunossupressora, portadores de doenças autoimunes, pacientes com CHC e com dificuldade de deambulação. Pacientes do grupo CE que nunca apresentaram complicações clínicas associadas à cirrose nem foram internados em decorrência da doença hepática crônica, foram classificados em um subgrupo denominado cirrose compensada.

Como grupo controle saudável (CS) do estudo, foram recrutados indivíduos saudáveis com idade e sexo semelhantes aos pacientes cirróticos. Este recrutamento foi realizado por pareamento, simultaneamente ao recrutamento de pacientes hospitalizados com descompensação aguda da cirrose. Além disso, utilizou-se como referência características de pacientes cirróticos do HU UFSC descritas em estudo prévio: médias de idade de 53,74 anos (grupo DA) e 56,05 anos (grupo CE) e predomínio do sexo masculino de 73,1% (grupo DA) e de 65,3% (grupo CE) (FISCHER et al., 2017). Foram considerados critérios de exclusão para o grupo controle: antecedentes de doenças hepáticas, uso de antibióticos ou diagnóstico de infecções nos últimos sete dias, consumo abusivo de álcool, imunossupressão (uso de imunossupressores ou infecção por HIV), diabetes mellitus (DM), neoplasias malignas, doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas.

Cálculo amostral: O tamanho da amostra foi estimado em 31 indivíduos por grupo (grupos de pacientes cirróticos e grupo de controles saudáveis). Foram considerados os seguintes parâmetros (baseados em dados de estudos prévios): poder do teste 80%, intervalo de confiança 95%, razão dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> de pacientes cirróticos soronegativos para o HIV (média de 3,1 e desvio padrão de 1,3) e de controles saudáveis (média de 2,3 e desvio padrão de 0,9). O estudo utilizado como referência mensurou os subtipos linfocitários em pacientes cirróticos pela mesma técnica, a citometria de fluxo (MATOS et al., 2013).

#### 4.4 PROCEDIMENTOS E VARIÁVEIS EM ESTUDO

Um instrumento de coleta de dados (Apêndice A) foi aplicado na Emergência do HU UFSC nas primeiras 24 horas de internação dos pacientes DA por médicos alunos do Programa

de Mestrado Profissional em Cuidados Intensivos e Paliativos envolvidos no projeto. Outro instrumento de coleta de dados (Apêndice B) foi aplicado no momento da coleta de amostra dos pacientes CE em atendimento ambulatorial. Um questionário foi aplicado antes da coleta de amostra dos CS (Apêndice C). Adicionalmente, outras informações clínicas e laboratoriais dos pacientes com cirrose hepática foram recolhidas do prontuário físico e do sistema de informação da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do HU UFSC.

As características clínicas e epidemiológicas foram avaliadas a partir de variáveis demográficas e de dados referentes à doença hepática e comorbidades. As variáveis de exame físico e sinais vitais foram obtidas durante avaliação clínica. As variáveis laboratoriais contemplam hemograma, sódio, potássio, ureia, creatinina, tempo e atividade da protrombina (TAP), RNI, proteína C reativa (PCR), lactato, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina, bilirrubinas totais e frações, hemocultura, citologia e cultura de líquido ascítico. As variáveis obtidas a partir da análise das células circulantes por CF foram as quantidades absolutas e relativas no SP de: neutrófilos, monócitos e subtipos, linfócitos B e T e seus subtipos, células NK e seus subtipos, DCs e seus subtipos, além de alterações de fenótipo e fenótipos de ativação. Além disso, outras variáveis obtidas por CF foram as concentrações plasmáticas de citocinas IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 em pg/mL.

#### 4.5 PROTOCOLOS DE MARCAÇÃO E AQUISIÇÃO DE AMOSTRAS (IMUNOFENOTIPAGEM)

A amostra biológica utilizada no presente trabalho foi sangue total em tubo contendo o anticoagulante EDTA/K3. Os dados do hemograma, processado no equipamento XE 2100 (Sysmex, Japão), foram coletados e, após liberado, o tubo do hemograma foi utilizado para realizar os testes. Dessa forma, o estudo não necessitou de uma coleta adicional de amostra biológica. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente até o momento do processamento e foram processadas em até 24 horas, pois nessas condições mantém-se a estabilidade para realizar a imunofenotipagem com qualidade. Contudo, pequena perda celular deve ser levada em consideração (DIKS et al., 2019). O resultado do hemograma foi utilizado para obter os valores absolutos das células.

Para a marcação dos Tubos 1, 2, 3 e 6, de 200 a 300 uL de sangue total com EDTA/K3 foram pipetados em um tubo de poliestireno de 5 mL juntamente com os anticorpos monoclonais utilizando os volumes definidos pela titulação. Após homogeneização, os tubos foram incubados por 30 minutos na ausência de luz e em temperatura ambiente. Em seguida, 2 mL de solução lisante de hemácias previamente diluída 10x (Beckton Dickinson, EUA) foram adicionados aos tubos, seguido de nova incubação de 15 minutos. Após a incubação, a amostra lisada foi centrifugada por 5 minutos a 2.000 rpm, seguida de uma lavagem com PBS. Após a lavagem, o sobrenadante foi retirado e descartado com auxílio de uma seringa. O pellet de leucócitos foi suspenso com 300 uL de PBS. Os tubos foram adquiridos no citômetro de fluxo imediatamente após o preparo. Para a avaliação do Tubo 1, foram salvos 200.000 eventos CD45<sup>+</sup>. Para avaliação dos Tubos 2 e 3 foram salvos de 40 a 100 mil eventos CD3<sup>+</sup>. Para a investigação das DCs (Tubo 6), foram salvos de 500.000 a 1.000.000 de eventos CD45<sup>+</sup>, a fim de aumentar a sensibilidade e detectar essas células de baixa frequência. Os protocolos de processamento e marcação das amostras estão descritos em detalhes no Apêndice D.

A marcação do Tubo 4, que é destinado ao estudo das células T reg, requer a marcação intracitoplasmática/intranuclear com a utilização de tampão específico para fator de transcrição (Transcription Factor Buffer Set, Beckton Dickinson, EUA). Duzentos a 300 uL de sangue total com EDTA/K3 foram pipetados em um tubo de poliestireno de 5 mL juntamente com os anticorpos monoclonais (exceto FoxP3) utilizando-se os volumes definidos pela titulação. Esse procedimento requer duas etapas de incubação de 40 minutos: a primeira com a solução Fix/Perm seguida de duas lavagens, e uma segunda com o anticorpo monoclonal FoxP3 seguida de duas lavagens finais. Para avaliação desse tubo, foram salvos de 40 a 100 mil eventos CD3<sup>+</sup> (Apêndice D).

Para a marcação do Tubo 5, utilizou-se as PBMC a fim de concentrar mais linfócitos B. Para este fim, após centrifugação de 10 minutos a 4.400 rpm, retirou-se o plasma da amostra, o qual foi aliqotado em dois criotubos para futuras análises. Adicionou-se PBS na mesma quantidade do plasma retirado e homogeneizou-se totalmente. Em seguida, 2 mL de amostra foram centrifugados com solução de separação de PBMC por gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque 1077, Sigma-Aldrich, Alemanha) por 30 minutos a 2.000 rpm de acordo com procedimentos padrões (COSSARIZZA et al., 2019). Ao final da separação e lavagem, o pellet de PBMC presente no tubo de poliestireno de 5 mL suspenso com PBS foi marcado com os



anticorpos monoclonais utilizando-se os volumes definidos pela titulação. A marcação das PBMC foi realizada conforme marcação dos tubos 1, 2, 3 e 6 (marcação de superfície). Foram salvos de 10 a 50 mil eventos CD19<sup>+</sup> (Apêndice E).

Para todas as amostras foi realizado um tubo sem marcação, chamado “Branco”, ou seja, sem adição de anticorpos monoclonais. Esse tubo serve como controle negativo, auxilia na detecção de autofluorescência e evita a interpretação de falsos positivos.

O equipamento utilizado foi o FACSCanto II (Beckton Dickinson, EUA) na configuração oito cores e três lasers e com o software de aquisição de dados FACSDiva (versões 6 e 8). A performance do citômetro de fluxo foi verificada diariamente com o uso de esferas de calibração (BD™ CS&T beads; Beckton Dickinson, EUA). A análise dos dados foi realizada no software de análise Infinicyt 1.7 (Cytognos, Espanha).

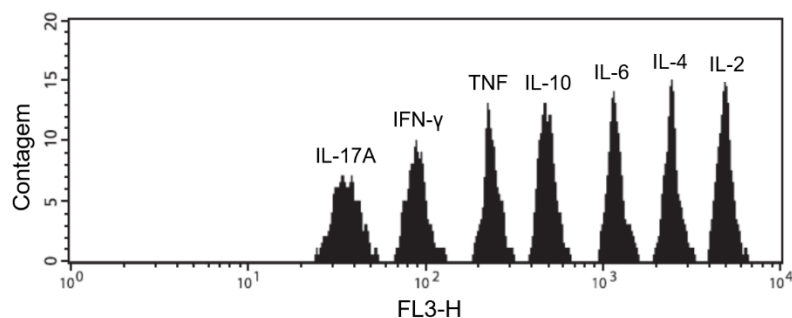
Além disso, para a análise dos subtipos de células B, foi utilizado o aplicativo web Cytobank™ 7.3.0 (Beckman Coulter; Brea, CA, EUA) (KOTECHA; KRUTZIK; IRISH, 2010). Os arquivos Flow Cytometry Standard (FCS) 3.0 foram importados para o software Infinicyt™ e submetidos a um procedimento de análise padrão para remover restos e agregados celulares e identificar células B CD19<sup>+</sup>. Em seguida, 7.500 células CD19<sup>+</sup> por amostra foram exportadas para análise posterior no aplicativo Cytobank™ 7.3.0 usando as ferramentas viSNE e mapa de calor (*heatmap*). A contagem de células escolhida (7.500 células) foi o menor número de células B remanescentes em uma das amostras após a remoção de restos e agregados celulares; assim, todas as amostras foram padronizadas em conformidade.

Para analisar a expressão de HLA-DR nos subtipos de monócitos avaliou-se a intensidade de fluorescência média (IFM) do marcador HLA-DR para os subtipos cMo, iMo, ncMo e TiMas (iMo e ncMo juntos). Em seguida, as IFMs de HLA-DR de iMo, de ncMo e de TiMas foram divididas pela IFM de HLA-DR de cMo (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>neg</sup>), a fim de reduzir as variabilidades envolvidas com lotes de anticorpos, marcações e condições diárias do equipamento. Já a expressão de CD62L, que é bimodal, foi avaliada pela porcentagem de células que expressam essa molécula em sua superfície.

#### 4.6 DOSAGEM DE CITOCINAS (CBA)

Como visto anteriormente, no momento do isolamento das PBMC para a marcação do Tubo 5, o plasma foi separado e acondicionado em dois criotubos. Os dois criotubos identificados com os dados do indivíduo foram armazenados imediatamente em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ao final da coleta de amostras um dos criotubos com plasma de cada indivíduo foi descongelado e utilizado para a dosagem de citocinas pelo kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) (Beckton Dickinson, EUA), por CF. É importante destacar que, de acordo com estudo prévio, as citocinas permanecem estáveis a  $-80^{\circ}\text{C}$  por até dois anos (DE JAGER et al., 2009). Foram incluídos nesses testes todos os indivíduos dos grupos CS, DA e CE. O kit utilizado foi o CBA Human Th1/Th2/Th17, o qual avalia as concentrações de sete citocinas: IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 em apenas 50  $\mu\text{L}$  de plasma. O protocolo de marcação, baseado nas instruções do fabricante, pode ser encontrado em detalhes no Apêndice F. O CBA tem como fundamento o uso de esferas conjugadas com anticorpo de captura, os quais se ligam às citocinas. Cada tipo de esfera possui diferente intensidade de fluorescência, assim, diversos tipos de citocinas podem ser analisados simultaneamente no canal FL3 no citômetro de fluxo, como mostra a Figura 15.

Figura 15 - Histogramas de distribuição das sete populações de esferas em função de suas diferentes intensidades de fluorescência.



Fonte (adaptado): Manual de instruções do kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit.

Em conjunto com as amostras, foi realizada uma curva padrão, com diluições desde 0  $\text{pg/mL}$  a 5.000  $\text{pg/mL}$ . É com base nessa curva padrão que o software calcula as concentrações das citocinas nas amostras. Antes da aquisição da curva e das amostras no citômetro de fluxo,

este foi calibrado utilizando-se um reagente específico do kit, conforme instruções do fabricante. O equipamento utilizado foi o FACSCanto II (Beckton Dickinson, EUA) com o *software* de aquisição de dados FACSDiva (versão 8). A análise dos dados foi realizada com o *software* FCAP Array™ (Beckton Dickinson, EUA).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, as variáveis foram testadas quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. A seguir, as variáveis numéricas paramétricas foram comparadas pelos testes t de Student ou pelo teste ANOVA de uma via seguido do post-hoc Bonferroni. Em caso de desigualdade de variâncias, o teste de Welch também foi empregado, seguido do post-hoc de Games-Howell. Por outro lado, as variáveis numéricas não paramétricas foram comparadas pelos teste de Mann-Whitney U ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do post-hoc de Dunn-Bonferroni. A correlação entre as variáveis numéricas foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ). Correlação moderada foi considerada se valor de  $r_s$  foi de 0,4 – 0,6, forte se 0,6 – 0,8 e muito forte se maior que 0,8 (AKOGLU, 2018). As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste Qui-quadrado ou exato de Fisher. A análise de regressão logística foi usada para investigar fatores independentemente associados com ACLF. Análises de regressão de Cox univariadas foram utilizadas para avaliar a associação entre as variáveis de interesse e a sobrevida. Em seguida, foi realizada regressão múltipla de Cox incluindo os marcadores com significância estatística na regressão univariada além de variáveis relevantes, sabidamente associadas à sobrevida pacientes cirróticos. Os melhores pontos de corte para os marcadores predizerem os desfechos ACLF e mortalidade foram determinados a partir das curvas ROC (*Receiver Operating Characteristics*). O desempenho das variáveis em predizer os desfechos foi analisado pelo cálculo da área sob a curva ROC e pelo cálculo da sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos. As curvas de sobrevida foram calculadas usando o método Kaplan-Meier e as diferenças de sobrevida entre os grupos foram comparadas usando o teste de log-rank. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$ . O programa estatístico utilizado foi o software SPSS versão 17.0 (Chicago, IL, EUA).

Os dados paramétricos foram expressos como média e desvio padrão (SD), e os não paramétricos, como mediana e intervalo mínimo e máximo. Os elementos dos diagramas de caixas consistem em *whisker* (valores mínimos e máximos), linha base da caixa (primeiro quartil), linha superior da caixa (terceiro quartil) e linha central da caixa (mediana ou segundo quartil). Quando representados em diagramas de caixas, dados paramétricos estão sinalizados por um “+”, que representa a posição da média no gráfico de caixa.

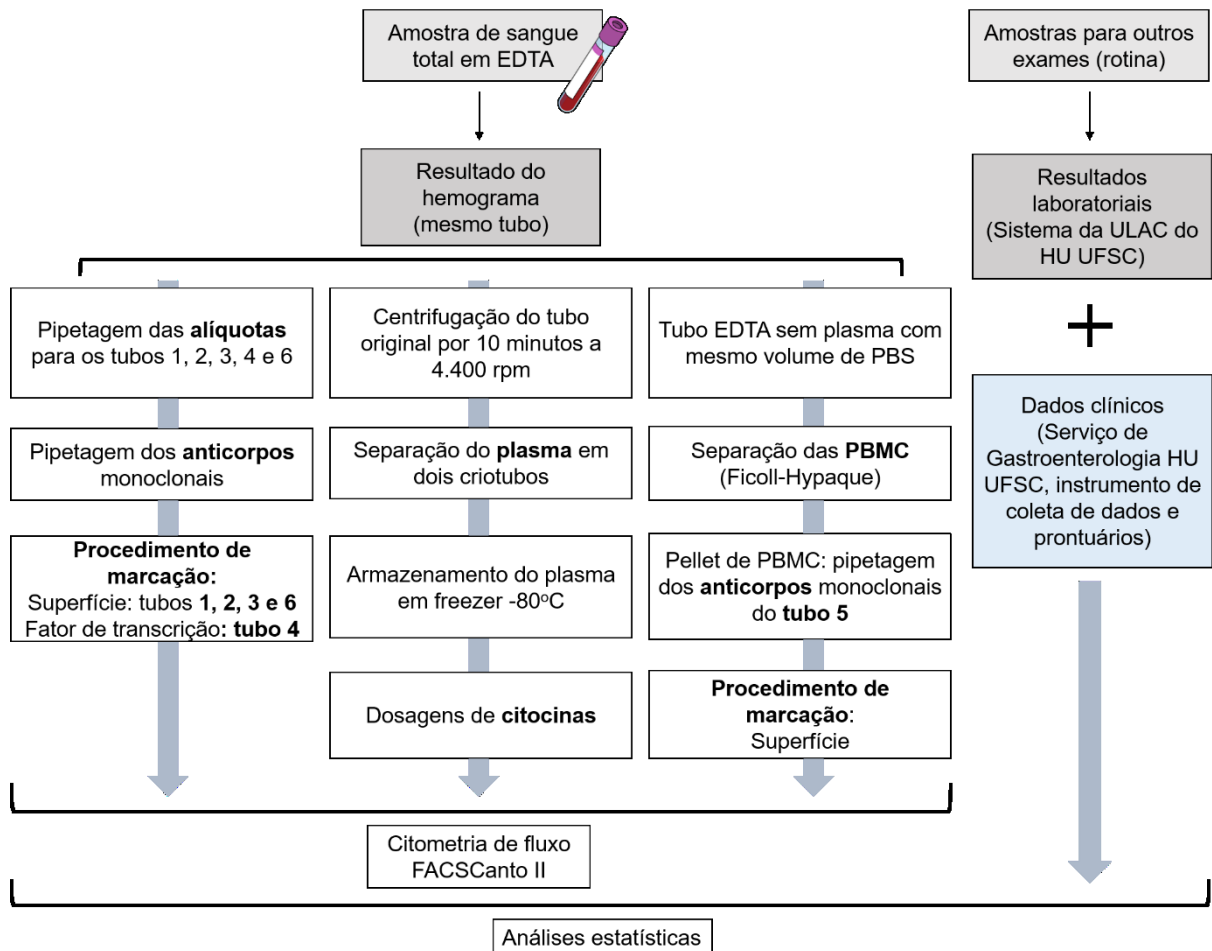
#### 4.8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo está em conformidade com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/1996. Os protocolos do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) e encontram-se registrados sob o Parecer nº 1822 de 28/01/2011 (Anexo A) e na Emenda 2 do Projeto Parecer 1822/2011. Todos os participantes do estudo leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B).

#### 4.9 VISÃO GERAL DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A Figura 16 mostra a visão geral da estratégia experimental do presente trabalho com o fluxo desde a obtenção das amostras até as análises estatísticas.

Figura 16 - Visão geral da estratégia experimental.



Após as pipetagens das alíquotas dos tubos 1, 2, 3, 4 e 6, o tubo original de sangue total em EDTA/K3 seguiu para centrifugação para separação do plasma. Foram armazenados dois criotubos contendo plasma para cada indivíduo do estudo. Um criotubo de cada indivíduo foi utilizado para dosar as citocinas, enquanto o outro criotubo permanece armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . PBMC: células mononucleares do sangue periférico; ULAC: Unidade de Laboratório de Análises Clínicas; HU UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Fonte: a autora.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho foram separados em duas partes. A primeira parte contém os resultados obtidos durante a validação do painel de anticorpos para avaliar as células do sistema imune por CF. A segunda parte contém os resultados das análises de células do sistema imune e de citocinas de pacientes com cirrose hepática (CE e DA) e de controles saudáveis (CS).

### 5.1 PARTE 1 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO PAINEL DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

O painel de anticorpos monoclonais desenvolvido e validado no presente estudo pode ser observado no Quadro 7. Compõe-se de seis tubos que permitem avaliar a frequência e perfil de ativação e de diferenciação da maioria das células imune circulantes. Informações técnicas dos reagentes podem ser encontradas detalhadamente no Apêndice G.

Quadro 7 - Composição do painel de anticorpos.

Tubo	PacB	PacO	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PECy7	APC	APCH7
1	CD20/ CD4*	CD45	CD8/ Igλ	CD56/ Igκ	CD5	CD19/ TCRγδ	CD3	CD38
2	HLA-DR	CD45	CD62L	CCR7	CD4	CD45RA	CD3	CD8
3	HLA-DR	CD45	CD57	CD28	CD4	CD45RA	CD3	CD8
4	CD3	CD45	CD127	CD25	CD4	CD45RA	FoxP3*	CD8
5	CD20	CD45	IgD	CD24	CD27	CD19	IgM	CD38
6	HLA-DR	CD45	CD16	CD123	CD11c	CD10	CD14	Lin (CD3/ CD19/ CD20)

APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PacO: Pacific Orange/V500; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5–5: peridina-clorofila-proteína; Ig: imunoglobulina; Lin: linhagem. \*CD4 está conjugado a brilliant violet 421 (BV421) e FoxP3 a Alexa Fluor 647 (AF647). Fonte: CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

Durante o processo de validação do painel, os testes de titulação de anticorpos monoclonais e a avaliação de controles internos positivos e negativos apresentaram resultados satisfatórios, ou seja, os marcadores apresentaram clara distinção entre as populações negativas

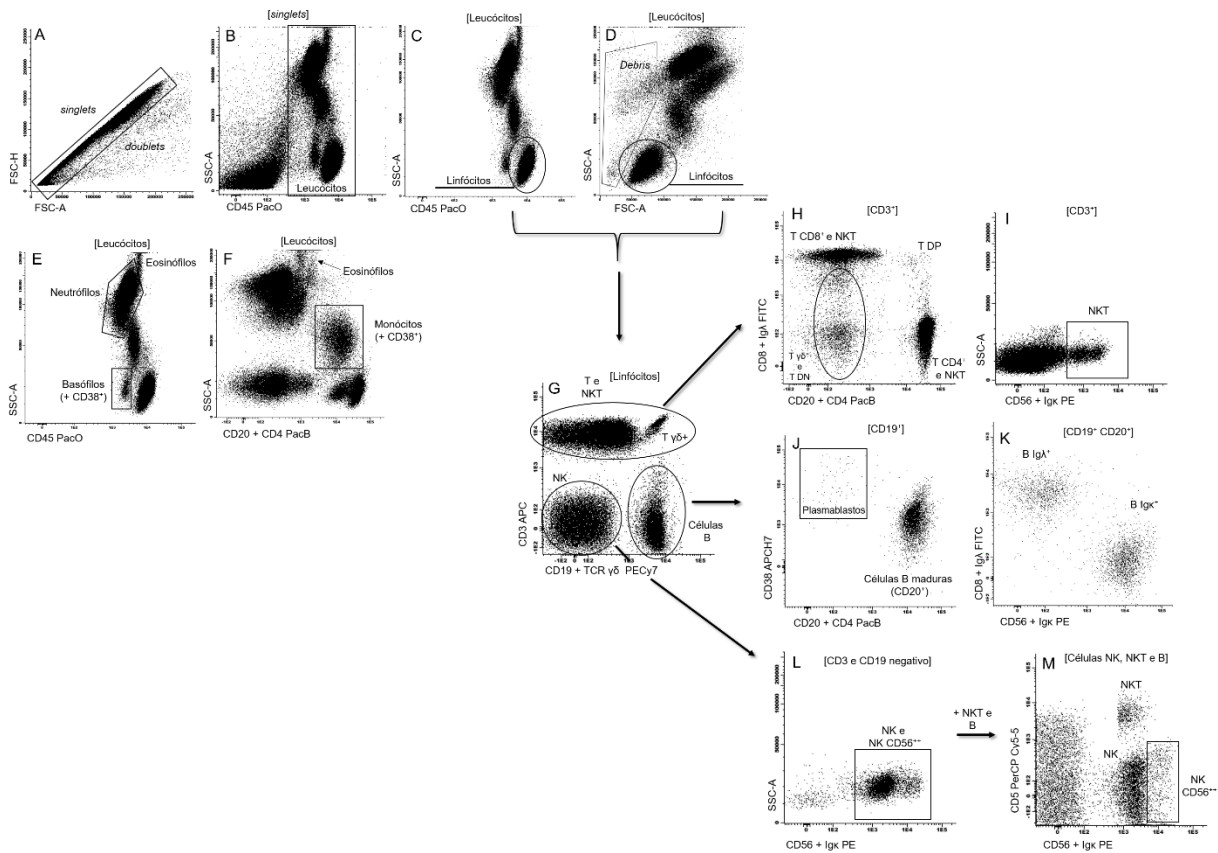
e positivas. O volume ideal de cada anticorpo monoclonal definido pelas titulações podem ser encontrados no Apêndice G. Além disso, o uso de controles FMO assegurou que a combinação selecionada de anticorpos monoclonais e fluorocromos não apresentou interferências importantes na marcação de cada antígeno de interesse, além de determinar pontos de corte entre populações celulares negativas e positivas, especialmente em casos de expressão heterogênea. Os controles FMO foram aplicados durante o desenvolvimento do painel e não há necessidade de aplicá-los novamente ao utilizar o painel em outros estudos.

O Tubo 1 foi desenvolvido com o objetivo de analisar o perfil leucocitário da amostra e é baseado no tubo de triagem LST (do inglês, *Lymphoid Screening Tube*) do consórcio Euroflow, o qual é formado por 20 grupos de pesquisa que realizam estudos de padronização de CF (VAN DONGEN et al., 2012). A partir da análise desse tubo, pode-se determinar a celularidade total da amostra, ou seja, as porcentagens relativas de neutrófilos, monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos; além de identificar os subtipos de linfócitos, incluindo a clonalidade dos linfócitos B, linfócitos B maduros e imaturos, plasmablastos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, linfócitos T TCR GD<sup>+</sup>, células NK e NKT (Figura 17). É importante destacar que o compartimento denominado NKT no presente estudo representa a soma de iNKT e T CD56<sup>+</sup>.

Como citado anteriormente, quando pretende-se avaliar a marcação de imunoglobulinas e a clonalidade dos linfócitos B (Igκ e Igλ), é necessário realizar múltiplas lavagens da amostra com PBS BSA 0,2% para seguir a marcação com os anticorpos, a fim de retirar interferentes. No entanto, esse processo tem como limitação a perda celular, como foi observado anteriormente na Figura 14. Além disso, no Tubo 1 não seria possível a marcação de PBMC, já que se objetiva avaliar também as células polimorfonucleares. Assim, em condições clínicas nas quais não se pretende avaliar a relação Igκ/Igλ, esses anticorpos podem ser retirados do painel e, assim, não é necessário realizar esse procedimento de lavagem.



Figura 17 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 1 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável.



Painel A: doublets foram excluídos utilizando os parâmetros FSC-A versus FSC-H. Painel B: os leucócitos foram selecionados pela expressão do CD45 versus o parâmetro SSC-A. Painéis C e D: os linfócitos foram selecionados pelos parâmetros FSC-A versus SSC-A, juntamente com a expressão forte e homogênea de CD45. Além disso, os restos celulares (debris) foram excluídos. Essa estratégia de análise dos painéis A a D foram aplicadas a todos os tubos. Neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos foram separados pela sequência de análise mostrada nos painéis E e F. Painel G: os linfócitos selecionados foram subdivididos em células T e NKT,  $T \gamma\delta^+$ , B e NK. Painel H: os linfócitos  $CD3^+$  foram subdivididos em  $T CD4^+$ ,  $T CD8^+$ , T duplo-positivos (DP) e T duplo negativos (DN). Painel I: os linfócitos  $CD3^+ CD56^+$  foram classificados como NKT. Painel J: as células  $CD19^+$  foram classificadas como células B maduras e plasmablastos. Painel K: as células B maduras podem ser categorizadas como  $B Igk^+$  ou  $Igk^+$  para determinar a relação  $Igk/Ig\lambda$  (clonalidade). Painel L: os linfócitos  $CD3$  e  $CD19$  negativos foram subdivididos de acordo com a expressão de  $CD56$  em células NK  $CD56^{fraco}$  e células NK  $CD56^{++}$ . Painel M: análise das células NK e NKT com relação à expressão de  $CD5$  e  $CD56$ . +: expressão moderada; ++: expressão forte; APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PacO: Pacific Orange/V500; PE: ficoeritrina; PE-Cy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridinina-clorofila-proteína; Ig: imunoglobulina. Fonte: CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

Como o Tubo 1 não possui todos os clones recomendados pelo consórcio Euroflow, a intensidade de fluorescência mediana (IFMed) da marcação do Tubo 1 foi comparada com o resultado da avaliação de qualidade do tubo LST do Euroflow (KALINA et al., 2015), que está

demonstrado na Tabela 3. Apenas os anticorpos monoclonais CD45 PacO, CD5 PerCP Cy5-5 e CD19 PECy7 foram utilizados com o mesmo clone recomendado pelo Euroflow. Como pode ser observado, a marcação dos CD45 PacO e CD5 PerCP Cy5-5 forneceu um resultado semelhante ao observado pelo Euroflow, enquanto o CD19 PECy7 apresentou uma marcação mais fraca, porém com clara distinção entre as populações negativas e positivas (Figura 17G).

Tabela 3 - Intensidade de fluorescência mediana (IFMed) e coeficiente de variação (CV) do Tubo 1 (arquivo de 30 controles saudáveis) comparados aos resultados de avaliação de qualidade do tubo LST do Euroflow.

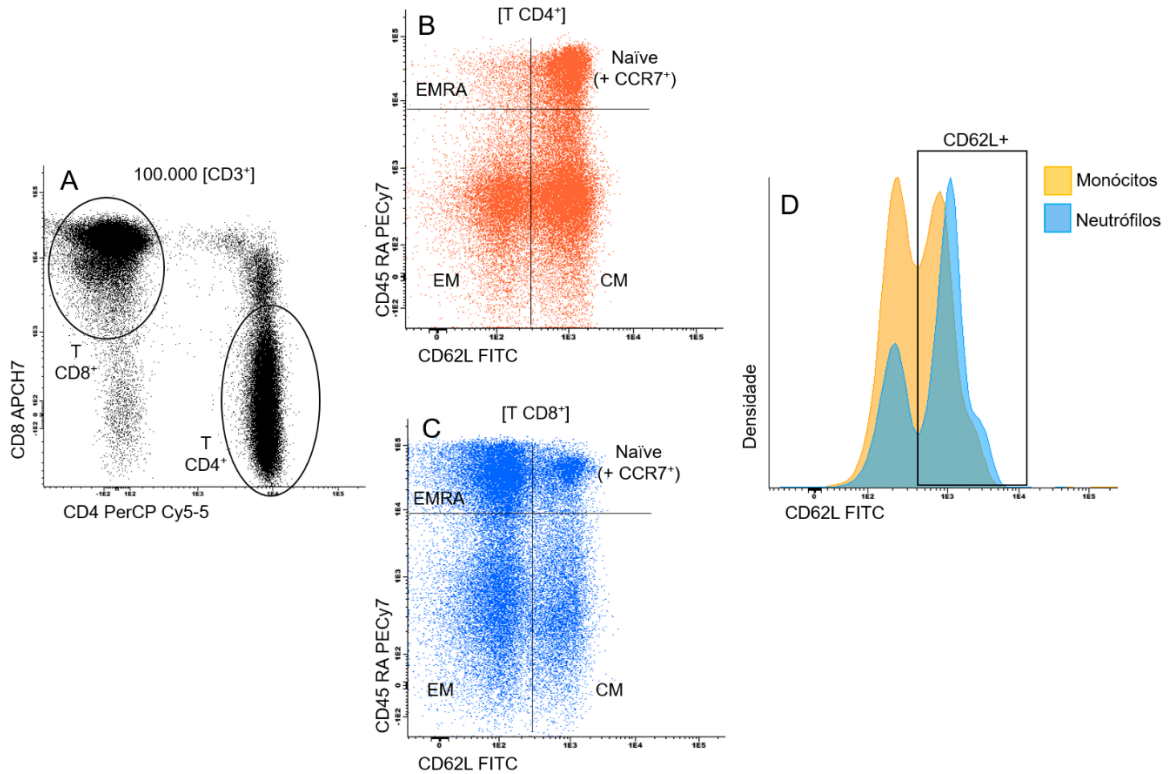
Marcador	Subtipo celular	IFMed	CV (%)	IFMed Euroflow	CV Euroflow (%)
<b>CD20 PacB</b>	Células B	14,550	55,46	22,200	26,98
<b>CD4 PacB*</b>	T CD4 <sup>+</sup>	40,356	28,78	7,807	16,20
<b>CD45 PacO</b>	Células T	8,470	31,02	5,287	25,02
<b>CD8 FITC</b>	T CD8 <sup>+</sup>	13,277	35,21	15,137	24,68
<b>Igλ FITC</b>	B Igλ <sup>+</sup>	2,770	98,13	11,824	89,28
<b>CD56 PE</b>	NK CD56 <sup>++</sup>	11,403	41,24	18,064	31,98
<b>Igκ PE</b>	B Igκ <sup>+</sup>	6,124	80,03	9,685	95,48
<b>CD5 PerCP Cy5-5</b>	Células T	8,854	66,42	9,795	31,40
<b>CD19 PECy7</b>	Células B	9,472	55,87	14,785	22,70
<b>CD3 APC</b>	Células T	9,100	54,58	33,647	33,42

\* No presente estudo, CD4 estava conjugado a brilliant violet 421 (BV421). Clones equivalentes do Tubo 1 e LST: CD4 PacB (mas fluorocromo diferente), CD45 PacO, CD5 PerCP Cy5-5 e CD19 PECy7. APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PacO: Pacific Orange/V500; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína. +: positivo; ++: positivo forte. Fonte: CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

Com relação aos outros anticorpos monoclonais, Igλ FITC, Igκ PE e CD3 APC também apresentaram uma marcação mais fraca do que a observada no estudo do Euroflow, porém, devido à qualidade de marcação observada pelo nosso estudo, com clara distinção entre as populações negativas e positivas, o anticorpo monoclonal e o clone foram mantidos para a composição do painel.

O Tubo 2 foi desenvolvido para classificar os subtipos de células T quanto ao seu grau de maturação em N, CM, EM e EMRA (Figura 18). Para isso, foram utilizados os marcadores CD62L, CD45RA e CCR7 (CD197). Além disso, como pode ser observado na Figura 18D, a partir da análise desse tubo é possível avaliar a expressão de CD62L em outras células do sistema imune, como em monócitos e em neutrófilos. Os monócitos podem ser identificados nesse tubo pela expressão de CD45<sup>++</sup> CD4<sup>fraco</sup> HLA-DR<sup>+</sup>; e os neutrófilos, pela expressão de CD45<sup>+</sup> HLA-DR<sup>neg</sup> associada à elevada característica de dispersão de luz (SSC-A).

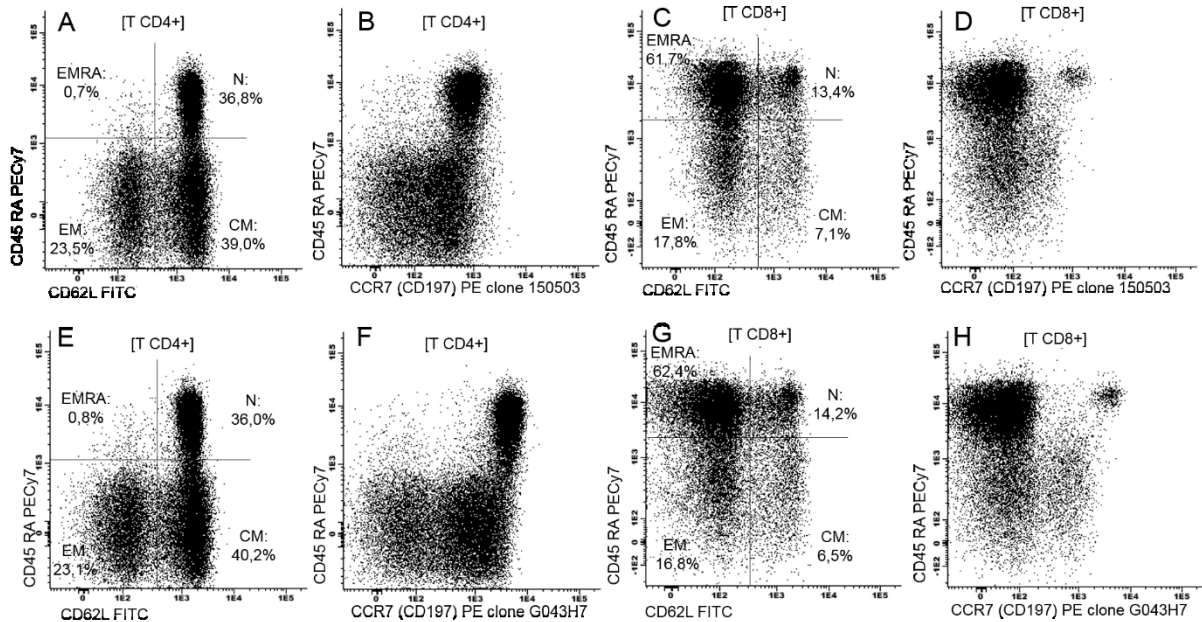
Figura 18 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 2 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável.



Painel A: linfócitos CD3<sup>+</sup> foram selecionados (100.000 eventos CD3<sup>+</sup> foram salvos) e subdivididos em T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Painéis B e C: os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (laranja) e T CD8<sup>+</sup> (azul) foram classificados como naïve (CD62L<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>), memória central (CM) (CD62L<sup>+</sup> CD45RA<sup>neg</sup>), memória efetora (EM) (CD62L<sup>neg</sup> CD45RA<sup>neg</sup>) e efetora terminal CD45RA (EMRA) (CD62L<sup>neg</sup> CD45RA<sup>+</sup>) Painel D: histograma normalizado com a avaliação da porcentagem de neutrófilos e monócitos CD62L<sup>+</sup>. APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridinina-clorofila-proteína; +: expressão moderada; neg: ausência de expressão. Fonte (adaptado): CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

Os resultados dos testes realizados para o Tubo 2 demonstraram que a combinação dos marcadores CD62L e CD45RA foi mais eficiente do que a combinação CCR7 e CD45RA para separar esses quatro subtipos celulares na amostra do mesmo indivíduo saudável. Além disso, foram testados dois clones do anticorpo monoclonal CCR7 (CD197) recomendados pela literatura (150503 e G043H7). Como pode-se observar na Figura 19, o último apresentou melhor marcação e, dessa forma, foi selecionado para compor o painel.

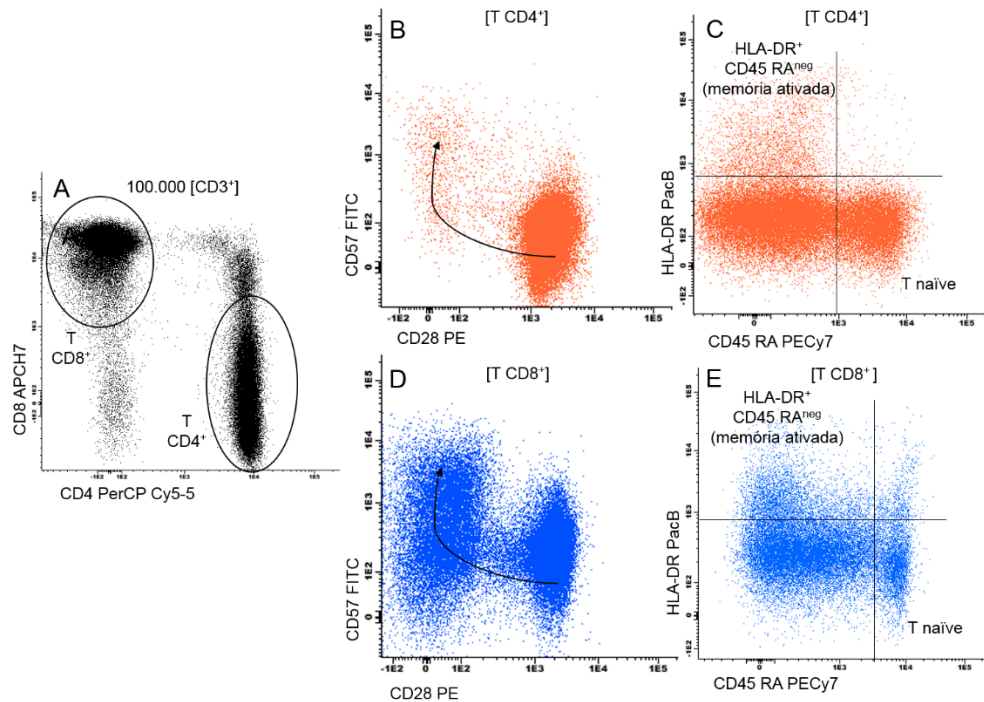
Figura 19 - CD62L *versus* CD45RA e CCR7 (CD197) *versus* CD45RA para identificar os subtipos de células T naïve, memória central, memória efetora e efetora terminal CD45RA<sup>+</sup>.



Painel A, B, C e D: diferenças entre CD62L e CCR7 clone 150503. Paineis E, F, G e H: diferenças entre CD62L e CCR7 clone G043H7. Entre os dois clones testados, o G043H7 apresentou melhor marcação, especialmente na separação dos subtipos CM e EM. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PECy7: ficoeritrina Cy7; PE: ficoeritrina; N: naïve; CM: memória central; EM: memória efetora; EMRA: efetora terminal CD45RA<sup>+</sup>. Fonte: CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

Dando continuidade à análise das células T, com o Tubo 3 é possível classificar as células T quanto ao seu grau de ativação pela análise dos marcadores CD28, CD57 e HLA-DR (Figura 20). O gráfico CD28 *versus* CD57 é bastante útil para esse objetivo, pois a partir dele pode-se observar com clareza as células T CD28<sup>+</sup> CD57<sup>neg</sup> recém-diferenciadas, as T terminais CD28<sup>neg</sup> CD57<sup>neg</sup> e as células T terminais CD28<sup>neg</sup> CD57<sup>+</sup>, geradas no organismo após estímulos antigênicos adicionais (Figura 20, painéis B e D). A expressão do marcador tardio de ativação de linfócitos T, HLA-DR, também pode ser avaliada nesse tubo (Figura 20, painéis C e E).

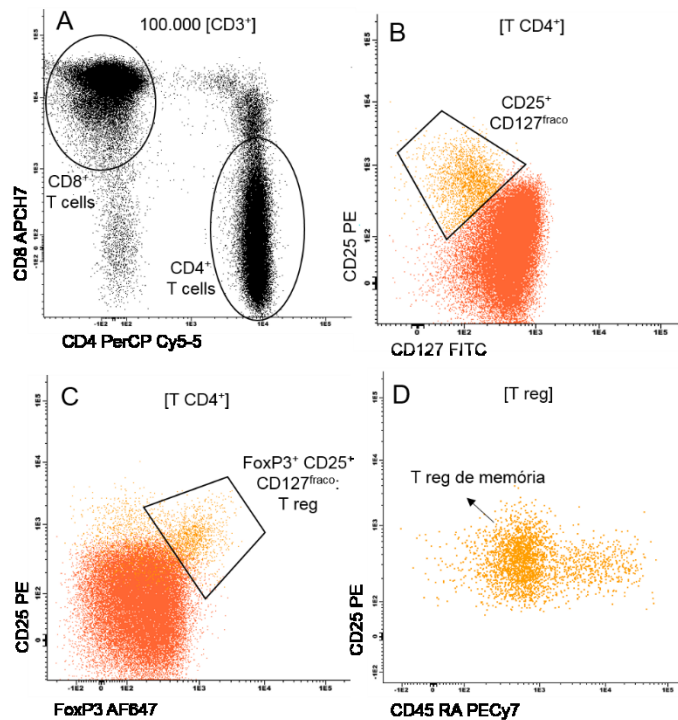
Figura 20 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 3 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável.



Painel A: linfócitos CD3<sup>+</sup> foram selecionados (100.000 eventos CD3<sup>+</sup> foram salvos) e subdivididos em T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (laranja) foram classificados de acordo com a expressão de CD28 (recém diferenciados) e de CD57 (diferenciação terminal) (Painel B) e pela expressão de HLA-DR e CD45RA (Painel C). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (azul) foram classificados de acordo com a expressão de CD28 (recém diferenciados) e de CD57 (diferenciação terminal) (Painel D) e pela expressão de HLA-DR e CD45RA (Painel E). A seta nos painéis B e D mostram o caminho de ativação. APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridínina-clorofila-proteína; +: expressão moderada; neg: ausência de expressão. Fonte (adaptado): CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

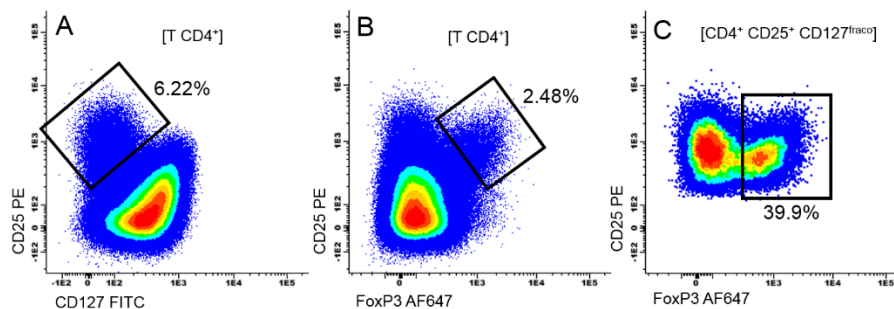
A análise das células T reg pode observada na Figura 21, que mostra a estratégia de análise do Tubo 4. A combinação dos marcadores CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>fraco</sup> associada à positividade para o fator de transcrição FoxP3<sup>+</sup> foi selecionada para identificar as T reg, em vez da combinação CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>fraco</sup>, pois a última compreende uma população celular maior do que a primeira e, assim poderia superestimar as porcentagens de T reg (Figura 22). Com o Tubo 4 também foi possível classificar as células T reg de memória ou ativadas (CD45 RA<sup>neg</sup>), que compreende a maioria desse subtipo celular (Figura 21D).

Figura 21 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 4 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável.



Painel A: linfócitos  $CD3^+$  foram selecionados (100.000 eventos  $CD3^+$  foram salvos) e subdivididos em  $T CD4^+$  e  $T CD8^+$ . Os linfócitos  $T CD4^+$  (laranja) foram classificados de acordo com a expressão de  $CD127^{fraco} CD25^+$  (Painel B) e, posteriormente, em  $CD25^+ FoxP3^+$ , as quais representam as  $T reg$  (Painel C). Painel D: a maior parte das  $T reg$  pode ser classificada como célula de memória ( $CD45RA^{neg}$ ). AF647: Alexa Fluor 647; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridínina-clorofila-proteína; +: expressão moderada;  $^{fraco}$ : expressão fraca. Fonte: CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

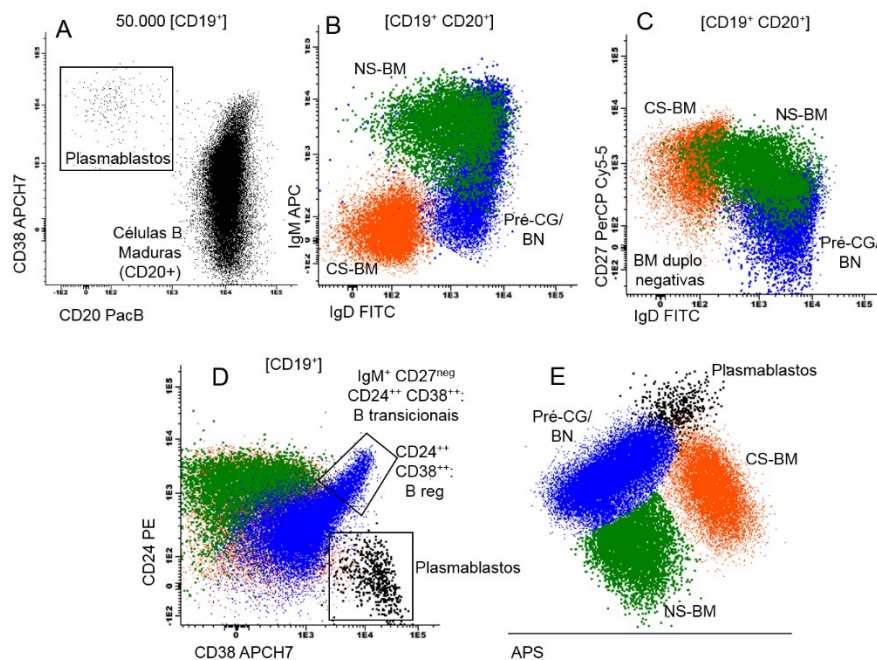
Figura 22 - Comparação entre  $CD4^+ CD25^+ CD127^{fraco}$  e  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+ CD127^{fraco}$  para identificar as células  $T reg$ . Fusão de arquivos de dez indivíduos saudáveis.



A população celular  $CD4^+ CD25^+ CD127^{fraco}$  compreendeu uma porcentagem maior de células (6,22% do total de  $T CD4^+$ ) (Painel A) do que a população celular  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+ CD127^{fraco}$  (2,48% do total de  $T CD4^+$ ) (Painel B). Painel C: Pode-se perceber que apenas parte das células  $CD4^+ CD25^+ CD127^{fraco}$  expressam  $FoxP3$  (39,9%). Fonte: CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

Diversos subtipos de células B podem ser identificados com a análise do Tubo 5 (Figura 23), especialmente com relação à expressão de IgD, IgM e CD27. O Tubo 5 é o único em que se utiliza a amostra PBMC em vez de SP, pois objetiva-se lograr uma análise de qualidade das imunoglobulinas com alta sensibilidade. No presente estudo, o compartimento selecionado pela marcação  $CD24^{++} CD38^{++}$  corresponde às células B transicionais somadas às células B reg, pois não foi possível fazer a discriminação desses dois subtipos celulares com os marcadores selecionados.

Figura 23 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 5 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável.

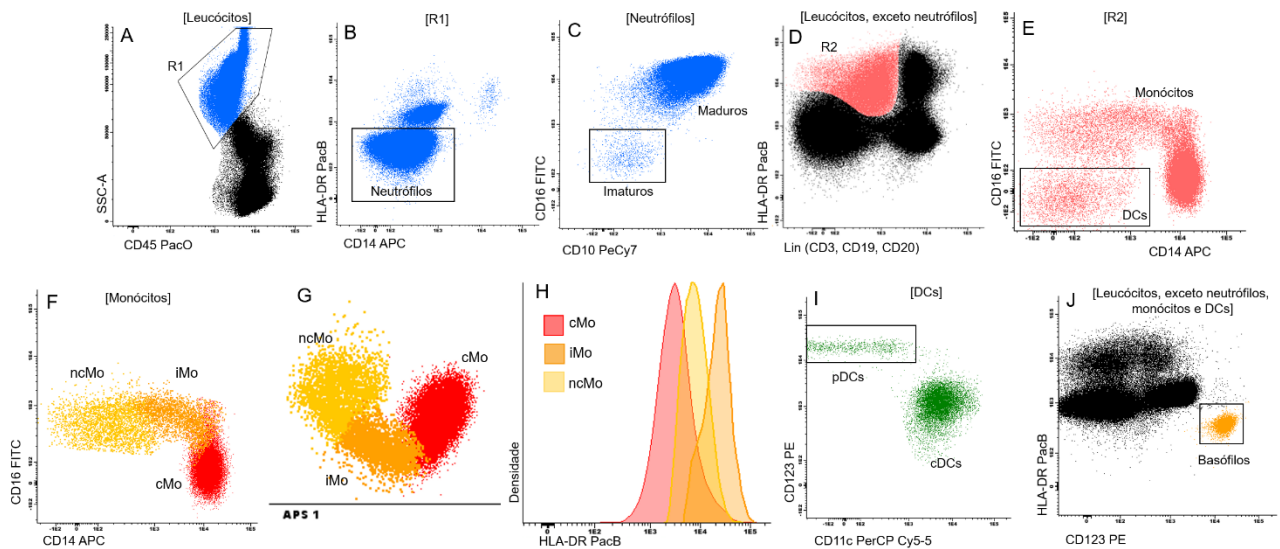


Painel A: células linfoides B foram selecionadas (50.000 eventos  $CD19^{+}$  foram salvos) e subdivididos em células B maduras e plasmablastos. Na sequência, as células B maduras foram classificadas em células B pré-CG ou B naïve (BN) (em azul), *non-switched* (NS) B de memória (BM) (em verde) e em *class-switched* (CS)-BM e BM duplo negativas (em laranja) de acordo com a expressão das imunoglobulinas IgD e IgM (Painel B) em conjunto com a expressão de CD27 (Painel C). As células B transicionais e B reg foram classificadas pela expressão forte de CD24 e CD38 (sobreposição fenotípica), e os plasmablastos, pela expressão forte de CD38 (Painel D) e de  $CD27^{++}$  (não mostrado). Painel E: separador automático de populações (APS) e os subtipos de células B. +: expressão moderada; ++: expressão forte; neg: negativo; CG: centro germinativo; APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PE: ficoeritrina; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína; Ig: imunoglobulina. Fonte (adaptado): CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

O Tubo 6 foi criado para avaliar os subtipos de DCs (cDCs e pDCs) e de monócitos (cMo, iMo e ncMo), além de detectar a presença de neutrófilos imaturos e determinar com mais precisão a frequência de basófilos. A combinação de anticorpos monoclonais utilizada permite

a identificação desses subtipos celulares com clareza (Figura 24). Após a identificação dos monócitos, pode-se avaliar a expressão da molécula HLA-DR em cada um dos três subtipos, como demonstrado na Figura 24H.

Figura 24 - Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 6 usando como exemplo a amostra de um indivíduo saudável.



Painel A: os leucócitos foram identificados pela expressão de CD45 e SSC-A e a região 1 (R1) foi selecionada. Painel B: com a R1 selecionada, os neutrófilos (em azul) foram identificados pela ausência de expressão de HLA-DR e CD14. Painel C: com os neutrófilos selecionados, pode-se identificar a presença de formas imaturas pela ausência de expressão de CD16 e de CD10. Painel D: após classificar os neutrófilos, pela expressão de HLA-DR e Lin (linhagem) pode-se selecionar a região 2 (R2) que representa a ausência de expressão de marcadores de linhagem T e B com expressão de HLA-DR. Painel E: com a R2 selecionada, os monócitos podem ser separados das DCs pela expressão de CD16 e CD14. Painel F: classificação dos monócitos em clássicos, intermediários e não-clássicos pela expressão de CD16 e CD14. Painel G: separador automático de populações (APS) e os subtipos de monócitos. Painel H: histograma normalizado com a expressão de HLA-DR na superfície dos três subtipos de monócitos. Painel I: classificação das DCs em cDCs (CD11c<sup>+</sup>) e pDCs (CD123<sup>+</sup>). Painel J: identificação dos basófilos pela expressão de CD123 e ausência de HLA-DR. DCs: células dendríticas; cDCs: DCs clássicas; pDCs: DCs plasmocitoides; Lin: linhagem; cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não-clássicos; APC: aloficocianina; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PacO: Pacific Orange/V500; PE: ficoeritrina; PEcy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína. Fonte (adaptado): CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

Os custos para a marcação de uma amostra com o painel de anticorpos monoclonais proposto no presente estudo podem ser encontrados no Apêndice H. Os reagentes para a marcação do painel completo apresentam um custo aproximado de R\$ 359,00. Além do presente trabalho, o painel proposto, completo ou adaptado, tem sido utilizado em dois outros projetos de pesquisa: 1) perfil imunológico de agricultores e moradores expostos a agrotóxicos e 2) perfil imunológico de indivíduos diagnosticados com COVID-19. Além disso, os Tubos 2



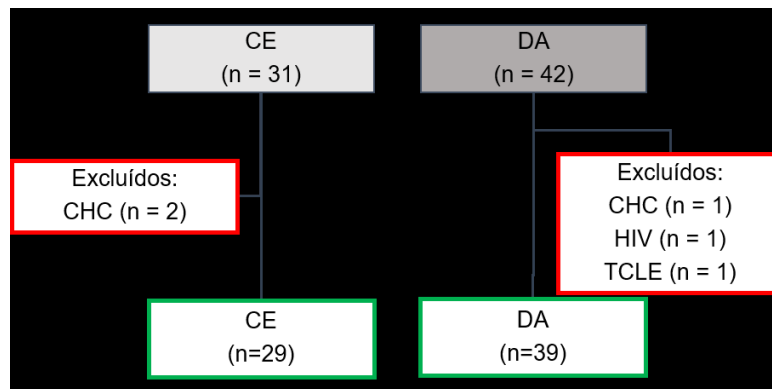
e 5 foram empregados na rotina do Laboratório de Marcadores Celulares do HU UFSC para avaliar as células T e B em casos de suspeita de imunodeficiência primária, juntamente com o tubo LST (Tubo 1).

## 5.2 PARTE 2 – AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS IMUNE CIRCULANTES E DE CITOCINAS PLASMÁTICAS DE PACIENTES COM CIRROSE HEPÁTICA

### 5.2.1 Características da casuística

O painel de anticorpos monoclonais validado no presente estudo foi aplicado a 30 controles saudáveis (CS), 31 pacientes com cirrose estável (CE) e 42 pacientes com cirrose em descompensação aguda (DA). No entanto, dois pacientes CE foram diagnosticados com CHC logo após a coleta de dados e foram excluídos do estudo. Além disso, dentro dos pacientes DA, um foi diagnosticado com CHC na internação, um foi diagnosticado soropositivo para HIV e outro não concordou em assinar o TCLE (Figura 25). Todos os 30 CS foram incluídos.

Figura 25 - Pacientes com cirrose hepática incluídos no estudo.



Inicialmente, 31 pacientes com cirrose estável (CE) e 42 pacientes com descompensação aguda da cirrose (DA) haviam sido incluídos no estudo. No entanto, dois pacientes CE foram diagnosticados com carcinoma hepatocelular (CHC) dias após a consulta. Além disso, um paciente com DA foi diagnosticado com CHC na internação, outro paciente foi soropositivo para HIV e em outro caso a família do paciente não concordou em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Com essas exclusões, o número de pacientes final foi de 29 no grupo CE e 39 no grupo DA.

O grupo dos 30 CS apresentou média de idade de  $50,90 \pm 10,25$  anos e foi composto por 20 indivíduos do sexo masculino (66,7%) e 10 do sexo feminino (33,3%). A partir da análise das células imune circulantes dos CS, foi gerada uma tabela com os valores para essa faixa

etária, que foi utilizada como referência no presente estudo e que pode ser útil para comparações em futuros estudos (Apêndice I).

A Tabela 4 mostra as características dos pacientes com cirrose incluídos no estudo, tanto CE, em consulta ambulatorial, quanto DA, internados na emergência. Não foram observadas diferenças em relação à idade, ao sexo, a fatores etiológicos da cirrose, a diagnóstico de DM e a hábitos de etilismo entre os dois grupos. Maior número de pacientes do grupo CE relatou ser fumante atual ou ex-fumante. Quando consideramos os dois grupos de cirróticos juntos, o fator etiológico da cirrose mais comum foi o consumo de álcool, seguido pela infecção pelo HCV e EHNA. A infecção pelo HBV foi responsável por apenas um caso em cada grupo. A etiologia alcoólica e por HCV também foram as causas mais comuns de cirrose em estudos prévios conduzidos no HU-UFSC (FISCHER et al., 2017; MATIOLLO et al., 2020).

Foram encontradas diferenças estatísticas em diversos resultados de exames laboratoriais. Os pacientes DA apresentaram linfopenia e anemia importantes quando comparados aos CE, já a plaquetopenia esteve presente em ambos os grupos. Em comparação aos CE, os DA tiveram concentrações séricas elevadas de creatinina, de bilirrubina e de lactato, valores maiores de RNI e concentrações diminuídas de albumina.

A distribuição dos pacientes de acordo com o escore de Child-Pugh mostrou que a maioria dos pacientes CE foram classificados como Child-Pugh A (89,7%). Enquanto que a mesma porcentagem de DA, 89,7%, foi classificada como Child-Pugh B e C (41,0% Child-Pugh C). A pontuação do escore MELD da população do estudo teve como mediana 9 para o grupo CE e 16, para DA. Além disso, oito pacientes do grupo DA (20,5%) foram diagnosticados com ACLF, desses, sete com ACLF grau 1 e um com ACLF grau 2. Nenhum dos pacientes do estudo foi diagnosticado com ACLF grau 3 (Tabela 4).

Vale destacar que do total de pacientes CE, oito (27,6%) nunca apresentaram complicações clínicas associadas à cirrose nem foram internados em decorrência da doença hepática crônica. Além de participar do grupo CE, esses pacientes foram agrupados no grupo cirrose compensada (CC) para futuras análises.

Tabela 4 - Características dos pacientes com cirrose estável e com descompensação aguda da cirrose incluídos no estudo.

Variável	Cirrose estável (n = 29)	Descompensação aguda (n = 39)	p
Idade (anos), mediana (intervalo)	58,72 ± 7,49	56,31 ± 11,59	0,301
Sexo masculino, n (%)	23 (79,3)	27 (69,2)	0,351
Fator etiológico da cirrose, n (%)			
Álcool	15 (51,7)	15 (38,5)	0,309
Hepatite C	2 (6,9)	8 (20,5)	0,232
Hepatite B	1 (3,4)	1 (2,6)	0,611
Álcool + viral	2 (6,9)	3 (7,7)	0,640
EHNA	3 (10,3)	7 (17,9)	0,498
Criptogênica	2 (6,9)	3 (7,7)	0,640
Outros <sup>a</sup>	4 (13,8)	2 (5,1)	0,390
Diabetes mellitus, n (%)	11 (37,9)	15 (38,5)	0,964
Exames laboratoriais			
Leucócitos/mm <sup>3</sup> , mediana (intervalo)	6.100 (2.620 – 10.530)	5.120 (1.010 – 14.510)	0,687
Linfócitos/mm <sup>3</sup> , mediana (intervalo)	1.328 (480 – 3.970)	840 (161 – 2.250)	0,001
Hemácias/mm <sup>3</sup> , média ± DP	4,57 ± 0,49	3,24 ± 0,65	≤0,001
Hemoglobina (g/dL), mediana (intervalo)	14,6 (7,6 – 17,5)	9,5 (6,3 – 15,0)	≤0,001
Hematócrito, mediana (intervalo)	42,7 (27,8 – 51,9)	28,3 (20,0 – 43,3)	≤0,001
Plaquetas/mm <sup>3</sup> , mediana (intervalo)	104.500 (37.000 – 234.000)	67.500 (18.000 – 259.000)	0,070
Sódio (mEq/L), média ± DP	138,4 ± 3,0	136,6 ± 5,3	0,086
Creatinina (mg/dL), mediana (intervalo)	0,88 (0,62 – 2,08)	1,14 (0,55 – 6,19)	0,001
RNI, mediana (intervalo)	1,11 (0,96 – 1,64)	1,44 (1,04 – 2,58)	≤0,001
Albumina (g/dL), média ± DP	3,81 ± 0,42	2,88 ± 0,68	≤0,001
PCR (mg/L), mediana (intervalo)	3,25 (0,50 – 22,70)	23,45 (3,2 – 172,90)	≤0,001
Bilirrubina (mg/dL), mediana (intervalo)	1,00 (0,30 – 5,50)	2,45 (0,20 – 8,90)	0,006
Lactato (mmol/L), mediana (intervalo)	1,20 (0,40 – 3,20)	1,65 (0,80 – 4,90)	0,003
AST (U/L), mediana (intervalo)	31,50 (16,00 – 143,00)	46,00 (15,00 – 260,00)	0,052
ALT (U/L), mediana (intervalo)	34,00 (16,00 – 133,00)	32,00 (8,00 – 165,00)	0,378
GGT (U/L), mediana (intervalo)	80,50 (30,00 – 1165,00)	107,00 (18,00 – 536,00)	0,391
Child-Pugh, mediana (intervalo)	5 (5 – 8)	9 (6 – 14)	≤0,001
Child-Pugh A, n (%)	26 (89,7)	4 (10,3)	≤0,001
Child-Pugh B, n (%)	3 (10,3)	19 (48,7)	0,001
Child-Pugh C, n (%)	-	16 (41,0)	≤0,001
MELD, mediana (intervalo)	9 (7 – 19)	16 (8 – 31)	≤0,001
MELD < 9, n (%)	19 (65,5)	3 (7,7)	≤0,001
MELD 10-19, n (%)	10 (34,5)	27 (69,2)	0,004
MELD 20-29, n (%)	-	9 (23,2)	0,008
Etilismo			
Sim (prévio e atual)	23 (79,3%)	24 (61,5%)	0,117
Tabagismo			
Sim (prévio e atual)	23 (79,3%)	19 (48,7%)	0,010

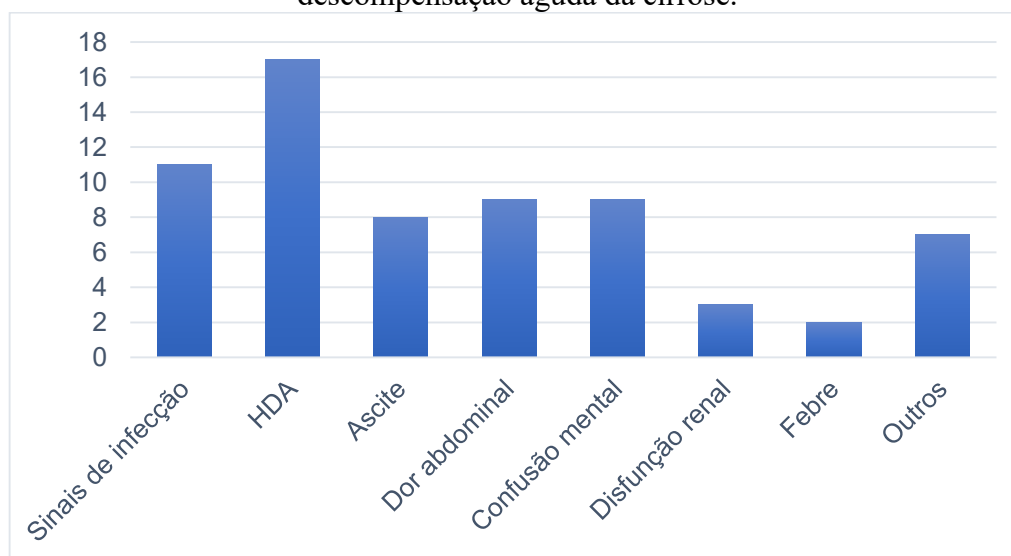
(continuação)

Variável	Cirrose estável (n = 29)	Descompensação aguda (n = 39)	p
Ascite atual, n (%)	0 (0,0)	26 (66,7)	<0,001
Grau I, n (%)	0 (0,0)	12 (30,8)	0,001
Grau II e III, n (%)	0 (0,0)	14 (35,9)	<0,001
EH atual, n (%)	0 (0,0)	19 (48,7)	<0,001
Grau I, n (%)	0 (0,0)	8 (20,5)	0,017
Grau II e III, n (%)	0 (0,0)	11 (28,2)	0,002
HDA atual, n (%)	0 (0,0)	17 (43,6)	<0,001
ACLF, n (%)	-	8 (20,5)	-
Grau 1, n (%)	-	7 (18,0)	-
Grau 2, n (%)	-	1 (2,6)	-
PBE, n (%)	-	4 (10,3)	-

<sup>a</sup> Outras causas da cirrose foram hemocromatose, Doença de Wilson e cirrose biliar secundária. As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de T de Student (representadas por média e desvio padrão) e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney U (representadas por mediana e intervalo). As variáveis qualitativas foram avaliadas pelo teste de Qui-quadrado. As quantidades de pacientes com ascite, EH, HDA, ACLF e PBE significam detecção dessas complicações clínicas no momento da internação ou consulta e durante a hospitalização. ACLF: insuficiência hepática crônica agudizada; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; EH: encefalopatia hepática; GGT: gama glutamiltransferase; MELD: Model for End-Stage Liver Disease; HDA: hemorragia digestiva alta; PCR: proteína C reativa; PBE: peritonite bacteriana espontânea; RNI: razão normatizada internacional.

Foram avaliados os principais motivos de internação dos pacientes cirróticos do grupo DA, ou seja, o motivo pelo qual o paciente buscou atendimento na Emergência do HU-UFSC (Figura 26).

Figura 26 – Principais motivos de internação dos pacientes hospitalizados com descompensação aguda da cirrose.

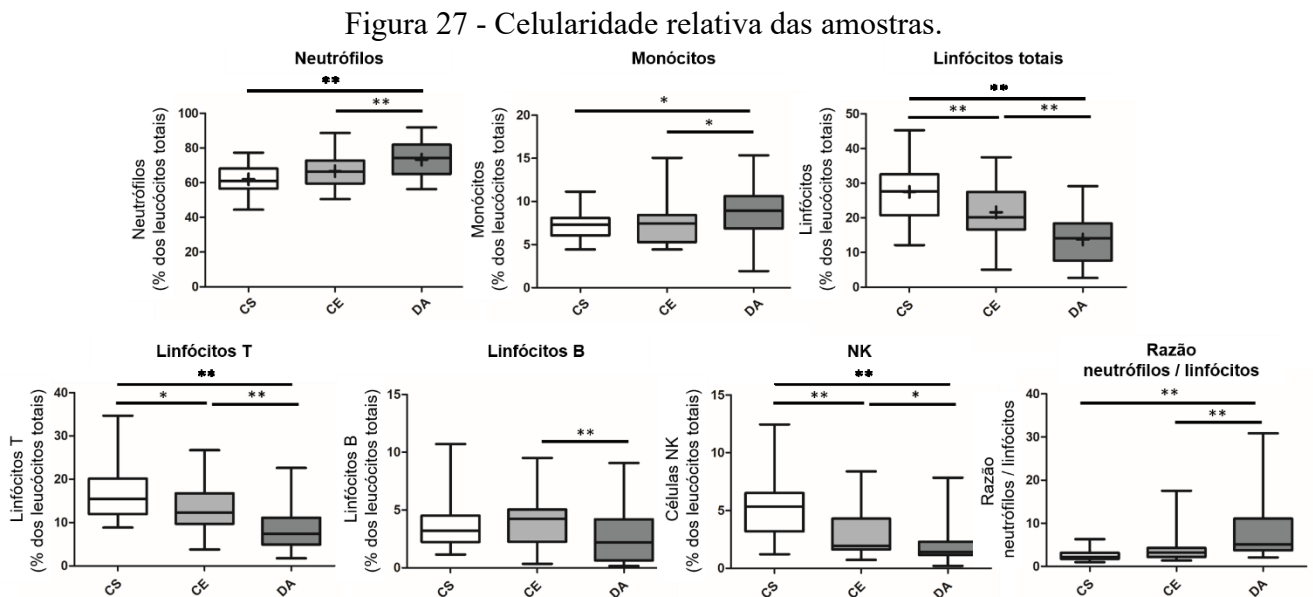


Os valores estão representados em número de pacientes. Outros motivos de internação: fraqueza, tremores e dispneia. HDA: hemorragia digestiva alta.

O motivo de internação mais comumente encontrado foi a hemorragia digestiva alta (HDA), presente em 17 pacientes do grupo DA (43,6%). Essa é uma complicação clínica grave da cirrose e classifica os pacientes, em conjunto com a ascite, em quatro estágios. Os pacientes com sangramento de TGI são classificados no estágio 4, mesmo sem a presença de ascite (D'AMICO; GARCIA-TSAO; PAGLIARO, 2006). Com o estabelecimento de opções terapêuticas mais eficazes, o prognóstico de pacientes com HDA melhorou muito nas últimas duas décadas; as taxas de mortalidade em um ano caíram de 50% para aproximadamente 20% (D'AMICO; DE FRANCHIS; GROUP, 2003).

### 5.2.2 Celularidade total

Como pode ser observado na Figura 27, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de indivíduos incluídos no estudo com relação às quantidades relativas dos principais grupos celulares circulantes, como neutrófilos, monócitos e linfócitos.

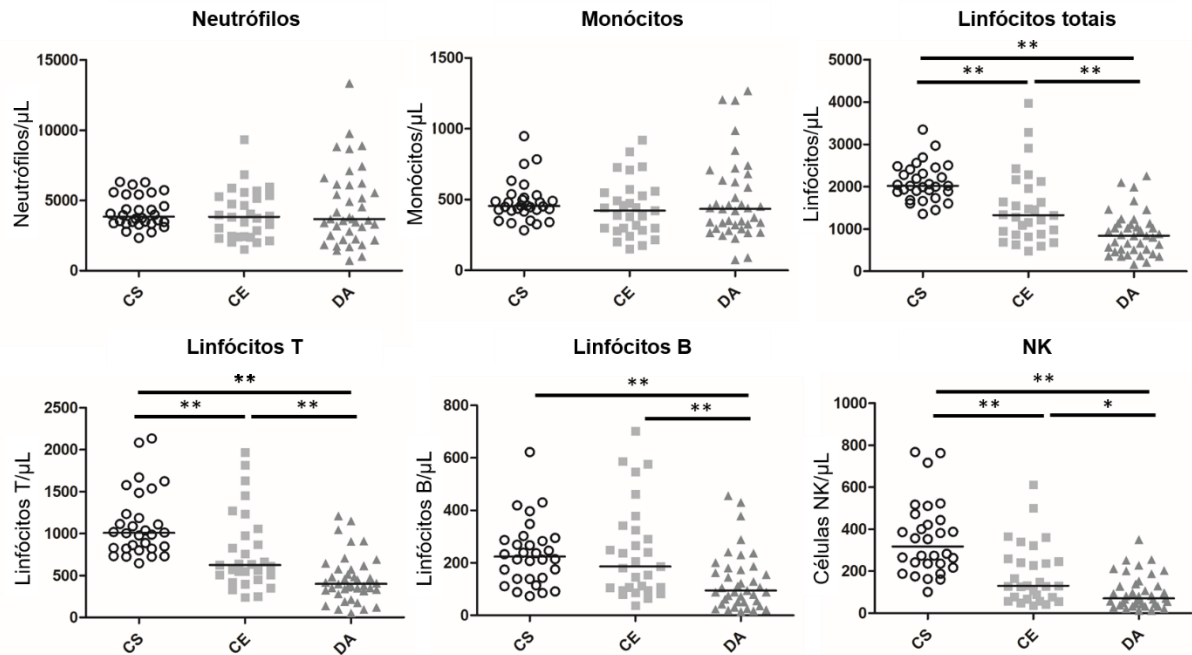


Valores representados como porcentagens considerando-se os leucócitos totais como 100%. As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni (apresentam a média representada por um “+” no gráfico de caixa) e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

O fato de os pacientes com cirrose apresentarem maiores porcentagens de neutrófilos e menores de linfócitos gerou uma razão neutrófilos/linfócitos (N/L) aumentada no grupo DA quando comparado aos outros dois grupos do estudo ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 27). De acordo com Deng et al. (2019), a razão N/L maior que 8,9 foi associada a alto risco de mortalidade dentro de 90 dias. Esse resultado será abordado com maiores detalhes na Seção “Relação das variáveis do sistema imune e mortalidade”.

Com relação às quantidades absolutas das células, os pacientes cirróticos apresentaram valores absolutos diminuídos de linfócitos quando comparados aos CS, e, dentre os pacientes cirróticos, o grupo DA apresentou menores quantidades de linfócitos circulantes (Figura 28). Por outro lado, não houve diferença estatística entre os valores de leucometria dos grupos, sendo que a mediana da leucometria dos CS foi de 6.315 leucócitos/mm<sup>3</sup> (intervalo de 4.670 a 9.620/mm<sup>3</sup>), dos CE 6.100 leucócitos/mm<sup>3</sup> (intervalo de 2.620 a 10.530/mm<sup>3</sup>) e dos DA 5.120 leucócitos/mm<sup>3</sup> (intervalo de 1.010 a 14.510/mm<sup>3</sup>). Assim, os pacientes cirróticos não apresentaram alterações de leucometria, nem de valores absolutos de neutrófilos e monócitos; porém, apresentaram linfopenia absoluta com diminuição de linfócitos T, B e NK.

Figura 28 - Celularidade absoluta das amostras.



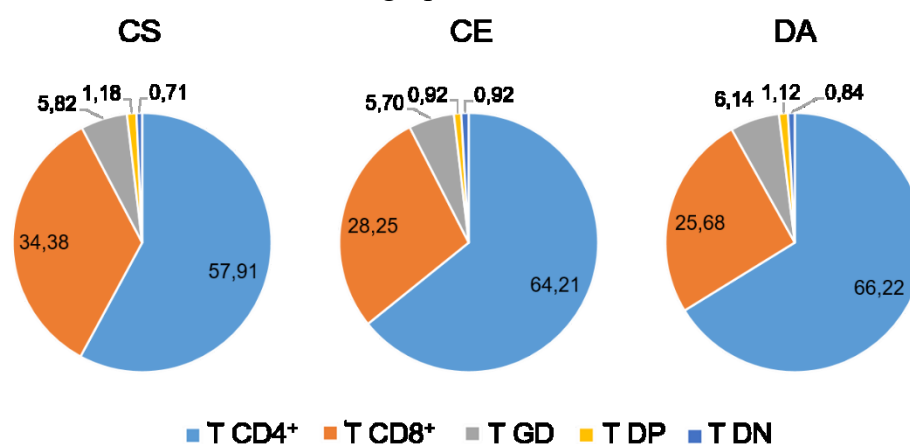
Valores representados em quantidade de células/ $\mu\text{L}$  de sangue total. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose.

O resultado obtido corrobora achados da literatura, que demonstram que a linfopenia é uma característica laboratorial comumente observada em pacientes portadores de cirrose hepática. Estudos prévios sugerem que a depleção de linfócitos T circulantes observada em paciente cirróticos pode ser devido a defeitos na timopoiese, ao aumento de apoptose de células ativadas devido à translocação bacteriana e ao sequestro esplênico (LARIO et al., 2013; MCGOVERN et al., 2007; MÁRQUEZ et al., 2009).

### 5.2.3 Linfócitos T

Com relação à distribuição dos linfócitos T em  $T\text{ CD}4^+$ ,  $T\text{ CD}8^+$ ,  $T\text{ GD}^+$ , T duplo positivo e T duplo negativo (não  $\text{GD}^+$ ), os pacientes CE e DA apresentaram valores relativos mais altos de  $T\text{ CD}4^+$  e mais baixos de  $T\text{ CD}8^+$ , quando considerados os linfócitos T como 100% (Figura 29) e linfócitos totais como 100% (Tabela 5). Esse resultado forneceu uma razão  $T\text{ CD}4^+ / T\text{ CD}8^+$  maior nos grupos de pacientes com cirrose quando comparados aos controles saudáveis.

Figura 29 - Distribuição dos subtipos de linfócitos T pela expressão de CD4, CD8 e TCR GD nos grupos do estudo.



Resultados expressos em porcentagem média dentro dos linfócitos T. CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose; GD: gamma delta; DP: duplo positivo (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>); DN: duplo negativo (não-GD<sup>+</sup>).

Tabela 5 - Distribuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e razão T CD4<sup>+</sup> / T CD8<sup>+</sup>.

	CS	CE	DA
T CD4 <sup>+</sup> (média ± DP)	35,53 ± 7,02 **	38,25 ± 6,79	42,65 ± 12,82 **
T CD8 <sup>+</sup> (média ± DP)	21,42 ± 6,86 **	17,70 ± 7,00	15,96 ± 6,07 **
T CD4 <sup>+</sup> /T CD8 <sup>+</sup> , mediana (intervalo)	1,70 (0,78 – 4,13) #, **	2,18 (1,05 – 6,53) #	2,52 (1,03 – 11,50) **

Resultados de T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressos em porcentagem dentro dos linfócitos totais. As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. # $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose.

Resultado semelhante foi encontrado por Matos e colaboradores (2013), que observaram a razão T CD4<sup>+</sup> / T CD8<sup>+</sup> aumentada em pacientes com cirrose de etiologia alcoólica. Por outro lado, outros dois estudos observaram resultados contrários associados à infecção pelo HCV. Feuth e colaboradores (2014) detectaram a razão T CD4<sup>+</sup> / T CD8<sup>+</sup> diminuída em pacientes com infecção crônica pelo HCV, resultado que correlacionou com maior grau de fibrose hepática. Assim como Garg e colaboradores (2020), que também observaram a razão T CD4<sup>+</sup> / T CD8<sup>+</sup> diminuída em pacientes com cirrose hepática associada ao HCV.

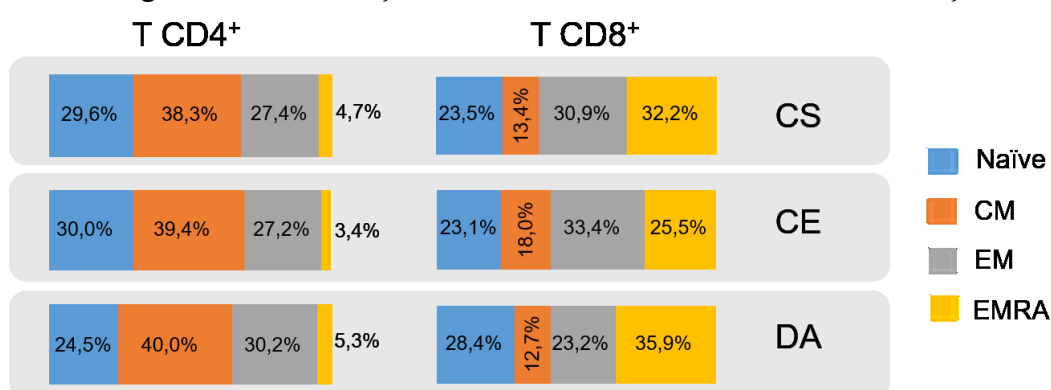
Para melhor entendimento desses resultados, no presente estudo, os pacientes com cirrose (CE e DA) foram divididos em dois grupos, de etiologia apenas alcoólica (n = 30) e apenas por infecção pelo HCV (n = 10). Os valores da razão T CD4<sup>+</sup> / T CD8<sup>+</sup> foram distintos entre os grupos com mediana de 2,70 (intervalo de 1,12 a 11,50) para a etiologia alcoólica e de



1,60 (intervalo de 1,03 a 2,62) para a etiologia HCV ( $p = 0,001$ ). Esse resultado está de acordo com a literatura e demonstrou que os pacientes com cirrose alcoólica apresentam uma razão T CD4<sup>+</sup> / T CD8<sup>+</sup> aumentada e que, uma vez que esta representa a causa mais comum de cirrose nos pacientes incluídos neste estudo, refletiu no resultado encontrado para os pacientes com cirrose em geral.

O grau de maturação dos linfócitos T foi avaliado nos grupos do estudo de acordo com a distribuição dos subtipos de células T N, CM, EM e EMRA (Figura 30).

Figura 30 - Distribuição dos linfócitos T de acordo com a maturação.



Valores expressos em porcentagem média dentro dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>. CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose; CM: memória central; EM: memória efetora; EMRA: efetora terminal CD45 RA<sup>+</sup>.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os subtipos de T CD4<sup>+</sup> nos grupos do estudo. Por outro lado, entre os subtipos de T CD8<sup>+</sup>, foram encontradas diferenças principalmente entre os grupos CE e DA (Tabela 6). O último apresentou menores porcentagens de T CD8<sup>+</sup> CM e T CD8<sup>+</sup> EM, e maiores porcentagens de T CD8<sup>+</sup> EMRA, quando comparado ao grupo CE, o que mostra uma alteração no padrão maturativo com acúmulo de células T CD8<sup>+</sup> efetoras terminais. Além disso, a diminuição de células T CD8<sup>+</sup> EM na circulação de pacientes DA sugere recrutamento dessas células em direção ao tecido hepático, aumento de apoptose ou, ainda, defeito na produção dessas células. De fato, um estudo prévio observou aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória com expressão de marcadores de apoptose (CD95<sup>+</sup>) em pacientes cirróticos (MÁRQUEZ et al., 2009).

Tabela 6 - Subtipos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos do estudo.

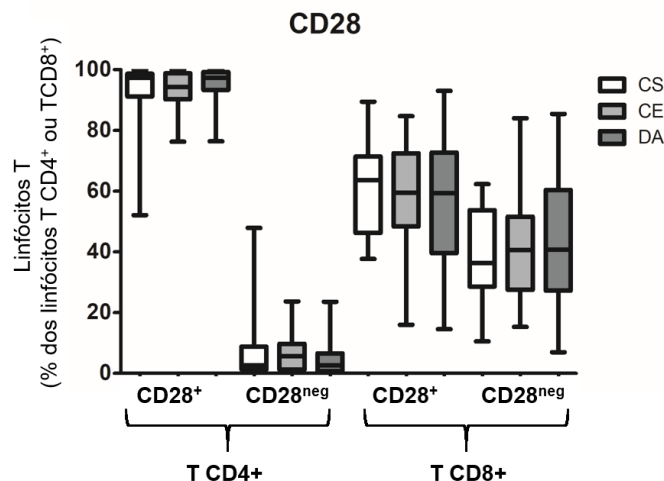
	CS	CE	DA
T CD8 <sup>+</sup> CM, mediana (intervalo)	13,05 (4,37 – 33,17)	16,56 (3,99 – 36,06)*	10,28 (0,23 – 29,31)*
T CD8 <sup>+</sup> EM, mediana (intervalo)	31,33 (8,60 – 61,15)	30,08 (11,65 – 68,04)*	23,14 (0,42 – 49,99)*
T CD8 <sup>+</sup> EMRA, mediana (intervalo)	30,60 (5,91 – 68,63)	22,37 (6,11 – 52,78)*	31,33 (7,02 – 79,62)*

Resultados expressos em porcentagem dentro dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0,05$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose; CM: memória central; EM: memória efetora; EMRA: efetora terminal CD45 RA<sup>+</sup>.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> efetores apresentam funções importantes no fígado, e a morfologia desse órgão proporciona características que facilitam a migração de leucócitos para o seu interior. Porém, o mecanismo do trânsito desses linfócitos pelo tecido hepático não está totalmente elucidado (BERTOLETTI, 2016; IANNACONE, 2015). Além disso, um estudo prévio observou disfunção nas células T CD8<sup>+</sup> de pacientes com infecção crônica pelo HCV, tanto em nível periférico quanto hepático, e que essa disfunção poderia estar associada à imunopatogênese da infecção (SCHINKEL et al., 2016).

Com relação aos marcadores de ativação estudados no presente trabalho, não foram observadas alterações nas porcentagens de células T que expressam a molécula que gera sinal de ativação CD28 (Figura 31).

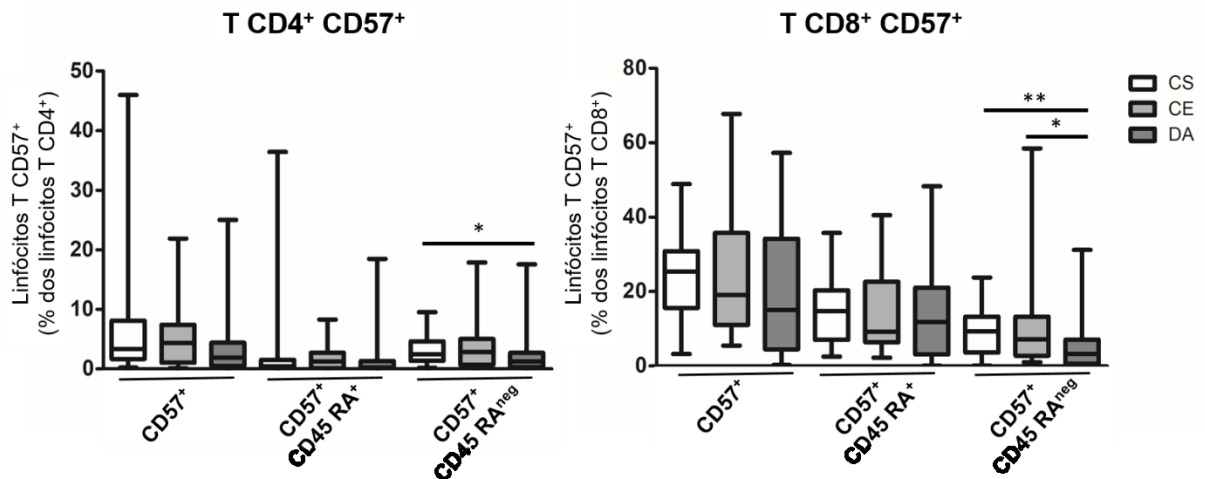
Figura 31 - Expressão de CD28 nos linfócitos T.



As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Por outro lado, a expressão da molécula de ativação imune persistente, CD57, parece estar diminuída nos pacientes DA. Como pode ser observado da Figura 32, houve diferenças estatísticas entre os grupos para o subtipo T CD57<sup>+</sup> CD45RA<sup>neg</sup> (de memória). Como visto, as células T CD57<sup>+</sup> são células terminais que passaram por estímulo crônico e repetitivo e que não apresentam capacidade proliferativa, também chamadas de células senescentes. A baixa frequência encontrada nos pacientes DA do presente estudo pode estar associada ao estado imunodeficiente ou a um aumento da apoptose dessas células.

Figura 32 - Expressão de CD57 nos linfócitos T.



As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

O resultado observado na Figura 32 é diferente do encontrado previamente por Márquez e colaboradores (2009). Esses autores observaram um aumento da porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> CD45 RO<sup>+</sup>, a qual corresponde à população T CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> CD45 RA<sup>neg</sup> da Figura 32, em 40 pacientes com cirrose hepática quando comparados a controles saudáveis.

Não foram observadas diferenças na expressão da molécula HLA-DR, que indica ativação tardia de linfócitos T, apesar de os pacientes DA apresentarem porcentagens mais elevadas de T CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> do que os grupos CS e CE (Tabela 7).

Tabela 7 - Expressão da molécula HLA-DR pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.

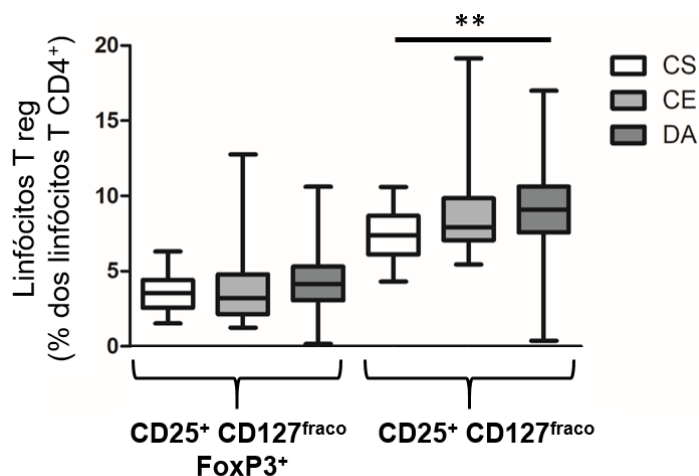
	CS	CE	DA
T CD4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , mediana (intervalo)	7,45 (3,13 – 34,76)	6,25 (2,23 – 15,48)	8,16 (2,14 – 18,76)
T CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , mediana (intervalo)	19,10 (6,70 – 52,54)	15,97 (5,51 – 31,36)	21,17 (1,84 – 62,24)

Os resultados estão expressos em porcentagens de células HLA-DR<sup>+</sup>. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose.

Um estudo recente demonstrou que pacientes cirróticos apresentaram maiores quantidades de linfócitos T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> quando comparados a controles saudáveis, e que essas células apresentam função imunorregulatória que pode contribuir para o desenvolvimento da DIAC (LEBOSSÉ et al., 2019).

Com relação às células T reg, não houve diferença entre os grupos quando esse subtipo foi selecionado pelo fenótipo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>fraco</sup> FoxP3<sup>+</sup>. Porém, ao avaliar a quantidade de T reg utilizando a combinação de marcadores CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>fraco</sup>, ou seja, sem avaliar a expressão de FoxP3, pode-se observar que houve diferença entre os pacientes DA e os CS, sendo que os primeiros apresentaram maiores porcentagens desse subtipo celular (Figura 33).

Figura 33 – Quantidades relativas de células T regulatórias.



As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. A primeira parte do gráfico mostra as quantidades de T reg utilizando a expressão de CD25, CD127 e FoxP3, enquanto que a segunda parte mostra as quantidades de T reg utilizando apenas a expressão de CD25 e CD127.  $**p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose; T reg: T regulatória. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

As células T reg de memória ou ativadas, selecionadas pelo fenótipo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>fraco</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD45RA<sup>neg</sup>, encontraram-se aumentadas nos pacientes DA quando comparados aos pacientes CE ( $p \leq 0,01$ ) (Tabela 8).

Tabela 8 - Células T reg de memória nos grupos do estudo.

	CS	CE	DA
<b>T reg de memória, mediana (intervalo)</b>	2,02 (0,85-5,27)	1,60 (0,65-6,81)**	2,55 (0,06-8,62)**

Resultados expressos em porcentagem dentro dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \*\*  $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose; T reg: T regulatórias.

Esses resultados corroboram o estudo conduzido por Huang e colaboradores (2015), no qual foi detectado um aumento das porcentagens de células T reg, principalmente T reg de memória, em pacientes com cirrose hepática. Esse aumento foi correlacionado positivamente com concentrações séricas de bilirrubina e parece predizer o risco de infecções bacterianas dentro de um ano. Dessa forma, o aumento de células T reg na circulação dos pacientes DA pode estar associado ao desenvolvimento de imunotolerância periférica.

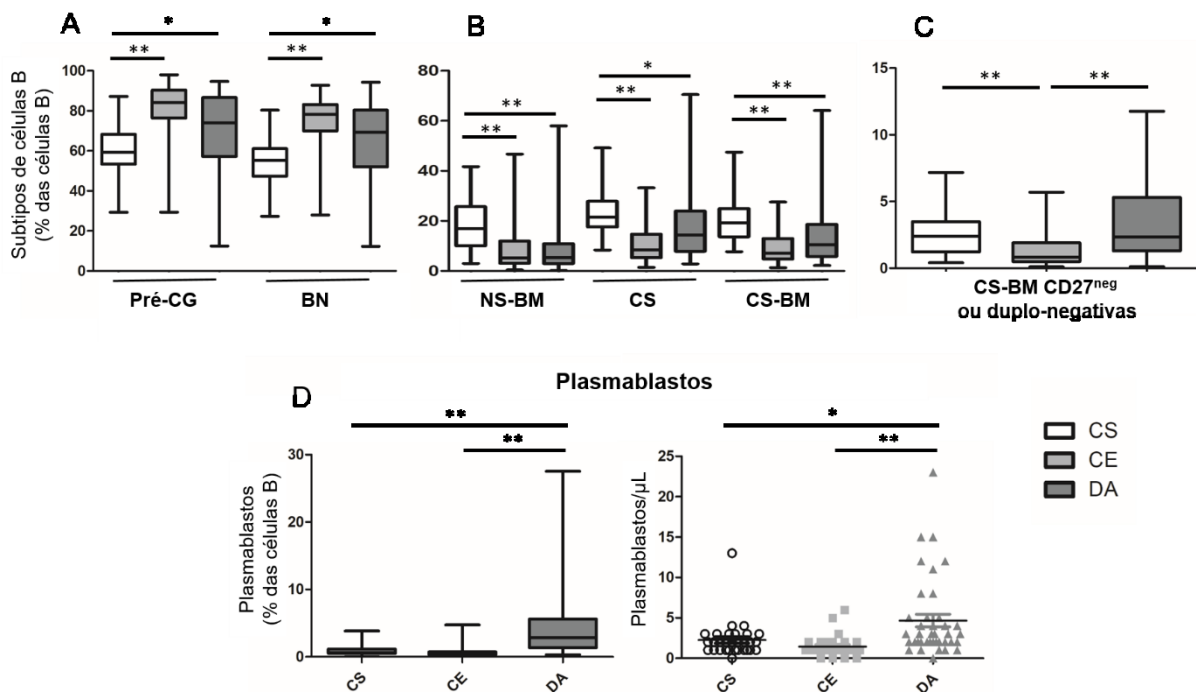
#### 5.2.4 Células B

Como pode ser observado nas Figuras 34 e 35, os resultados do presente trabalho demonstram que o perfil de distribuição das células B entre os grupos foi bastante distinto. Os pacientes cirróticos (CE e DA) apresentaram valores relativos de células B do compartimento pré-CG maiores que os CS e bastante semelhantes entre si (Figura 34A). Nos resultados, o compartimento pré-CG inclui as células B pré-naïve (células B transicionais) e as células BN. Não foi detectada a presença de células B imaturas circulantes (CD19<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD20<sup>neg</sup> CD45<sup>fraco</sup>) em nenhum dos pacientes.

Em relação às células B transicionais, não houve diferença estatística entre os grupos. Sendo assim, o aumento do compartimento pré-CG observado na Figura 34A para os grupos CE e DA se deu às custas do aumento da frequência de células BN. Adicionalmente, os pacientes cirróticos, CE e DA, apresentaram o mesmo perfil de distribuição das células B de memória NS-BM, CS e CS-BM (CD27<sup>+</sup>), ambos com valores menores que os controles saudáveis (Figuras 34B e 35). Assim, dentro do compartimento B, os pacientes cirróticos

apresentaram mais células BN e menos células BM. Esse padrão de alteração nas células B é frequentemente observado em indivíduos soropositivos para o HIV (DE MILITO et al., 2001) e em pacientes com imunodeficiência do tipo CVID (SALZER; SACK; FUCHS, 2019). Na CVID, além da diminuição de células BM, pode-se encontrar aumento relativo de células B CD21<sup>neg</sup> CD38<sup>neg</sup> e de células B transicionais, e redução relativa de plasmablastos (SALZER; SACK; FUCHS, 2019). Além disso, estudos prévios relataram diminuição de células BM em pacientes cirróticos, a qual foi associada a menor resposta à vacinação e à maior susceptibilidade a infecções bacterianas (DOI et al 2012; JHUN et al., 2015).

Figura 34 - Quantidades relativas e absolutas dos subtipos de células B.

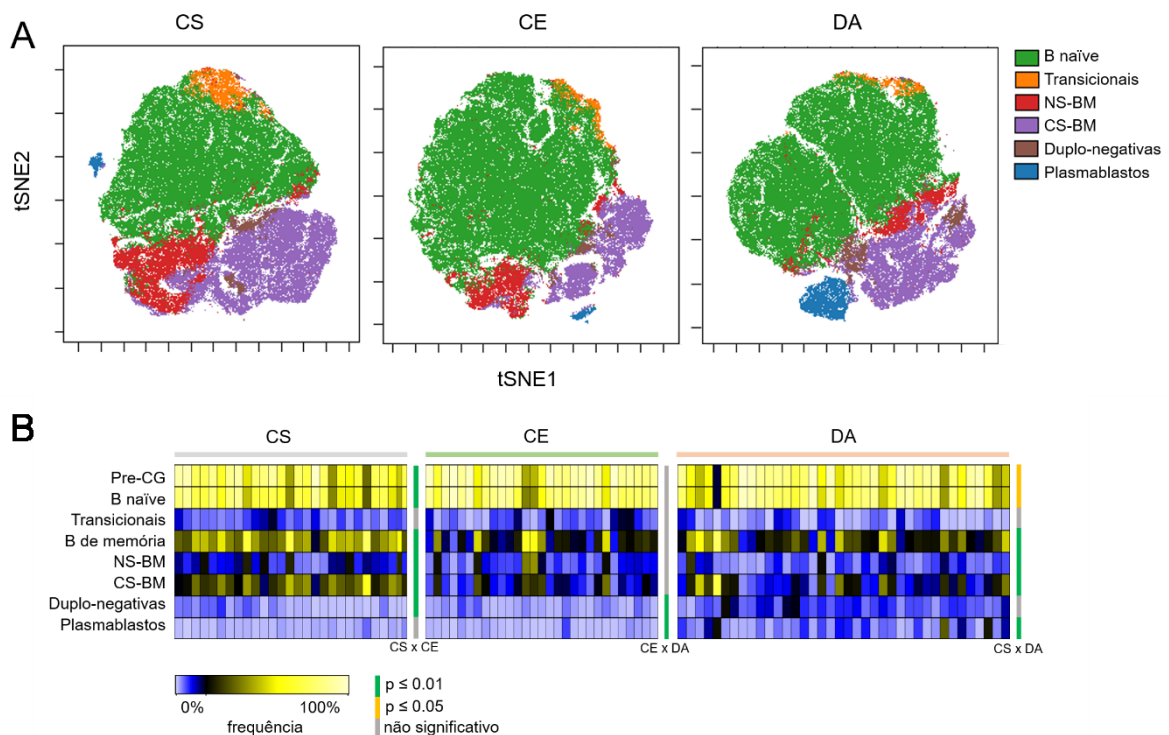


Painel A: distribuição dos subtipos de células B em: compartimento pré-CG (pré-naïve somadas às B naïve) e células B naïve (BN). Painel B: distribuição dos subtipos de células B em *non-switched* B de memória (NS-BM), *class-switched* (CS) totais e CS-BM (CD27<sup>+</sup>). Painel C: CS-BM CD27<sup>neg</sup> (duplo negativas). Paineis D: valores relativos e absolutos de plasmablastos. CG: centro germinativo. Neg: ausência de expressão. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . Na legenda: CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Como pode ser observado nas Figuras 34C e 35, entre os pacientes cirróticos, o grupo DA apresentou maiores porcentagens de células B CS CD27<sup>neg</sup> (duplo-negativas) quando comparado ao grupo CE. A expansão dessa população celular foi detectada em pacientes com

lupus eritematoso sistêmico (LES) e foi associada à atividade da doença, a pior prognóstico e a pior resposta à terapia de depleção de células B (SANZ et al., 2019; WEI et al., 2007). De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se considerar a possibilidade de essas células também estarem associadas à atividade da doença hepática e a mau prognóstico.

Figura 35 - Comparação do compartimento de células B entre os grupos do estudo pela análise viSNE e *heatmap*.



Análise e representação do compartimento de células B pelas ferramentas viSNE (A) e *heatmap* (B) do aplicativo Cytobank™ 7.3.0. Foram incluídos na análise 30 controles saudáveis (CS), 29 pacientes com cirrose estável (CE) e 39 pacientes com descompensação aguda da cirrose (DA). As cores no *heatmap* representam a porcentagem dos subtipos de células B considerando as células CD19<sup>+</sup> como 100%, cada coluna representa um indivíduo e cada linha, um subtipo celular. Para essas análises, arquivos FCS contendo 7.500 eventos CD19<sup>+</sup> foram inseridos no aplicativo.

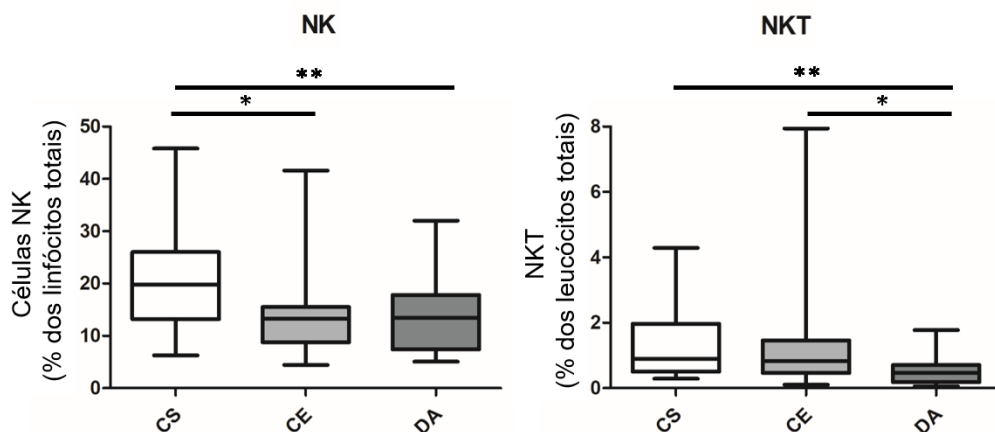
As Figuras 34D e 35 mostram um aumento importante de plasmablastos circulantes em pacientes DA, quando comparados aos CS e a pacientes CE. De fato, esse aumento relativo de plasmablastos causou impacto no valor absoluto dessas células, o que não aconteceu com os outros subtipos de células B, como as BN, que mesmo aumentadas em porcentagem, devido à linfopenia, estão diminuídas em valores absolutos. Assim, enquanto o perfil de células BN e BM de pacientes cirróticos é semelhante a pacientes com imunodeficiência do tipo CVID, de forma diferente, os pacientes DA apresentam aumento relativo e absoluto de plasmablastos.

Um pico transitório de plasmablastos no SP é observado após seis ou sete dias de infecção viral aguda ou de vacinação e pode ser marcado por frequências relativamente altas dessas células (FINK, 2012). Outros estudos também observaram um aumento significativo de plasmablastos em pacientes com cirrose hepática quando comparados a pacientes com fibrose em estágio inicial e a controles saudáveis. Algumas possíveis explicações para o aumento de plasmablastos e a diminuição de BM circulantes são altas taxas de conversão de BM em plasmablastos de vida curta e compartimentalização de BM no tecido hepático ou linfoide (DOI et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

### 5.2.5 NK e NKT

Os pacientes com cirrose apresentaram valores relativos de células NK circulantes diminuídos quando comparados aos CS, como foi visto na Seção “Celularidade total”. Além disso, também foram encontradas diferenças estatísticas nas quantidades de células NK dentro dos linfócitos totais e do compartimento NKT dentro dos leucócitos totais (Figura 36). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos para o subtipo de células NK CD56<sup>++</sup>.

Figura 36 - Quantidades relativas de células NK e do compartimento NKT.



As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

A redução das porcentagens de células NK circulantes foi descrita em estudo recente em pacientes com cirrose causada por HBV, principalmente em pacientes com a doença

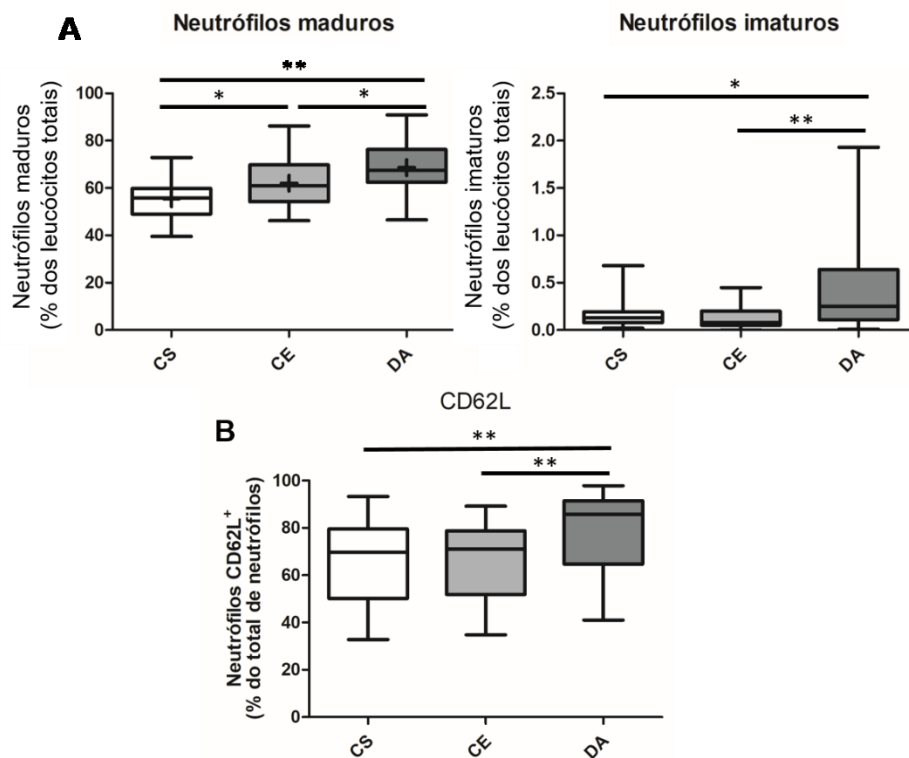


descompensada. Essas células exercem papel importante na regulação imunológica do fígado e sua diminuição na circulação periférica e perda da atividade citotóxica parecem estar associadas à descompensação da função hepática (JIANG et al., 2020).

### 5.2.6 Neutrófilos

Como visto anteriormente na Seção “Celularidade total”, foi observado aumento relativo, mas não absoluto, de neutrófilos nos pacientes com cirrose, especialmente em pacientes do grupo DA. Posteriormente, investigou-se as quantidades relativas de neutrófilos maduros ( $CD10^+ CD16^+$ ) e imaturos ( $CD10^{neg} CD16^{neg}$ ) nas amostras (Figura 37A).

Figura 37 - Quantidades relativas de neutrófilos maduros e imaturos e a expressão de CD62L.



Painel A: Valores relativos de neutrófilos maduros e imaturos dentro dos leucócitos totais. Painel B: Porcentagem de neutrófilos que expressam CD62L. As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni (apresentam a média representada por um “+” no gráfico de caixa) e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Na comparação entre os grupos, foi observado aumento relativo tanto de neutrófilos maduros quanto imaturos nos pacientes cirróticos, com destaque para as porcentagens de neutrófilos imaturos do grupo DA quando comparadas às do grupo CE, tanto dentro dos leucócitos totais quanto ao considerar neutrófilos como 100% (Figura 37A e Tabela 9, respectivamente).

Tabela 9 - Neutrófilos imaturos dos grupos do estudo.

	CS	CE	DA
<b>Neutrófilos imaturos, mediana (intervalo)</b>	0,22 (0,05 – 0,94)	0,12 (0,00 – 0,64)**	0,39 (0,02 – 2,48)**

Resultados expressos em porcentagem dentro dos neutrófilos totais. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \*\*  $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose.

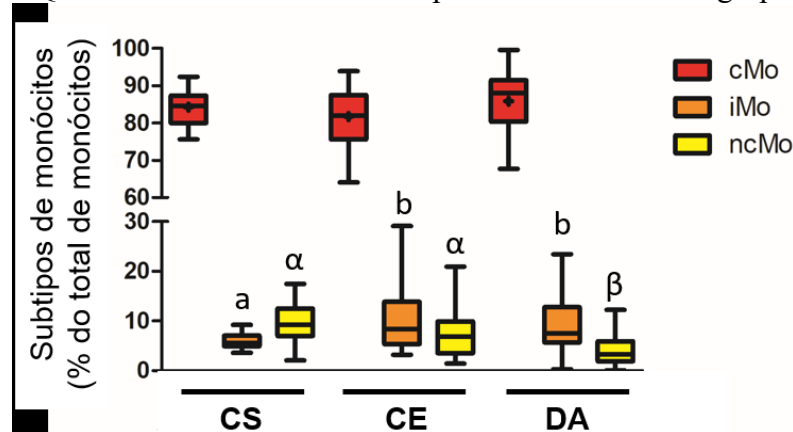
Esses resultados sugerem recrutamento de neutrófilos da MO para o SP de pacientes cirróticos, quando frequentemente ocorre escape de formas imaturas para a circulação. Possivelmente, esse escape de neutrófilos imaturos em pacientes cirróticos está associado à presença de infecções bacterianas e à inflamação, que resulta na movimentação de neutrófilos para as regiões acometidas (GARDNER et al., 2017; XU et al., 2014). Com relação à expressão de moléculas de adesão, as porcentagens de neutrófilos CD62L<sup>+</sup> foram avaliadas (Figura 37B). Os pacientes do grupo DA apresentaram porcentagens aumentadas de neutrófilos CD62L<sup>+</sup> do que os outros dois grupos do estudo ( $p \leq 0,01$ ). Esse resultado sugere maior adesão e transmigração de neutrófilos através dos vasos sanguíneos em direção aos tecidos inflamados no grupo DA, e corrobora a hipótese do aumento do recrutamento dessas células, com consequente aumento das quantidades de neutrófilos imaturos circulantes.

### 5.2.7 Monócitos

De forma semelhante ao que foi observado para os neutrófilos e como foi visto anteriormente na Seção “Celularidade Total”, foi observado um aumento relativo de monócitos nos pacientes com DA, mas não absoluto. Em seguida, ao classificar os monócitos como cMo, iMo e ncMo foram detectadas algumas alterações na distribuição desses subtipos (Figura 38). Como era esperado, o grupo CS apresentou como principal subtipo de monócito o cMo, seguido do ncMo, e por último e menos frequente, o iMo. Ambos os grupos de pacientes cirróticos

apresentaram maiores porcentagens de iMo, quando comparados aos CS. Além disso, o grupo DA apresentou menores quantidades de ncMo quando comparado tanto com o grupo CS quanto com o CE ( $p \leq 0,01$ ).

Figura 38 - Quantidades relativas dos subtipos de monócitos nos grupos do estudo.



Resultados expressos em porcentagem dentro do compartimento monocítico. As variáveis paramétricas (cMo) foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni e pelo teste de Welch (apresentam a média representada por um “+” no gráfico de caixa) e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose; cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; cMo: monócitos não-clássicos. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. a e b: diferença entre CS e CE e entre CS e DA ( $p \leq 0,01$ ).  $\alpha$  e  $\beta$ : diferença entre DA e CS e entre DA e CE ( $p \leq 0,01$ ).

Como pode ser visto na figura acima, não foram encontradas diferenças estatísticas para os valores de cMo dentro do compartimento monocítico, mas sim, quando se considera a porcentagem dessas células dentro dos leucócitos totais (Tabela 10).

Tabela 10 - Subtipos de monócitos nos grupos do estudo.

	CS	CE	DA
<b>cMo, mediana (intervalo)</b>	5,74 (3,16 – 8,67)#	5,52 (2,27 – 13,97)*	7,57 (1,63 – 14,06)*.#
<b>iMo, mediana (intervalo)</b>	0,40 (0,22 – 0,68)*.**	0,53 (0,21 – 3,92)*	0,63 (0,24 – 3,63)**
<b>ncMo, mediana (intervalo)</b>	0,60 (0,19 – 1,25)**	0,46 (0,08 – 1,66)	0,25 (0,01 – 1,07)**

Resultados expressos em porcentagem dentro dos leucócitos totais. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis; \*,# $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose; cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; cMo: monócitos não-clássicos.

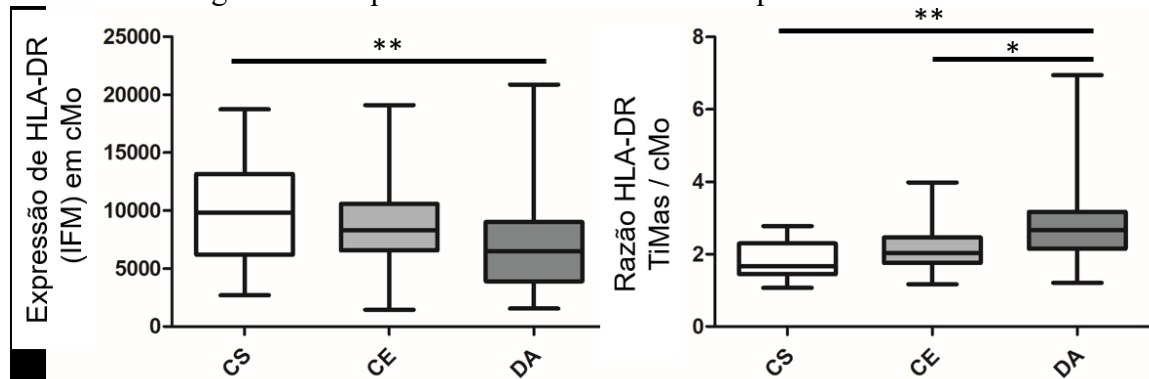
Dessa forma, foi observada uma alteração na proporção dos subtipos de monócitos circulantes em pacientes portadores de cirrose, principalmente entre aqueles com indícios de doença hepática mais avançada. Esses achados podem indicar um aumento do recrutamento de

monócitos da MO para o SP, gerando aumento de cMo circulantes, que pelos estímulos recebidos, poderiam se diferenciar em iMo na circulação, resultando em um aumento dessas células no SP dos pacientes cirróticos. O fluxo de iMo continuamente migraria para as áreas em que há inflamação (fígado, líquido ascítico), onde se diferenciariam em ncMo, que, após atuarem nessas áreas, retornariam ao SP. Os ncMo, que apresentam funções como de reparo tecidual, estão diminuídos na circulação de pacientes com DA, mas sua frequência poderia estar aumentada nos tecidos. Essa análise foi proposta considerando-se a teoria mista de diferenciação e migração, ou seja, de que o último passo da diferenciação se dá fora da circulação (TAK et al., 2017).

Estudos prévios observaram aumento de monócitos CD16<sup>+</sup> no SP e no tecido hepático de pacientes com cirrose. Acredita-se que essas células exerçam funções tanto de perpetuação do sinal inflamatório e profibrogênico durante a progressão da doença hepática quanto de reparo tecidual (GADD et al., 2016; PENG et al., 2016; ZIMMERMANN et al., 2010).

No presente estudo também foi analisada a expressão de HLA-DR nos subtipos de monócitos. O resultado esperado da razão da expressão de HLA-DR de TiMas/cMo deve ser um valor positivo, pois os monócitos não clássicos apresentam maiores quantidades dessa molécula em sua superfície, especialmente o subtipo iMo, pela sua atividade na apresentação de antígenos (KAPELLOS et al., 2019). Como pode ser observado na Figura 39, os pacientes DA apresentaram menor IFM de HLA-DR nos cMo e maior valor da razão de expressão de HLA-DR TiMas/cMo. Além disso, não houve diferenças estatísticas da IFM de HLA-DR de iMo e de ncMo entre os grupos. Portanto, esses resultados indicam que os cMo de pacientes do grupo DA apresentam menor expressão de HLA-DR em sua superfície, e que a razão TiMas/cMo aumentada se dá às custas dessa diminuição e não por um aumento da expressão dessa molécula na superfície de iMo e ncMo.

Figura 39 - Expressão de HLA-DR nos subtipos de monócitos.

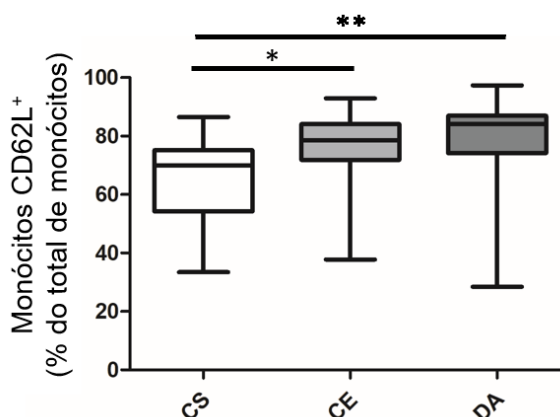


As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis; \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ . Para a avaliação da expressão de HLA-DR, o grupo CS foi composto por 29 indivíduos. CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose; cMo: monócitos clássicos; IFM: intensidade de fluorescência média; TiMas: macrófagos tissulares. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

A diminuição da expressão da molécula HLA-DR em monócitos de pacientes com cirrose hepática já foi documentada na literatura e foi associada ao avanço da doença e a maiores taxas de mortalidade (BERRES et al., 2009; GADD et al., 2016; XING et al., 2007), à ACLF e a choque séptico (ANTONIADES; WENDON; VERGANI, 2005). Juntamente com aumento das concentrações séricas de IL-6 e IL-10 e à supressão de IL-1, TNF- $\alpha$  e óxido nítrico sintetase, a diminuição da expressão de HLA-DR é uma característica de exaustão ou paralisia do sistema imune (NOOR; MANORIA, 2017).

Além da expressão de HLA-DR, também avaliou-se a expressão de CD62L na superfície dos monócitos, a qual é uma molécula de adesão expressa pelas células para aderirem ao endotélio vascular e migrarem para os tecidos (XU et al., 2008). Pode-se observar na Figura 40, que os pacientes portadores de cirrose dos grupos CE e DA apresentaram maiores porcentagens de monócitos CD62L<sup>+</sup> em relação aos CS com  $p \leq 0,05$  e  $p \leq 0,01$ , respectivamente. Esse achado reforça os resultados anteriores do presente estudo, que indicam que em pacientes cirróticos ocorre uma taxa maior de migração de monócitos da circulação periférica para os tecidos.

Figura 40 - Expressão de CD62L nos monócitos.



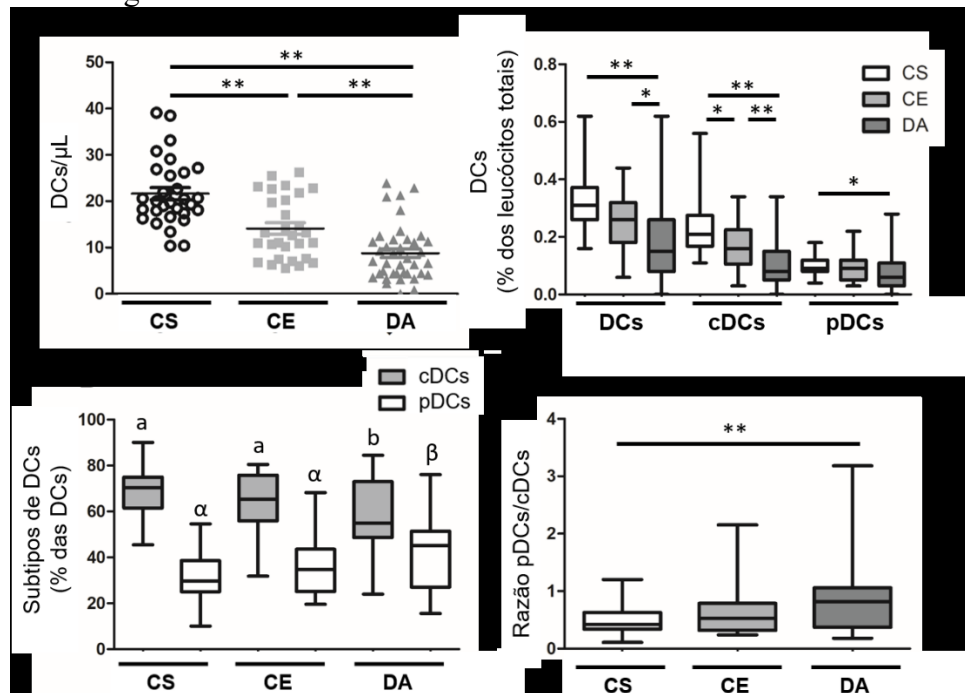
As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Os resultados do presente estudo corroboram o estudo de Gadd et al. (2016), que observou que pacientes com cirrose descompensada apresentaram expressões mais altas de CD62L em monócitos do que controles saudáveis e que esse dado correlacionou positivamente com o escore MELD.

### 5.2.8 Células dendríticas

Os resultados deste estudo mostram que os pacientes com cirrose, sobretudo os pacientes DA, apresentaram quantidades absolutas e relativas diminuídas de DCs, quando comparados aos CS (Figura 41). Além disso, foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes, CE e DA, como pode ser observado na Figura 41A. Na Figura 41B, pode-se observar que em pacientes com descompensação aguda da cirrose houve redução no percentual de cDCs e aumento do percentual de pDCs dentro do compartimento de DCs, o que resultou em uma razão pDCs/cDCs aumentada no grupo DA. Assim, pode-se observar que existe um desequilíbrio nas proporções dos subtipos de DCs em pacientes com cirrose hepática descompensada.

Figura 41 - Valores relativos e absolutos de células dendríticas.



Painéis A: valores absolutos e relativos das células dendríticas (DCs). Painéis B: valores relativos dos subtipos cDCs e pDCs dentro do compartimento de células DCs (a e b e  $\alpha$  e  $\beta$ : diferença entre CS e CE comparados à DA;  $p \leq 0,01$ ) e a razão pDCs/cDCs. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ . CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

As pDCs apresentam papel pro-inflamatório importante pela secreção de IFN tipo I e têm sido associadas à iniciação e promoção de diversas doenças autoimunes (YE et al., 2020). Por outro lado, essas células também apresentam função de indução de tolerância imune e de imunossupressão. No âmbito dos transplantes, observou-se que a razão pDCs/cDCs aumentada relaciona-se a menores taxas de rejeição (ROGERS; ISENBERG; THOMSON, 2013). Assim, sugere-se que a diminuição das quantidades de DCs circulantes e o desequilíbrio entre cDCs e pDCs em pacientes cirróticos pode estar associado à DIAC e à imunotolerância.

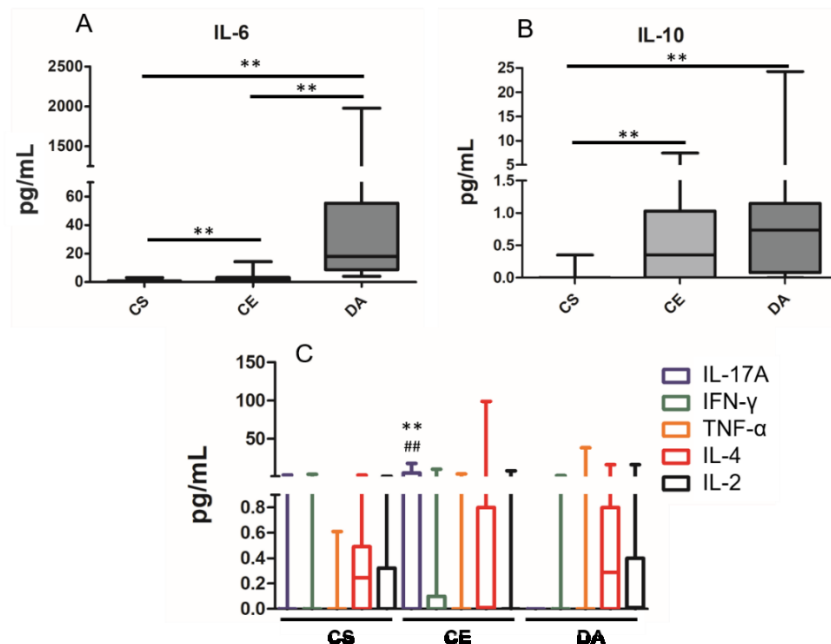
Para finalizar e resumir essa parte dos resultados (Seções 5.2.2. a 5.2.8), pode-se observar no Apêndice J uma tabela com os valores relativos e absolutos dos subtipos celulares analisados no presente estudo para os três grupos de indivíduos: CS, CE e DA.

### 5.2.9 Citocinas

Nesse trabalho também foram dosadas as citocinas plasmáticas IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 em todos os indivíduos dos grupos CS, CE e DA (Figura 42). A IL-6 apresentou resultado distinto entre os grupos, sobretudo nos pacientes DA, que exibiram concentrações de IL-6 muito elevadas em comparação aos outros dois grupos (Figura 42A). Resultado semelhante foi observado na análise da IL-10, porém, sem diferença estatística entre os pacientes CE e DA (Figura 42B). A Figura 42C mostra o resultado encontrado para as outras citocinas avaliadas no estudo: IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-2. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos para as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-2.

É importante ressaltar que o perfil de citocinas encontrado no presente estudo – concentrações elevadas de IL-6 e IL-10, especialmente no grupo DA, e concentrações elevadas de IL-17A, especialmente no grupo CE – corrobora um estudo prévio realizado no HU UFSC que incluiu 118 pacientes com CE, 130 pacientes com DA, e 30 controles saudáveis (FISCHER et al., 2017).

Figura 42 - Dosagem de citocinas plasmáticas.



Painel A: dosagem de IL-6. Painel B: dosagem de IL-10 nos grupos de estudo. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis.  $**p \leq 0,01$ . Painel C: Dosagem das citocinas IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-2. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. No painel C:  $**p \leq 0,01$  (comparação de CE e CS) e  $##p \leq 0,01$  (comparação entre CE e DA). CS: controles saudáveis; CE: cirrose estável; DA: descompensação aguda da cirrose. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.



Em condições inflamatórias, células NK e T CD8<sup>+</sup> EM são grandes produtoras de IFN- $\gamma$  (AHLERS; BELYAKOV, 2010; CALIGIURI, 2008). Porém, nos pacientes cirróticos, houve linfopenia absoluta e relativa, com diminuição importante desses dois subtipos celulares, o que pode em parte explicar as concentrações praticamente indetectáveis dessa citocina no plasma desses pacientes. Além da diminuição da frequência dessas células, em algumas condições clínicas, como na doença hepática crônica, pode haver perda de função, com defeitos na liberação de IFN- $\gamma$  e de degranulação (JIANG et al., 2020; LASO et al., 1997).

Como pode ser observado na Figura 42, algumas citocinas obtiveram mediana de 0,00, ou no caso da IL-17A no grupo DA todos os pacientes apresentaram valores de 0,00. Destaca-se que 0,00 representa valores abaixo do limite de detecção do teste. Apesar da mediana de 0,00, os pacientes CE obtiveram a soma dos postos das concentrações da citocina pró-inflamatória IL-17A aumentadas quando comparados aos grupos CS e DA. Essa citocina está especialmente elevada em pacientes CE que já apresentaram complicações prévias da cirrose ou que já foram hospitalizados devido à doença quando comparados a pacientes CE classificados como cirrose compensada ( $p \leq 0,05$ ). Esse foi o único parâmetro que apresentou diferença estatística ao comparar o grupo CE conforme essas características.

Pacientes com cirrose hepática por HCV apresentaram redução na produção de citocinas associadas à resposta de Th1, como IFN- $\gamma$  e IL-2, e aumento de produção de citocinas associadas à resposta de Th2, como a IL-10 (SAKAGUCHI et al., 2001; SUN; RAN, 2004). Estudos *in vitro* demonstraram que a citocina IL-10, juntamente com TGF- $\beta$ , geram estímulos que induzem a conversão de cMo em iMo (LIASKOU et al., 2013). Assim, o aumento dessa citocina pode estar associado ao aumento de iMo circulantes observado em pacientes DA quando comparados aos CS.

A IL-6, juntamente com a IL-4, está associada à diferenciação de linfócitos T a Th2 e está profundamente envolvida com ativação de monócitos e quimiotaxia dessas células para regiões inflamadas (SUN; RAN, 2004). Já a IL-17A é uma citocina pró-inflamatória produzida pelos linfócitos Th17, cujo aumento das concentrações séricas não possui significado totalmente elucidado, especialmente em pacientes com doenças hepáticas. Uma possível explicação para a concentração plasmática diminuída dessa citocina em pacientes DA poderia ser o efeito inibitório que a IL-10 exerce nas células Th17 (WU et al., 2015).

### 5.2.10 Relação das variáveis do sistema imune e laboratoriais

O coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) foi utilizado para identificar as correlações entre as variáveis numéricas de interesse. Dessa forma, os resultados de maior destaque encontrados no presente estudo com relação às células imune circulantes foram comparados aos resultados dos exames laboratoriais dos pacientes. Além disso, também foram comparados os resultados dos exames laboratoriais entre si. A análise foi realizada incluindo todos os pacientes com cirrose CE e DA (n=68), pois os exames laboratoriais completos não foram realizados para o grupo CS.

Tabela 11 - Correlação de variáveis do sistema imune com variáveis laboratoriais de pacientes com cirrose hepática.

Variáveis	Leuco	Hem	Hg	Ht	Creat	RNI	Alb	PCR	Bil	Lact
<b>B transicional<sup>a</sup></b>					<b>-0,437</b>					
<b>CS CD27<sup>neg a</sup></b>		<b>-0,434</b>	-0,384	<b>-0,448</b>			-0,325	-0,365		
<b>Plasmablastos<sup>a</sup></b>		<b>-0,659</b>	<b>-0,558</b>	<b>-0,610</b>		<b>0,546</b>	<b>-0,488</b>	<b>0,545</b>	<b>0,507</b>	
<b>cMo</b>		-0,398	-0,313	-0,363		0,376		0,351		
<b>ncMo</b>								-0,317		<b>-0,402</b>
<b>DCs</b>	-0,378	<b>0,408</b>	0,315					<b>-0,457</b>		-0,364
<b>cDCs</b>	-0,345	<b>0,467</b>	0,349	0,347	-0,313	-0,318		<b>-0,503</b>		-0,326
<b>pDCs</b>	-0,368									-0,370
<b>HLA-DR</b>						<b>0,416</b>		<b>0,422</b>		
<b>ncMo/cMo</b>										
<b>Razão N/L</b>		<b>-0,433</b>	-0,330	-0,355		<b>0,430</b>		<b>0,466</b>		
<b>IL-17A</b>		<b>0,438</b>	0,399	<b>0,426</b>		-0,397	<b>0,495</b>	<b>-0,509</b>		
<b>IL-10</b>		-0,346			0,333					
<b>IL-6</b>		<b>-0,791</b>	<b>-0,726</b>	<b>-0,740</b>	<b>0,517</b>	<b>0,616</b>	<b>-0,570</b>	<b>0,821</b>		0,396

Estão descritos os resultados das células e citocinas que apresentaram as melhores correlações com os exames laboratoriais ( $p \leq 0,01$ ). Estão em destaque (negrito) as correlações com coeficiente  $r_s$  acima de 0,400 ou -0,400 (correlação moderada a muito forte). Foram avaliados os exames laboratoriais que apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes CE e DA. As variáveis foram analisadas pela correlação de Spearman. Valores de  $r_s$  positivos indicam correlação diretamente proporcional, enquanto valores de  $r_s$  negativos indicam correlação inversamente proporcional. Além disso, quanto mais perto de 1,00 ou -1,00, melhor a correlação.

Leuco: leucometria; Hem: hemácias; Hg: hemoglobina; Ht: hematócrito; Creat: creatinina; RNI: razão normalizada internacional; Alb: albumina; PCR: proteína C reativa; Bil: bilirrubina total; Lact: lactato; HLA-DR ncMo/cMo: razão da expressão de HLA-DR dos monócitos não clássicos (ncMo) pelos clássicos (cMo); N/L: razão neutrófilos por linfócitos; cDCs: DCs clássicas; CS: *class-switched*; DCs: células dendríticas; pDCs: DCs plasmocitoides. As células foram analisadas pela sua porcentagem dentro dos leucócitos, exceto quando assinaladas com <sup>a</sup>, que representa a porcentagem dentro das células B. Nessa análise, estão incluídos apenas os pacientes com cirrose hepática (n=68).

Como pode ser observado na Tabela 11 os parâmetros que apresentaram melhores correlações com os exames laboratoriais foram subtipos de células B, subtipos de monócitos e de DCs, razão N/L e algumas citocinas, sobretudo a IL-6. Os plasmablastos foram as únicas células circulantes que correlacionaram com a bilirrubina, com uma correlação moderada diretamente proporcional. De forma interessante, as DCs e seus subtipos apresentaram, diferentemente da maioria dos outros subtipos celulares, correlação inversamente proporcional com a leucometria; ou seja, pacientes com leucometria aumentada apresentaram menores porcentagens de DCs circulantes. Além disso, as porcentagens de ncMo exibiram correlação moderada inversamente proporcional com as concentrações de lactato, o qual, quando em concentrações séricas elevadas, pode indicar falta de perfusão tecidual e está associado à gravidade da cirrose hepática (DROLZ et al., 2019).

A melhor correlação demonstrada na Tabela 10 foi a concentração de IL-6 com a dosagem de PCR (correlação muito forte e positiva de 0,821,  $p \leq 0,01$ ). Essa correlação era um resultado esperado, pois quando a IL-6 é sintetizada nos estágios iniciais da inflamação, é direcionada pela corrente sanguínea até o fígado, onde induz a produção de proteínas de fase aguda, como a PCR. Ou seja, a síntese hepática de PCR é estimulada pela IL-6 (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

#### **5.2.11 Relação das variáveis do sistema imune e clínicas**

As variáveis das células imune circulantes e a pontuação dos escores MELD e Child-Pugh foram correlacionadas pelo teste de Spearman ( $r_s$ ) (Tabela 12).

De acordo com a análise das correlações, pode-se observar que pacientes com valores de MELD e de Child-Pugh mais elevados apresentaram maiores porcentagens de plasmablastos dentro das células B (correlação forte). Além disso, a dosagem de IL-6 correlacionou de forma diretamente proporcional com a pontuação de MELD e de Child-Pugh, enquanto o oposto ocorreu com as dosagens de IL-17A.

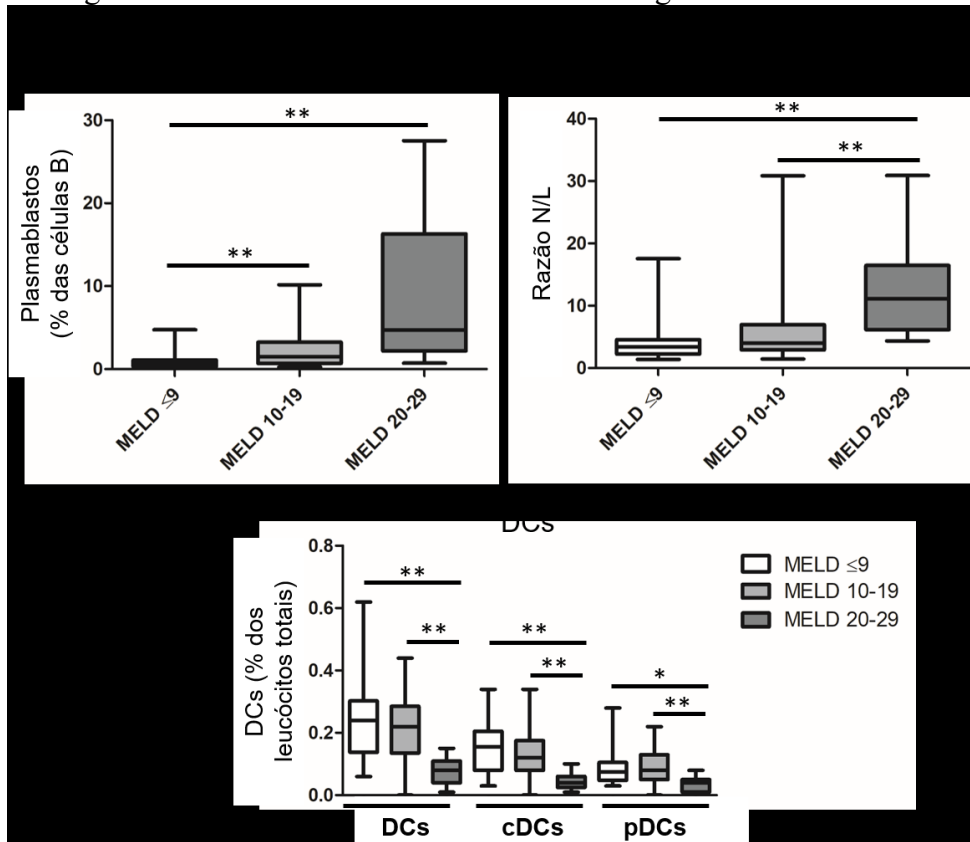
Tabela 12 - Correlação dos resultados das células imune circulantes e a pontuação dos escores MELD e Child-Pugh de pacientes com cirrose hepática.

Variáveis	MELD		Child-Pugh	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
<b>Linfócitos</b>	-0,502	<0,01	-0,472	≤0,01
<b>TCD8<sup>+</sup> CM (mm<sup>3</sup>)</b>	-0,400	<0,01	-0,416	≤0,01
<b>Células B</b>	-0,427	<0,01	-0,454	≤0,01
<b>Pré-CG (mm<sup>3</sup>)</b>	-0,446	<0,01	-0,451	≤0,01
<b>BN (mm<sup>3</sup>)</b>	-0,430	<0,01	-0,451	≤0,01
<b>B transicionais (mm<sup>3</sup>)</b>	-0,536	<0,01	-0,570	≤0,01
<b>Plasmablastos<sup>a</sup></b>	0,612	<0,01	0,697	≤0,01
<b>Monócitos</b>	0,268	<0,05	0,313	≤0,01
<b>cMo</b>	0,302	<0,05	0,376	≤0,01
<b>cMo<sup>b</sup></b>	0,207	0,091	0,321	≤0,01
<b>cMo (mm<sup>3</sup>)</b>	0,148	0,229	0,249	≤0,05
<b>NcMo</b>	-0,257	<0,05	-0,324	≤0,01
<b>NcMo<sup>b</sup></b>	-0,355	<0,01	-0,425	≤0,01
<b>NcMo (mm<sup>3</sup>)</b>	-0,286	<0,05	-0,320	≤0,01
<b>TiMas<sup>b</sup></b>	-0,206	0,092	-0,320	≤0,01
<b>HLA-DR cMo</b>	-0,329	<0,01	-0,298	≤0,05
<b>HLA-DR TiMas/cMo</b>	0,455	<0,01	0,290	≤0,05
<b>CD62L<sup>b</sup></b>	0,256	<0,05	0,163	0,183
<b>DCs (mm<sup>3</sup>)</b>	-0,440	<0,01	-0,353	≤0,01
<b>cDCs</b>	-0,414	<0,01	-0,447	≤0,01
<b>cDCs<sup>c</sup></b>	-0,269	<0,05	-0,429	≤0,01
<b>cDCs (mm<sup>3</sup>)</b>	-0,494	<0,01	-0,450	≤0,01
<b>pDCs<sup>c</sup></b>	0,269	<0,05	0,429	≤0,01
<b>pDCs (mm<sup>3</sup>)</b>	-0,251	<0,05	-0,124	0,313
<b>pDCs/cDCs</b>	0,269	<0,05	0,429	≤0,01
<b>Razão N/L</b>	0,476	<0,01	0,443	≤0,01
<b>IL-17A</b>	-0,438	<0,01	-0,529	≤0,01
<b>IL-6</b>	0,672	<0,01	0,761	≤0,01

As variáveis foram analisadas pela correlação de Spearman. Valores de  $r_s$  positivos indicam correlação positiva, enquanto valores de  $r_s$  negativos indicam correlação negativa. Além disso, quanto mais perto de 1,00 ou -1,00, melhor a correlação. Estão descritos os resultados que apresentaram correlações moderadas a muito fortes (acima de 0,400 ou -0,400) com os escores de MELD e/ou de Child-Pugh. <sup>a</sup>: porcentagem dentro das células B; <sup>b</sup>: porcentagem dentro dos monócitos; <sup>c</sup>: porcentagem dentro das DCs; (mm<sup>3</sup>): células/ mm<sup>3</sup> ou /uL; CG: centro germinativo; BN: B naïve; CM: memória central; cDCs: DCs clássicas; cMo: monócitos clássicos; DCs: células dendríticas; IL: interleucina; MELD: Model for End-Stage Liver Disease; ncMo: monócitos não clássicos; TiMas: macrófagos tissulares; pDCs: DCs plasmocitoides. Nessa análise, estão incluídos apenas os pacientes com cirrose hepática (n=68).

Algumas variáveis que se destacaram na Tabela 12 foram analisadas com mais detalhes de acordo com os escores MELD e Child-Pugh categorizados. Como pode ser observado na Figura 43, os valores relativos de plasmablastos e a razão N/L apresentaram valores maiores conforme valores de MELD mais altos. Por outro lado, pacientes com doença hepática mais avançada, apresentaram menores porcentagens de DCs e de seus subtipos, cDCs e pDCs, inclusive com resultados bastante distintos entre pacientes com MELD de 10 a 19 e de 20 a 29.

Figura 43 - Células imune circulantes e as categorias do escore MELD.

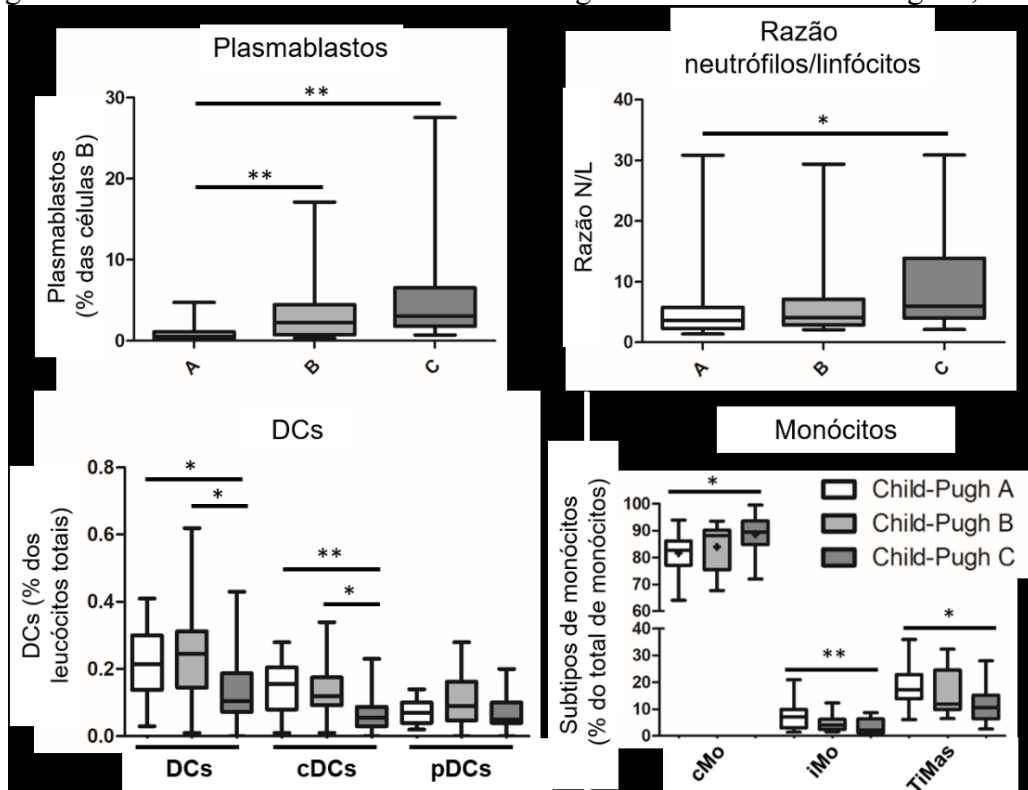


As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ . Nessa análise, estão incluídos apenas os pacientes com cirrose (n=68). MELD: Model for End-Stage Liver Disease. DCs: células dendríticas; cDCs: DCs clássicas; pDCs: DCs plasmocitoides. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Os resultados de maior destaque ao categorizar os pacientes com cirrose como Child-Pugh A, B e C podem ser observados na Figura 44.

Os resultados apresentados neste estudo (Tabela 12, Figuras 43 e 44) mostram que quanto maior a pontuação de MELD e de Child-Pugh os pacientes apresentaram menores quantidades de células BN e maiores porcentagens de plasmablastos, maiores valores da razão N/L e menores quantidades de DCs circulantes.

Figura 44 - Células imune circulantes e as categorias do escore Child-Pugh A, B e C.

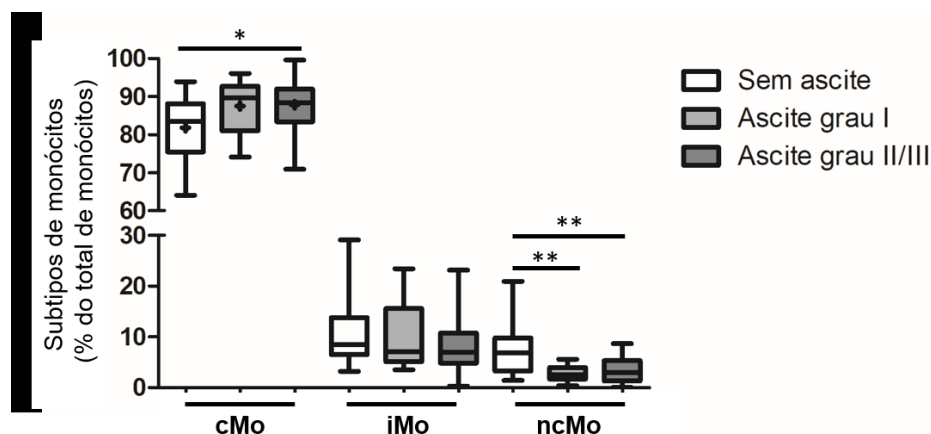


As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni (apresentam a média representada por um “+” no gráfico de caixa) e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis.  $*p \leq 0,05$  e  $**p \leq 0,01$ . Nessa análise, estão incluídos apenas os pacientes com cirrose ( $n=68$ ). cDCs: DCs clássicas; cMo: monócitos clássicos; DCs: células dendríticas; iMo: monócitos intermediários; razão N/L: razão neutrófilos por linfócitos; pDCs: DCs plasmocitoides; TiMas: macrófagos tissulares. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Posteriormente, os pacientes cirróticos foram agrupados de acordo com a presença de ascite. É importante destacar que nenhum dos pacientes CE apresentava ascite no momento da coleta. Os pacientes com DA que apresentavam ascite foram classificados em dois grupos: grau I ou II/III. Sabe-se que na presença de ascite, ocorre recrutamento de monócitos da circulação, os quais migram para a região inflamada a fim de exercer suas funções. Assim, primeiramente, avaliou-se o perfil dos subtipos de monócitos circulantes em pacientes com e sem ascite.

Como pode ser observado na Figura 45, os pacientes com ascite apresentaram valores relativos aumentados de cMo e diminuídos de ncMo dentro do compartimento monocítico, sem alterações no subtipo iMo.

Figura 45 - Subtipos de monócitos em pacientes cirróticos com e sem ascite.



As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni (apresentam a média representada por um “+” no gráfico de caixa) e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis.  $*p \leq 0,05$  e  $**p \leq 0,01$ . Nessa análise, foram incluídos apenas os pacientes com cirrose (n=68). cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

A expressão da molécula de adesão CD62L nos monócitos não apresentou diferença significativa entre os grupos de pacientes com e sem ascite.

Como pode ser observado na Tabela 13, outras variáveis apresentaram diferenças estatísticas importantes ao comparar pacientes com relação às complicações clínicas ascite e EH. Algumas variáveis que não haviam apresentado diferença estatística ao dividir os pacientes cirróticos em CE e DA apresentaram significância ao dividi-los de acordo com a presença dessas complicações. Dessa forma, a ascite e a EH parecem ter importante associação com alterações nas células imune em nível periférico, como a distribuição das células B.

Os pacientes com ascite e/ou EH apresentaram menores porcentagens de células B pré-CG e maiores porcentagens de células BM CS, inclusive do subtipo CS CD27<sup>neg</sup>, e de plasmablastos. Além disso, apresentaram menores porcentagens de células do compartimento células B transitórias / B reg.

Tabela 13 - Células imune circulantes em pacientes cirróticos de acordo com a presença de ascite e de encefalopatia hepática.

	Sem ascite (n=42)	Com ascite (n=26)	<i>p</i>
<b>Linfócitos totais, média ± DP</b>	19,78 ± 7,84	12,78 ± 7,36	0,001
<b>Linfócitos T, mediana (intervalo)</b>	11,24 (2,54 – 26,70)	6,52 (1,75 – 22,62)	0,002
<b>Linfócitos B, mediana (intervalo)</b>	3,65 (0,16 – 9,50)	1,72 (0,38 – 9,07)	0,004
<b>NK, mediana (intervalo)</b>	1,90 (0,22 – 8,40)	1,44 (0,36 – 4,99)	0,050
<b>NKT, mediana (intervalo)</b>	0,73 (0,06 – 7,94)	0,34 (0,06 – 1,48)	0,006
<b>T reg M<sup>a</sup>, mediana (intervalo)</b>	1,79 (0,58 – 6,81)	3,09 (0,06 – 8,62)	<0,001
<b>Pré-CG<sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	84,34 (29,34 – 98,00)	68,77 (12,44 – 94,71)	0,001
<b>B transicional<sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	6,47 (0,85 – 16,51)	1,82 (0,05 – 13,97)	0,001
<b>CS<sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	8,22 (1,46 – 39,46)	19,80 (2,81 – 70,51)	0,001
<b>CS BM<sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	6,88 (1,29 – 33,42)	15,12 (2,16 – 64,15)	0,004
<b>CS CD27<sup>neg</sup><sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	1,18 (0,10 – 8,93)	3,32 (0,12 – 11,77)	0,001
<b>Plasmablastos<sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	0,63 (0,08 – 5,27)	3,04 (0,62 – 27,53)	<0,001
<b>cMo<sup>c</sup>, média ± DP</b>	81,84 ± 8,05	87,69 ± 7,13	0,003
<b>DCs, mediana (intervalo)</b>	0,23 (0,03 – 0,62)	0,12 (0,00 – 0,39)	0,001
<b>cDCs, mediana (intervalo)</b>	0,16 (0,01 – 0,34)	0,07 (0,00 – 0,21)	<0,001
	Sem EH (n = 49)	Com EH (n = 19)	<i>p</i>
<b>T reg M<sup>a</sup>, mediana (intervalo)</b>	1,89 (0,06 – 7,70)	3,38 (1,41 – 8,62)	<0,001
<b>B transicional<sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	5,92 (0,09 – 16,51)	2,14 (0,05 – 10,06)	0,011
<b>CS<sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	8,66 (1,46 – 39,46)	18,11 (2,81 – 70,51)	0,012
<b>CS-BM<sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	7,27 (1,29 – 33,42)	14,90 (2,16 – 64,15)	0,027
<b>CS CD27<sup>neg</sup><sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	1,41 (0,10 – 7,01)	3,56 (0,12 – 11,77)	0,008
<b>Plasmablastos<sup>b</sup>, mediana (intervalo)</b>	0,74 (0,08 – 27,53)	2,85 (0,72 – 17,10)	0,001
<b>cMo<sup>c</sup>, média ± DP</b>	82,26 ± 8,20	88,76 ± 6,11	0,001
<b>iMo<sup>c</sup>, mediana (intervalo)</b>	8,49 (3,20 – 29,12)	6,57 (0,29 – 23,45)	0,034
<b>NcMo<sup>c</sup>, mediana (intervalo)</b>	5,72 (0,43 – 20,97)	3,70 (0,08 – 8,68)	0,009
<b>DCs, mediana (intervalo)</b>	0,22 (0,03 – 0,62)	0,14 (0,00 – 0,39)	0,043
<b>cDCs, mediana (intervalo)</b>	0,14 (0,01 – 0,34)	0,07 (0,00 – 0,23)	0,007

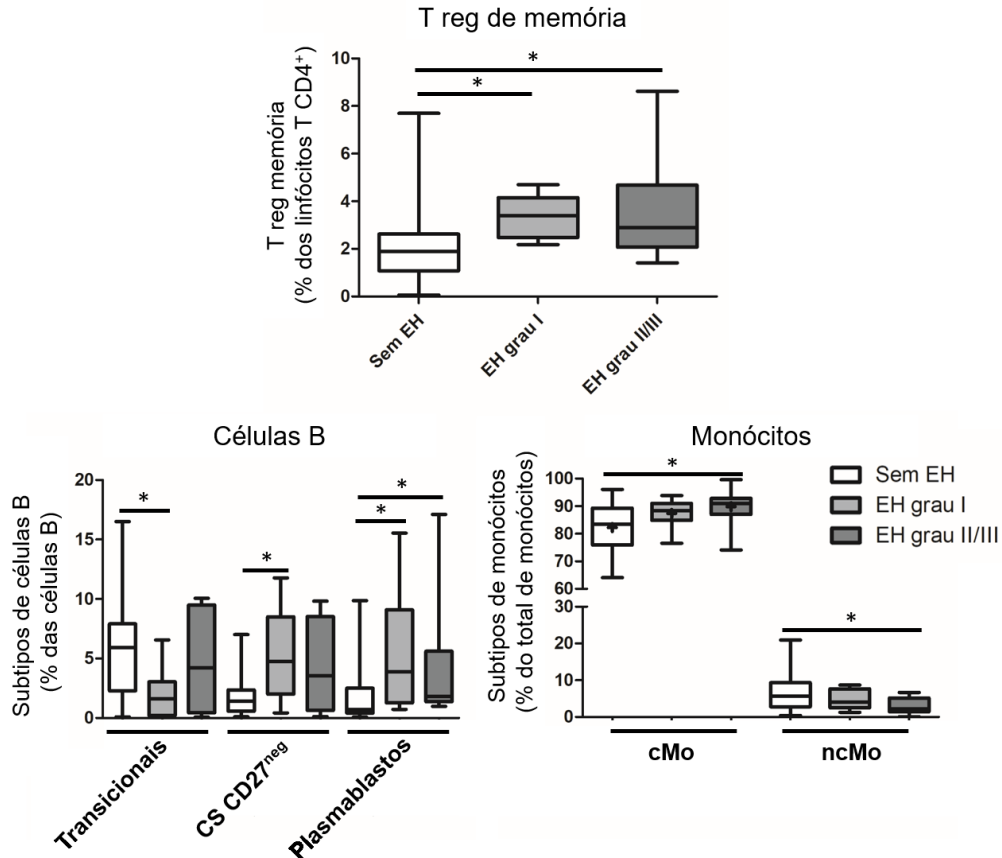
As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney U e as paramétricas, pelo teste T de student. Os resultados estão representados como porcentagens dentro dos leucócitos totais, exceto em: <sup>a</sup> porcentagem dentro dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, <sup>b</sup> porcentagens dentro das células B e <sup>c</sup> porcentagem dentro dos monócitos totais. Nessa análise, foram incluídos apenas os pacientes com cirrose (n=68). BM: B de memória; CG: centro germinativo; CS: *class-switched*; DCs: células dendríticas; T reg M: T regulatória de memória; cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos; DP: desvio padrão; EH: encefalopatia hepática.

Com relação à EH, do total de pacientes cirróticos, 19 (48,7%) apresentavam algum grau de EH no momento da coleta dos dados, oito com grau I e onze com grau II/III. Como pode ser observado na Tabela 13 e na Figura 46, a presença de EH foi associada a maiores frequências de cMo e menores de iMo e de ncMo, e a maiores quantidades de T reg de memória. Além disso, pacientes cirróticos com ascite e/ou EH apresentaram menores porcentagens de DCs ( $p \leq 0,05$ ) e de cDCs ( $p \leq 0,01$ ) que os pacientes sem a complicação. Esses resultados



semelhantes entre ascite e EH eram esperados, pois a ocorrência concomitante dessas complicações clínicas foi comum nessa casuística.

Figura 46 - Células imune circulantes em pacientes cirróticos com e sem encefalopatia hepática.



As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni (apresentam a média representada por um “+” no gráfico de caixa) e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ . Nessa análise foram incluídos apenas os pacientes com cirrose ( $n=68$ ). EH: encefalopatia hepática; T reg: T regulatória; CS: *class-switched*; cMo: monócitos clássicos; ncMo: monócitos não-clássicos. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Como pode ser observado nos resultados anteriores, pacientes cirróticos com a presença de complicações clínicas, como ascite e EH, e com pontuação de MELD e de Child-Pugh mais elevada, apresentaram um perfil de distribuição das células do sistema imune circulantes diferente daqueles pacientes com a doença em estágios mais iniciais. Essas alterações foram mais pronunciadas nos compartimentos celulares B e monocítico.

Com relação às células B, o presente estudo observou uma diminuição das células B pré-CG e um aumento de frequência em direção às células BM e plasmablastos. Essa mudança de perfil pode indicar a ocorrência de resposta imune de células B nesses pacientes, inclusive da resposta B independente do CG. Porém, no presente estudo não foi avaliada a eficácia dessa resposta. Com relação a essa questão, Doi e colaboradores (2012) observaram que as células B de pacientes cirróticos são hiporresponsivas à ativação por CD40/TLR9 e menos capazes de estimular a proliferação de Th do que as células B de pacientes não cirróticos HCV<sup>+</sup> e de controles saudáveis. Diferente dos nossos resultados, um estudo recente observou um declínio progressivo das células BM CD27<sup>+</sup> nos estágios mais avançados da cirrose (DOI et al., 2018). Dessa forma, esse é um tema que requer maiores investigações para atingir resultados mais conclusivos.

Recentemente, um estudo observou um aumento dos níveis séricos do fator de ativação de células B (BAFF) em pacientes com cirrose avançada (DOI et al., 2018). BAFF é um regulador importante da maturação periférica das células B e da sua diferenciação em plasmablastos, também envolvido com sobrevivência celular, produção e recombinação de Ig. Concentrações séricas elevadas de BAFF também foram descritas em pacientes com EHNA (MIYAKE et al., 2013) e infectados pelo HCV (SÈNE et al., 2007; TOUBI et al., 2006). Esses resultados indicam que pacientes com cirrose hepática apresentam maior expressão e sinalização de BAFF, o que poderia explicar o aumento de células BM e de plasmablastos encontrados nos pacientes com cirrose avançada do presente estudo. Além disso, estímulo exagerado por BAFF pode levar à produção excessiva de Ig (SZODORAY et al., 2004). De fato, hipergamaglobulinemia é um achado comum em pacientes com cirrose avançada (DOI et al., 2018; FALLATAH; AKBAR, 2010; YAZDANI et al., 2019). Outra evidência de estímulo de diferenciação de células B é a maior concentração plasmática de IL-10 em pacientes cirróticos. Essa citocina está envolvida com o aumento da sobrevivência de células B, e juntamente com a IL-4, é um importante cofator para a proliferação desse subtipo celular (GADANI et al., 2012; HEINE et al., 2014; ROUSSET et al., 1992).

Com relação aos monócitos e seus subtipos, o presente estudo observou um aumento das porcentagens de cMo e uma diminuição de TiMas nos pacientes com complicações clínicas, como a ascite. Nesses pacientes, ocorre um aumento importante de translocação bacteriana, com a liberação de PAMPs que ativam o sistema imune e causam inflamação sistêmica

(ALBILLOS; LARIO; ÁLVAREZ-MON, 2014). Esses estímulos aumentam o recrutamento de monócitos da MO para o SP, os quais atingem a circulação como cMo. A diminuição de ncMo circulantes observada pode sugerir que essas células estejam acumuladas nos tecidos inflamados, onde exercem as suas funções de apresentação de antígenos e de reparo tecidual. De forma semelhante, os pacientes classificados como Child-Pugh C apresentaram mais cMo e menos TiMas que pacientes Child-Pugh A. Outra possível explicação para o desaparecimento dos TiMas da circulação seria a presença da DIAC, que leva o sistema imune a colapso nos estágios mais avançados da cirrose, e, assim, não há a diferenciação normal dessas células.

Como citado anteriormente, um estudo conduzido por Huang e colaboradores (2015) detectou um aumento das porcentagens de células T reg, principalmente T reg de memória, em pacientes com cirrose hepática, e observou que o aumento se dá paralelamente à severidade da doença hepática. No presente estudo, foram encontrados resultados semelhantes com um aumento significativo de T reg de memória em pacientes com as complicações clínicas ascite e EH. As células T reg de memória estão associadas à inflamação e apresentam potente atividade imunossupressora. Dessa forma, os autores do estudo supracitado acreditam que essas células participam direta ou indiretamente do desenvolvimento do perfil imunossupressor da cirrose hepática.

Dando sequência à análise dos pacientes de acordo com as características clínicas, apenas quatro pacientes do grupo DA (10,3%) apresentaram infecção bacteriana do tipo PBE durante o período de hospitalização. O diagnóstico de PBE se fez pela contagem de neutrófilos maior que  $250/\text{mm}^3$  no líquido ascítico associado ou não ao crescimento bacteriano. As bactérias isoladas nos casos de PBE do presente estudo foram: *Achromobacter xylooxidans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As enterobactérias, como a *Escherichia coli*, são as bactérias mais frequentemente isoladas em pacientes com PBE, cerca de 25,5% dos casos (STRAUSS; CALY, 2003). As análises estatísticas não foram realizadas devido ao baixo número de eventos (quatro pacientes).

Ao analisar os pacientes do grupo DA que buscaram o atendimento na Emergência do HU UFSC com HDA (n=17) e aqueles que não apresentavam HDA (n=22) foram encontradas diferenças estatísticas apenas para os subtipos de células B: pré-CG, naïve, CS, CS-MB e CS CD27<sup>neg</sup> (Tabela 14).

Tabela 14 - Quantidades das células imune circulantes em pacientes cirróticos internados por descompensação aguda com e sem a presença de hemorragia digestiva alta.

	Sem HDA (n=22)	Com HDA (n=17)	<i>p</i>
<b>Pré-CG, mediana (intervalo)</b>	63,87 (12,44 – 90,70)	84,01 (44,85 – 94,71)	0,017
<b>B naïve, mediana (intervalo)</b>	57,44 (12,31 – 87,63)	78,56 (41,52 – 94,25)	0,020
<b>CS, mediana (intervalo)</b>	20,57 (4,57 – 70,51)	10,25 (2,81 – 39,46)	0,020
<b>CS BM, mediana (intervalo)</b>	15,95 (2,59 – 64,15)	8,12 (2,16 – 33,42)	0,031
<b>CS CD27<sup>neg</sup>, mediana (intervalo)</b>	3,74 (0,42 – 11,77)	1,75 (0,12 – 9,23)	0,027
<b>Plasmablastos, mediana (intervalo)</b>	3,04 (0,32 – 27,53)	1,82 (0,41 – 17,10)	0,190

As variáveis foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney U. Os resultados estão representados como porcentagens dentro das células B. Nessa análise, foram incluídos apenas os pacientes com descompensação aguda da cirrose (n=39) que buscaram atendimento na Emergência do HU-UFSC com ou sem a presença de HDA (hemorragia digestiva alta). BM: B de memória; CG: centro germinativo; CS: *class-switched*.

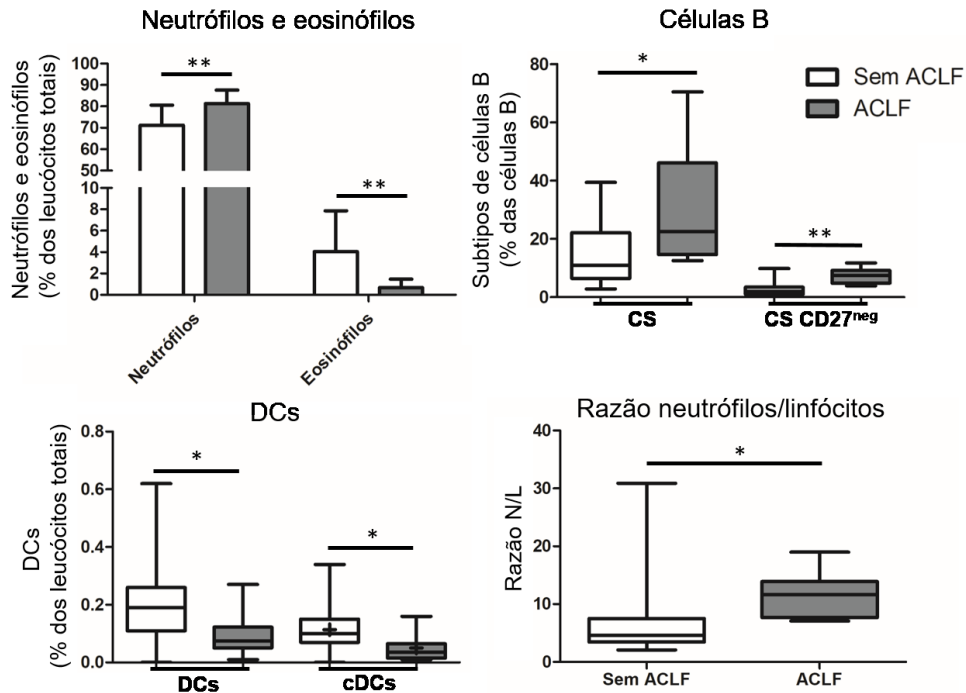
Como pode ser observado, os pacientes cirróticos internados com HDA apresentaram um perfil distinto de distribuição das células B dos pacientes DA com infecção (dado não mostrado pelo baixo número de eventos), do grupo DA separado pela presença de ascite e EH (dado não mostrado) e com ACLF (demonstrado a seguir na Seção 5.2.12). O perfil das células B dos pacientes com HDA é semelhante ao perfil das células de pacientes cirróticos com doença hepática menos avançada (maiores quantidades de BN e menores de BM), enquanto em pacientes com doença hepática mais avançada (ascite, EH, infecção e ACLF) observou-se redução das quantidades de BN e aumento das BM e plasmablastos. Possivelmente, essa diferença de fenótipo está associada ao fato de que, como já citado, as terapias empregadas precocemente em pacientes com HDA têm apresentado sucesso terapêutico, o que melhorou o prognóstico e diminuiu as taxas de mortalidade desses pacientes (D'AMICO; DE FRANCHIS; GROUP, 2003).

### 5.2.12 Relação das variáveis do sistema imune e ACLF

Em seguida, os pacientes com DA foram classificados de acordo com a presença de falências orgânicas, que caracteriza a síndrome ACLF. Alguns subtipos de células imune circulantes se destacaram nessa análise, como as porcentagens de neutrófilos e de eosinófilos, as porcentagens de células B CS e CS CD27<sup>neg</sup> (dentro do compartimento B), além das DCs e cDCs e a razão N/L (Figura 47). Como pode ser observado, houve aumento das quantidades relativas de neutrófilos e conseqüente aumento da razão N/L em pacientes com ACLF, o que

era esperado, pois a síndrome ACLF muitas vezes é desencadeada por infecções bacterianas (ARROYO, 2019).

Figura 47 - Células imune circulantes em pacientes cirróticos descompensados com e sem ACLF.



As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney U e as variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de T de student (gráficos de colunas ou apresentam a média representada por um “+” no gráfico de caixa). \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ . CS: *class-switched*; DCs: células dendríticas; cDCs: DCs clássicas; ACLF: insuficiência hepática crônica agudizada; N/L: razão neutrófilos/linfócitos. Nessa análise, estão incluídos apenas os pacientes com cirrose descompensada (DA) (n=39). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Dando continuidade à análise dos pacientes que desenvolveram ACLF, na Tabela 15 estão evidenciados com mais detalhes os compartimentos celulares que apresentaram maiores associações com ACLF, além de parâmetros clínicos e laboratoriais.

Tabela 15 – Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com descompensação aguda da cirrose diagnosticados ou não com ACLF.

Variável	DA sem ACLF (n = 31)	DA com ACLF (n = 8)	p
Idade (anos), média ± DP	55,48 ± 12,06	59,50 ± 9,56	0,389
Sexo masculino, n (%)	10 (32,3)	2 (25,0)	0,527
<b>Parâmetros laboratoriais</b>			
Leucócitos/mm <sup>3</sup> , mediana (intervalo)	5.060 (1.010 – 14.510)	8.035 (4.050 – 10.940)	0,092
Linfócitos/mm <sup>3</sup> , mediana (intervalo)	840 (161 – 2,250)	836 (351 – 1,988)	0,932
Neutrófilos, média ± DP	71,22 ± 9,38	81,31 ± 6,29	<b>0,007</b>
<b>Compartimento B<sup>a</sup></b>			
Pre-CG, média ± DP	77,78 (15,95 – 94,71)	59,37 (12,44 – 78,71)	<b>0,044</b>
Transicional, mediana (intervalo)	4,23 (0,05 – 13,97)	0,85 (0,09 – 10,06)	0,222
Naïve, média ± DP	71,23 (15,90 – 94,25)	56,20 (12,31 – 78,62)	0,065
NS-BM, mediana (intervalo)	4,81 (0,23 – 57,96)	5,63 (1,52 – 26,99)	0,932
CS, mediana (intervalo)	10,94 (2,81 – 39,46)	22,59 (12,57 – 70,51)	<b>0,012</b>
CS-BM, mediana (intervalo)	10,39 (2,16 – 33,42)	15,65 (7,27 – 64,15)	0,085
CS CD27 <sup>neg</sup> , mediana (intervalo)	1,99 (0,12 – 9,83)	7,44 (3,93 – 11,77)	<b>≤0,001</b>
Plasmablastos, mediana (intervalo)	2,83 (0,32 – 27,53)	3,07 (0,62 – 15,54)	0,986
<b>Compartimento DCs</b>			
DCs, mediana (intervalo)	0,19 (0,00 – 0,62)	0,07 (0,01 – 0,27)	<b>0,015</b>
cDCs, média ± DP <sup>b</sup>	58,75 ± 12,46	54,39 ± 20,69	0,449
pDCs, média ± DP <sup>b</sup>	41,22 ± 12,47	45,61 ± 20,69	0,447
Razão pDCs/cDCs, média ± DP	0,82 (0,19 – 1,45)	0,91 (0,18 – 3,18)	0,554
cDCs, média ± DP	0,11 (0,00 – 0,34)	0,05 (0,01 – 0,16)	<b>0,026</b>
Plaquetas/mm <sup>3</sup> , mediana (intervalo)	68.000 (18.000 – 245.000)	72.000 (39.000 – 259.000)	0,645
Sódio (mEq/L), média ± DP	136,84 ± 4,86	135,87 ± 6,96	0,650
Creatinina (mg/dL), mediana (intervalo)	1,09 (0,57 – 1,70)	2,22 (0,55 – 6,19)	<b>0,003</b>
RNI, mediana (intervalo)	1,44 (1,04 – 2,16)	1,47 (1,17 – 2,58)	0,720
Albumina (g/dL), média ± DP	2,92 ± 0,57	2,72 ± 1,05	0,632
PCR (mg/L), mediana (intervalo)	14,90 (3,20 – 172,90)	48,85 (12,70 – 162,70)	<b>0,023</b>
Bilirrubina total (mg/dL), mediana (intervalo)	2,10 (0,20 – 8,60)	1,70 (0,60 – 8,90)	0,597
Lactato (mmol/L), mediana (intervalo)	1,55 (0,80 – 4,90)	2,00 (1,50 – 2,60)	0,183
AST (IU/L), mediana (intervalo)	46 (20 – 260)	37 (15 – 70)	0,173
ALT (IU/L), mediana (intervalo)	36 (8 – 165)	22 (14 – 32)	<b>0,012</b>
GGT (IU/L), mediana (intervalo)	114 (34 – 536)	94 (18 – 261)	0,346
IL-6 (pg/mL), mediana (intervalo)	13,39 (4,06 – 800,95)	76,48 (8,64 – 1.978,06)	<b>0,023</b>
IL-10 (pg/mL), mediana (intervalo)	0,41 (0,00 – 24,25)	1,43 (0,51 – 4,09)	<b>0,005</b>
<b>Características clínicas, n (%)</b>			
Ascite	19 (61,3)	7 (87,5)	0,229
Encefalopatia hepática	12 (38,7)	7 (87,5)	<b>0,020</b>
Sangramento gastrointestinal	15 (48,4)	2 (25,0)	0,426
Peritonite bacteriana espontânea	2 (6,5)	2 (25,0)	0,180
Child–Pugh, mediana (intervalo)	9 (6 – 13)	10 (7 – 14)	0,173
Child–Pugh A, n (%)	4 (12,9)	0 (0,0)	0,563
Child–Pugh B, n (%)	16 (51,6)	3 (37,5)	0,695
Child–Pugh C, n (%)	11 (35,5)	5 (62,5)	0,235
MELD, mediana (intervalo)	14 (8 – 22)	21 (14 – 29)	<b>0,007</b>
MELD < 9, n (%)	3 (9,7)	0 (0,0)	0,492
MELD 10 – 19, n (%)	24 (77,4)	3 (37,5)	0,079
MELD 20 – 29, n (%)	4 (12,9)	5 (62,5)	0,009

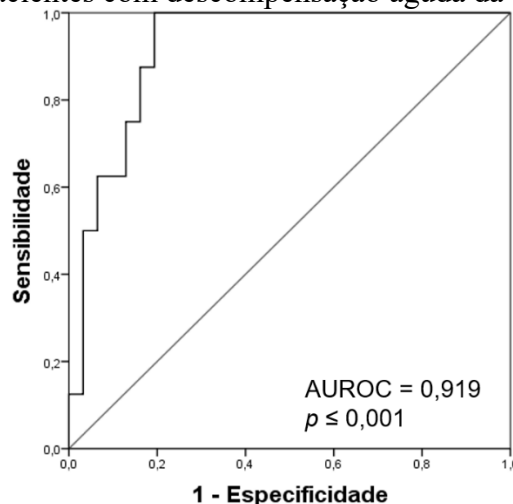
<sup>a</sup> Valores representados como porcentagens considerando as células B como 100%. <sup>b</sup> Valores representados como porcentagens considerando as células dendríticas como 100%. ACLF: insuficiência hepática crônica agudizada; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; BM: B de memória; cDCs: DCs clássicas; DA: descompensação aguda da cirrose; DCs: células dendríticas; DP: desvio padrão; CS: *class-switched*; CS-MB: *class-switched* BM(CD27<sup>+</sup>); CS CD27<sup>neg</sup>: *class-switched* BM (CD27<sup>neg</sup>); CG: centro germinativo; GGT: gama glutamiltransferase; MELD: Model for End-Stage Liver Disease; NS-MB: *Non Switched* BM; PCR: proteína C reativa; pDCs: DCs plasmocitoides; RNI: razão normalizada internacional. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney U e as variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de T de student.

ACLF foi associada às concentrações de creatinina, PCR, ALT, IL-6 e IL-10, à presença de EH, à pontuação de MELD e às porcentagens de neutrófilos, de subtipos B pré-CG, CS e CS CD27<sup>neg</sup>, de DCs e de cDCs. Não houve diferença estatística ao analisar as porcentagens dos subtipos cDCs e pDCs dentro do compartimento de DCs.

Apesar do número pequeno de pacientes que desenvolveram ACLF (n=8), a análise de regressão logística foi realizada e demonstrou que as variáveis PCR, IL-10, CS e CS CD27<sup>neg</sup> foram independentemente associadas à ACLF. Outras variáveis com resultados significativos na análise bivariada, como EH, creatinina e pontuação de MELD, não foram incluídas na análise de regressão logística, pois já pertencem ao escore de CLIF-SOFA ou são intimamente relacionadas à ACLF.

Com destaque nessa análise, as células B CS CD27<sup>neg</sup> foram independentemente associadas à ACLF com *odds ratio* (OR) de 1,935, intervalo de confiança (IC) de 95% de 1,153 – 3,249 e  $p = 0,012$ . A área sob a curva ROC (Figura 48) das CS CD27<sup>neg</sup> para diagnosticar ACLF foi de  $0,919 \pm 0,044$  ( $p \leq 0,001$ , IC 95% 0,834 – 1,000) com o melhor ponto de corte em 4,7%. Nesse ponto de corte, as células B CS CD27<sup>neg</sup> apresentaram sensibilidade de 75%, especificidade de 84%, valor preditivo positivo (VPP) de 54% e valor preditivo negativo (VPN) de 93%.

Figura 48 - Curva ROC das porcentagens de células B CS CD27<sup>neg</sup> para a predição de ACLF entre pacientes com descompensação aguda da cirrose.



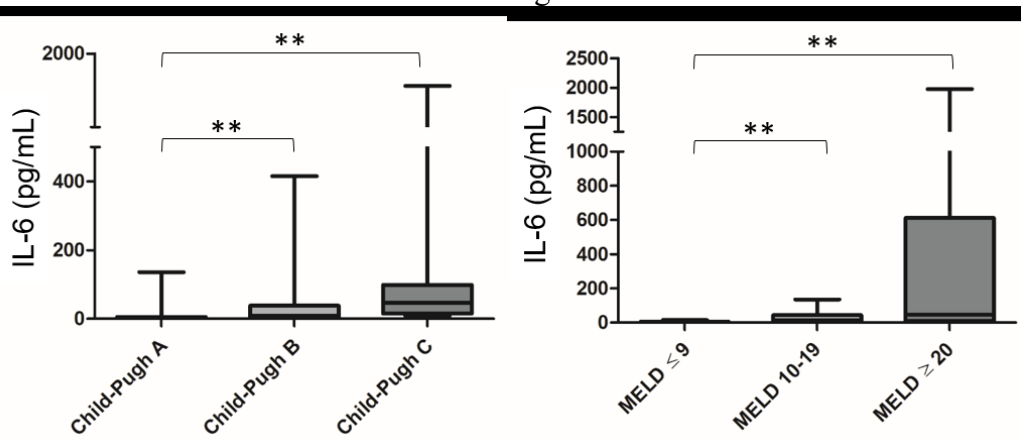
AUROC: área sob a curva característica de operação do receptor.

O diagnóstico rápido de ACLF é de grande relevância clínica, visto que essa síndrome é associada a mau prognóstico e baixo tempo de sobrevida livre de transplante (ARROYO, 2019). Dessa forma, a detecção e quantificação das células B CS CD27<sup>neg</sup> pode representar um biomarcador útil para pacientes hospitalizados com cirrose hepática. Até o momento, esse é o primeiro estudo que investiga a relação desse subtipo celular com ACLF. Fraussen e colaboradores (2019) observaram expansão dessas células B em pacientes com esclerose múltipla, e descobriram que essas células mostravam características pró-inflamatórias. A síndrome ACLF é associada a um estado extremamente inflamatório, o que contribui para a sua patogênese e progressão, assim, sugere-se que as células B CS CD27<sup>neg</sup> com características inflamatórias poderiam estar envolvidas na patogênese da ACLF.

#### 5.2.12.1 Citocinas e características clínicas

A IL-6 apresentou diferenças importantes entre os grupos ao categorizar os pacientes em Child-Pugh A, B e C e valores de MELD  $\leq 9$ , 10-19 e  $\geq 20$ , com concentrações plasmáticas mais elevadas em cirróticos com doença hepática mais avançada (Figura 49).

Figura 49 – Concentrações plasmáticas de IL-6 de pacientes cirróticos de acordo com os escores de Child-Pugh e de MELD.



As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis  $**p \leq 0,01$ . IL: interleucina. MELD: Model for End-Stage Liver Disease.

Os resultados das concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 conforme classificação dos pacientes pelos escores de MELD e de Child-Pugh, pela presença de complicações clínicas (ascite e EH) e pela síndrome ACLF estão demonstrados a seguir (Tabela 16).



Tabela 16 - Concentrações plasmáticas das citocinas IL-6 e IL-10 em pacientes cirróticos classificados de acordo com os escores prognósticos, complicações clínicas e ACLF.

Citocina (pg/mL)	Categorias		
	MELD ≤ 9	MELD 10-19	MELD 20-29
<b>IL-6, mediana (intervalo)</b>	1,68 (0,34-14,29) <b>**##</b>	11,73 (0,48-136,15) <b>**</b>	46,50 (8,39-1.978,06) <b>##</b>
	Child-Pugh A	Child-Pugh B	Child-Pugh C
<b>IL-6, mediana (intervalo)</b>	1,70 (0,34-136,15) <b>**##</b>	8,83 (1,60-415,13) <b>**</b>	45,69 (8,39-1.978,06) <b>##</b>
	Sem ascite	Ascite grau I	Ascite grau II/III
<b>IL-6, mediana (intervalo)</b>	2,78 (0,34-35,98) <b>**##</b>	33,00 (4,36-800,95) <b>**</b>	47,28 (8,39-1.978,06) <b>##</b>
<b>IL-10, mediana (intervalo)</b>	1,85 (0,00-7,46) <b>*</b>	0,94 (0,00-1,80)	0,98 (0,00-24,25) <b>*</b>
	Sem EH	EH grau I	EH grau II/III
<b>IL-6, mediana (intervalo)</b>	4,06 (0,34-800,95) <b>**##</b>	59,11 (4,36-1.978,06) <b>**</b>	15,04 (7,02-415,13) <b>##</b>
<b>IL-10, mediana (intervalo)</b>	0,24 (0,00-7,46) <b>*</b>	0,94 (0,00-24,45)	0,92 (0,03-3,32) <b>*</b>
	Sem ACLF	Com ACLF (grau 1 e 2)	
<b>IL-6 mediana (intervalo)</b>	13,39 (4,06-800,95) <b>*</b>	76,48 (8,64-1.978,06) <b>*</b>	
<b>IL-10 mediana (intervalo)</b>	0,41 (0,00-24,25) <b>**</b>	1,43 (0,51-4,09) <b>**</b>	

As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis ou de Mann-Whitney; \* $p \leq 0,05$ ; **\*\*##**  $p \leq 0,01$ . Na análise de MELD, Child-Pugh, ascite e EH, foram incluídos todos os pacientes cirróticos (n=68). Já na análise de ACLF, foram incluídos apenas os pacientes DA (n=39). EH: encefalopatia hepática; ACLF: insuficiência hepática crônica agudizada; MELD: Model for End-Stage Liver Disease.

O estudo de Fischer e colaboradores (2017) também observou concentrações aumentadas de IL-6 em pacientes com doença hepática mais avançada (Child-Pugh B e C) quando comparados a pacientes classificados como Child-Pugh A. Adicionalmente, esse estudo relatou aumento das citocinas IL-6, IL-10 e IL-17A nos pacientes com ACLF, especialmente naqueles com a presença concomitante de ACLF e infecção. Na síndrome ACLF, é comum ocorrer a chamada tempestade de citocinas; dessa forma, esperava-se registrar aumentos das concentrações tanto de citocinas pró-inflamatórias (IL-6) quanto de anti-inflamatórias (IL-10). Além de IL-6 e IL-10, não houve diferença estatística para os outros tipos de citocinas avaliados no presente estudo ao separar os pacientes com ou sem ACLF.

Ademais, pode-se destacar as elevadas concentrações plasmáticas de IL-6 encontradas em pacientes com ascite grau I e ascite grau II/III ao compará-los a pacientes sem ascite ( $p \leq$

0,01). Esse resultado corrobora dados descritos em um estudo prévio, o qual sugere que a IL-6 apresenta papel importante na formação da ascite (Zhang et al., 2002).

### **5.2.13 Relação das variáveis do sistema imune e mortalidade**

Dez pacientes (25,6% do grupo DA) foram a óbito dentro de um ano após a coleta da amostra. Todos os pacientes que vieram a óbito pertencem ao grupo DA. Cinco pacientes faleceram no período de hospitalização e, desses, quatro haviam sido diagnosticados com ACLF. Três pacientes faleceram dentro de 30 dias, dois entre 30 e 60 dias, um entre 60 e 90 dias, e os quatro restantes, entre 90 e 365 dias. A análise de regressão de Cox univariada foi realizada a fim de investigar fatores associados com a mortalidade. Os subtipos celulares e tempos de sobrevida com os resultados mais interessantes encontrados no presente estudo estão descritos a seguir.

Durante os primeiros 90 dias, seis pacientes foram a óbito (15% do grupo DA). A análise de regressão de Cox univariada foi realizada para investigar os fatores associados com a mortalidade em 90 dias e os resultados de maior destaque estão demonstrados na Tabela 17. Nessa análise, a presença de infecção bacteriana, concentrações de PCR e IL-6, porcentagens de cMo, iMo e TiMas dentro do compartimento monocítico, porcentagem de monócitos CD62L<sup>+</sup>, cDCs e pDCs dentro do compartimento de DCs e a razão pDCs/cDCs foram associados com mortalidade em 90 dias. A análise de regressão de Cox multivariada não foi realizada devido ao baixo número de eventos (seis óbitos).

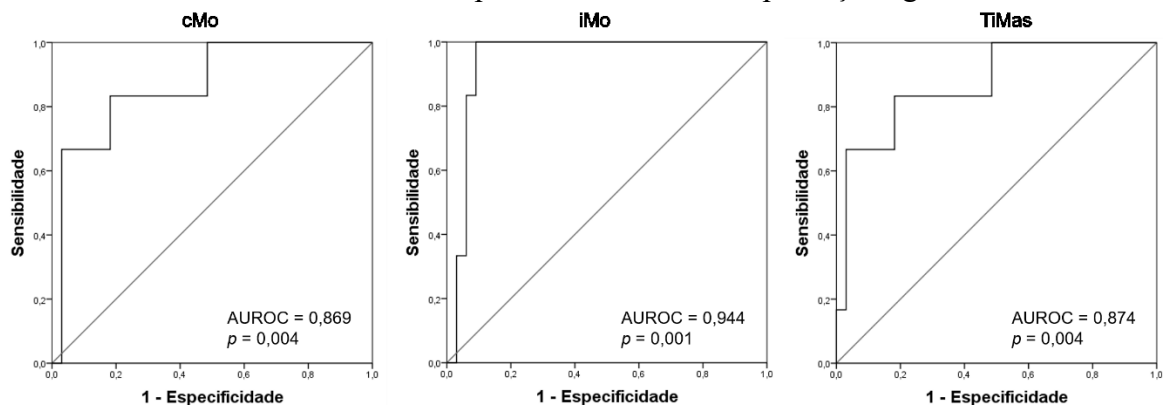
Tabela 17 - Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com descompensação aguda da cirrose de acordo com a sobrevida em 90 dias.

Variável	Sobreviventes (n=33)	Óbitos (n=6)	Análise univariada HR (IC 95%)	p
Idade (anos), média ± DP	54,79 ± 10,96	64,67 ± 12,40	1,086 (0,995 – 1,186)	0,064
Sexo masculino, n (%)	24 (72,7)	3 (50,0)	2,426 (0,489 – 12,022)	0,278
Alcoolismo ativo, n (%)	6 (18,6)	1 (16,7)	1,170 (0,476 – 2,875)	0,732
<b>Complicações clínicas, n (%)</b>				
Ascite	20 (60,6)	6 (100,0)	4,098 (0,390 – 33,161)	0,296
Encefalopatia hepática	15 (45,5)	4 (66,7)	2,260 (0,414 – 12,351)	0,347
Sangramento gastrointestinal	15 (45,5)	2 (33,3)	0,640 (0,117 – 3,493)	0,606
Peritonite bacteriana espontânea	1 (3,0)	3 (50,0)	12,986 (2,515 – 67,038)	<b>0,002</b>
<b>Parâmetros laboratoriais</b>				
Leucócitos/mm <sup>3</sup> , mediana (intervalo)	5.060 (1.010 – 14.510)	8.240 (3.100 – 11.340)	1,189 (0,953 – 1,483)	0,124
<b>Compartimento monocítico</b>				
Monócitos, média ± DP	8,95 ± 3,62	10,30 ± 3,78	1,002 (1,000 – 1,004)	0,052
cMo <sup>a</sup> , média ± DP	84,51 ± 7,70	93,06 ± 4,07	1,254 (1,065 – 1,478)	<b>0,007</b>
iMo <sup>a</sup> , mediana (intervalo)	8,30 (0,29 – 23,45)	4,70 (2,37 – 5,69)	0,683 (0,526 – 0,885)	<b>0,004</b>
ncMo <sup>a</sup> , mediana (intervalo)	3,70 (0,08 – 12,27)	1,36 (0,16 – 8,36)	0,747 (0,494 – 1,130)	0,167
TiMas <sup>a</sup> , mediana (intervalo)	14,08 (3,59 – 32,34)	6,28 (2,53 – 14,06)	0,698 (0,537 – 0,906)	<b>0,007</b>
CD62L <sup>+</sup> , mediana (intervalo)	84,20 (28,97 – 97,40)	61,81 (28,49 – 96,00)	0,959 (0,926 – 0,994)	<b>0,021</b>
<b>Compartimento DCs</b>				
DCs, mediana (intervalo)	0,17 (0,00 – 0,62)	0,08 (0,03 – 0,29)	0,000 (0,000 – 7,566)	0,120
cDCs <sup>b</sup> , média ± DP	59,72 ± 13,25	47,64 ± 16,84	0,929 (0,864 – 1,000)	<b>0,049</b>
pDCs <sup>b</sup> , média ± DP	40,26 ± 13,25	52,36 ± 16,84	1,076 (1,000 – 1,158)	<b>0,049</b>
Razão pDCs/cDCs, mediana (intervalo)	0,81 (0,18 – 1,45)	1,05 (0,37 – 3,18)	3,842 (1,444 – 10,221)	<b>0,007</b>
Razão N/L, mediana (intervalo)	4,61 (2,07 – 30,84)	13,88 (6,82 – 30,87)	1,110 (1,034 – 1,191)	<b>0,004</b>
Sódio (mEq/L), média ± DP	137,06 ± 4,75	134,33 ± 7,66	0,919 (0,787 – 1,074)	0,288
Creatinina (mg/dL), mediana (intervalo)	1,11 (0,55 – 6,19)	1,28 (0,94 – 2,48)	1,037 (0,483 – 2,224)	0,926
RNI, mediana (intervalo)	1,51 ± 0,29	1,74 ± 0,52	5,348 (0,677 – 42,215)	0,112
Albumina (g/dL), média ± DP	2,90 ± 0,65	2,75 ± 0,91	0,743 (0,217 – 2,544)	0,637
PCR (mg/L), mediana (intervalo)	14,90 (3,20 – 172,90)	88,30 (21,20 – 158,00)	1,016 (1,004 – 1,028)	<b>0,011</b>
Bilirrubina total (mg/dL), mediana (intervalo)	2,10 (0,20 – 8,60)	1,85 (0,60 – 8,90)	1,240 (0,911 – 1,686)	0,171
IL-6 (pg/mL), mediana (intervalo)	13,39 (4,06 – 415,13)	264,37 (48,06 – 1,978,06)	1,015 (1,005 – 1,025)	<b>0,004</b>
Child-Pugh C, n (%)	5 (15,2)	3 (50,0)	4,275 (0,858 – 21,197)	0,076

<sup>a</sup> Valores representados como porcentagens considerando os monócitos como 100%. <sup>b</sup> Valores representados como porcentagens considerando as células dendríticas como 100%. cDCs: DCs clássicas; DCs: células dendríticas; DP: desvio padrão; HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confiança; IL: interleucina; cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos; Razão N/L: razão neutrófilos/linfócitos; TiMas: macrófagos tissulares (iMo + ncMo); PCR: proteína C reativa; pDCs: DCs plasmocitoides; RNI: razão normalizada internacional.

A área sob a curva ROC para a porcentagem de cMo (dentro do compartimento monocítico) para prever a mortalidade dos pacientes DA em 90 dias foi de  $0,869 \pm 0,078$  ( $p = 0,004$ , IC 95%  $0,716 - 1,000$ ), com o melhor ponto de corte em 90%. Nesse ponto de corte, as porcentagens de cMo mostraram uma sensibilidade de 83,3%, especificidade de 75,8%, VPP de 38,5% e VPN de 96,2% para prever mortalidade em 90 dias. A área sob a curva ROC para a porcentagem de iMo (dentro do compartimento monocítico) para prever a mortalidade dos pacientes DA em 90 dias foi de  $0,944 \pm 0,037$  ( $p = 0,001$ , IC 95%  $0,872 - 1,000$ ) com o melhor ponto de corte em 5,7%. Nesse ponto de corte, as porcentagens de iMo demonstraram uma sensibilidade de 100%, especificidade de 87,9%, VPP de 60,0% e VPN de 100%. A área sob a curva ROC para a porcentagem de TiMas (dentro do compartimento monocítico) para prever a mortalidade dos pacientes DA em 90 dias foi de  $0,874 \pm 0,078$  ( $p = 0,004$ , IC 95%  $0,721 - 1,000$ ) com o melhor ponto de corte em 8,6%. Nesse ponto de corte, as porcentagens de TiMas demonstraram uma sensibilidade de 83,3%, especificidade de 81,8%, VPP de 45,5% e VPN de 96,4% (Figura 50).

Figura 50 - Curvas ROC das porcentagens dos subtipos de monócitos para a predição de mortalidade em 90 dias entre pacientes com descompensação aguda da cirrose.



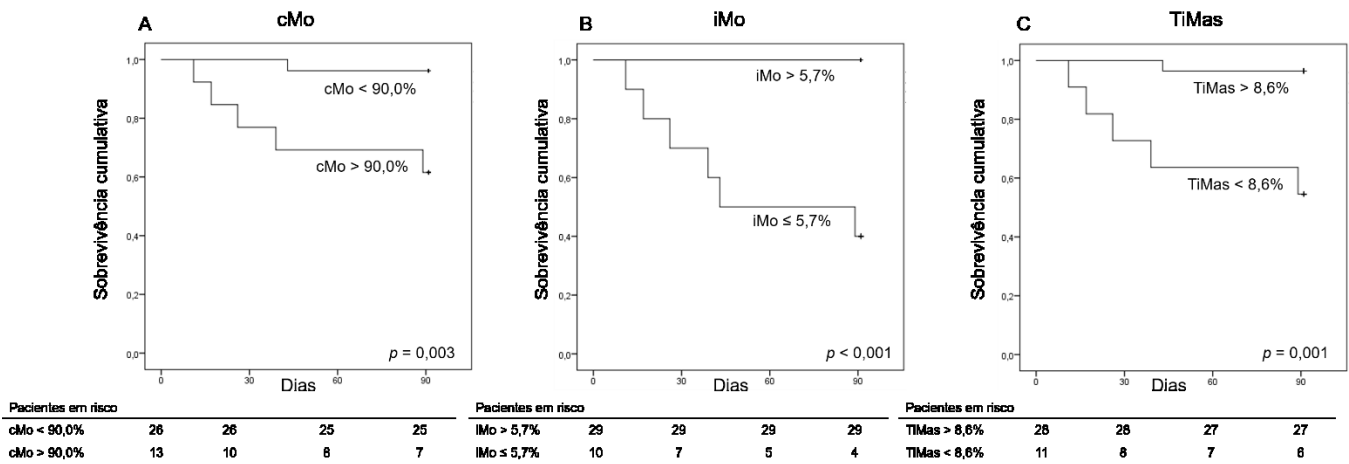
AUROC: área sob a curva característica de operação do receptor; cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; TiMas: macrófagos tissulares.

A área sob a curva ROC para os monócitos CD62L<sup>+</sup> e para a razão pDCs/cDCs não apresentou resultados significativos.

A partir dos melhores pontos de corte escolhidos pela análise das curvas ROC, a figura 50 mostra as curvas de Kaplan-Meier de mortalidade em 90 dias com as porcentagens de cMo, iMo e TiMas categorizadas. De acordo com essa análise, a probabilidade de sobrevivência de

Kaplan-Meier foi de 96,2% para pacientes com porcentagens de cMo menores que 90% e de 61,5% para aqueles com porcentagens de cMo maiores que 90% ( $p = 0,003$ ) (Figura 51A). A probabilidade de sobrevivência foi de 100% para pacientes com porcentagens de iMo maiores que 5,7% e de 60% para aqueles com porcentagens de iMo menores ou iguais a 5,7% ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 51B). A probabilidade de sobrevivência foi de 96,4% para pacientes com porcentagens de TiMas maiores que 8,6% e de 54,5% para aqueles com porcentagens de TiMas menores que 8,6% ( $p = 0,001$ ) (Figura 51C).

Figura 51 - Sobrevivência cumulativa em 90 dias de pacientes hospitalizados por descompensação aguda da cirrose de acordo com os subtipos de monócitos.



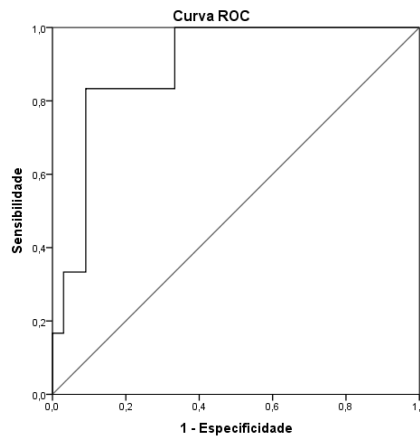
A probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier foi de 96,2% para pacientes com porcentagens de cMo menores que 90% e de 61,5% para aqueles com porcentagens de cMo maiores que 90% ( $p = 0,003$ ) (A), 100% para pacientes com porcentagens de iMo maiores que 5,7% e de 60% para aqueles com porcentagens de iMo menores ou iguais a 5,7% ( $p < 0,001$ ) (B), de 96,4% para pacientes com porcentagens de TiMas maiores que 8,6% e de 54,5% para aqueles com porcentagens de TiMas menores que 8,6% ( $p = 0,001$ ) (C).

No presente estudo, observou-se constantemente o aumento das porcentagens de cMo e a redução de TiMas nos pacientes com cirrose avançada. Adicionalmente, foi visto que baixas frequências de iMo e de TiMas e altas frequências de cMo, dentro do compartimento monocítico, foram associadas com a mortalidade em 90 dias. Esses achados podem indicar que a DIAC presente nos estágios terminais da cirrose hepática, quando o sistema imune entra em colapso, é marcada pelo desaparecimento dos monócitos não-clássicos da circulação sanguínea. Esses resultados inéditos podem representar biomarcadores de grande utilidade na prática clínica.

Como citado anteriormente na Seção Celularidade total, Deng et al. (2019) descreveram que a razão N/L maior que 8,9 foi associada a alto risco de mortalidade dentro de 90 dias.

Assim, no presente estudo também foi avaliada a associação da razão N/L e a mortalidade em 90 dias. A área sob a curva ROC para a razão N/L para prever a mortalidade dos pacientes DA em 90 dias foi de  $0,894 \pm 0,059$  ( $p = 0,002$ , IC 95% 0,779 – 1,000) com o melhor ponto de corte em 8,0% (Figura 52).

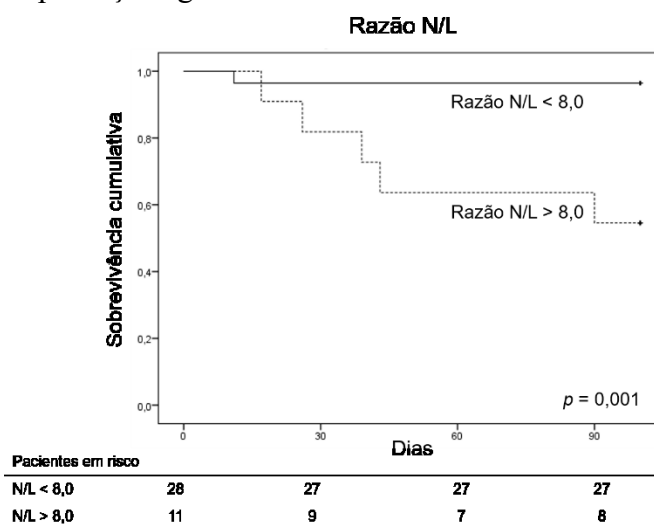
Figura 52 - Curva ROC da razão N/L para a predição de mortalidade em 90 dias entre pacientes com descompensação aguda da cirrose.



AUROC: área sob a curva característica de operação do receptor; N/L: razão neutrófilos/linfócitos.

A partir do ponto de corte de 8,0 escolhido pela análise da curva ROC, a Figura 53 mostra a curva Kaplan-Meier de mortalidade em 90 dias com a razão N/L categorizada. De acordo com essa análise, a probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier foi de 96,4% para pacientes com razão N/L menores que 8,0 e de 54,4% para aqueles com razão N/L maiores que 8,0 ( $p = 0,001$ ). Nesse ponto de corte, a razão N/L demonstrou uma sensibilidade de 83,3%, especificidade de 81,8%, VPP de 45,5% e VPN de 96,4%.

Figura 53 - Sobrevivência cumulativa em 90 dias de pacientes hospitalizados por descompensação aguda da cirrose de acordo com a razão N/L.



A probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier foi de 96,4% para pacientes com a razão N/L maior que 8,0 (traçado contínuo) e de 54,4% para aqueles com a razão N/L menor que 8,0 (traçado tracejado) ( $p = 0,001$ ).

Dessa forma, os resultados encontrados no presente estudo corroboram os observados no trabalho de Deng e colaboradores (2019). Esse estudo avaliou 589 pacientes cirróticos entre os anos de 2015 e 2018 e descreveu que a razão N/L maior que 8,9 foi associada à mortalidade em 90 dias, independente de sexo, idade, exames de coagulação ou pontuação de MELD. Os autores utilizaram o equipamento Sysmex XE-2100 para obter os valores absolutos de neutrófilos e linfócitos, e posteriormente dividi-los a fim de obter a razão N/L (DENG et al., 2019). Assim, a razão N/L é uma variável de fácil acesso que identifica pacientes com cirrose hepática com risco de mortalidade em 90 dias, e que poderia ser adicionada à avaliação prognóstica sem custos adicionais.

Em seguida, a análise de regressão de Cox univariada foi realizada para investigar os fatores associados com a mortalidade em 365 dias e os resultados com maior destaque estão demonstrados na Tabela 18. Nessa análise, as variáveis idade, presença de infecção bacteriana, sódio, PCR, RNI, IL-6, porcentagens de células B pré-CG, transicionais, BN, CS e plasmablastos foram associados à mortalidade em 365 dias.

Tabela 18 - Parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com descompensação aguda da cirrose de acordo com a sobrevida em 365 dias.

Variável	Sobreviventes (n=29)	Óbitos (n=10)	Análise univariada HR (IC 95%)	p
Idade (anos), média ± DP	53,38 ± 10,64	54,80 ± 10,35	1,095 (1,022 – 1,174)	<b>0,010</b>
Sexo masculino, n (%)	21 (72,4)	6 (60,0)	1,635 (0,461 – 5,798)	0,446
Alcoolismo ativo, n (%)	19 (62,1)	6 (60,0)	1,090 (0,546 – 2,175)	0,807
<b>Complicações clínicas, n (%)</b>				
Ascite	17 (58,6)	9 (90,0)	5,364 (0,679 – 42,401)	0,111
Encefalopatia hepática	13 (44,8)	6 (60,0)	1,698 (0,479 – 6,020)	0,412
Sangramento gastrointestinal	15 (51,7)	2 (20,0)	0,300 (0,064 – 1,415)	0,128
Peritonite bacteriana espontânea	1 (3,4)	3 (30,0)	7,418 (1,836 – 29,970)	<b>0,005</b>
<b>Parâmetros laboratoriais</b>				
Leucócitos/mm <sup>3</sup> , mediana (intervalo)	5.060 (1.010 – 14.510)	6.260 (3.100 – 11.340)	1,094 (0,910 – 1,316)	0,338
Linfócitos/mm <sup>3</sup> , mediana (intervalo)	837 (210 – 2,250)	994 (161 – 1,988)	0,759 (0,207 – 2,791)	0,679
<b>Compartimento B <sup>a</sup></b>				
Pré-CG, mediana (intervalo)	77,91 (44,58 – 93,72)	56,57 (12,44 – 94,71)	0,967 (0,942-0,992)	<b>0,010</b>
Transicional, mediana (intervalo)	5,72 (0,07-13,97)	0,44 (0,05-5,92)	0,609 (0,409-0,907)	<b>0,015</b>
Naive, mediana (intervalo)	71,23 (37,95 – 87,63)	53,50 (12,31 – 94,25)	0,971 (0,943-0,999)	<b>0,040</b>
NS-BM, mediana (intervalo)	4,78 (0,23-26,99)	7,78 (1,52-57,96)	1,021 (0,979-1,064)	0,384
CS, mediana (intervalo)	11,29 (4,30-48,14)	23,48 (2,81-70,51)	1,038 (1,001-1,077)	<b>0,043</b>
CS-BM, mediana (intervalo)	10,14 (2,59-39,61)	16,32 (2,16-64,15)	1,040 (0,999-1,083)	0,058
CS CD27 <sup>neg</sup> , mediana (intervalo)	2,13 (0,12-9,83)	4,35 (0,57-11,77)	1,174 (0,969-1,423)	0,102
Plasmablastos, mediana (intervalo)	2,50 (0,41-17,10)	7,48 (0,32-27,53)	1,156 (1,059-1,262)	<b>0,001</b>
Sódio (mEq/L), média ± DP	137,7 ± 4,6	133,7 ± 6,2	0,881 (0,777 – 0,999)	<b>0,048</b>
Creatinina (mg/dL), mediana (intervalo)	1,09 (0,55 – 3,34)	1,34 (0,94 – 6,19)	1,377 (0,943 – 2,009)	0,097
RNI, mediana (intervalo)	1,40 (1,04 – 2,04)	1,53 (1,23 – 2,58)	6,352 (1,130 – 35,720)	<b>0,036</b>
Albumina (g/dL), média ± DP	2,87 ± 0,66	2,90 ± 0,77	1,055 (0,411 – 2,709)	0,911
PCR (mg/L), mediana (intervalo)	12,70 (3,20 – 172,90)	54,05 (4,60 – 158,00)	1,011 (1,001 – 1,021)	<b>0,033</b>
Bilirrubina total (mg/dL), mediana (intervalo)	2,20 (0,20 – 8,60)	1,45 (0,30 – 8,90)	1,047 (0,750 – 1,462)	0,788
IL-6 (pg/mL), mediana (intervalo)	13,39 (4,36 – 415,13)	84,60 (4,06 – 1.978,06)	1,001 (1,000 – 1,002)	<b>0,004</b>
IL-10 (pg/mL), mediana (intervalo)	0,41 (0,00 – 24,25)	1,05 (0,00 – 4,09)	0,999 (0,855 – 1,166)	0,988
ACLF, n (%)	4 (13,8)	4 (40,0)	3,176 (0,891 – 11,320)	0,075
MELD, mediana (intervalo)	15 (8 – 24)	17 (11 – 29)	1,137 (0,995 – 1,299)	0,060
Child-Pugh C, n (%)	10 (34,5)	6 (60,0)	2,664 (0,750 – 9,457)	0,130

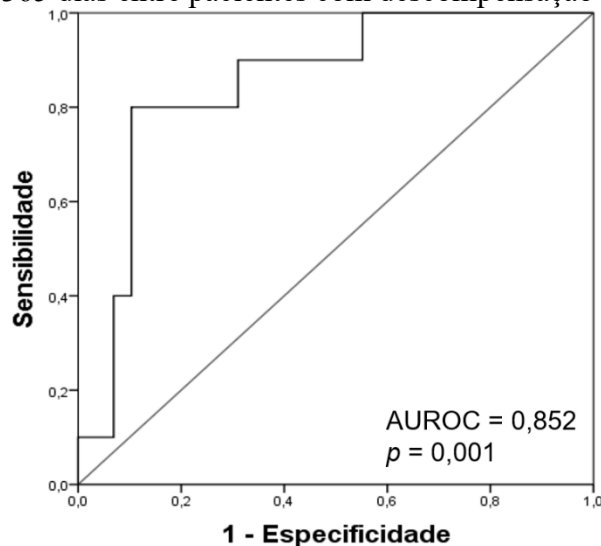
<sup>a</sup> Valores representados como porcentagens considerando as células B como 100. ACLF: insuficiência hepática crônica agudizada; BM: B de memória; CS: *class-switched*; CS-MB: *class-switched* BM(CD27<sup>+</sup>); CS CD27<sup>neg</sup>: *class-switched* BM (CD27<sup>neg</sup>); CG: centro germinativo; DP: desvio padrão; HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confiança; IL: interleucina; MELD: Model for End-Stage Liver Disease; NS-MB: *Non Switched* BM; PCR: proteína C reativa; RNI: razão normalizada internacional.



A análise de regressão de Cox multivariada foi realizada para obter um número aceitável de eventos por variável. Na análise multivariada, apenas as células B transicionais (HR = 0,633, IC 95% 0,430 – 0,932,  $p = 0,021$ ) e os plasmablastos (HR = 1,128, IC 95% 1,021 – 1,246,  $p = 0,018$ ) foram independentemente associados à mortalidade em 365 dias.

A área sob a curva ROC (Figura 54) para a porcentagem de células B transicionais (dentro do compartimento de células B) para prever a mortalidade dos pacientes DA em 365 dias foi de  $0,852 \pm 0,067$  ( $p = 0,001$ , IC 95% 0,720 – 0,983) com o melhor ponto de corte em 1,3%. Nesse ponto de corte, as porcentagens de células transicionais mostraram uma sensibilidade de 80%, especificidade de 90%, VPP de 73% e VPN de 93%. As áreas sob a curva ROC dos outros subtipos de células B não apresentaram resultados significativos.

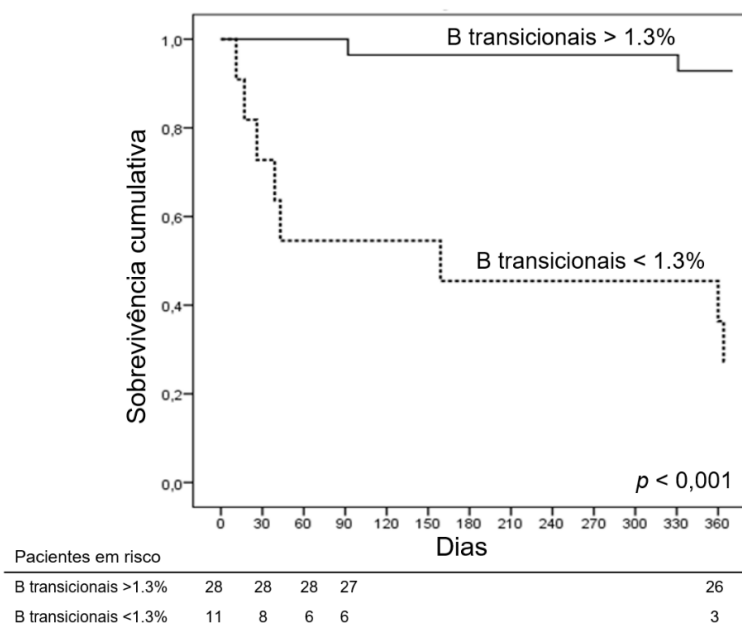
Figura 54 - Curva ROC das porcentagens das células B transicionais para a predição de mortalidade em 365 dias entre pacientes com descompensação aguda da cirrose.



AUROC: área sob a curva característica de operação do receptor.

Em seguida, a Figura 55 mostra a curva Kaplan-Meier de mortalidade em 365 dias com as porcentagens de células B transicionais categorizadas no ponto de corte de 1,3%, selecionado a partir da curva ROC. De acordo com essa análise, a probabilidade de sobrevivência foi de 92,9% para pacientes com porcentagens maiores que 1,3% e de 27,3% para aqueles com porcentagens menores que 1,3% ( $p < 0,001$ ).

Figura 55 - Sobrevivência cumulativa em 365 dias de pacientes hospitalizados por descompensação aguda da cirrose de acordo com as células B transicionais.



A probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier foi de 92,9% para pacientes com porcentagens de células B transicionais maiores que 1,3% (traçado contínuo) e de 27,3% para aqueles com porcentagens menores que 1,3% (traçado tracejado) ( $p < 0,001$ ).

Estudos observaram que em determinadas imunodeficiências pode ocorrer expansão das células B transicionais, como nas deficiências de BAFF e de PI3K8, em que há bloqueio do desenvolvimento das células B (CUSS et al., 2006; SALZER; SACK; FUCHS, 2019). Por outro lado, na deficiência de GATA2, existe uma diminuição das quantidades de células B transicionais e naïve circulantes, resultado de um defeito na produção das células B (SALZER; SACK; FUCHS, 2019). No presente estudo, foram encontradas reduções significativas das porcentagens do compartimento de células B transicionais em pacientes cirróticos que foram a óbito em um ano, o qual é um resultado ainda não descrito na literatura. Essa redução marcante pode refletir um defeito na produção de células B na MO desses pacientes, já que há relatos de anormalidades na hematopoese de pacientes com cirrose avançada (BIHARI et al., 2016).

O presente estudo apresenta as seguintes limitações: 1) O número de pacientes com cirrose descompensada, pois ao agrupar os pacientes de acordo com as variáveis clínicas, os grupos formados apresentam poucos pacientes; 2) A aplicação do painel completo e da avaliação das citocinas por CF possui diversas vantagens, porém tem alto custo; 3) Não é possível discriminar as células B transicionais das B reg pelos marcadores do Tubo 5. 4) Os

valores absolutos do presente estudo podem apresentar vieses, pois eles foram obtidos por plataforma dupla, com a utilização de dois equipamentos, e o conteúdo dos tubos passou por uma lavagem final com PBS, que aumenta a perda celular.



## 6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- ✓ O painel de anticorpos desenvolvido e validado para a realização de imunofenotipagem por CF foi uma ferramenta útil para a identificação das células do sistema imune circulantes. O painel pode ser aplicado na íntegra ou parcialmente em estudos futuros para detectar alterações sistêmicas associadas à inflamação e à imunodeficiência;
- ✓ As células circulantes e citocinas de pacientes com cirrose hepática estão alteradas quando comparados a indivíduos saudáveis, principalmente em pacientes com a doença mais avançada. Essas alterações foram mais evidentes nas células T CD8<sup>+</sup> EMRA, T reg de memória, células B, DCs, neutrófilos e monócitos, e nas concentrações de IL-6 e IL-10;
- ✓ Ao analisar os pacientes com complicações clínicas, como ascite e EH, observou-se que, apesar de apresentarem alguns aspectos de imunodeficiência (tais como aumento de T reg de memória, diminuição de NK e de DCs), esses pacientes apresentam um perfil de células B diferente do que usualmente se encontra em estados imunodeficientes: aumento de células BM e de plasmablastos;
- ✓ O presente estudo também demonstrou alguns achados inéditos. A associação do aumento de células B CS CD27<sup>neg</sup> com ACLF. A associação entre o aumento de cMo e a diminuição de iMo e TiMas e a mortalidade em 90 dias, e entre a diminuição de células B transitórias e a mortalidade em 365 dias. Pontos de cortes foram estabelecidos e podem ser úteis na prática clínica. Além disso, o estudo confirmou a associação da razão N/L com a mortalidade em 90 dias, com um ponto de corte muito próximo do descrito na literatura.

A análise e quantificação das células do sistema imune circulantes pelo painel proposto, em especial do compartimento de células B e monocítico, mostrou ser de grande valor e pode complementar a avaliação de biomarcadores já estabelecidos. Assim como a razão N/L, a avaliação dos subtipos de monócitos parece predizer a mortalidade em 90 dias. Porém, além

disso, fornece informações adicionais sobre o sistema imune do paciente, tais como: o recrutamento e a expressão de HLA-DR em monócitos.

Pode-se constatar que a DIAC tem papel crucial nas principais manifestações clínicas da cirrose e na descompensação da doença hepática, e que pode se tornar um potencial alvo terapêutico. Ao traçar o perfil imunológico dos pacientes com cirrose hepática pode-se fornecer informações importantes para estimar o risco de complicações clínicas graves e auxiliar a tomada de decisões terapêuticas ou profiláticas personalizadas. Além disso, no âmbito do futuro uso de imunoterapias para estimular o sistema imunológico de pacientes em estágio de imunodeficiência, a avaliação do perfil imune dos pacientes com cirrose fornece informações importantes sobre a resposta terapêutica, como o restabelecimento das quantidades de DCs, de TiMas e de linfócitos T circulantes.

## 7 PERSPECTIVAS

O presente estudo sugere como perspectivas a avaliação de parâmetros adicionais que poderiam somar informações importantes sobre o sistema imune de pacientes com cirrose hepática, utilizando o material biológico armazenado em freezer -80°C. Dessa forma, propõem-se:

- Avaliar as concentrações plasmáticas das imunoglobulinas IgM, IgG e IgA;
- Avaliar as concentrações do metabólito nitrito/nitrato (NOx) e a atividade de mieloperoxidase (MPO) plasmáticos;
- Avaliar as concentrações de outras citocinas plasmáticas importantes, como a IL-12 e TGF- $\beta$ .
- Realizar a dosagem de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1).





## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, R. S.; AUBERT, G. Flow Cytometry, a Versatile Tool for Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiencies. **Clin Vaccine Immunol**, v. 23, n. 4, p. 254-271, abr. 2016.
- AHLERS, J. D.; BELYAKOV, I. M. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. **Blood**, v. 115, n. 9, p. 1678-1689, mar. 2010.
- AKOGLU, H. User's guide to correlation coefficients. **Turk J Emerg Med**, v. 18, n. 3, p. 91-93, set. 2018.
- ALBILLOS, A.; HERA AD, A. E. L.; REYES, E.; MONSERRAT, J. et al. Tumour necrosis factor-alpha expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. **J Hepatol**, v. 40, n. 4, p. 624-631, abr. 2004.
- ALBILLOS, A.; LARIO, M.; ÁLVAREZ-MON, M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. **J Hepatol**, v. 61, n. 6, p. 1385-1396, dez. 2014.
- AMARAL, A. E. **MicroRNAs circulantes em doenças hepáticas não tumorais: possíveis biomarcadores para diagnóstico e prognóstico**. 2018. 132f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2018.
- AMARAL, A. E. D.; RODE, M. P.; CISILOTTO, J.; SILVA, T. E. D. et al. MicroRNA profiles in serum samples from patients with stable cirrhosis and miRNA-21 as a predictor of transplant-free survival. **Pharmacol Res**, v. 134, p. 179-192, ago. 2018.
- ANGELI, P.; BERNARDI, M.; VILLANUEVA, C.; FRANCOZ, C. et al. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. **J Hepatol**, v. 69, n. 2, p. 406-460, ago. 2018.
- ANTONIADES, C. G.; WENDON, J.; VERGANI, D. Paralyzed monocytes in acute on chronic liver disease. **J Hepatol**, v. 42, n. 2, p. 163-165, fev. 2005.
- ANTHONY, P. P.; ISHAK, K. G.; NAYAK, N. C.; POULSEN, H. E. et al. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. **J Clin Pathol**, v. 31, n. 5, p. 395-414, mai. 1978.
- ARROYO, V. Acute-on-Chronic Liver Failure in Cirrhosis Requires Expedited Decisions for Liver Transplantation. **Gastroenterology**, v. 156, n. 5, p. 1248-1249, abr. 2019.
- ARROYO, V.; MOREAU, R.; KAMATH, P. S.; JALAN, R. et al. Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16041, jun. 2016.

- ASRANI, S. K.; DEVARBHAVI, H.; EATON, J.; KAMATH, P. S. Burden of liver diseases in the world. **J Hepatol**, v. 70, n. 1, p. 151-171, jan. 2019.
- ASRANI, S. K.; KAMATH, P. S. Natural history of cirrhosis. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 15, n. 2, p. 308, fev. 2013.
- BAJAJ, J. S. Review article: the modern management of hepatic encephalopathy. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 31, n. 5, p. 537-547, mar. 2010.
- BAJAJ, J. S. Liver capsule: Hepatic encephalopathy. **Hepatology**, v. 62, n. 3, p. 955, set. 2015.
- BAJAJ, J. S. Hepatic encephalopathy: classification and treatment. **J Hepatol**, v. 68, n. 4, p. 838-839, abr. 2018.
- BAJAJ, J. S. Altered Microbiota in Cirrhosis and Its Relationship to the Development of Infection. **Clin Liver Dis (Hoboken)**, v. 14, n. 3, p. 107-111, set. 2019.
- BAMBHA, K.; KIM, W. R.; PEDERSEN, R.; BIDA, J. P.; KREMERS, W. K.; KAMATH, P. S. Predictors of early rebleeding and mortality after acute variceal hemorrhage in patients with cirrhosis. **Gut**, v. 27, p. 814-820, fev. 2008.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **J Clin Invest**, v. 115, n. 2, p. 209-218, fev. 2005.
- BAUMGARTH, N.; ROEDERER, M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. **J Immunol Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 77-97, set. 2000.
- BERKOWSKA, M. A.; DRIESSEN, G. J.; BIKOS, V.; GROSSERICHTER-WAGENER, C. et al. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2150-2158, ago. 2011.
- BERNARD, A.; LAMY AND, L.; ALBERTI, I. The two-signal model of T-cell activation after 30 years. **Transplantation**, v. 73, n. 1 Suppl, p. S31-35, jan. 2002.
- BERNARDI, M.; CARACENI, P. Novel perspectives in the management of decompensated cirrhosis. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 12, p. 753-764, dez. 2018.
- BERRES, M. L.; SCHNYDER, B.; YAGMUR, E.; INGLIS, B. et al. Longitudinal monocyte human leukocyte antigen-DR expression is a prognostic marker in critically ill patients with decompensated liver cirrhosis. **Liver Int**, v. 29, n. 4, p. 536-543, abr. 2009.
- BERTOLETTI, A. T cell fitness in the liver: How can T cells keep it up? **J Hepatol**, v. 64, n. 6, p. 1208-1210, jun. 2016.

BHATTACHARYA, C.; DAS-MONDAL, M.; GUPTA, D.; SARKAR, A. K. et al. Infection in cirrhosis: A prospective study. **Ann Hepatol**, v. 18, p. 862-868, set. 2019.

BIGGINS, S. W.; KIM, W. R.; TERRAULT, N. A.; SAAB, S. et al. Evidence-based incorporation of serum sodium concentration into MELD. **Gastroenterology**, v. 130, n. 6, p. 1652-1660, mai. 2006.

BIHARI, C.; ANAND, L.; ROOGE, S.; KUMAR, D., et al. Bone marrow stem cells and their niche components are adversely affected in advanced cirrhosis of the liver. **Hepatology**, v. 64, n. 4, p. 1273-1288, 10 2016.

BITTENCOURT, P. L.; ZOLLINGER, C. C.; LOPES, E. P. D. A. **Manual de Cuidados Intensivos em Hepatologia**. 2.ed. Barueri: Manole Ltda., 2017.

BLACHIER, M.; LELEU, H.; PECK-RADOSAVLJEVIC, M.; VALLA, D. C., et al. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. **J Hepatol**, v. 58, n. 3, p. 593-608, mar. 2013.

BLAIR, P. A., NOREÑA, L. Y.; FLORES-BORJA, F.; RAWLINGS, D. J.; ISENBERG, D. A.; David A.; EHRENSTEIN, M. R.; MAURI, C. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. **Immunity**, v. 32, n. 1, p. 129-140, jan. 2010.

BLANCO, E.; PÉREZ-ANDRÉS, M.; ARRIBA-MÉNDEZ, S.; CONTRERAS-SANFELICIANO, T., et al. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. **J Allergy Clin Immunol**, v. 141, n. 6, p. 2208-2219, jun. 2018.

BLATT, C. **Um Olhar sobre a efetividade e custos do tratamento da hepatite C sob a perspectiva do Sistema Único de Saúde**. 2011. 190f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2011.

BOSCH, F. X.; RIBES, J.; DÍAZ, M.; CLÉRIES, R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5 Suppl 1, p. S5-S16, nov. 2004.

BRODIN, P.; DAVIS, M. M. Human immune system variation. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 1, p. 21-29, jan. 2017.

BUREL, J. G.; QIAN, Y.; LINDESTAM ARLEHAMN, C.; WEISKOPF, D., et al. An Integrated Workflow To Assess Technical and Biological Variability of Cell Population Frequencies in Human Peripheral Blood by Flow Cytometry. **J Immunol**, v. 198, n. 4, p. 1748-1758, fev. 2017.

CAI, Y. J.; DONG, J. J.; DONG, J. Z.; YANG, N. B., et al. Neutrophil-lymphocyte ratio predicts hospital-acquired bacterial infections in decompensated cirrhosis. **Clin Chim Acta**, v. 469, p. 201-207, jun. 2017.

CALDERARO, J.; ROUSSEAU, B.; AMADDEO, G., MERCEY, M. et al. PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma: relationship with clinical and pathological features. **Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 2038-2046, ago. 2016.

CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 461-469, ago. 2008.

CARDOSO, C. C.; SANTOS-SILVA, M. C. Eight-color panel for immune phenotype monitoring by flow cytometry. **J Immunol Meth**, v. 468, p. 40-48, mar. 2019.

CARR, E. J.; DOOLEY, J.; GARCIA-PEREZ, J. E.; LAGOU, V., et al. The cellular composition of the human immune system is shaped by age and cohabitation. **Nat Immunol**, v. 17, n. 4, p. 461-468, abr. 2016.

CASTELO, A., PESSOA, M. G.; BARRETO, T. C. B. B.; ALVES M. R. D.; ARAÚJO, D. V. Estimativas de custo da hepatite crônica B no sistema único de saúde Brasileiro em 2005. **Rev Assoc Med Bras**, v. 53, n. 6, p. 6, 2007.

CHERIAN, S.; LEVIN, G.; LO, W. Y.; MAUCK, M., et al. Evaluation of an 8-color flow cytometric reference method for white blood cell differential enumeration. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 78, n. 5, p. 319-328, set. 2010.

CHILD, C. G.; TURCOTTE, J. G. Surgery and portal hypertension. **Major Probl Clin Surg**, v. 1, p. 1-85, 1964.

CLARK, G. J.; SILVEIRA, P. A.; HOGARTH, P. M.; HART, D. N. J. The cell surface phenotype of human dendritic cells. **Semin Cell Dev Biol**, v. 85, p. 3-14, mar 2018.

COOK, R. T.; WALDSCHMIDT, T. J.; COOK, B. L.; LABRECQUE, D. R., et al. Loss of the CD5<sup>+</sup> and CD45RAhi B cell subsets in alcoholics. **Clin Exp Immunol**, v. 103, n. 2, p. 304-310, fev. 1996.

COSSARIZZA, A.; CHANG, H. D.; RADBRUCH, A.; ACS, A. et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). **Eur J Immunol**, v. 49, n. 10, p. 1457-1973, out. 2019.

CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3941-3967, abr. 2008.

CRUVINEL, W.; MESQUITA, D.; ARAÚJO, J.; CATELAN, T., et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 27, 2010.

CUSS, A. K.; AVERY, D. T.; CANNONS, J. L.; YU, L. et al. Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. **J Immunol**, v. 176, n. 3, p. 1506-1516, fev. 2006.

D'AMICO, G.; GARCIA-TSAO, G.; PAGLIARO, L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. **J Hepatol**, v. 44, n. 1, p. 217-231, jan. 2006.

D'AMICO, G.; MORABITO, A.; D'AMICO, M.; PASTA, L., et al. New concepts on the clinical course and stratification of compensated and decompensated cirrhosis. **Hepatol Int**, v. 12, n. Suppl 1, p. 34-43, fev. 2018.

D'AMICO, G.; DE FRANCHIS, R.; GROUP, C. S. Upper digestive bleeding in cirrhosis. Post-therapeutic outcome and prognostic indicators. **Hepatology**, v. 38, n. 3, p. 599-612, set. 2003.

DA SILVA, T. **Significado prognóstico de níveis circulantes de adipocinas e de parâmetros metabólicos na cirrose**. 2018. 311f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2018.

DA SILVA, T. E.; COSTA-SILVA, M.; CORREA, C. G.; DENARDIN, G., et al. Clinical Significance of Serum Adiponectin and Resistin Levels in Liver Cirrhosis. **Ann Hepatol**, v. 17, n. 2, p. 286-299, mar 2018.

DAMASCENO, D.; TEODOSIO, C.; VAN DEN BOSSCHE, W. B. L.; PEREZ-ANDRES, M., et al. Distribution of subsets of blood monocytic cells throughout life. **J Allergy Clin Immunol**, v. 144, n. 1, p. 320-323, jul. 2019.

DE JAGER, W.; BOURCIER, K.; RIJKERS, G. T.; PRAKKEN, B. J., et al. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. **BMC Immunol**, v. 10, p. 52, set. 2009.

DE MILITO, A.; MÖRCH, C.; SÖNNERBORG, A.; CHIODI, F. Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. **AIDS**, v. 15, n. 8, p. 957-964, maio 2001.

DE TUTE, R. M. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. **Histopathology**, v. 58, p. 16, 2011.

DENG, Y.; FAN, X.; RAN, Y.; XU, X. et al. Prognostic impact of neutrophil-to-lymphocyte ratio in cirrhosis: A propensity score matching analysis with a prespecified cut-point. **Liver Int**, v. 39, n. 11, p. 2153-2163, nov. 2019.

DIKS, A. M.; BONROY, C.; TEODOSIO, C.; GROENLAND, R. J., et al. Impact of blood storage and sample handling on quality of high dimensional flow cytometric data in multicenter clinical research. **J Immunol Methods**, v. 475, p. 112616, dez. 2019.

DIRCHWOLF, M.; PODHORZER, A.; MARINO, M.; SHULMAN, C., et al. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. **Cytokine**, v. 77, p. 14-25, jan. 2016.

DIVE. **Diretoria de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina**. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br>>. Acesso em: 07 jan. 2020.

DOI, H.; IYER, T. K.; CARPENTER, E.; LI, H. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. **Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 709-719, mar. 2012.

DOI, H.; HAYASHI, E.; ARAI, J.; TOJO, M. et al. Enhanced B-cell differentiation driven by advanced cirrhosis resulting in hyperglobulinemia. **J Gastroenterol Hepatol**, fev. 2018.

DROLZ, A.; HORVATITS, T.; RUTTER, K.; LANDAHL, F. et al. Lactate Improves Prediction of Short-Term Mortality in Critically Ill Patients With Cirrhosis: A Multinational Study. **Hepatology**, v. 9, n. 1, p. 258-269, jan. 2019.

DUAN, X. Z.; LIU, F. F.; TONG, J. J.; YANG, H. Z., et al. Granulocyte-colony stimulating factor therapy improves survival in patients with hepatitis B virus-associated acute-on-chronic liver failure. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 7, p. 1104-1110, fev. 2013.

DURAND, F.; VALLA, D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. **J Hepatol**, v. 42 Suppl, n. 1, p. S100-107, 2005.

D'AMICO, G. Natural History and Stages of Cirrhosis. In: FRANCHIS, R; DELL'ERA, A. **Variceal Hemorrhage**. Nova Iorque: Springer, 2014. v. XIII, cap. 2, p. 15-28.

EROĞLU, A.; DEMIRCI, S.; AKBULUT, H.; SEVER, N., et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hepatic regeneration after 70% hepatectomy in normal and cirrhotic rats. **HPB (Oxford)**, v. 4, n. 2, p. 67-73, 2002.

FALLATAH, H. I.; AKBAR, H. O. Elevated serum immunoglobulin G levels in patients with chronic liver disease in comparison to patients with autoimmune hepatitis. **Libyan J Med**, v. 5, jan. 2010.

FATTOVICH, G.; STROFFOLINI, T.; ZAGNI, I.; DONATO, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5 Suppl 1, p. S35-50, nov. 2004.

FECTEAU, J. F.; CÔTÉ, G.; NÉRON, S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 3728-3736, set. 2006.

FERENCI, P.; LOCKWOOD, A.; MULLEN, K.; TARTER, R., et al. Hepatic encephalopathy. Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. **Hepatology**, v. 35, n. 3, p. 716-721, mar. 2002.

FEUTH, T.; VAN BAARLE, D.; VAN ERPECUM, K. J.; SIERSEMA, P. D., et al. CD4/CD8 ratio is a promising candidate for non-invasive measurement of liver fibrosis in chronic HCV-monoinfected patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 7, p. 1113-1117, jul. 2014.

FINAK, G.; LANGWEILER, M.; JAIMES, M.; MALEK, M., et al. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. **Sci Rep**, v. 6, p. 20686, fev. 2016.

FINK, K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. **Front Immunol**, v. 3, p. 78, 2012.

FISCHER, J. **Níveis circulantes de interleucinas 6, 10 e 17 como marcadores prognósticos na cirrose hepática**. 2016. 139f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2016.

FISCHER, J.; SILVA, T. E.; SOARES E SILVA, P. E.; COLOMBO, B. S. et al. From stable disease to acute-on-chronic liver failure: Circulating cytokines are related to prognosis in different stages of cirrhosis. **Cytokine**, v. 91, p. 162-169, mar. 2017.

FIUZA, C., et al. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. **J Infect Dis**, v. 182, n. 2, p. 526-533, ago. 2000.

FIUZA, C.; SALCEDO, M.; CLEMENTE, G.; TELLADO, J. M. Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient in vitro neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 2, p. 433-439, mar. 2002.

FLORES-BORJA, F.; BOSMA, A.; NG, D.; REDDY, V., et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 173, p. 173ra123, fev. 2013.

FRAUSSEN, J.; MARQUEZ, S.; TAKATA, K.; BECKERS, L. et al. Phenotypic and Ig Repertoire Analyses Indicate a Common Origin of IgD. **J Immunol**, v. 203, n. 6, p. 1650-1664, set. 2019.

GADANI, S. P.; CRONK, J. C.; NORRIS, G. T.; KIPNIS, J. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. **J Immunol**, v. 189, n. 9, p. 4213-4219, nov. 2012.

GADD, V. L.; PATEL, P. J.; JOSE, S.; HORSFALL, L., et al. Altered Peripheral Blood Monocyte Phenotype and Function in Chronic Liver Disease: Implications for Hepatic Recruitment and Systemic Inflammation. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157771, 2016.

GARDNER, J. G.; BHAMIDIPATI, D. R.; RUEDA, A. M.; NGUYEN D. T. M, et al. White Blood Cell Counts, Alcoholism, and Cirrhosis in Pneumococcal Pneumonia. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, fev. 2017.

- GARG, R.; KAUR, K.; KAUR, A.; KAUR, R., et al. Association of CD4/CD8 Ratio with Viral Load, Genotype and Cirrhosis in Chronic Hepatitis C. **J Assoc Physicians India**, v. 68, n. 2, p. 35-38, fev 2020.
- GARG, V.; GARG, H.; KHAN, A.; TREHANPATI, N., et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. **Gastroenterology**, v. 142, n. 3, p. 505-512, mar. 2012.
- GEGINAT, J.; PARONI, M.; FACCIOTTI, F.; GRUARIN, P., et al. The CD4-centered universe of human T cell subsets. **Semin Immunol**, v. 25, n. 4, p. 252-262, nov. 2013.
- GEORGIEV, P.; CHARBONNIER, L. M.; CHATILA, T. A. Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. **J Clin Immunol**, v. 39, n. 7, p. 623-640, out. 2019.
- GINES, P.; ANGELI, P.; LENZA, K.; MOLLER, S., et al. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. **J Hepatol**, v. 53, n. 3, p. 397-417, set. 2010.
- HAN, Y.; CHEN, Z.; YANG, Y.; JIANG, Z., et al. Human CD14+ CTLA-4+ regulatory dendritic cells suppress T-cell response by cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-dependent IL-10 and indoleamine-2,3-dioxygenase production in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 59, n. 2, p. 567-579, fev. 2014.
- HEINE, G.; DROZDENKO, G.; GRÜN, J. R.; CHANG, H. D. et al. Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 6, p. 1615-1621, jun. 2014.
- HONG, C. W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. **Immune Netw**, v. 17, n. 5, p. 298-306, out. 2017.
- HONG, S.; ZHANG, Z.; LIU, H.; TIAN, M., et al. B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4. **Immunity**, v. 49, n. 4, p. 695-708, out. 2018.
- HUANG, C. H.; JENG, W. J.; HO, Y. P.; TENG, W., et al. Increased regulatory T cells in patients with liver cirrhosis correlated with hyperbilirubinemia and predict bacterial complications. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 30, n. 4, p. 775-783, abr. 2015.
- IANNACONE, M. Hepatic effector CD8(+) T-cell dynamics. **Cell Mol Immunol**, v. 12, n. 3, p. 269-272, maio 2015.
- INVERNIZZI, P. Liver auto-immunology: the paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ. **J Autoimmun**, v. 46, p. 1-6, out 2013.
- IRVINE, K. M.; RATNASEKERA, I.; POWELL, E. E.; HUME, D. A. Causes and Consequences of Innate Immune Dysfunction in Cirrhosis. **Front Immunol**, v. 10, p. 293, 2019.



JALAN, R.; FERNANDEZ, J.; WIEST, R.; SCHNABL, B. et al. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013. **J Hepatol**, v. 60, n. 6, p. 1310-1324, jun. 2014.

JIANG, Y.; CHEN, Y.; CHEN, L.; YAO, W. et al. Impaired circulating CD56dim NK cells are associated with decompensation of HBV-related cirrhosis. **Hum Immunol**, v. 81, n. 1, p. 32-40, jan. 2020.

JHUN, J. Y.; KIM, H. Y.; BYUN, J. K.; CHUNG, B. H. et al. B-cell-associated immune profiles in patients with decompensated cirrhosis. **Scand J Gastroenterol**, v. 50, n. 7, p. 884-891, jul. 2015.

KALINA, T.; FLORES-MONTERO, J.; LECREVISSE, Q.; PEDREIRA, C. E., et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds. **Cytometry A**, v. 87, n. 2, p. 145-156, fev. 2015.

KALINA, T.; FLORES-MONTERO, J.; VAN DER VELDEN, V. H.; MARTIN-AYUSO, M., et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1986-2010, set. 2012.

KAMATH, P. S.; WIESNER, R. H.; MALINCHOC, M.; KREMERS, W., et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. **Hepatology**, v. 33, n. 2, p. 464-470, fev. 2001.

KAMATH, P. S.; KIM, W. R.; GROUP, A. L. D. S. The model for end-stage liver disease (MELD). **Hepatology**, v. 45, n. 3, p. 797-805, mar. 2007.

KANEGANE, H.; HOSHINO, A.; OKANO, T.; YASUMI, T., et al. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. **Allergol Int**, v. 67, n. 1, p. 43-54, jan. 2018.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 23, nov. 2019.

KAPELLOS, T. S.; BONAGURO, L.; GEMÜND, I.; REUSCH, N., et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. **Front Immunol**, v. 10, p. 2035, 2019.

KARED, H.; MARTELLI, S.; NG, T. P.; PENDER, S. L., et al. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. **Cancer Immunol Immunother**, v. 65, n. 4, p. 441-452, abr. 2016.

KHANAM, A.; TREHANPATI, N.; GARG, V.; KUMAR, C., et al. Altered frequencies of dendritic cells and IFN-gamma-secreting T cells with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) therapy in acute-on- chronic liver failure. **Liver Int**, v. 34, n. 4, p. 505-513, abr. 2014.

KOK, B.; ABRALDES, J. G. Child-Pugh Classification: Time to Abandon? **Semin Liver Dis**, v. 39, n. 1, p. 96-103, fev. 2019.

KOTECHA, N.; KRUTZIK, P. O.; IRISH, J. M. Web-based analysis and publication of flow cytometry experiments. **Curr Protoc Cytom**, Chapter 10, Unit 10.17, jul. 2010.

KUBES, P.; JENNE, C. Immune Responses in the Liver. **Annu Rev Immunol**, v. 36, p. 247-277, abr. 2018.

LAMBERT, C.; SACK, U. Monocytes and macrophages in flow cytometry. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 92, n. 3, p. 178-179, mai. 2017.

LARIO, M.; MUÑOZ, L.; UBEDA, M.; BORRERO, M. J. et al. Defective thymopoiesis and poor peripheral homeostatic replenishment of T-helper cells cause T-cell lymphopenia in cirrhosis. **J Hepatol**, v. 59, n. 4, p. 723-730, out. 2013.

LASO, F. J.; MADRUGA, J. I.; LÓPEZ, A.; CIUDAD, J., et al. Distribution of peripheral blood lymphoid subsets in alcoholic liver cirrhosis: influence of ethanol intake. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20, n. 9, p. 1564-1568, dez. 1996.

LASO, F. J.; MADRUGA, J. I.; GIRÓN, J. A.; LÓPEZ, A., et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. **Hepatology**, v. 25, n. 5, p. 1096-1100, mai. 1997.

LEBOSSÉ, F.; GUDD, C.; TUNC, E.; SINGANAYAGAM, A. et al. CD8. **EBioMedicine**, v. 49, p. 258-268, nov. 2019.

LEE, P. T.; BENLAGHA, K.; TEYTON, L.; BENDELAC, A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. **J Exp Med**, v. 195, n. 5, p. 637-641, mar. 2002.

LEFTON, H. B.; ROSA, A.; COHEN, M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. **Med Clin North Am**, v. 93, n. 4, p. 787-799, jul. 2009.

LEMMERS, A.; GUSTOT, T.; DURNEZ, A.; EVRARD, S., et al. An inhibitor of interleukin-6 trans-signalling, sgp130, contributes to impaired acute phase response in human chronic liver disease. **Clin Exp Immunol**, v. 156, n. 3, p. 518-527, jun. 2009.

LENG, S. X.; MCELHANEY, J. E.; WALSTON, J. D.; XIE, D., et al. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 63, n. 8, p. 879-884, ago. 2008.

LIASKOU, E.; ZIMMERMANN, H. W.; LI, K. K.; OO, Y. H. et al. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. **Hepatology**, v. 57, n. 1, p. 385-398, jan. 2013.

- MAECKER, H. T.; MCCOY, J. P.; NUSSENBLATT, R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 3, p. 191-200, fev. 2012.
- MAGUIRE, O.; TARIO, J. D.; SHANAHAN, T. C.; WALLACE, P. K., et al. Flow cytometry and solid organ transplantation: a perfect match. **Immunol Invest**, v. 43, n. 8, p. 756-774, 2014.
- MAKAROVA-RUSHER, O. V.; MEDINA-ECHEVERZ, J.; DUFFY, A. G.; GRETEN, T. F. The yin and yang of evasion and immune activation in HCC. **J Hepatol**, v. 62, n. 6, p. 1420-1429, jun. 2015.
- MALINCHOC, M.; KAMATH, P. S.; GORDON, F. D.; PEINE, C. J., et al. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. **Hepatology**, v. 31, n. 4, p. 864-871, abr. 2000.
- MÁRQUEZ, M.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, C.; MONTES-DE-OCA, M.; BLANCO, M. J. et al. Chronic antigenic stimuli as a possible explanation for the immunodepression caused by liver cirrhosis. **Clin Exp Immunol**, v. 158, n. 2, p. 219-229, nov. 2009.
- MARTIN, V. G.; WU, Y. B.; TOWNSEND, C. L.; LU, G. H., et al. Transitional B Cells in Early Human B Cell Development - Time to Revisit the Paradigm? **Front Immunol**, v. 7, p. 546, 2016.
- MATIOLO, C.; RATEKE, E. C. M.; DE OLIVEIRA, K. G.; TURNES, B. L. et al. Elevated neopterin levels are associated with acute-on-chronic liver failure and mortality in patients with liver cirrhosis. **Dig Liver Dis**, v. 52, n. 7, p. 753-760, jul. 2020.
- MATOS, L. C.; BATISTA, P.; MONTEIRO, N.; RIBEIRO, J. et al. Lymphocyte subsets in alcoholic liver disease. **World J Hepatol**, v. 5, n. 2, p. 46-55, fev. 2013.
- MAZZAFERRO, V.; BHOORI, S.; SPOSITO, C.; BONGINI, M., et al. Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an evidence-based analysis of 15 years of experience. **Liver Transpl**, v. 17 Suppl 2, p. S44-57, out. 2011.
- MCGOVERN, B. H.; GOLAN, Y.; LOPEZ, M.; PRATT, D. et al. The impact of cirrhosis on CD4+ T cell counts in HIV-seronegative patients. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 3, p. 431-437, fev. 2007.
- MD CALC. **MELD Score (Model For End-Stage Liver Disease 12 and older)**. Disponível em: <<https://www.mdcalc.com/meld-score-model-end-stage-liver-disease-12-older>>. Acesso em 07 jan. 2020.
- MELO, A. P. S.; FRANÇA, E. B.; MALTA, D. C.; GARCIA, L. P., et al. Mortalidade por cirrose, câncer hepático e transtornos devidos ao uso de álcool: Carga Global de Doenças no Brasil, 1990 e 2015. **Rev Bras Epidemiol**, v. 20, n. 1, p. 61-74, mai. 2017.

MESQUITA, D.; CATELAN, T.; CRUVINEL, W.; DA SILVA, N. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n.5, p. 552-580, 2010.

MISODOR. **O fígado: referências de cirurgia**. Disponível em: <<https://www.misodor.com.br/FIGADO.php>>. Acesso em: 11 dez. 2019.

MIYARA, M.; YOSHIOKA, Y.; KITOH, A.; SHIMA, T., et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. **Immunity**, v. 30, n. 6, p. 899-911, jun. 2009.

MIYAKE, T.; ABE, M.; TOKUMOTO, Y.; HIROOKA, M. et al. B cell-activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatol Int**, v. 7, n. 2, p. 539-547, jun. 2013.

MONNERET, G.; VENET, F. Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 90, n. 4, p. 376-386, jul. 2016.

MONTOYA, C. J.; POLLARD, D.; MARTINSON, J.; KUMARI, K., et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. **Immunology**, v. 122, n. 1, p. 1-14, set. 2007.

MOOKERJEE, R. P.; STADLBAUER, V; LIDDER, S.; WRIGHT, G. A. K., et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. **Hepatology**, v. 46, n. 3, p. 831–840, mar. 2007.

MOREAU, R.; JALAN, R.; GINES, P.; PAVESI, M., et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 144, n. 7, p. 1426-1437, jun. 2013.

MORONI, F.; DWYER, B. J.; GRAHAM, C.; PASS, C., et al. Safety profile of autologous macrophage therapy for liver cirrhosis. **Nat Med**, v. 25, n. 10, p. 1560-1565, out. 2019.

NADER, L. A.; DE MATTOS, A. A.; BASTOS, G. A. Burden of liver disease in Brazil. **Liver Int**, v. 34, n. 6, p. 844-849, jul. 2014.

NEMETH, E.; BAIRD, A. W.; O'FARRELLY, C. Microanatomy of the liver immune system. **Semin Immunopathol**, v. 31, n. 3, p. 333-343, set. 2009.

NEWSOME, P. N.; FOX, R.; KING, A. L.; BARTON, D., et al. Granulocyte colony-stimulating factor and autologous CD133-positive stem-cell therapy in liver cirrhosis (REALISTIC): an open-label, randomised, controlled phase 2 trial. **Lancet Gastroenterol Hepatol**, v. 3, n. 1, p. 25-36, jan. 2018.

- NOOR, M. T.; MANORIA, P. Immune Dysfunction in Cirrhosis. **J Clin Transl Hepatol**, v. 5, n. 1, p. 50-58, mar. 2017.
- O'BRIEN, A. J.; FULLERTON, J. N.; MASSEY, K. A.; AULD, G., et al. Immunosuppression in acutely decompensated cirrhosis is mediated by prostaglandin E2. **Nat Med**, v. 20, n. 5, p. 518-523, mai. 2014.
- O'KEEFFE, M.; MOK, W. H.; RADFORD, K. J. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 22, p. 4309-4325, nov. 2015.
- OBUKHANYCH, T. V.; NUSSENZWEIG, M. C. T-independent type II immune responses generate memory B cells. **J Exp Med**, v. 203, n. 2, p. 305-310, fev. 2006.
- PAPAMICHAIL, M.; PEREZ, S. A.; GRITZAPIS, A. D.; BAXEVANIS, C. N. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. **Cancer Immunol Immunother**, v. 53, n. 3, p. 176-186, mar. 2004.
- PATEL, A. A.; ZHANG, Y.; FULLERTON, J. N.; BOELEN, L., et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. **J Exp Med**, v. 214, n. 7, p. 1913-1923, jul. 2017.
- PATENTE, T. A.; PINHO, M. P.; OLIVEIRA, A. A.; EVANGELISTA, G. C. M., et al. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. **Front Immunol**, v. 9, p. 3176, 2018.
- PEDREIRA, C. E.; COSTA, E. S.; LECREVISSE, Q.; VAN DONGEN, J. J., et al. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. **Trends Biotechnol**, v. 31, n. 7, p. 415-425, jul. 2013.
- PENG, A.; KE, P.; ZHAO, R.; LU, X., et al. Elevated circulating CD14<sup>low</sup> CD16<sup>+</sup> monocyte subset in primary biliary cirrhosis correlates with liver injury and promotes Th1 polarization. **Clin Exp Med**, v. 16, n. 4, p. 511-521, nov. 2016.
- PEREZ-ANDRES, M.; PAIVA, B.; NIETO, W. G.; CARAUX, A., et al. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 78 Suppl 1, p. S47-60, 2010.
- PERFETTO, S. P.; CHATTOPADHYAY, P. K.; ROEDERER, M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 8, p. 648-655, ago. 2004.
- POLI, A.; MICHEL, T.; THÉRÉSINE, M.; ANDRÈS, E., et al. CD56<sup>bright</sup> natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. **Immunology**, v. 126, n. 4, p. 458-465, abr. 2009.

PORTELA, M.; NERI, E.; FONTELES, M.; GARCIA, J., et al. O custo do transplante hepático em um hospital universitário do Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 5, 2010.

POSE, E.; CARDENAS, A. Translating Our Current Understanding of Ascites Management into New Therapies for Patients with Cirrhosis and Fluid Retention. **Dig Dis**, v. 35, n. 4, p. 402-410, 2017.

PUGH, R. N.; MURRAY-LYON, I. M.; DAWSON, J. L.; PIETRONI, M. C., et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. **Br J Surg**, v. 60, n. 8, p. 646-649, ago. 1973.

QIAN, Y.; WEI, C.; EUN-HYUNG LEE, F.; CAMPBELL, J., et al. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 78 Suppl 1, p. S69-82, 2010.

QUECK, A.; RUESCHENBAUM, S.; KUBESCH, A.; CAI, C., et al. The portal vein as a distinct immunological compartment - A comprehensive immune phenotyping study. **Hum Immunol**, v. 79, n. 10, p. 716-723, out. 2018.

QUEIROZ, E. **Gastos com internações hospitalares e sobrevida de pacientes adultos que receberam transplante de fígado no SUS no período 2001-2011**. 2016. 171f. Tese (Doutorado em Economia) - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, 2016.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S54-62, fev. 2006.

REIZIS, B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. **Immunity**, v. 50, n. 1, p. 37-50, jan. 2019.

REVENFELD, A. L.; STEFFENSEN, R.; PUGHOLM, L. H.; JØRGENSEN, M. M., et al. Presence of HLA-DR Molecules and HLA-DRB1 mRNA in Circulating CD4(+) T Cells. **Scand J Immunol**, v. 84, n. 4, p. 211-221, out. 2016.

ROBINSON, M. W.; HARMON, C.; O'FARRELLY, C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. **Cell Mol Immunol**, v. 13, n. 3, p. 267-276, mai. 2016.

RODÉS, J.; BENHAMOU, J.-P.; BLEI, A. T.; REICHEN, J., et al. **Textbook of Hepatology**. 3.ed. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd., 2007.

ROGERS, N. M.; ISENBERG, J. S.; THOMSON, A. W. Plasmacytoid dendritic cells: no longer an enigma and now key to transplant tolerance? **Am J Transplant**, v. 13, n. 5, p. 1125-1133, mai. 2013.

ROSSER, E. C.; MAURI, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 607-612, abr. 2015.

ROUSSET, F.; GARCIA, E.; DEFRANCE, T.; PÉRONNE, C. et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 5, p. 1890-1893, mar. 1992.

RUDOLF-OLIVEIRA, R. C.; GONÇALVES, K. T.; MARTIGNAGO, M. L.; MENGATTO, V., et al. Determination of lymphocyte subset reference ranges in peripheral blood of healthy adults by a dual-platform flow cytometry method. **Immunol Lett**, v. 163, n. 1, p. 96-101, jan. 2015.

SALLUSTO, F.; LANGENKAMP, A.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 251, p. 167-171, 2000.

SALZER, U.; SACK, U.; FUCHS, I. Flow Cytometry in the Diagnosis and Follow Up of Human Primary Immunodeficiencies. **EJIFCC**, v. 30, n. 4, p. 407-422, nov. 2019.

SAKAGUCHI, E; KAYANO, K.; SEGAWA, M.; AOYAGI, M.; SAKAIDA, I.; OKITA, K. Th1/Th2 imbalance in HCV-related liver cirrhosis. **Nihon Rinsho**, v. 59; n. 7, p. 1259-1263, jul. 2001.

SANGRO, B.; GOMEZ-MARTIN, C.; DE LA MATA, M.; IÑARRAIRAEGUI, M., et al. A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C. **J Hepatol**, v. 59, n. 1, p. 81-88, jul. 2013.

SANTEGOETS, S. J.; DIJKGRAAF, E. M.; BATTAGLIA, A.; BECKHOVE, P., et al. Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. **Cancer Immunol Immunother**, v. 64, n. 10, p. 1271-1286, out. 2015.

SANZ, I.; WEI, C.; JENKS, S. A.; CASHMAN, K. S., et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. **Front Immunol**, v. 10, p. 2458, 2019.

SCHINKEL, S. C. B.; CARRASCO-MEDINA, L.; COOPER, C. L.; CRAWLEY, A. M. Generalized Liver- and Blood-Derived CD8<sup>+</sup> T-Cell Impairment in Response to Cytokines in Chronic Hepatitis C Virus Infection. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. 0157055, jun. 2016.

SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838-851, mar. 2008.

SCHWARTZ, J. M.; REINUS, J. F. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease. **Clin Liver Dis**, v. 16, n. 4, p. 659-666, nov. 2012.

SÈNE, D.; LIMAL, N.; GHILLANI-DALBIN, P.; SAADOUN, D. et al. Hepatitis C virus-associated B-cell proliferation--the role of serum B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF). **Rheumatology (Oxford)**, v. 46, n. 1, p. 65-69, jan 2007.

SHANKLAND, K. R.; ARMITAGE, J. O.; HANCOCK, B. W. Non-Hodgkin lymphoma. **Lancet**, v. 380, n. 9844, p. 848-857, set. 2012.

SHERWOOD, G. **Waldenstrom's Macroglobulinemia - Basic Immunology**. 2.ed. Sarasota: International Waldenstrom's Macroglobulinemia Foundation (IWMF), 2018.

SIH/SUS. **Sistema de Informações Hospitalares do SUS**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/nruf.def>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

SIMS, G. P.; ETTINGER, R.; SHIROTA, Y.; YARBORO, C. H., et al. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. **Blood**, v. 105, n. 11, p. 4390-4398, jun. 2005.

SIPEKI, N.; ANTAL-SZALMAS, P.; LAKATOS, P. L.; PAPP, M. Immune dysfunction in cirrhosis. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 10, p. 2564-2577, mar. 2014.

SOOD, S.; TESTRO, A. G. Immune monitoring post liver transplant. **World J Transplant**, v. 4, n. 1, p. 30-39, mar. 2014.

STRAUSS, E.; CALY, W. R. Spontaneous bacterial peritonitis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 6, p. 711-717, dez. 2003.

STREITZ, M.; MILOUD, T.; KAPINSKY, M.; REED, M. R., et al. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. **Transplant Res**, v. 2, n. 1, p. 17, out. 2013.

STRIOGA, M.; PASUKONIENE, V.; CHARACIEJUS, D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. **Immunology**, v. 134, n. 1, p. 17-32, set. 2011.

SUN, Q. L.; RAN, W. Review of cytokine profiles in patients with hepatitis. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 12, p. 1709-1715, Jun 2004.

SZODORAY, P.; JELLESTAD, S.; ALEX, P.; ZHOU, T. et al. Programmed cell death of peripheral blood B cells determined by laser scanning cytometry in Sjögren's syndrome with a special emphasis on BAFF. **J Clin Immunol**, v. 24, n. 6, p. 600-611, nov. 2004.

TAK, T.; DRYLEWICZ, J.; CONEMANS, L.; DE BOER, R. J., et al. Circulatory and maturation kinetics of human monocyte subsets in vivo. **Blood**, v. 130, n. 12, p. 1474-1477, set. 2017.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, n. 10, p. a016295, set. 2014.



TANOUE, S.; KAPLAN, D. E. CD14(+) regulatory dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis. **Hepatology**, v. 63, n. 4, p. 1391-1392, abr. 2016.

THALHEIMER, U.; LEANDRO, G.; SAMONAKIS, D. N.; TRIANTOS, C. K., et al. TIPS for refractory ascites: a single-centre experience. **J Gastroenterol**, v. 44, n. 10, p. 1089-1095, 2009.

THALHEIMER, U.; TRIANTOS, C. K.; SAMONAKIS, D. N.; PATCH, D., et al. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. **Gut**, v. 54, n. 4, p. 556-563, abr. 2005.

THOMSON, A.; LOTZE, M. **The Cytokine Handbook**. 4.ed. Londres: Elsevier Science Ltd, 2003.

TOUBI, E.; GORDON, S.; KESSEL, A.; ROSNER, I. et al. Elevated serum B-Lymphocyte activating factor (BAFF) in chronic hepatitis C virus infection: association with autoimmunity. **J Autoimmun**, v. 27, n. 2, p. 134-139, set. 2006.

TRIANAFYLLOU, E.; WOOLLARD, K. J.; MCPHAIL, M. J. W.; ANTONIADES, C. G., et al. The Role of Monocytes and Macrophages in Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure. **Front Immunol**, v. 9, p. 2948, 2018.

TRITTO, G.; BECHLIS, Z.; STADLBAUER, V.; DAVIES, N., et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. **J Hepatol**, v. 55, n. 3, p. 574-581, set. 2011.

TSOCHATZIS, E. A.; BOSCH, J.; BURROUGHS, A. K. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 383, n. 9930, p. 1749-1761, mai. 2014.

VAN ACKER, H. H.; CAPSOMIDIS, A.; SMITS, E. L.; VAN TENDELOO, V. F. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? **Front Immunol**, v. 8, p. 892, 2017.

VAN DONGEN, J. J. M.; LHERMITTE, L.; BOTTCHER, S.; ALMEIDA, J., et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1908-1975, set. 2012.

VAN DONGEN, J. J. M.; ORFAO, A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1899-1907, set. 2012.

VAN DONGEN, J. J. M.; VAN DER BURG, M.; KALINA, T.; PEREZ-ANDRES, M., et al. EuroFlow-Based Flowcytometric Diagnostic Screening and Classification of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System. **Front Immunol**, v. 10, p. 1271, 2019.

VILSTRUP, H.; AMODIO, P.; BAJAJ, J.; CORDOBA, J., et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. **Hepatology**, v. 60, n. 2, p. 715-735, ago. 2014.

VOILLET, V.; BUGGERT, M.; SLICHTER, C. K.; BERKSON, J. D., et al. Human MAIT cells exit peripheral tissues and recirculate via lymph in steady state conditions. **JCI Insight**, v. 3, n. 7, abr. 2018.

WANG, L.; HOFFMAN, R. A. Standardization, Calibration, and Control in Flow Cytometry. **Curr Protoc Cytom**, v. 79, p. 1.3.1-1.3.27, jan. 2017.

WEI, C.; ANOLIK, J.; CAPPIONE, A.; ZHENG, B., et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. **J Immunol**, v. 178, n. 10, p. 6624-6633, mai. 2007.

WIESNER, R.; EDWARDS, E.; FREEMAN, R.; HARPER, A., et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. **Gastroenterology**, v. 124, n. 1, p. 91-96, jan. 2003.

WILLIAMS, R. Global challenges in liver disease. **Hepatology**, v. 44, n. 3, p. 521-526, set. 2006.

WOLF, A. A.; YÁÑEZ, A.; BARMAN, P. K.; GOODRIDGE, H. S. The Ontogeny of Monocyte Subsets. **Front Immunol**, v. 10, p. 1642, 2019.

WREE, A.; MARRA, F. The inflammasome in liver disease. **J Hepatol**, v. 65, n. 5, p. 1055-1056, nov. 2016.

WRIGHT, G.; NOIRET, L.; OLDE DAMINK, S. W.; JALAN, R. Interorgan ammonia metabolism in liver failure: the basis of current and future therapies. **Liver Int**, v. 31, n. 2, p. 163-175, fev. 2011.

WU, H. P.; SHIH, C. C.; CHU, C. M.; HUANG, C. Y. et al. Effect of interleukin-17 on in vitro cytokine production in healthy controls and patients with severe sepsis. **J Formos Med Assoc**, v. 114, n. 12, p. 1250-1257, dez. 2015.

XIAO, X.; CAI, J. Mucosal-Associated Invariant T Cells: New Insights into Antigen Recognition and Activation. **Front Immunol**, v. 8, p. 1540, 2017.

XING, T.; LI, L.; CAO, H.; HUANG, J. Altered immune function of monocytes in different stages of patients with acute on chronic liver failure. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 1, p. 184-188, jan. 2007.

XU, H.; MANIVANNAN, A.; CRANE, I.; DAWSON, R. et al. Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocyte trafficking in vivo during inflammation. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 1166-1174, ago. 2008.

XU, R.; HUANG, H.; ZHANG, Z.; WANG, F. The role of neutrophils in the development of liver diseases. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 11, p. 224–231, jan. 2014.

YAZDANI, R.; FEKRVAND, S.; SHAHKARAMI, S.; AZIZI, G. et al. The hyper IgM syndromes: Epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and management. **Clin Immunol**, v. 198, p. 19-30, jan. 2019.

YE, Y.; GAUGLER, B.; MOHTY, M., MALARD, F. Plasmacytoid dendritic cell biology and its role in immune-mediated diseases. **Clinical & Translational Immunology**, v. 9, p. e1139, abr. 2020.

ZIEGLER-HEITBROCK, L.; ANCUTA, P.; CROWE, S.; DALOD, M., et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74-80, out. 2010.

ZIMMERMANN, H. W.; SEIDLER, S.; NATTERMANN, J.; GASSLER, N., et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11049, jun. 2010.

ZHANG, W.; YUE, B.; WANG, G. Q.; LU, S. L. Serum and ascites levels of macrophage migration inhibitory factor, TNF-alpha and IL-6 in patients with chronic virus hepatitis B and hepatitis cirrhosis. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 1, n. 4, p. 577-580, nov 2002.

ZHANG, J.; ZHANG, W.; LEUNG, P. S.; BOWLUS, C. L. et al. Ongoing activation of autoantigen-specific B cells in primary biliary cirrhosis. **Hepatology**, v. 60, n. 5, p. 1708-1716, nov. 2014.



## APÊNDICE A – Instrumento de Coleta de Dados do Grupo Emergência

### AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNE DE PACIENTES COM CIRROSE HEPÁTICA PACIENTES DA EMERGÊNCIA

<b>Dados de identificação e contato</b>	
1. Nome: _____	nome
2. Número do prontuário: _____	num_pront
3. Data da avaliação: ____ / ____ / ____	data_aval
4. Data de nascimento: ____ / ____ / ____	data_nasc
5. Telefone residencial: (____)	tel_resid
6. Telefone celular: (____)	tel_celular
7. Outro telefone de contato 1: (____)	tel_contato1
8. Nome da pessoa de contato 1: (____)	nome_contato1
9. Outro telefone de contato 2: (____)	tel_contato2
10. Nome da pessoa de contato 2: (____)	nome_contato2

<b>Critérios exclusão</b>			
11. Incluído no estudo?	(0) Não	(1) Sim	incluido
12. Motivo da exclusão:			motivo_excl
(0) Diagnóstico duvidoso de cirrose			
(1) Diagnóstico de hepatocarcinoma			
(2) Diagnóstico de infecção atual			
(3) Uso de interferon nos últimos 30 dias			
(4) Uso de antibiótico nos últimos 7 dias			
(5) Limitação da capacidade de compreensão			
(6) Recusa			

<b>Características sócias demográficas</b>	
13. Idade: _____ anos	idade
14. Sexo: (0) Feminino (1) Masculino	sexo
15. Cor da pele/raça (conforme observado pelo pesquisador): (0) Branca (1) Parda (2) Negra (3) Amarela (4) Indígena (5) IGN	cor_pele
16. Estado civil: <i>Neste momento o (a) Sr.(a) está?</i> (0) Casado ou morando com companheiro (1) Solteiro (2) Divorciado ou separado (3) Viúvo (4) IGN	estado_civil

<b>Comorbidades</b> <i>Algum médico já disse que o senhor tem ou teve:</i> <b>(complementar com dados do prontuário)</b>				
17. Pressão alta	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	has
18. Diabetes	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	diabetes
19. AIDS/HIV	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hiv
20. Asma	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	asma
21. Enfisema ou bronquite crônica (DPOC)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	dpoc
22. Infarto do miocárdio	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	iam
23. Angina	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	angina
24. Derrame (AVC)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	avc
25. Colesterol alto	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	dislipidemia
26. Insuficiência cardíaca congestiva (ICC)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	icc
27. Insuficiência renal	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	insuf renal
28. Hipotireoidismo	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hipotir
29. Osteoporose ou osteopenia	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	osteop
30. Artrite reumatóide	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	artrite
31. Lupus	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	lupus
32. Depressão	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	depressao
33. Tuberculose	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	tuberc

<b>Medicações</b> <b>(complementar com dados do prontuário)</b>				
<b><i>O senhor faz uso regular de alguma das medicações abaixo?</i></b>				
34. Propranolol Dose: _____ mg/d	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	proprano dose proprano
35. Espironolactona Dose: _____ mg/d	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	espiro dose_espiro
36. Furosemida Dose: _____ mg/d	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	furo dose_furo
37. Lactulose Dose: _____ ml/d	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	lactulose dose lactulose
38. Norfloxacin	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	norflox
39. Metronidazol	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	metron
40. Hidroclorotiazida	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hctz
41. Prednisona	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	pred
42. Remédio oral para diabetes Qual? _____	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hipoglicem qual hipogl
43. Remédio para pressão alta Qual? _____	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	antihias qual_antihias
44. Insulina	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	insulina
45. Remédio para colesterol alto (estatinas)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	estatinas
<b><i>Quais outras medicações o senhor fez uso regular nos últimos 30 dias (anotar os nomes):</i></b>				med l

	med2
	med3

<b>Hábitos de vida – Consumo de álcool</b>	
46. O Sr. (a) tem ou já teve o hábito de beber bebidas alcoólicas? (0) Não tenho e nunca bebi - pule para a pergunta n° 52 (1) Já bebi, mas parei há mais de 30 dias - pule para a pergunta n° 48 (2) Ainda bebo – continue abaixo	etilismo
<b>Etilismo atual</b>	
47. Há quantos anos o Sr. (a) começou a beber? _____ anos	dur_etilismoatu
48. Com que frequência em média o(a) Sr.(a) toma bebidas alcoólicas? (0) Menos que uma vez ao mês (1) Uma vez ao mês (2) Duas vezes ao mês (3) Uma vez por semana (4) Duas vezes por semana (5) Três vezes por semana (6) Quatro vezes por semana (7) Cinco vezes por semana (8) Seis vezes por semana (9) Todos os dias (10) NSA (99) IGN	freq_etilismoatu
49. Quanto de álcool o(a) Sr.(a) toma normalmente ao beber por vez? (ver quadro de equivalência de dose padrão abaixo) Bebida: ( ) Cerveja; volume em ml _____ ( ) Vinho ou champanhe; volume em ml _____ ( ) Destilado (aguardente; whisky; vodca; gim; etc); volume em ml _____ <b>Quantidade ingerida por semana após conversão em gramas: _____ g/sem</b>	dose_alcoolatu
<b>Etilismo prévio</b>	
50. Há quantos meses o Sr. (a) parou de beber completamente? _____ meses	tempo_abst
51. Por quantos anos o Sr. (a) consumiu bebidas alcoólicas? _____ anos	dur_etilismoprev
52. Com que frequência em média o(a) Sr.(a) tinha o hábito de tomar bebidas alcoólicas? (1) Mensalmente ou menos (2) Uma vez ao mês (3) Duas vezes ao mês (4) Uma vez por semana (5) Duas vezes por semana (6) Três vezes por semana (7) Quatro vezes por semana (8) Cinco vezes por semana (9) Seis vezes por semana (10) Todos os dias (11) NSA	freq_etilismoprev

(99) IGN	
53. Quanto de álcool o(a) Sr.(a) toma normalmente ao beber por vez? (ver quadro de equivalência de dose padrão abaixo) Bebida: ( ) Cerveja; volume em ml _____ ( ) Vinho ou champanhe; volume em ml _____ ( ) Destilado (aguardente; whisky; vodca; gim; etc); volume em ml _____ <b>Quantidade ingerida por semana após conversão em gramas: _____ g/sem</b>	dose_alcoolprev

<b>Hábitos de vida - Tabagismo</b>				
54. O Sr. (a) fuma ou já fumou? (0) Nunca fumei - pule para a pergunta nº 62 (1) Já fumei, mas parei - pule para a pergunta nº 59 (2) Ainda fumo – continue abaixo	tabagismo			
<b>Tabagismo atual</b>				
55. Há quantos anos o Sr. (a) começou a fumar? _____ anos	tempo_tabagatu			
56. Quantos cigarros o Sr. (a) usa em média por dia? _____ cigarros	cigar_diaatu			
<b>Tabagismo prévio</b>				
57. Há quantos anos o Sr. (a) parou de fumar completamente? _____	tempo_semfumo			
58. Por quantos anos o Sr. (a) teve o hábito de fumar? _____ anos	tempo_tabagprev			
59. Quantos cigarros o Sr. (a) usava em média por dia? _____ cigarros	cigar_diaprev			
<b>Tabagismo para escore de Framingham</b>				
60. O Sr. Fumou algum cigarro no último mês?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	cigar_framing

<b>Complicações prévias da cirrose hepática</b> <i>O senhor tem ou já teve algum dos problemas abaixo?</i> <b>(complementar com dados do prontuário)</b>				
61. Inchaço nas pernas	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	edema_prev
62. Água na barriga (ascite)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	ascite_prev
63. Retirou líquido da barriga (paracentese)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	paracent_prev
64. Vômitos com sangue/hemorragia digestiva	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hda_prev
65. Internação por confusão mental (encefalopatia)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	encef_prev
66. Internação por infecção no líquido da barriga (PBE)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	pbe_prev
67. Internação por complicações da cirrose	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	interna_prev
68. Data primeira internação (mês/ano): _____ / _____				data_primintern
69. Data última internação (dia/mês/ano): _____ / _____ / _____				data_ultintern

<b>Infecção atual</b>
<b>Informações Clínicas – Atualmente o Sr. Vem sentindo/apresentando (últimos 7 dias)?</b> A exclusão ocorrerá de acordo com a avaliação do examinador considerando que queixas comuns e habituais do paciente não necessariamente indicam infecção bacteriana presente. O paciente poderá ser remarcado para nova avaliação após controle do quadro.



70. Febre		(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	inf_febre
71. Tosse com expectoração (diferente da habitual)		(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	inf_tosse
72. Dor ou ardência para urinar		(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	inf_disuria
73. Dor de garganta		(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	inf_amigdal
74. Inflamação na pele (examinar)		(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	inf_celulite

### História familiar de risco Cardiovascular

*O senhor tem alguém na família (pais ou irmãos) que foram diagnosticados com algumas das doenças abaixo?*

75. Infarto Agudo do Miocárdio		(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hf_iam
76. Angina do peito		(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hf_angina
77. AVC/derrame		(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hf_avc

### Exame Físico

78. Edema: (0) Ausente (1) Até tornozelo (+) (2) Até joelho (++) (3) Até raiz de coxa (+++) (4) Anasarca (++++)					edema_atu
79. Ascite: (0) Ausente (1) Grau 1 (apenas ultrassonográfica – ver último USG prontuário) (2) Grau 2 (moderada não tensa) (3) Grau 3 (ascite importante/tensa)					ascite_atu

### Dados complementares de exame físico

80. Peso (kg): _____ <i>Descontar peso da roupa extra!</i>					peso
81. Altura (cm): _____					altura
82. Pressão arterial sistólica:					pasist
83. Pressão arterial diastólica:					padiast
84. Frequência cardíaca:					fcard
85. Icterícia: (0) Ausente (1) 1+ (2) 2++ (3) 3+++ (4) 4++++					ictericia
86. Fala arrastada	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN		fala
87. Sonolência	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN		sono
88. Desatenção	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN		desatencao
89. Flapping	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN		flapping
90. Encefalopatia hepática (Critérios de West Haven): (0) Ausente – Nenhuma anormalidade detectada.					encef_atu

<p>(1) Grau 1 – falta atenção, euforia, ansiedade, desempenho prejudicado.</p> <p>(2) Grau 2 – Flapping; letargia, desorientação leve tempo e espaço, mudança súbita personalidade.</p> <p>(3) Grau 3 – Flapping; sonolento, mas responsivo a estímulos, confusão e desorientação importante.</p> <p>(4) Grau 4 – coma.</p>	
---	--

<b>Dados complementares de prontuário</b>				
Etiologia da doença hepática crônica (marcar mais de uma se presente)				
91. Hepatite B	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hep_b
92. Hepatite C	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hep_c
93. Álcool	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	alcool_etiol
94. Hepatite auto-imune	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hep_ai
95. Cirrose biliar primária	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	cbp
96. Colangite esclerosante primária	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	cep
97. Hemocomatose	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hemocr
98. Esteatohepatite não-alcoólica	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	nash
99. Criptogênica	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	cripto_etiol
100. Outra:				outra_etiol
Hepatocarcinoma:				
101. Diagnóstico HCC?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hcc
Endoscopia digestiva alta:				
102. Data última EDA:     /     /				data_eda
103. Varizes esôfago	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	varesof_eda
104. Varizes gástricas	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	vargastr_eda
105. Gastropatia hipertensiva portal	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	gastrop_eda
Hipertensão portal (no caso de ausência de indícios na EDA)				
106. Outros indícios de hipertensão portal em exame de imagem (USG/TC/RM)?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hipert_imag

<b>Diagnóstico de cirrose hepática (Hipertensão portal = varizes de esôfago/gástricas OU ascite com GASA <math>\geq</math> 1,1 OU exame de imagem sugestivo)</b>	
107. Critérios para diagnóstico da cirrose hepática (no caso de mais de uma resposta, escolha o menor número): <p>(0) Biópsia hepática mostrando cirrose</p> <p>(1) Hipertensão portal + exame de imagem sugestivo de cirrose</p> <p>(2) Hipertensão portal + estigmas clínicos de insuficiência hepática crônica</p> <p>(3) Hipertensão portal + alterações laboratoriais sugestivas de cirrose</p> <p>(4) Outro</p>	diagn_cirrose
108. Especificar outro critério diagnóstico:	outrocrit_cirrose

**Exames Laboratoriais: resultados obtidos do sistema do laboratório do HU.**

Fonte: Elaborada pelo autor e colaboradores (2018).

## APÊNDICE B – Instrumento de Coleta de Dados do Grupo Ambulatório

### AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNE DE PACIENTES COM CIRROSE HEPÁTICA PACIENTES DO AMBULATÓRIO

<b>Dados de identificação e contato</b>	
1. Nome:	nome
2. Número do prontuário:	num_pront
3. Data da avaliação: ____ / ____ / ____	data_aval
4. Data de nascimento: ____ / ____ / ____	data_nasc
5. Telefone residencial: (____)	tel_resid
6. Telefone celular: (____)	tel_celular
7. Outro telefone de contato 1: (____)	tel_contato1
8. Nome da pessoa de contato 2: (____)	nome_contato1
9. Outro telefone de contato 2: (____)	tel_contato2
10. Nome da pessoa de contato 2: (____)	nome_contato2

<b>CrITÉRIOS exclusÃO</b>			
11. Incluído no estudo?	(0) Não	(1) Sim	incluido
12. Motivo da exclusão:			motivo_excl
(7) Diagnóstico duvidoso de cirrose (8) Diagnóstico de hepatocarcinoma (9) Uso de interferon nos últimos 30 dias (10) Limitação da capacidade de compreensão (11) Recusa			

<b>Características sócias demográficas</b>	
13. Idade: ____ anos	idade
14. Sexo: (2) Feminino (3) Masculino	sexo
15. Cor da pele/raça (conforme observado pelo pesquisador): (6) Branca (7) Parda (8) Negra (9) Amarela (10) Indígena (11) IGN	cor_pele

<b>Comorbidades</b>				
<i>Algum médico já disse que o senhor tem ou teve:</i>				
<b>(complementar com dados do prontuário)</b>				
17. Pressão alta	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	has
18. Diabetes	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	diabetes
19. AIDS/HIV	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hiv
20. Asma	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	asma
21. Enfisema ou bronquite crônica (DPOC)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	dpoc

22. Infarto do miocárdio	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	iam
23. Angina	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	angina
24. Derrame (AVC)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	avc
25. Colesterol alto	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	dislipidemia
26. Insuficiência cardíaca congestiva (ICC)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	icc
27. Insuficiência renal	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	insuf renal
28. Hipotireoidismo	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hipotir
29. Osteoporose ou osteopenia	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	osteop
30. Artrite reumatóide	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	artrite
31. Lupus	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	lupus
32. Depressão	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	depressao
33. Tuberculose	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	tuberc
<b>Medicações (complementar com dados do prontuário)</b>				
<b><i>O senhor faz uso regular de alguma das medicações abaixo?</i></b>				
34. Propranolol Dose: _____ mg/d	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	proprano dose proprano
35. Espironolactona Dose: _____ mg/d	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	espiro dose_espiro
36. Furosemida Dose: _____ mg/d	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	furo dose_furo
37. Lactulose Dose: _____ ml/d	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	lactulose dose lactulose
38. Norfloxacin Dose: _____ mg/d	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	norflox dose_norflox
44. Remédio oral para diabetes Qual? _____	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hipoglicem qual_hipogl
45. Insulina	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	insulina
47. Remédio para colesterol alto (estatinas)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	estatinas
<b><i>Quais outras medicações o senhor fez uso regular nos últimos 30 dias (anotar os nomes):</i></b>				
				med1
				med2
				med3
				med4
				med5
				med6
				med7
				med8

**Hábitos de vida – Consumo de álcool**

48. O Sr. (a) tem ou já teve o hábito de beber bebidas alcoólicas? (3) Não tenho e nunca bebi - pule para a pergunta nº 56 (4) Já bebi, mas parei há mais de 30 dias - pule para a pergunta nº 52 (5) Ainda bebo – continue abaixo	etilismo
---	----------

**Etilismo atual**

49. Há quantos anos o Sr. (a) começou a beber? _____ anos	dur_etilismoatu
50. Com que frequência em média o(a) Sr.(a) toma bebidas alcoólicas? (0) Menos que uma vez ao mês (1) Uma vez ao mês (2) Duas vezes ao mês (3) Uma vez por semana (4) Duas vezes por semana (5) Três vezes por semana (6) Quatro vezes por semana (7) Cinco vezes por semana (8) Seis vezes por semana (9) Todos os dias (10) NSA (99) IGN	freq_etilismoatu
51. Quanto de álcool o(a) Sr.(a) toma normalmente ao beber por vez? (ver quadro de equivalência de dose padrão abaixo) Bebida: ( ) Cerveja; volume em ml _____ ( ) Vinho ou champanhe; volume em ml _____ ( ) Destilado (aguardente; whisky; vodca; gim; etc); volume em ml _____ <b>Quantidade ingerida por semana após conversão em gramas: _____ g/sem</b>	dose_alcoolatu
<b>Etilismo prévio</b>	
52. Há quantos meses o Sr. (a) parou de beber completamente? _____ meses	tempo_abst
53. Por quantos anos o Sr. (a) consumiu bebidas alcoólicas? _____ anos	dur_etilismoprev
54. Com que frequência em média o(a) Sr.(a) tinha o hábito de tomar bebidas alcoólicas? (1) Mensalmente ou menos (2) Uma vez ao mês (3) Duas vezes ao mês (4) Uma vez por semana (5) Duas vezes por semana (6) Três vezes por semana (7) Quatro vezes por semana (8) Cinco vezes por semana (9) Seis vezes por semana (10) Todos os dias (11) NSA (99) IGN	freq_etilismoprev
55. Quanto de álcool o(a) Sr.(a) toma normalmente ao beber por vez? (ver quadro de equivalência de dose padrão abaixo) Bebida: ( ) Cerveja; volume em ml _____ ( ) Vinho ou champanhe; volume em ml _____ ( ) Destilado (aguardente; whisky; vodca; gim; etc); volume em ml _____	dose_alcoolprev

<b>Quantidade ingerida por semana após conversão em gramas:</b> _____ <b>g/sem</b>	
--	--

**TABAGISMO** \_\_\_ SIM \_\_\_ EX \_\_\_ NÃO

<b>Complicações prévias da cirrose hepática</b> <i>O senhor tem ou já teve algum dos problemas abaixo?</i> <b>(complementar com dados do prontuário)</b>				
63. Água na barriga (ascite)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	ascite_prev
64. Retirou líquido da barriga (paracentese)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	paracent_prev
65. Vômitos com sangue/hemorragia digestiva	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hda_prev
66. Internação por confusão mental (encefalopatia)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	encef_prev
67. Internação por infecção no líquido da barriga (PBE)	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	pbe_prev
68. Internação por complicações da cirrose	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	interna_prev
69. Data primeira internação (mês/ano): _____ / _____				data_intern

<b>Dados complementares de exame físico</b>				
103. Pressão arterial sistólica:				pasist
104. Pressão arterial diastólica:				padiast
105. Frequência cardíaca:				fcard
106. Saturação de oxigênio (paciente de pé):				sao2
107. Icterícia: (5) Ausente (6) 1+ (7) 2++ (8) 3+++ (9) 4++++				ictericia
108. Fala arrastada	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	fala
109. Sonolência	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	sono
110. Desatenção	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	desatencao
111. Flapping	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	flapping
112. Encefalopatia hepática (Critérios de West Haven): (5) Ausente – Nenhuma anormalidade detectada. (6) Grau 1 – falta atenção, euforia, ansiedade, desempenho prejudicado. (7) Grau 2 – Flapping; letargia, desorientação leve tempo e espaço, mudança súbita personalidade. (8) Grau 3 – Flapping; sonolento, mas responsivo a estímulos, confusão e desorientação importante. (9) Grau 4 – coma.				encef_atu

<b>Dados de antropometria</b>	
113. Peso (kg): _____ <i>Descontar peso da roupa extra!</i>	peso

114. Peso seco estimado: _____	peso_seco
115. IMC (peso seco): _____ kg/m <sup>2</sup>	imc_pesoseco

<b>Dados complementares de prontuário</b>				
Etiologia da doença hepática crônica (marcar mais de uma se presente)				
127. Hepatite B	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hep_b
128. Hepatite C	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hep_c
129. Alcool	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	alcool_etiol
130. Hepatite auto-imune	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hep_ai
131. Cirrose biliar primária	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	cbp
132. Colangite esclerosante primária	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	cep
133. Hemocomatose	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hemocr
134. Esteatohepatite não-alcoólica	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	nash
135. Criptogênica	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	cripto_etiol
136. Outra: _____				outra_etiol
Hepatocarcinoma:				
137. Diagnóstico HCC?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hcc
Endoscopia digestiva alta:				
138. Data última EDA: _____ / _____ / _____				data_eda
139. Varizes esôfago	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	varesof_eda
140. Varizes gástricas	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	vargastr_eda
141. Gastropatia hipertensiva portal	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	gastrop_eda
Hipertensão portal (no caso de ausência de indícios na EDA)				
142. Outros indícios de hipertensão portal em exame de imagem (USG/TC/RM)?	(0) Não	(1) Sim	(9) IGN	hipert_imag

<b>Diagnóstico de cirrose hepática (Hipertensão portal = varizes de esôfago/gástricas OU ascite com GASA <math>\geq</math> 1,1 OU exame de imagem sugestivo)</b>	
143. Critérios para diagnóstico da cirrose hepática (no caso de mais de uma resposta, escolha o menor número): (5) Biópsia hepática mostrando cirrose (6) Hipertensão portal + exame de imagem sugestivo de cirrose (7) Hipertensão portal + estigmas clínicos de insuficiência hepática crônica (8) Hipertensão portal + alterações laboratoriais sugestivas de cirrose (9) Outro	diagn_cirrose
144. Especificar outro critério diagnóstico: _____	outrocrit_cirrose
<b>Exames Laboratoriais: resultados obtidos do sistema do laboratório do HU.</b>	

Fonte: Elaborada pelo autor e colaboradores (2019).





**APÊNDICE C – Questionário aplicado aos controles saudáveis****QUESTIONÁRIO CONTROLES SAUDÁVEIS**

- 1) **Você tem ou já teve alguma doença hepática (no fígado)?**
  - a. Não
  - b. Sim (    ) hepatite viral (hepatite A, B ou C)  
(    ) esteatose hepática (gordura no fígado)  
(    ) cirrose  
(    ) outra: \_\_\_\_\_
  
- 2) **Você está tomando antibiótico ou teve infecção nos últimos 7 (sete) dias?**
  - a. Não
  - b. Sim
  
- 3) **Você está tomando medicamento imunossupressor? Ex: Azatioprina (Imuram), Tacrolimo (Prograf, Tarfic e Tacrofort), Ciclosporina (Sandimmun e Sigmasporim), Prednisona (Meticorten, Artinizona, Corticorten, Flamacorten, Predson, Prednax, Prednis, Predcort e Precortil), Micofenolato de sódio (Myfortic), Micofenolato mofetil (Cellcept), Everolimo (Certican), Sirolimo (Rapamune).**
  - a. Não
  - b. Sim
  
- 4) **Você tem diabetes?**
  - a. Não
  - b. Sim
  - c. Não sei
  
- 5) **Você tem alguma doença autoimune ou doença inflamatória crônica? (ex: artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, doença celíaca, esclerose múltipla, doença de Crohn, asma e sinusite crônica)**
  - a. Não
  - b. Sim
  - c. Não sei
  
- 6) **Você está se sentindo gripado/resfriado (a) ou com febre?**
  - a. Não
  - b. Sim



**APÊNDICE D – Protocolo de marcação de superfície e intracitoplasmática (fator de transcrição)**

**Tubos 1, 2, 3, 4 e 6**

1. Homogeneizar completamente a amostra de sangue-periférico (SP) com EDTA;
2. Identificar 5 tubos de poliestireno de 5 mL com as iniciais do paciente e os números 1, 2, 3, 4 e 6, além de um tubo identificado com as iniciais do paciente e a letra B (Branco);
3. Adicionar 30 uL de SP e 70uL de PBS ao tubo B;
4. Adicionar 300 uL de SP a um tubo Falcon de 15 mL para as lavagens do Tubo 1 (em caso de avaliação das cadeias leves de imunoglobulinas); ou adicionar diretamente 200 uL de SP ao tubo de poliestireno de 5 mL identificado com 1 (em caso de não avaliar as cadeias leves de imunoglobulinas);
5. Adicionar 200-300 uL (de acordo com a Tabela 1) de SP aos Tubos 2, 3 e 4;
6. Adicionar 200-300 uL (de acordo com a Tabela 2) de SP ao Tubo 6.

Tabela 1. Volume de sangue periférico de acordo com a contagem absoluta de linfócitos (hemograma).

<b>Linfócitos/mm<sup>3</sup></b>	<b>Volume de sangue total em EDTA</b>
<b>Até 1.000</b>	300 uL
<b>1.000 a 1.500</b>	280 uL
<b>1.501 a 2.500</b>	250 uL
<b>Mais de 2.500</b>	200 uL

Tabela 2. Volume de sangue periférico de acordo com a contagem absoluta de leucócitos (hemograma).

<b>Leucócitos/mm<sup>3</sup></b>	<b>Volume de sangue total em EDTA</b>
<b>Até 4.000</b>	300 uL
<b>4.000 a 5.000</b>	280 uL
<b>5.001 a 7.000</b>	250 uL
<b>Mais de 7.000</b>	200 uL

**Procedimento inicial quando o Tubo 1 incluir a marcação das cadeias leves de imunoglobulinas (I $\mu$ κ e I $\mu$ λ)**

1. Preencher o Tubo Falcon contendo 300 uL de SP com PBS BSA 0,2%;
2. Homogeneizar por inversão;
3. Centrifugar por 5 minutos a 2.000 rpm;
4. Remover o sobrenadante com uma pipeta Pasteur cuidadosamente;

5. Repetir os passos 1-4 mais duas vezes (três lavagens no total);
6. Após a última centrifugação, ressuspender o pellet com 100 uL de PBS BSA 0,2% e transferir o volume para o tubo de 5 mL identificado com 1.

#### **Marcação de superfície (Tubos B, 1, 2, 3 e 6)**

1. Pipetar os anticorpos monoclonais, de acordo com o painel, nos tubos com SP;
2. Homogeneizar em vórtex;
3. Incubar por 30 minutos no escuro e temperatura ambiente;
4. Adicionar 2 mL de solução lisante de hemácias, homogeneizar em vórtex;
5. Incubar por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente;
6. Centrifugar 5 minutos a 2.000 rpm;
7. Remover o sobrenadante com pipeta Pasteur e ressuspender a amostra em 2 mL de PBS;
8. Centrifugar 5 minutos a 2.000 rpm;
9. Remover o sobrenadante com pipeta Pasteur e ressuspender a amostra em 300 uL de PBS;
10. Adquirir imediatamente no citômetro ou manter em geladeira por no máximo 1 hora até a aquisição.

#### **Aquisição dos dados dos tubos B, 1, 2, 3 e 6**

1. Para o Tubo B: guardar 10.000 eventos totais
2. Para o Tubo 1: guardar 200.000 eventos totais
3. Para os Tubos 2 e 3: guardar 40.000 a 100.000 eventos CD3<sup>+</sup> (stopping gate)
4. Para o Tubo 6: guardar de 500.000 a 1.000.000 eventos CD45<sup>+</sup> (stopping gate)

#### **Marcação intracelular de fator de transcrição – Tubo 4**

Preparar as soluções 1x Fix/Perm Buffer e 1x Perm/Wash Buffer. Homogeneizar os 3 frascos de reagentes por inversão antes da preparação.

- Fix/Perm Buffer (concentração 4x). Deve-se diluir dessa forma: 3 partes de Diluent Buffer e 1 parte de Fix/Perm Buffer de acordo com a Tabela 1. Para 1 amostra, precisa de 1 mL.
- Perm/Wash Buffer (concentração 5x). Deve-se diluir dessa forma: 4 partes de água destilada e 1 parte de Perm/Wash Buffer de acordo com a Tabela 2. Para 1 amostra, precisa de cerca de 7,5 mL.

Tabela 1. Diluição do Fix/Perm Buffer

	<b>Diluent Buffer</b>	<b>Fix/Perm Buffer</b>
<b>1 amostra</b>	750 uL	250 uL
<b>2 amostras</b>	1.500 uL	500 uL
<b>3 amostras</b>	2.250 uL	750uL

Tabela 2. Diluição do Perm/Wash Buffer

	Água destilada	Perm/Wash Buffer
<b>1 amostra</b>	6,0 mL	1,5 mL
<b>2 amostras</b>	12,0 mL	3,0 mL
<b>3 amostras</b>	16,0 mL	4,0 mL

Observação: Após o preparo, manter as soluções em geladeira.

1. Pipetar os anticorpos monoclonais de superfície (todos, exceto o FoxP3) no Tubo 4 com o SP;
2. Homogeneizar em vórtex;
3. Incubar por 30 minutos na geladeira (escuro, 2-8°C);
4. Adicionar 1 mL de **PBS frio**, homogeneizar em vórtex e centrifugar 5 min a 2.000 rpm;
5. Remover o sobrenadante, soltar o pellet passando no vórtex, e ressuspender o pellet em 1 mL da solução **Fix/Perm Buffer (1x)**, passar no vórtex novamente;
6. Incubar por 40 minutos na geladeira (escuro, 2-8°C);
7. Adicionar 1 mL da solução **Perm/Wash (1x)**, homogeneizar em vórtex e centrifugar 6 min a 2.000 rpm a 2-8°C;
8. Remover o sobrenadante, soltar o pellet passando no vórtex, e ressuspender o pellet em 2 mL da solução **Perm/Wash Buffer (1x)**, passar no vórtex novamente;
9. Centrifugar 6 min a 2000 rpm a 2-8°C. Remover o sobrenadante;
10. Ressuspender o pellet em 100 uL de **Perm/Wash Buffer (1x)**, homogeneizar em vórtex, e pipetar o anticorpo monoclonal intracelular (**FoxP3**), homogeneizar em vórtex;
11. Incubar por 40 minutos na geladeira (escuro, 2-8°C);
12. Adicionar 2 mL da solução **Perm/Wash (1x)**, homogeneizar por inversão e centrifugar 6 min a 2.000 rpm a 2-8°C;
13. Remover o sobrenadante;
14. Adicionar 2 mL da solução **Perm/Wash (1x)**, homogeneizar por inversão e centrifugar 6 min a 2.000 rpm a 2-8°C;
15. Remover o sobrenadante e ressuspender o pellet com 300 uL de PBS, homogeneizar em vórtex;
16. Adquirir imediatamente no citômetro ou manter em geladeira por no máximo 1 hora até a aquisição.

#### **Aquisição dos dados do tubo 4**

Guardar 40.000 a 100.000 eventos CD3<sup>+</sup> (stopping gate).

Fonte: Elaborada pelo autor (2017).



## APÊNDICE E – Protocolo de separação das células mononucleares (PBMC)

### Tubo 5

Enquanto os tubos 1, 2, 3, 4 e 6 estão incubando com o anticorpo, centrifugar o restante da amostra por 10 minutos a 4.400 rpm a fim de separar o plasma. Antes de retirar o plasma, fazer uma marca no tubo onde está o volume total. Dividir o volume de plasma em dois microtubos (criotubos) de 2mL devidamente identificados para armazenar em freezer -80°C. Adicionar PBS na mesma quantidade removida de plasma e homogeneizar por inversão.

#### Separação das PBMC:

1. Pipetar 2 mL de Ficoll-Hypaque a um tubo de poliestireno de 5mL identificado e deixar atingir a temperatura ambiente;
2. Em um outro tubo misturar 1,5 mL de sangue total (sem plasma, com PBS) a 0,5 mL de PBS;
3. Pipetar essa mistura sobre o Ficoll com uma pipeta Pasteur, cuidar para não misturar;
4. Centrifugar por 30 minutos a 2.000 rpm;
5. Remover e descartar a camada superior, coletar o “anel” que contém as PBMC com uma pipeta Pasteur e transferir para outro tubo de 5mL identificado;
6. Adicionar PBS até quase encher o tubo (volume final cerca de 4 mL), homogeneizar por inversão e centrifugar 5 minutos a 2.000 rpm;
7. Ressuspender o pellet com 100 uL de PBS;
8. Proceder a marcação do **Tubo 5** (marcação de superfície – protocolo Apêndice D);

#### Aquisição dos dados do tubo 5

Guardar 10.000 a 50.000 eventos CD19<sup>+</sup> (stopping gate).

Fonte: Elaborada pelo autor (2017).





## APÊNDICE F – Protocolo de marcação de citocinas (CBA)

- 1. Preparar os padrões de citocinas (incubação de 15 minutos)**
  - 1.1. Os padrões vêm liofilizados e devem ser reconstituídos e diluídos
  - 1.2. Abra um frasco de padrão Th1/Th2/Th17 (C)
  - 1.3. Transfira as esferas para um falcon de 15 mL, rotule como “Top Standard”
  - 1.4. Adicione 2 mL de Assay Diluent (G), deixe essa mistura por 15 minutos a T.A.
  - 1.5. Homogenize apenas com a ponteira (não passe no vórtex)
  - 1.6. Rotule tubos 12 x 75 mm tubos e coloque-os na seguinte ordem: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256
  - 1.7. Pipete 300 uL de Assay Diluent (G) em cada um dos tubos
  - 1.8. Faça as diluições seriadas: Transfira 300 uL do “Top Standard” para o tubo 1:2 e misture com a pipeta. Continue fazendo as diluições seriadas transferindo sempre 300uL para o tubo seguinte até chegar no último tubo (1:256)
  - 1.9. Prepare mais um tubo 12 x 75 mm com apenas Assay Diluent (G) (300 uL) para servir como controle negativo (0 pg/mL).
  
- 2. Misturar as “Capture Beads” (incubação de 30 minutos)**
  - 2.1. Determine o número de tubos que serão feitos no ensaio (incluindo padrões e controle)
  - 2.2. Misture cada frasco de “Capture Bead” no vórtex vigorosamente por 3 - 5 segundos exatamente antes de pegar a alíquota (A1-A7)
  - 2.3. Adicionar 10 uL de cada “Capture Bead” para cada tubo a ser analisado em um tubo rotulado como “mixed Capture Beads” = ex: 10uL de IL-2 Capture Beads x 18 = 180 uL de IL-2 Capture Beads. Fazer isso para todas as citocinas que for usar
  - 2.4. Misture o tubo “mixed Capture Beads” completamente
  - 2.5. Centrifugue o tubo “mixed Capture Beads” a 200g (1.400 rpm) por 5 minutos
  - 2.6. Marque o volume total no tubo, aspire e descarte o sobrenadante
  - 2.7. Ressuspenda o pellet com Serum Enhancement Buffer (mesmo volume que foi retirado de sobrenadante) e misture completamente
  - 2.8. Incube por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente.
  
- 3. Diluir as amostras, se necessário**
  - 3.1. Diluir amostras com conteúdo de citocinas muito elevado .
  
- 4. Realizar o ensaio (tempo de duração: 3 horas)**
  - 4.1. Passe no vórtex o tubo “mixed Capture Beads” e adicione 50uL em cada tubo do ensaio
  - 4.2. Adicione 50 uL das diluições Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Standard aos tubos controle seguindo a tabela do manual (Página 24). Rotule os tubos de 1 a 10. Sendo que o 1 será o controle negativo, o 2 será a diluição 1:256 (20 pg/mL,) (...), o 9 será a diluição 1:2 e o 10 será o Top Standard (5.000 pg/mL)

- 4.3. Adicione 50 uL de soro/plasma em cada tubo de amostra devidamente rotulados
- 4.4. Adicione 50 uL de “Human Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent” (B) a todos os tubos do ensaio
- 4.5. Homogeneizar em vórtex
- 4.6. Incube por **3 horas** no escuro à temperatura ambiente
- 4.7. Nesse momento, recomenda-se fazer o Cytometer Setup (item 5)
- 4.8. Após a incubação, adicione 1mL de Wash Buffer (F) em cada tubo do ensaio e centrifugue a 200g (1.400 rpm) por 5 minutos
- 4.9. Aspire e descarte o sobrenadante
- 4.10. Adicione 200uL de Wash Buffer (F) a cada tubo e ressuspenda o pellet (vortex) – passar no vórtex cada tubo novamente antes de adquirir.

**5. Fazer a Instrument Setup com as Cytometer Setup Beads – pode ser feito durante a incubação de 3 horas**

- 5.1. 1 tubo contendo 100uL cytometer setup beads (D) + 400uL wash buffer (F). Adquirir em LOW/MED.
- 5.2. Ajustar FSC e SSC para as beads ficarem dentro de P1. Seguir instruções do protocolo da BD. Ao final: botão direito no cytometer settings: “Save to Catalog” – nomear a calibração. Anotar as voltagens.

**6. Adquirir as amostras ([bdbiosciences.com/cbasetup](http://bdbiosciences.com/cbasetup))**

- 6.1. Passar novamente o tubo com as cytometer setup beads apenas para ficar salvo (CBA tube)
- 6.2. Criar vários tubos e nomeá-los (controles, pacientes, etc)
- 6.3. Começar com a curva pelo tubo menos concentrado (0 pg/mL) até o mais concentrado (5.000pg/mL)
- 6.4. Em seguida, passar as amostras
- 6.5. Esses tubos podem ser adquiridos em HIGH. Definir 400 eventos de P1 por citocina (exemplo:  $400 \times 7 = 2.800$  = arredondar para 3.000 eventos de P1 por tubo). Salvar apenas os eventos em P1 (P1 = storage e P1 = stopping).

**7. Análise dos dados (FCAP Array Software)**

- 7.1. Exportar como 2.0 (all events selecionado) em uma única pasta.

## APÊNDICE G – Informações técnicas dos reagentes

Quadro 1. Informações técnicas dos anticorpos monoclonais.

Marcador	Fluorocromo	Clone	Fornecedor	Nº catálogo	µL/teste
CD3	APC	UCHT1	BD Bioscience	555335	5
CD3	APCH7	SK7	BD Bioscience	557832	5
CD3	PacB	UCHT1	Exbio	PB-514-T100	1
CD4	PerCP Cy5-5	MEM-241	Exbio	PC-359-T100	1
CD4	BV421	RP4-T4	BD Bioscience	562424	2
CD5	PerCP Cy5-5	L17F12	BD Bioscience	341089	5
CD8	FITC	B9.11	Beckman Coulter	A07756	3
CD8	APCH7	SK1	BD Bioscience	557834	2
CD10	PECy7	HI10A	BD Bioscience	341092	3
CD11c	PerCP Cy5-5	BU15	Exbio	T9-529-T100	1
CD14	APC	MφP9	BD Bioscience	345787	2
CD16	FITC	3G8	Beckman Coulter	IM0814U	7
CD19	PECy7	J3-119	Beckman Coulter	IM3628	2
CD19	APCH7	HIB19	Biologend	302218	1
CD20	APCH7	2H7	BD Bioscience	560853	1
CD20	PacB	L27	BD Bioscience	642274	2
CD24	PE	ML5	BD Bioscience	555428	10
CD25	PE	M-A251	BD Bioscience	555432	10
CD27	PerCP Cy5-5	M-T271	BD Bioscience	560612	2
CD28	PE	CD28.2	BD Bioscience	555729	7
CD38	APCH7	HB7	BD Bioscience	656646	2
CD45	PacO	HI30	BD Bioscience	560777	1
CD45 RA	PECy7	HI100	BD Bioscience	560675	3
CD56	PE	N901 (NKH-1)	Beckman Coulter	A07788	10
CD57	FITC	HNK-1	BD Bioscience	333169	15
CD62L	FITC	LT-TD180	Exbio	1F-449-T100	15
CD123	PE	7G3	BD Bioscience	554529	3
CD127	FITC	HIL-7R-M21	BD Bioscience	560549	5
CD197 (CCR7)	PE	G043H7	Biologend	353204	15
FoxP3	AF647	236A/E7	BD Bioscience	561184	7
HLA-DR	PacB	L243	BD Bioscience	642276	2
IgD	FITC	IADB6	Beckman Coulter	B30652	5
Igκ	PE	G20-193	BD Bioscience	555792	15
Igλ	FITC	JDC-12	BD Bioscience	555796	7
IgM	APC	G20-127	BD Bioscience	551062	10
TCR γδ	PECy7	11F2	BD Bioscience	655410	2

APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PacO: Pacific Orange/V500; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína; Ig: imunoglobulina; Lin: linhagem. \*CD4 está conjugado a brilliant violet 421 (BV421) e FoxP3 com Alexa Fluor 647 (AF647).

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).



## APÊNDICE H – Custo do painel proposto.

Tabela 1. Custo do painel.

	Marcador	Fluorocromo	Valor 100 testes (R\$)	Valor por teste* (uL/teste)	VOLUME utilizado pós titulação (µL/teste)	Valor por teste após titulação (R\$)	Fator de multiplicação **	Valor final por teste (R\$)
1	<b>CD3</b>	APC	1.469,00	14,69	5	3,68	3	11,04
2	<b>CD3</b>	APCH7	768,00	7,68	5	7,68	1	7,68
3	<b>CD3</b>	PacB	1.980,00	19,80	1	3,96	1	3,96
4	<b>CD4</b>	PerCP Cy5-5	2.700,00	27,00	1	6,75	3	20,25
5	<b>CD4</b>	BV421	1.506,00	15,06	2	3,76	1	3,76
6	<b>CD5</b>	PerCP Cy5-5	2.536,00	25,36	5	6,34	1	6,34
7	<b>CD8</b>	FITC	1.408,00	14,08	3	2,11	1	2,11
8	<b>CD8</b>	APCH7	994,00	9,94	2	3,98	3	11,94
9	<b>CD10</b>	PECy7	1.742,00	17,42	3	10,43	1	10,43
10	<b>CD11c</b>	PerCP Cy5-5	2.700,00	27,00	1	6,75	1	6,75
11	<b>CD14</b>	APC	2.482,70	24,83	2	9,93	1	9,93
12	<b>CD16</b>	FITC	1.223,00	12,23	7	4,27	1	4,27
13	<b>CD19</b>	PECy7	2.261,00	22,61	2	2,26	2	4,52
14	<b>CD19</b>	APCH7	884,00	8,84	1	1,77	1	1,77
15	<b>CD20</b>	APCH7	949,91	9,50	1	1,90	1	1,90
16	<b>CD20</b>	PacB	890,00	8,90	2	3,56	2	7,12
17	<b>CD24</b>	PE	1.333,73	13,34	10	6,67	1	6,67
18	<b>CD25</b>	PE	1.301,00	13,01	10	6,50	1	6,50
19	<b>CD27</b>	PerCP Cy5-5	1.448,00	14,48	2	5,79	1	5,79
20	<b>CD28</b>	PE	1.363,00	13,63	7	4,77	1	4,77
21	<b>CD38</b>	APCH7	2.822,00	28,22	2	11,29	2	22,58
22	<b>CD45</b>	PacO	1.865,00	18,65	1	3,73	6	22,38
23	<b>CD45 RA</b>	PECy7	1.530,00	15,30	3	9,16	3	27,48
24	<b>CD56</b>	PE	1.799,00	17,99	10	9,00	1	9,00
25	<b>CD57</b>	FITC	1.081,00	10,81	15	8,28	1	8,28
26	<b>CD62L</b>	FITC	1.620,00	16,20	15	12,18	1	12,18
27	<b>CD123</b>	PE	1.028,45	10,28	3	6,16	1	6,16
28	<b>CD127</b>	FITC	569,94	5,70	5	1,42	1	1,42
29	<b>CD197 (CCR7)</b>	PE	2.303,00	23,03	15	17,32	1	17,32
30	<b>FoxP3</b>	AF647	940,52	9,40	7	3,29	1	3,29
31	<b>HLA-DR</b>	PacB	880,00	8,80	2	3,52	3	10,56
32	<b>IgD</b>	FITC	760,00	7,60	5	1,90	1	1,90
33	<b>Igκ</b>	PE	2.728,00	27,28	15	20,51	1	20,51
34	<b>Igλ</b>	FITC	3.568,00	35,68	7	12,46	1	12,46
35	<b>IgM</b>	APC	1.615,00	16,15	10	8,08	1	8,08
36	<b>TCR γδ</b>	PECy7	2.519,00	25,19	2	10,08	1	10,08
<b>VALOR TOTAL ANTICORPOS MONOCLONAIS (R\$):</b>								<b>331,18</b>
<b>Solução lisante para uma amostra (R\$)</b>								<b>16,71</b>
<b>Solução Transcription Factor Buffer para uma amostra (R\$)</b>								<b>8,50</b>
<b>Ficoll-Hypaque para uma amostra (R\$)</b>								<b>2,56</b>
<b>VALOR TOTAL (R\$):</b>								<b>358,95</b>

Fonte: Elaborada pelo autor (2020). AF647: alexa fluor 647; APC: allophycocyanin; APCH7: allophycocyanin H7; BV421: brilliant violet 421; FITC: fluorescein isothiocyanate; PacB: pacific blue/V450; PacO: pacific Orange/V500; PE: phycoerythrin; PECy7: phycoerythrin Cy7; PerCP Cy5-5: peridinin chlorophyll protein; Ig: immunoglobulin. \* com volume sugerido na bula. \*\*quantas vezes o anticorpo monoclonal é utilizado no painel. Fonte: Elaborada pelo autor (2020).



**APÊNDICE I – Frequências das células imune circulantes caracterizadas por cada tubo em 30 controles saudáveis.**

Tabela 1. Valores relativos (em porcentagem) das células imune circulantes.

30 indivíduos saudáveis					
Média de idade: 50,90 ± 10,25 anos; 20 homens e 10 mulheres					
Tubo	Subtipo celular	Média	DP	Mediana	Intervalo
1	Neutrófilos	61,98	8,23	60,94	44,42 – 77,25
1	Monócitos	7,27	1,55	7,31	4,45 – 11,14
1	Eosinófilos	2,58	1,84	1,94	0,36 – 8,70
1	Basófilos	0,70	0,29	0,60	0,25 – 1,36
1	Linfócitos	27,46	7,94	27,65	12,14 – 45,25
1	Linfócitos T	16,96	6,13	15,47	8,84 – 34,69
1	T CD4+	9,87	3,95	9,39	4,15 – 19,55
1	T CD8+	5,82	2,58	5,08	2,36 – 13,65
1	T $\gamma\delta^+$	0,95	0,63	0,84	0,07 – 2,66
1	T DP	0,21	0,25	0,12	0,04 – 1,10
1	T DN (T $\gamma\delta^-$ )	0,11	0,05	0,11	0,03 – 0,26
1	Células B	3,61	2,02	3,21	1,14 – 10,71
1	Linfócitos B maduros	2,96	1,40	2,68	1,05 – 6,08
1	Plasmablastos	0,02	0,02	0,02	0,00 – 0,06
1	Células NK	5,50	2,91	5,34	1,22 – 12,46
1	NK CD56 <sup>++</sup>	0,16	0,11	0,16	0,02 – 0,53
1	NK CD5 <sup>fraco</sup>	0,40	1,16	0,05	0,00 – 5,98
1	Células NKT	1,39	1,17	0,90	0,29 – 4,29
1	Razão N/L	2,58	1,24	2,22	0,98 – 6,30
1	Razão T CD4+/CD8+	1,84	0,74	1,70	0,78 – 4,13
2	T CD4+ N (T CD4+)	29,58	8,90	28,60	17,29 – 55,34
2	T CD4+ CM (T CD4+)	38,30	9,29	40,03	17,48 – 57,09
2	T CD4+ EM (T CD4+)	27,38	8,47	26,60	14,05 – 55,75
2	T CD4+ EMRA (T CD4+)	4,72	3,91	3,76	0,66 – 17,42
2	T CD8+ N (T CD8+)	22,69	9,98	21,33	8,73 – 48,78
2	T CD8+ CM (T CD8+)	13,34	6,41	13,05	4,37 – 33,17
2	T CD8+ EM (T CD8+)	30,93	11,53	31,33	8,60 – 61,15
2	T CD8+ EMRA (T CD8+)	32,23	15,39	30,60	5,91 – 68,63
3	T CD4+ HLA-DR+ (T CD4+)	8,77	5,66	7,45	3,13 – 34,76
3	T CD8+ HLA-DR+ (T CD8+)	22,26	11,18	19,10	6,7 – 52,54
3	T CD4+ CD57+ (T CD4+)	5,84	8,34	3,34	0,22 – 45,96
3	T CD8+ CD57+ (T CD8+)	24,66	11,42	25,32	3,21 – 48,91
3	T CD4+ CD28+ (T CD4+)	93,24	9,33	97,36	52,12 – 99,94
3	T CD8+ CD28+ (T CD8+)	60,81	14,09	63,62	37,71 – 89,46
4	T reg (T CD4+)	3,58	1,22	3,55	1,52 – 6,31
4	T reg memória (T CD4+)	2,21	1,01	2,02	0,85 – 5,27
4	CD25+ CD127 <sup>fraco</sup> CD4+ T (T CD4+)	7,40	1,57	7,39	4,30 – 10,59
5	B Pré-CG/naïve (B)	58,51	14,25	59,38	29,27 – 87,23
5	B Naïve (B)	52,84	13,16	55,28	27,25 – 80,35
5	B Transicional (B)	5,66	2,81	5,52	1,83 – 13,91

(continuação)

Tubo	Subtipo celular	Média	DP	Mediana	Intervalo
5	NS-BM (B)	18,03	10,01	16,92	2,95 – 41,70
5	B CS (B)	22,57	8,65	21,53	8,35 – 49,16
5	CS-BM (B)	19,86	8,44	19,30	7,71 – 47,49
5	B DN (B)	2,70	1,78	2,39	0,40 – 7,18
5	Plasmablastos (B)	0,90	0,74	0,63	0,00 – 3,84
6	Neutrófilos maduros	55,45	8,19	55,79	39,57 – 72,87
6	Neutrófilos imaturos	0,16	0,13	0,13	0,02 – 0,68
6	Basófilos	0,68	0,27	0,62	0,23 – 1,27
6	Monócitos	6,90	1,55	6,94	3,76 – 9,69
6	Monócitos clássicos (cMo)	5,85	1,45	5,75	3,16 – 8,67
6	Monócitos intermediários (iMo)	0,40	0,10	0,40	0,22 – 0,68
6	Monócitos não-clássicos (ncMo)	0,66	0,29	0,60	0,19 – 1,25
6	TiMas (iMo + ncMo)	1,06	0,34	1,00	0,46 – 1,86
6	Células dendríticas (DCs)	0,33	0,10	0,31	0,16 – 0,62
6	DCs clássicas (cDCs)	0,23	0,09	0,21	0,11 – 0,56
6	DCs plasmocitoides (pDCs)	0,10	0,36	0,09	0,04 – 0,18
6	Razão cDCs/pDCs	2,63	1,64	2,38	0,83 – 9,00
6	Razão pDCs/cDCs	0,49	0,25	0,42	0,11 – 1,20

DP: duplo positivos; DN: duplo negativos; N: naïve; CM: memória central; EM: memória efetora; EMRA: efetora terminal CD45 RA+; T reg: T regulatória; NS: non-switched; BM: B de memória; CS: class-switched; B reg: B regulatória; TiMas: Macrófagos tissulares. Fonte: Elaborada pelo autor (2018/2019).



## APÊNDICE J – Frequências das células imune circulantes nos grupos do estudo.

Tabela 1. Frequências das células imune circulantes nos em controles saudáveis, pacientes com cirrose estável e pacientes internados por descompensação aguda da cirrose.

Subtipo celular	Controles saudáveis (n=30)		Cirrose estável (n=29)		Descompensação aguda da cirrose (n=39)	
	Média ± DP	Mediana (intervalo)	Média ± DP	Mediana (intervalo)	Média ± DP	Mediana (intervalo)
Neutrófilos (%)	61,98 ± 8,23	60,94 (44,42 – 77,25)	66,59 ± 8,57	66,38 (50,57 – 88,63)	73,29 ± 9,68	74,32 (56,18 – 91,89)
Neutrófilos 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	4,2 ± 1,1	3,8 (2,3 – 6,3)	4,0 ± 1,8	3,8 (1,5 – 9,3)	4,5 ± 2,8	3,7 (0,7 ± 13,3)
Monócitos (%)	7,27 ± 1,55	7,31 (4,45 – 11,14)	7,59 ± 2,63	7,46 (4,44 – 15,05)	8,86 ± 3,17	8,92 (1,92 – 15,36)
Monócitos 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	0,5 ± 0,1	0,4 (0,3 – 0,9)	0,4 ± 0,2	0,4 (0,2 – 0,9)	0,5 ± 0,3	0,4 (0,1 – 1,3)
Eosinófilos (%)	2,58 ± 1,84	1,94 (0,36 – 8,70)	3,47 ± 2,90	2,74 (0,30 – 12,71)	2,77 ± 3,67	1,91 (0,00 – 15,89)
Eosinófilos/mm <sup>3</sup>	169 ± 120	108 (22 – 545)	193 ± 162	120 (22 – 616)	164 ± 176	93 (0 – 617)
Basófilos (%)	0,70 ± 0,29	0,60 (0,25 – 1,36)	0,70 ± 0,36	0,61 (0,22 – 1,95)	0,70 ± 0,46	0,71 (0,09 – 1,74)
Basófilos/mm <sup>3</sup>	46 ± 18	38 (15 – 87)	40 ± 19	36 (10 – 76)	39 ± 39	23 (3 – 206)
Linfócitos (%)	27,46 ± 8,94	27,65 (12,14 – 45,25)	21,60 ± 7,81	20,20 (5,05 – 37,47)	13,75 ± 7,12	14,15 (2,67 – 29,16)
Linfócitos 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	2,1 ± 0,4	2,0 (1,4 – 3,4)	1,5 ± 0,8	1,3 (0,5 – 4,0)	0,9 ± 0,5	0,8 (0,2 – 2,2)
Linfócitos T (%)	16,96 ± 6,13	15,47 (8,84 – 34,69)	13,11 ± 5,15	12,30 (3,77 – 26,70)	8,69 ± 5,15	7,39 (1,75 – 22,62)
Linfócitos T 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	1,1 ± 0,4	1,0 (0,6 – 2,1)	0,8 ± 0,5	0,6 (0,2 – 2,0)	0,5 ± 0,3	0,4 (0,05 – 1,2)
T CD4 <sup>+</sup> %	9,87 ± 3,95	9,39 (4,15 – 19,55)	8,24 ± 2,88	7,82 (1,93 – 14,41)	5,59 ± 3,22	5,37 (1,19 – 14,39)
T CD4 <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup>	643 ± 266	610 (342 – 1.550)	496 ± 286	408 (154 – 1.095)	300 ± 185	300 (37 – 880)
T CD8 <sup>+</sup> %	5,82 ± 2,58	5,08 (2,36 – 13,65)	3,87 ± 2,31	3,32 (0,92 – 10,93)	2,35 ± 1,74	2,23 (0,31 – 7,44)
T CD8 <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup>	383 ± 170	334 (151 – 839)	230 ± 170	165 (45 – 667)	120 ± 79	123 (10 – 281)
T γδ <sup>+</sup> (%)	0,95 ± 0,63	0,84 (0,07 – 2,66)	0,87 ± 0,87	0,62 (0,06 – 4,07)	0,58 ± 0,68	0,39 (0,01 – 3,26)
T γδ <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup>	61 ± 39	59 (4 – 153)	50 ± 37	38 (5 – 167)	30 ± 39	22 (1 – 188)
T DP (%)	0,21 ± 0,25	0,12 (0,04 – 1,10)	0,12 ± 0,10	0,08 (0,00 – 0,33)	0,09 ± 0,11	0,05 (0,00 – 0,54)
T DP/mm <sup>3</sup>	13 ± 15	6 (2 – 71)	7 ± 8	5 (0 – 30)	6 ± 9	2 (0 – 42)
T DN γδ <sup>-</sup> (%)	0,11 ± 0,05	0,11 (0,03 – 0,26)	0,12 ± 0,11	0,08 (0,01 – 0,44)	0,07 ± 0,07	0,05 (0,01 – 0,28)
T DN γδ <sup>-</sup> /mm <sup>3</sup>	8 ± 4	7 (2 – 17)	7 ± 8	5 (1 – 35)	3 ± 3	3 (0 – 17)
Células B (%)	3,61 ± 2,02	3,21 (1,14 – 10,71)	4,16 ± 2,43	4,24 (0,35 – 9,50)	2,67 ± 2,34	2,19 (0,16 – 9,07)
Células B/mm <sup>3</sup>	235 ± 122	223 (73 – 622)	243 ± 181	186 (37 – 702)	130 ± 111	94 (14 – 455)
Linfócitos B (%)	2,96 ± 1,40	2,68 (1,05 – 6,08)	3,56 ± 2,10	3,27 (0,33 – 8,10)	2,24 ± 1,95	1,65 (0,13 – 8,11)
Linfócitos B/mm <sup>3</sup>	194 ± 90	192 (61 – 367)	208 ± 155	160 (35 – 624)	108 ± 92	79 (13 – 366)
Plasmablastos (%)	0,02 ± 0,02	0,02 (0,00 – 0,06)	0,02 ± 0,02	0,01 (0,00 – 0,07)	0,05 ± 0,04	0,03 (0,00 – 0,19)
Plasmablastos/mm <sup>3</sup>	1 ± 1	1 (0 – 5)	1 ± 1	1 (0 – 5)	2 ± 3	2 (0 – 11)
NK (%)	5,50 ± 2,91	5,34 (1,22 – 12,46)	3,05 ± 1,98	1,95 (0,73 – 8,40)	1,82 ± 1,42	1,42 (0,22 – 7,85)
NK/mm <sup>3</sup>	356 ± 176	318 (101 – 768)	185 ± 144	130 (36 – 612)	100 ± 80	70 (13 – 350)
NK 56 <sup>++</sup> (%)	0,16 ± 0,11	0,16 (0,02 – 0,53)	0,20 ± 0,24	0,15 (0,02 – 1,28)	0,12 ± 0,10	0,10 (0,00 – 0,48)
NK 56 <sup>++</sup> /mm <sup>3</sup>	10 ± 7	10 (1 – 32)	10 ± 14	7 (2 – 79)	7 ± 8	5 (0 – 44)


<b>NKT (%)</b>	1,39 ± 1,17	0,90 (0,29 – 4,29)	1,27 ± 1,54	0,83 (0,10 – 7,94)	0,56 ± 0,46	0,47 (0,06 – 1,78)
<b>NKT/mm<sup>3</sup></b>	95 ± 90	58 (18 – 376)	78 ± 118	48 (5 – 635)	32 ± 33	22 (3 – 171)
<b>Razão Neutrófilos/Linfócitos</b>	2,58 ± 1,24	2,22 (0,98 – 6,30)	3,86 ± 2,95	3,22 (1,39 – 17,55)	8,38 ± 7,62	5,10 (2,07 – 30,87)
<b>Razão T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	1,84 ± 0,74	1,70 (0,78 – 4,13)	2,59 ± 1,30	2,18 (1,05 – 6,53)	3,29 ± 2,28	2,52 (1,03 – 11,5)
<b>T CD4<sup>+</sup> N (% T CD4<sup>+</sup>)</b>	29,58 ± 8,90	28,60 (17,29 – 55,34)	29,98 ± 12,43	29,09 (9,54 – 59,67)	24,46 ± 15,96	24,26 (1,72 – 61,45)
<b>T CD4<sup>+</sup> CM (% T CD4<sup>+</sup>)</b>	38,30 ± 9,29	40,03 (17,48 – 57,09)	39,35 ± 7,04	39,97 (25,49 – 51,23)	39,97 ± 12,47	41,66 (1,12 – 63,27)
<b>T CD4<sup>+</sup> EM (% T CD4<sup>+</sup>)</b>	27,38 ± 8,47	26,60 (14,05 – 55,75)	27,22 ± 9,08	25,57 (9,51 – 54,41)	30,25 ± 12,78	30,65 (0,42 – 58,37)
<b>T CD4<sup>+</sup> EMRA (% T CD4<sup>+</sup>)</b>	4,72 ± 3,91	3,76 (0,66 – 17,42)	3,34 ± 2,35	2,63 (0,66 – 9,25)	5,29 ± 8,01	2,72 (0,22 – 41,02)
<b>T CD8<sup>+</sup> N (% T CD8<sup>+</sup>)</b>	22,69 ± 9,98	21,33 (8,73 – 48,78)	23,10 ± 13,38	23,48 (3,97 – 58,68)	28,25 ± 18,02	26,74 (0,03 – 82,12)
<b>T CD8<sup>+</sup> CM (% T CD8<sup>+</sup>)</b>	13,34 ± 6,41	13,05 (4,37 – 33,17)	18,03 ± 8,09	16,56 (3,99 – 36,06)	12,68 ± 8,10	10,28 (0,23 – 29,31)
<b>T CD8<sup>+</sup> EM (% T CD8<sup>+</sup>)</b>	30,93 ± 11,53	31,33 (8,60 – 61,15)	33,40 ± 13,98	30,08 (11,65 – 68,04)	23,26 ± 13,38	23,14 (0,42 – 49,99)
<b>T CD8<sup>+</sup> EMRA (% T CD8<sup>+</sup>)</b>	32,23 ± 15,39	30,60 (5,91 – 68,63)	25,47 ± 12,64	22,37 (6,11 – 52,78)	35,90 ± 17,38	31,33 (7,02 – 79,62)
<b>T CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> (% T CD4<sup>+</sup>)</b>	8,77 ± 5,66	7,45 (3,13 – 34,76)	7,07 ± 2,73	6,25 (2,23 – 15,48)	9,07 ± 4,27	8,16 (2,14 – 18,76)
<b>T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> (% T CD8<sup>+</sup>)</b>	22,26 ± 11,18	19,10 (6,70 – 52,54)	16,30 ± 7,38	15,97 (5,51 – 31,36)	23,66 ± 14,75	21,17 (1,84 – 62,24)
<b>T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> (% T CD4<sup>+</sup>)</b>	93,24 ± 9,34	97,34 (52,12 – 99,94)	93,61 ± 6,10	94,36 (76,28 – 99,97)	95,27 ± 5,04	97,32 (76,39 – 99,91)
<b>T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> (% T CD8<sup>+</sup>)</b>	60,81 ± 14,09	63,62 (37,71 – 89,46)	57,58 ± 17,33	59,44 (15,98 – 84,67)	57,68 ± 20,42	59,29 (14,56 – 93,01)
<b>T CD4<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> (% T CD4<sup>+</sup>)</b>	5,84 ± 8,34	3,34 (0,22 – 45,96)	5,27 ± 5,21	4,35 (0,15 – 21,87)	3,85 ± 5,39	1,90 (0,04 – 25,02)
<b>T CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> (% T CD8<sup>+</sup>)</b>	24,66 ± 11,42	25,32 (3,21 – 48,91)	24,87 ± 15,52	19,07 (5,47 – 67,73)	20,42 ± 17,12	15,06 (0,26 – 57,29)
<b>T reg (% T CD4<sup>+</sup>)</b>	3,58 ± 1,22	3,55 (1,52 – 6,31)	3,86 ± 2,47	3,21 (1,24 – 12,76)	4,35 ± 2,05	4,15 (0,15 – 10,61)
<b>T reg memória (% T CD4<sup>+</sup>)</b>	2,22 ± 1,01	2,02 (0,85 – 5,27)	2,02 ± 1,43	1,60 (0,65 – 6,81)	3,00 ± 1,75	2,55 (0,06 – 8,62)
<b>CD25<sup>+</sup> CD127<sup>fraco</sup> (% T CD4<sup>+</sup>)</b>	7,40 ± 1,57	7,39 (4,30 – 10,59)	8,85 ± 3,03	7,93 (5,45 – 19,15)	9,24 ± 2,88	9,09 (0,37 – 16,99)
<b>B pré-CG (% B)</b>	58,51 ± 14,25	59,38 (29,27 – 87,23)	77,73 ± 18,96	84,23 (29,34 – 98,00)	68,95 ± 20,67	73,94 (12,44 – 94,71)
<b>B transicional (% B)</b>	5,66 ± 2,81	5,51 (1,83 – 13,91)	5,92 ± 3,44	5,98 (0,85 – 15,66)	4,69 ± 4,25	3,07 (0,05 – 13,97)
<b>B naïve (% B)</b>	52,85 ± 13,16	55,28 (27,25 – 80,35)	71,81 ± 17,35	78,18 (27,94 – 92,75)	64,25 ± 19,66	69,38 (12,31 – 94,25)
<b>NS-BM (% B)</b>	18,03 ± 10,01	16,92 (2,95 – 41,70)	10,23 ± 12,57	5,14 (0,46 – 46,71)	8,39 ± 10,06	5,35 (0,23 – 57,96)
<b>B CS (% B)</b>	22,57 ± 8,65	21,53 (8,35 – 49,16)	11,29 ± 7,89	8,41 (1,46 – 33,25)	18,15 ± 14,14	14,44 (2,81 – 70,51)
<b>CS-BM (% B)</b>	19,86 ± 8,44	19,30 (7,71 – 47,49)	9,95 ± 6,98	7,12 (1,29 – 27,55)	14,60 ± 12,43	10,52 (2,16 – 64,15)
<b>B DN (% B)</b>	2,70 ± 1,78	2,39 (0,40 – 6,78)	1,33 ± 1,23	0,83 (0,10 – 5,70)	3,55 ± 3,02	2,33 (0,12 – 11,77)
<b>Plasmablastos (% B)</b>	0,90 ± 0,73	0,63 (0,00 – 3,84)	0,75 ± 0,89	0,55 (0,08 – 4,74)	4,51 ± 5,42	2,83 (0,32 – 27,53)
<b>Neutrófilos maduros (%)</b>	55,45 ± 8,19	55,79 (39,57 – 72,87)	62,00 ± 9,46	61,05 (46,20 – 86,17)	68,60 ± 10,15	67,51 (46,52 – 90,88)
<b>Neutrófilos imaturos (%)</b>	0,16 ± 0,13	0,13 (0,02 – 0,68)	0,12 ± 0,10	0,08 (0,00 – 0,45)	0,42 ± 0,45	0,25 (0,01 – 1,93)

<b>Basófilos (%)</b>	0,68 ± 0,27	0,61 (0,23 – 1,27)	0,72 ± 0,34	0,63 (0,23 – 1,80)	0,66 ± 0,47	0,46 (0,09 – 2,02)
<b>Monócitos (%)</b>	6,90 ± 1,55	6,94 (3,76 – 9,69)	7,31 ± 2,73	7,12 (3,54 – 14,90)	9,16 ± 3,63	8,90 (1,92 – 16,70)
<b>cMo (%)</b>	5,85 ± 1,45	5,75 (3,16 – 8,67)	5,98 ± 2,34	5,52 (2,27 – 13,97)	7,85 ± 3,11	7,57 (1,63 – 14,06)
<b>iMo (%)</b>	0,40 ± 0,10	0,40 (0,22 – 0,68)	0,81 ± 0,76	0,53 (0,21 – 3,92)	0,95 ± 0,85	0,63 (0,24 – 3,63)
<b>ncMo (%)</b>	0,66 ± 0,29	0,60 (0,19 – 1,25)	0,52 ± 0,34	0,46 (0,08 – 1,66)	0,36 ± 0,29	0,25 (0,01 – 1,07)
<b>DCs (%)</b>	0,33 ± 0,10	0,31 (0,16 – 0,62)	0,25 ± 0,10	0,26 (0,06 – 0,44)	0,18 ± 0,13	0,15 (0,00 – 0,62)
<b>DCs (mm<sup>3</sup>)</b>	22 ± 7	20 (10 – 39)	14 ± 7	13 (5 – 26)	9 ± 6	7 (0 – 24)
<b>cDCs (%)</b>	0,23 ± 0,09	0,21 (0,11 – 0,56)	0,16 ± 0,08	0,16 (0,03 – 0,34)	0,11 ± 0,07	0,08 (0,00 – 0,34)
<b>pDCs (%)</b>	0,10 ± 0,03	0,09 (0,04 – 0,18)	0,09 ± 0,04	0,09 (0,03 – 0,22)	0,08 ± 0,06	0,06 (0,00 – 0,28)
<b>Razão pDCs/cDCs</b>	0,49 ± 0,25	0,42 (0,11 – 1,20)	0,67 ± 0,47	0,53 (0,24 – 2,15)	0,85 ± 0,54	0,82 (0,18 – 3,18)


BM: B de memória; CG: centro germinativo; CM: memória central; cMo: monócitos clássicos; CS: *class-switched*; DCs: células dendríticas; cDCs: DCs clássicas; pDCs: DCs plasmocitoides; T DP: T duplo positivos; DP: desvio padrão; DN: duplo negativos; EM: memória efetora; EMRA: efetora terminal CD45 RA+; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos; N: naïve; T reg: T regulatória; NS: *non-switched*. Fonte: Elaborada pelo autor (2020).



## ANEXO A - Certificado de Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

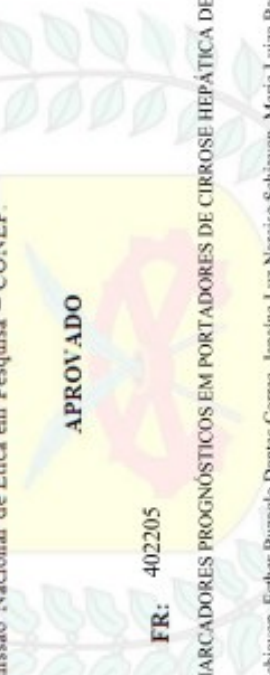


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



**CERTIFICADO** Nº 1822

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 GR.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 envolvem 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:** 1822      **FR:** 402205

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DE MARCADORES PROGNÓSTICOS EM PORTADORES DE CIRROSE HEPÁTICA DESCOMPENSADA

**AUTOR:** Leonardo de Lucca Schiavon, Esther Buziglo Dantas Correa, Janaina Luz Narciso Schiavon, Maria Luiza Bazzo, Marcelo Ronsoni, César Lazzarotto


**FLORIANÓPOLIS, 28 de Fevereiro de 2011.**

\_\_\_\_\_  
 Coordenador do CEPSH/UFSC



## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **AValiação DE MARCADORES PROGNÓSTICOS EM PORTADORES DE CIRROSE HEPÁTICA DESCOMPENSADA**

Você está sendo convidado para participar de um projeto de pesquisa: Aviação de marcadores prognósticos em portadores de cirrose hepática descompensada. Este projeto tem o objetivo de identificar dados da avaliação médica ou de exames laboratoriais que possam nos ajudar a identificar os pacientes com doença mais grave. Os resultados desta pesquisa poderão permitir a criação de ferramentas para a identificação rápida dos pacientes com doença mais grave, permitindo assim um tratamento mais adequado.

Caso você concorde em participar deste estudo, será feita uma avaliação clínica (entrevista e exame físico) no primeiro dia da sua internação e 48 horas depois. Além disso, uma coleta de sangue será realizada por punção periférica na veia do antebraço também nestes dois momentos. Parte do material será destinada aos exames de rotina (que são necessários para avaliação do seu caso durante a internação) e uma outra porção será armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para a posterior dosagem dos exames referentes a este estudo, que são: óxido nítrico, apelina, dimetilarginina assimétrica, 6-keto-PGF1 alfa, sCD40L, copeptina, pentraxina 3, fator de Von Willebrand, E-selectina, P-selectina, Ativador do plasminogênio tecidual, lecitina ligadora de manose, pro-peptídeo natriurético amino-terminal tipo-C, citocinas relacionadas à resposta inflamatória (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e VEGF), Troponina I, troponina T, pro-BNP e pro-ANP, Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL), Cistatina C, molécula de injúria renal tipo 1 (KIM-1), microRNAs, Neopterin, proteína induzida por interferon gama 10 (IP-10), receptor ativador de uroquinase plasminogênio solúvel (suPAR), proteína ligadora de lipopolissacárides (LBP), apolipoproteína A1, ST2, Fibrinogênio, produtos de degradação de fibrina (PDF), D-dímero, ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), inibidor de ativação do plasminogênio (PAI-1), tempo de lise de euglobulina, Adiponectina, visfatina, Ensaio Cometa, Teste de Micronúcleo, Neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, células NK e dendríticas, expressão de receptores de superfície celular. Serão também realizados os seguintes exames em amostra de urina coletada durante sua internação: Sódio, potássio, creatinina, proteína total, albumina, NGAL, KIM-1, Cistatina C, microRNAs. Caso seja necessária realização de uma punção para retirada de líquido ascítico (água da barriga) durante o seu tratamento no hospital, uma pequena parte deste líquido será utilizada para pesquisa de Neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, células NK e dendríticas, expressão de receptores de superfície celular, citocinas.

Dados do seu exame de eletrocardiograma realizado durante a internação também serão avaliados (Variabilidade da frequência cardíaca e intervalo QT).

Não existem riscos importantes relacionados a tais procedimentos, podendo ocorrer, como consequência da coleta de sangue, dor no local da punção e/ou formação de hematoma local.

Não há benefício direto para o participante. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores envolvidos são a Dra. Dariana Carla Maggi, Dra. Ariane Borgonovo, Dra. Janaína Luz Narciso Schiavon e o Dr. Leonardo de Lucca Schiavon que podem ser encontrados no endereço: Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário/Campus Universitário – Trindade - Cep 88040-970 - Florianópolis – SC Fone (48) 37219149/37219014; e-mail: [gastro.hu@uol.com.br](mailto:gastro.hu@uol.com.br). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Universidade Federal de Santa Catarina; Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão - Campus Universitário - Trindade - Florianópolis/SC; Tel: (48) 3721-9206.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Para retirada do consentimento basta entrar em contato com um dos pesquisadores através dos telefones e do e-mail fornecido acima.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, assim que os mesmos forem de conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

#### **Segue abaixo os termos da declaração para poder participar do estudo:**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo “**Avaliação de marcadores prognósticos em portadores de cirrose hepática descompensada**”.

Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, caso seja necessário. Concordo voluntariamente em participar deste



estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento: antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo, perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

---

Nome do participante	Assinatura	Data
ou		

---

Responsável legal	Assinatura	Data
-------------------	------------	------

---

Responsável pelo estudo	Assinatura	Data
-------------------------	------------	------



## ANEXO C – Produção científica e participação em eventos.

**Artigo publicado:** CARDOSO, CC; SANTOS-SILVA, MC. Eight-color panel for immune phenotype monitoring by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 468, p.40-48, mar. 2019.

*Journal of Immunological Methods* 468 (2019) 40–48



### Eight-color panel for immune phenotype monitoring by flow cytometry

Chandra Chiappin Cardoso<sup>a,b</sup>, Maria Claudia Santos-Silva<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Clinical Analysis, Flow Cytometry Service, University Hospital of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 88040-900, Brazil  
<sup>b</sup> Postgraduate Program in Pharmacy of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 88040-900, Brazil  
<sup>c</sup> Clinical Analysis Department, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Immune cells  
 Peripheral blood  
 Immunophenotyping  
 Flow cytometry

#### ABSTRACT

Flow cytometry (FC) is a fast and highly informative technology that has gained prominence in immune phenotype monitoring. FC standardization is crucial to obtain reliable results that are comparable among laboratories and immune monitoring studies, as this method is influenced by several variables, including equipment, reagents, staining procedures, and pre-analytical and analytical factors. Recent studies have standardized antibody panels and analytical procedures to analyze circulating immune cells in peripheral blood (PB). However, these panels cannot be adopted for laboratories that perform eight-color FC with liquid reagents. The aim of this study was to design and test an eight-color panel, intended to phenotype the main immune cell subsets in PB using liquid reagents and fresh whole blood samples. Samples were collected from healthy individuals recruited from staff and students and from six chemotherapy patients with leukopenia. The antibody panel was designed on the basis of previous studies. Quality controls comprised antibody titration, fluorescence minus one controls, internal controls, and compensation controls. Samples were analyzed by two operators using an eight-color three-laser FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, USA) and Infinicyt software (Cytognos, Spain). The proposed eight-color panel is composed of six tubes. Analysis of these tubes allowed evaluation of frequencies and classification of various immune cells, such as naïve T, central memory T, effector memory T, CDRA<sup>+</sup> effector memory T, activated T, and regulatory T cells; class-switched B, non-switched B, memory B, regulatory B cells, and plasmablasts; myeloid and plasmacytoid dendritic cells, classical and non-classical monocytes; and immature neutrophils. Immunophenotyping of leukocytes using the proposed panel was efficient to correctly differentiate the majority of immune cell subtypes. It is a promising tool to determine the immunological profile of patients in clinical trials and establish associations with disease progression, complications, and outcomes.

#### 1. Introduction

The immune system is responsible for defending the organism against pathogens, healing wounds, and clearing neoplastic cells. To be efficient, these multiple responses depend on the balanced and coordinated distribution of a great number of cells with different functions (Proserpio and Mahata, 2016).

Flow cytometry (FC) has become one of the most important tools for immune analysis, especially at a cellular level (Proserpio and Mahata, 2016). Over the past years, FC has gained prominence in studies of primary immunodeficiency diseases (Abraham and Aubert, 2016; Kanegane et al., 2018), solid organ transplantation (Maguire et al., 2014; Sindhil et al., 2016), sepsis (Venet et al., 2011; Monneret and Venet, 2016), and chronic diseases (Kotake et al., 2016; Arregui et al., 2017).

Because of the advantages of FC, such as high speed, sensitivity, and specificity, research groups have focused on standardizing antibody panels and procedures to analyze and classify immune cell subtypes for clinical trials. The ONE Study consortium and the Human Immunophenotyping consortium are examples of such efforts (Maecker et al., 2012; Streit et al., 2013; Finak et al., 2016; Burel et al., 2017). These studies have analyzed immune cells circulating in peripheral blood (PB), as this tissue is considered a window for a comprehensive analysis of the immune system (Brodin and Davis, 2017).

Standardization of FC is crucial to control the several variables that affect result reliability (Maecker et al., 2010; Maecker et al., 2012). The diversity of equipment, reagents, staining procedures, pre-analytical and analytical factors, and the need of a trained operator (expertise) are among the main issues that increase variability and cause divergent results within and between laboratories (Kalina et al., 2012; Streit

\* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Campus Universitário, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.  
 E-mail address: maria.claudia.silva@ufsc.br (M.C. Santos-Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.03.010>

Received 10 November 2018; Received in revised form 13 February 2019; Accepted 22 March 2019

Available online 23 March 2019

0022-1759/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Artigos submetidos (2020):** 1) B-Cell Compartment Abnormalities in Liver Cirrhosis are Associated with ACLF and Mortality. 2) Patterns of Dendritic Cell and Monocyte Subsets are Associated with Disease Severity and Mortality in Liver Cirrhosis Patients.

**Resumo apresentado em congresso:** Congresso da Sociedad Ibérica de Citometría (SIC), Salamanca, Espanha, 2019. Título de trabalho apresentado em forma de banner: Decreased Peripheral Dendritic Cells (DCs) in Decompensated Cirrhosis. Flow Cytometric Detection of DCs and its Relation to Disease Severity.



## Certificate of participation

We certify that

the paper entitled

Decreased peripheral dendritic cells (DCs) in decompensated cirrhosis. Flow cytometric detection of DCs and its relation to disease severity

has been presented by

Chandra Chiappin Cardoso  
 Carolina JH Pereira  
 Camila Matiollo  
 Janaina S Fonseca  
 Helder EL Alves  
 Otavio M Silva  
 Caudia R Dos Santos  
 Leonardo L Schiavon  
 Maria Claudia Santos-Silva

at the XVI Congress of the Iberian Society of Cytometry  
 held in Salamanca, Spain, 9-11 May 2019

Prof. Julia Almeida Parra  
 Chair of the Organising Committee

Prof. José Enrique O'Connor Blasco  
 President of the Iberian Society of Cytometry (SIC)

**Resumo apresentado em congresso:** Congresso Brasileiro de Hepatologia (HEPATO) São Paulo, Brasil, 2019. Título de trabalho apresentado em forma de banner: Doença Hepática Avançada está Associada à Alteração nos Macrófagos Tissulares (TiMas) Circulantes.

Certificamos que o trabalho

**"DOENÇA HEPÁTICA AVANÇADA ESTÁ ASSOCIADA À ALTERAÇÃO NOS MACRÓFAGOS TISSULARES (TIMAS) CIRCULANTES"**

dos autores **CHANDRA CHIAPPIN CARDOSO; CAROLINA HILGERT JACOBSEN PEREIRA; CAMILA MATIOLLO; JANAINA S FONSECA; HELDER E L ALVES; OTAVIO M SILVA; VIVIAN S MENEGASSI; LEONARDO DE LUCCA SCHIAVON; MARIA CLAUDIA SANTOS-SILVA**

foi apresentado no formato **POSTER** durante o **XXV Congresso Brasileiro de Hepatologia**, realizado nos dias 2 a 4 de outubro de 2019, em São Paulo - SP.

São Paulo, 4 de outubro de 2019.

Dr. Paulo Libboza Bittroncourt  
Presidente da Sociedade Brasileira de Hepatologia

Dra. Mariana Lucidi Ferraz  
Secretaria Geral da Sociedade Brasileira de Hepatologia

**Cursos realizados durante o período do doutorado:**

1. Diploma de especialización en citometria de flujo para el diagnóstico y monitorización de hemopatías malignas e inmunodeficiencias primarias. Universidad de Salamanca, Espanha, 2019.
2. Winter School of Cell Analysis in Immunology. Université de Genève, Suíça, 2020.