



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

PAULA FRANCO OBA

**Resposta imune à vacina contra hepatite B com
suplementação de beta glucana**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre no Programa de PG em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica - Mestrado Profissional.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marjorie de Assis Golim
Coorientador: Prof. Dr Jaime Olbrich Neto

**Botucatu
(2020)**

Paula Franco Oba

Resposta imune à vacina contra hepatite B com
suplementação de beta glucana

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre no Programa de PG em
Pesquisa e Desenvolvimento:
Biotecnologia Médica - Mestrado
Profissional.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marjorie de Assis Golim
Coorientador: Prof. Dr Jaime Olbrich Neto

Botucatu
(2020)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oba, Paula Franco.

Resposta imune à vacina contra hepatite B com
suplementação de beta glucana / Paula Franco Oba. - Botucatu,
2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Marjorie de Assis Golim
Coorientador: Jaime Olbrich Neto
Capes: 90400003

1. Resposta imune. 2. Hepatite B. 3. Vacinas contra
Hepatite B. 4. Imunogenicidade da vacina. 5. Antígenos na
hepatite. 6. Adjuvantes imunológicos.

Palavras-chave: Adjuvantes Imunológicos; Antígenos de
superfície da Hepatite B; Beta-Glucanas; Imunogenicidade da
vacina; Vacinas contra Hepatite B.

Paula Franco Oba

**RESPOSTA IMUNE À VACINA CONTRA HEPATITE B COM
SUPLEMENTAÇÃO DE BETA GLUCANA**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestra no Programa de PG em
Pesquisa e Desenvolvimento:
Biotecnologia Médica - Mestrado
Profissional.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra Marjorie de Assis Golim

Profa. Dra. Elenice Deffune

Profa. Dra. Ivana Regina Gonçalves

Botucatu, _____ de _____ de _____.

Dedico este trabalho a minha família, minha mãe que sempre me apoiou, meu pai querido, meu irmão de quem sempre me orgulhei, meu marido e amigo, e aos meus avós aos quais guardo um carinho especial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos e suporte na minha vida.

Ao meu marido Bruno Pereira Navarro Macedo, agradeço a paciência, o amor e a parceria para que tudo se concluísse da melhor forma.

Gostaria também de agradecer a meus pais Regina Celia de Almeida Franco Oba e Leonardo Oba, pelo apoio e amor incondicional em todos os meus projetos.

Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Marjorie de Assis Golim pela constante orientação neste trabalho, me dando suporte, atenção e fornecendo ensinamentos, assim como toda sua disponibilidade. Obrigada por tudo.

Ao Dr Jaime Olbrich Neto, um agradecimento especial, por me colocar neste caminho, acreditar em meu potencial, e me coorientar neste processo. Um médico excepcional e chefe querido.

Obrigada Ana Laura Mendes de Almeida e Camila Alves Tonami, pelo suporte, ajuda e amizade.

Também gostaria de agradecer aos amigos do programa Guilherme, Rita, Mariana, Ana Laura, Heloisa pelo companheirismo; a companhia de vocês fez tudo parecer mais leve.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, mesmo que nem sempre em evidência. Muitos me ajudaram neste sonho, mas seria impossível citar todos.

OBA, P.F. **Resposta imune à vacina contra hepatite B com suplementação de beta-glucanas.** 2020. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

RESUMO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite B (VHB) é a principal causa de cronificação da hepatite, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular em humanos. A vacinação contra hepatite B é essencial a saúde da população, sendo a medida de menor custo e maior eficiência para controlar o vírus. A vacina desencadeia resposta imune com produção de anticorpos contra o antígeno de superfície do VHB (anti-HBs), contudo, alguns indivíduos não desenvolvem imunidade efetiva, havendo necessidade de doses adicionais. Assim, estimular a resposta imune nos indivíduos já vacinados, porém pouco respondedores ou não respondedores previamente, poderia contribuir para o aumento da produção de anticorpos e persistência dos mesmos ao longo do tempo. Considerando o potencial imunomodulador de β -glucanas, inclusive no aumento da ativação de células T e B em resposta a antígenos, propôs-se neste estudo avaliar a influência do uso de β -glucanas como suplemento alimentar em indivíduos com imunidade não efetiva pós-vacina, que necessitassem de dose *booster*. Foram incluídos 46 doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu, com idade entre 18 anos e 25 anos completos, do sexo masculino, vacinados com três doses para hepatite B na primeira infância. Aqueles que apresentaram anti-HBs < 10 UI/L foram considerados não imunes, sendo mantidos no estudo (n=31) e divididos em dois grupos de forma aleatória. Ambos os grupos receberam *booster* da vacina, sendo um grupo suplementado via oral com cápsulas de amido (n=11; placebo - 500mg/dia), e outro com β -glucanas (n=20; 500mg/dia), durante duas semanas. Na comparação intergrupos, não foi observado diferença significativa em relação a soroproteção, através da dosagem de anti-HBs, com 7 e 14 dias após dose de reforço vacinal. Não se pôde avaliar se o uso de β -glucanas teve efeito imunoestimulador, possivelmente devido a memória imunológica presente e com rápida resposta, representada pelo fato de que com apenas uma dose de reforço, 93,34% dos pacientes anti-HBs < 10 UI/L desenvolveram soroproteção, independente do estímulo. Os dados obtidos abrem perspectiva de reavaliação dos protocolos vigentes de vacinação da hepatite B, considerando a recomendação de *booster* na adolescência, para assegurar a real imunização, pois apenas 30,44% dos participantes, todos vacinados na infância, tinham imunização efetiva, e tendo em vista a boa resposta a uma dose *booster*. Além disso, há que se considerar o potencial uso da suplementação com β -glucana como imunomodulador na primovacinação, modelo em que não há influencia da memória imunológica.

Palavras-chave: Beta-glucanas; Vacina Hepatite B; VHB; Antígenos de superfície da Hepatite B;

ABSTRACT

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is the main cause of hepatitis chronification, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in humans. Vaccination against hepatitis B is essential to the health of the population, being the least costly and most efficient measure to control the virus. The vaccine triggers an immune response with the production of antibodies against HBV surface antigen (Anti-HBs), however, some individuals do not develop effective immunity, requiring additional doses. Thus, stimulating the immune response in individuals who have already been vaccinated, but with little or no previous response, could contribute to increased antibody production and persistence over time. Considering the immunomodulatory potential of β -glucans, including the increased activation of T and B cells in response to antigens, it was proposed in this study to evaluate the influence of the use of β -glucans as a food supplement in individuals with post-vaccine ineffective immunity, who needed a booster dose. 46 blood donors from the Hemocenter of Botucatu, aged between 18 and 25 years old, male, who received three doses of hepatitis B vaccine in childhood were included. Those who had anti-HBs <10 IU / L were considered non-immune, being maintained in the study ($n = 31$) and randomly divided into two groups. Both groups received a vaccine booster, one group supplemented orally with starch capsules ($n = 11$; placebo - 500mg / day), and the other with β -glucans ($n = 20$; 500mg / day) for two weeks. In the intergroup comparison, no significant difference was observed in relation to seroprotection, through the dosage of anti-HBs, at 7 and 14 days after the vaccine booster dose. It was not possible to assess whether the use of β -glucans had an immunostimulatory effect, possibly due to the present immunological memory and rapid response, represented by the fact that with only one booster dose, 93.34% of anti-HBs patients <10 UI / L developed seroprotection. The study provides a new approach to the potential use of β -glucan supplementation as an immunomodulator in the primary vaccination. The data obtained also opens the prospect of reassessing the current hepatitis B vaccination protocols, considering the recommendation of booster in adolescence, to ensure real immunization, because only 30.44% of the participants, all vaccinated in childhood, had effective immunization, and in view of the good response to one booster dose. In addition, it is necessary to consider the potential use of β -glucan supplementation as an immunomodulator in the primary vaccination, a model in which there is no influence on immunological memory.

Keywords: beta-glucans; Hepatitis B vaccines; Immunological Adjuvants; immunogenicity of the vaccine; Hepatitis B Surface Antigens

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação do vírus da Hepatite B e principais antígenos.	13
Figura 2 – Estrutura e composição das β -glucanas.....	17
Figura 3 – Ativação imunológica induzida por β -glucanas.....	19
Figura 4 – Desenho do estudo com divisão dos participantes em grupos.....	24
Figura 5 – Esquema cronológico do estudo em dias.....	25
Figura 6 – Divisão entre respondedores e não respondedores, 2 semanas após a dose <i>booster</i>	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Porcentagem casos hepatites virais no Brasil.....	14
Gráfico 2 – Imunidade contra o vírus da Hepatite B de 46 doadores de sangue vacinados com 3 doses na infância.....	28
Gráfico 3 – Distribuição percentual nacional da inaptidão sorológica para os marcadores de doenças transmissíveis pelo sangue no Brasil em percentual.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cobertura da vacina Hepatite B no Brasil em 2019	16
Tabela 2 – Evolução da resposta à uma dose de vacina Hepatite B, em doadores vacinados na infância e não imunes, segundo estímulo recebido.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgHBs	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
Anti-HBc	Anticorpos Core do Vírus da Hepatite B
Anti-HBs	Anticorpo Contra o Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CR3	Receptor do Complemento 3
DCs	Células Dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTP	Difteria, Tétano e Pertussis
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
HB	Hepatite B
Hib	<i>Haemophilus Influenza Tipo B</i>
HPV	<i>Papilomavírus Humano</i>
iC3b	Complemento 3b Inativado
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IFN- γ	Interferons A
ITAM	Tirosina Imunorreceptora
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NK	<i>Natural Killers</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PRRs	Receptor de Reconhecimento de Padrões
RANTES	Regulada por Ativação, Normal T Expressa e Secretada
SBP	Sociedade Brasileira de Pediatria
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
Syk	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>
TLR-2/6	Receptores Toll-like 2 e 6

TNF	Fator de Necrose Tumoral
Th	Linfócitos T CD4 Auxiliares
Treg	Linfócitos T Reguladores
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
VHB	Vírus da Hepatite B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B	12
1.2	EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B	14
1.3	VACINA CONTRA A HEPATITE B	14
1.4	GLUCANAS	16
2	OBJETIVOS	21
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
3.1	LOCAL DE ESTUDO E APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	22
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	22
3.3	DESENHO DO ESTUDO	23
3.4	QUANTIFICAÇÃO DE ANTI-HBS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA	25
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5	CONCLUSÃO	34
6	REFERÊNCIAS	35
7	ANEXOS	39
	ANEXO A – Questionário	39
	ANEXO B – Parecer Consubstanciado do CEP	40

1 INTRODUÇÃO

A Hepatite B é uma doença potencialmente infectante causada pelo vírus da Hepatite B (VHB), com elevados surtos e prevalência na população mundial – estima-se que 257 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo. O VHB pode replicar-se dentro dos hepatócitos causando lesão celular, além de que a resposta imune contra o vírus, a qual é essencial para controlar sua disseminação, é também responsável pela resposta inflamatória que causa doença hepática. A infecção crônica pelo VHB é a principal causa de hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (WHO, 2017; Brasil, 2019).

A vacinação contra hepatite B é ferramenta essencial a saúde da população, sendo a medida de menor custo e eficiência para controlar o VHB. A aplicação da vacina desencadeia resposta imune com produção de anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (Anti-HBs). Contudo, alguns indivíduos apresentam anti-HBs não reagente, imunidade não efetiva, com necessidade da realização de novas doses da vacina (MAST, et al., 2004).

Assim, estímulos adicionais à resposta imune poderiam contribuir para maior produção de anticorpos, podendo até mesmo induzir uma resposta mais duradoura e persistente. Uma possibilidade seria a administração de β -glucanas, estruturas com conhecida capacidade imunestimulatória que impactam no aumento da resistência a doenças causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos. Estudos experimentais em ratos revelaram efeito adjuvante de β -glucanas para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), resultando no aumento do nível de IgG total (anti-HBsAg), demonstrando alta eficácia de carregamento de antígeno e baixa citotoxicidade (SOARES; JESUS; BORGES, 2018).

1.1 INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B

O VHB é um vírus hepatotrópico de DNA de fita dupla, envelopado, que pertence à família *Hepadnaviridae* (GANEM; PRINCE, 2004).

É constituído por um envelope que contém três glicoproteínas (antígenos de superfície). Dentro do envelope, encontra-se o nucleocápsideo icosaédrico, que abriga o DNA circular parcialmente duplicado e uma polimerase, responsável pela síntese de DNA viral em células infectadas (GANEM; PRINCE,

2004; DIENSTAG, 2008; YUEN et al., 2018).

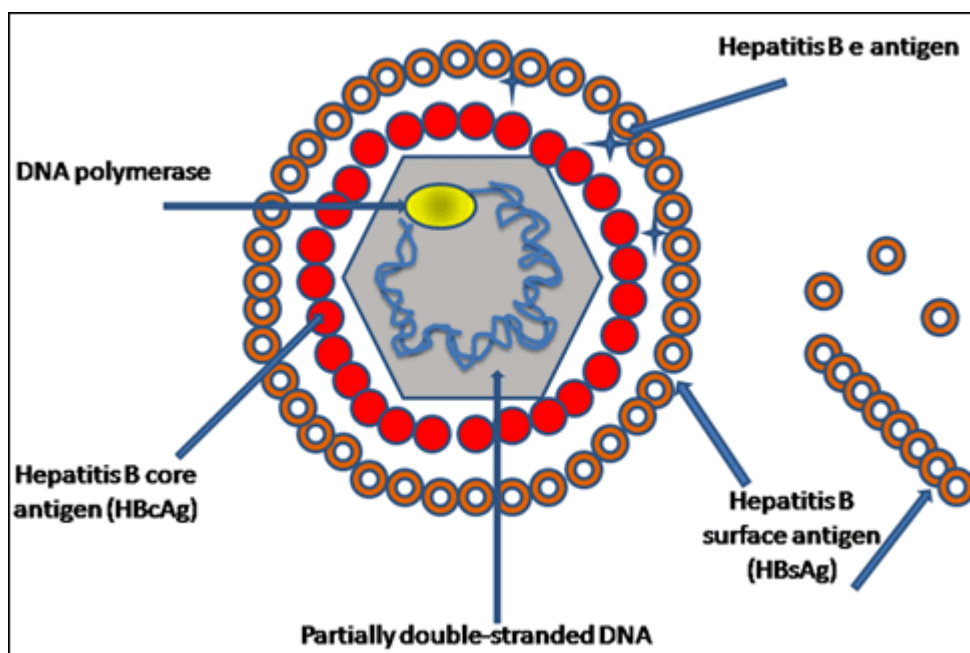
A resposta imunológica do hospedeiro contra o vírus é essencial para controlar sua disseminação, pois determinará se haverá clareamento viral ou se desencadeará doença hepática. Mecanismos das respostas imunes humoral e celular estão envolvidos na tentativa de eliminação viral, no entanto, também podem contribuir para agressão hepática, com injúria tecidual decorrente das lesões necroinflamatórias.

A infecção persistente pelo VHB pode levar a graus variáveis de dano hepático, podendo evoluir para hepatite, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (LI et al., 2019). A evolução para infecção crônica é maior quando a infecção ocorre em crianças, recém-nascidos ou lactentes.

Na maioria dos casos não apresenta sintomas e muitas vezes é diagnosticada décadas após a infecção, com sinais relacionados a outras doenças do fígado, e sintomas inespecíficos como cansaço, tontura, enjojo, vômitos, febre, dor abdominal, icterícia.

A principal forma de prevenção é por meio da vacinação, disponível no SUS para todas as pessoas, independentemente da idade.

Figura 1 – Representação do vírus da Hepatite B e principais antígenos.

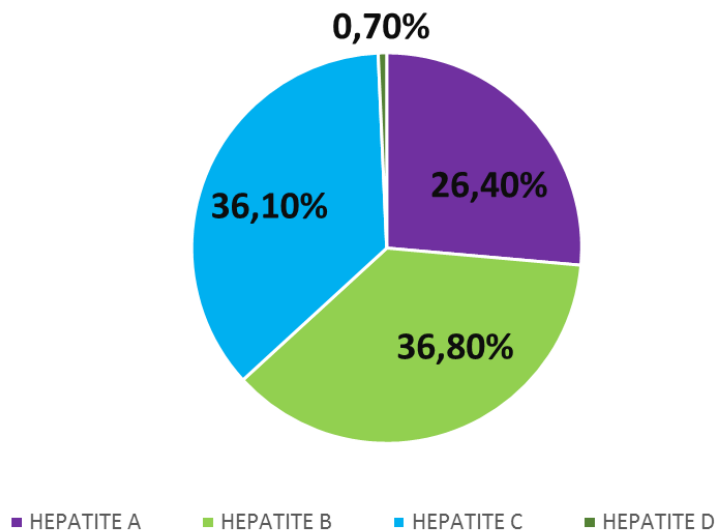


Fonte: <https://medlibes.com/entry/hepatitis-b>

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B

De 1999 a 2018, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 632.814 casos confirmados de hepatites virais no Brasil, sendo 233.027 referentes a hepatite B.

Gráfico 1 – Porcentagem casos hepatites virais no Brasil.



Fonte: Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. (2019).

Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, a maioria dos casos confirmados de hepatite B no Brasil está concentrada na região Sudeste, sendo a taxa de detecção de 6,7 casos para cada 100 mil habitantes em 2018.

De 2000 a 2017, foram registrados 15.033 óbitos relacionados a hepatites virais, dos quais, 54,8% tiveram a hepatite B como causa básica, em sua maior parte na região Sudeste (41,5%).

1.3 VACINA HEPATITE B

O uso da vacina hepatite B tem sido associado a drástica redução na incidência de infecções por VHB, bem como de carcinoma hepatocelular, em países onde é amplamente utilizada. Segundo JAN et al. (2010), a vacina induziu diminuição de 75% na incidência de carcinoma hepatocelular em crianças de 6 a 9

anos de idade, e declínio de 68% na mortalidade por hepatite fulminante e doenças hepáticas relacionadas ao VHB em lactentes.

A vacina foi introduzida no calendário nacional entre 1996-98, com extensão para todas as idades a partir de 2015 (MS, 2013). O SUS fornece a vacina em sua forma monovalente ou pentavalente, associada a outras vacinas (contra difteria, tétano, coqueluche, *Haemophilus influenzae* tipo b), sendo a dose variável de acordo com a idade e a condição do receptor (apresentação pediátrica é de 10mcg por vacina, e para adultos 20mcg), com administração IM, em região deltóide ou no vasto lateral da coxa (MS, 2019).

No entanto, desde 2012 no Programa Nacional de Imunizações (PNI), a vacina combinada DTP/Hib/HB (denominada pelo Ministério da Saúde de Penta) foi incorporada no calendário aos 2, 4 e 6 meses de vida. Dessa forma, os lactentes recebem quatro doses da vacina hepatite B (MS, 2013).

No Brasil a vacina é produzida por engenharia genética, através de leveduras, incluindo a *Saccharomyces cerevisiae*, levando a produção de HBsAg que posteriormente é purificado. Deste modo, as vacinas não promovem infecção, pois não contêm vírus vivo. Em sua composição ainda apresentam alumínio (hidróxido de alumínio) como adjuvante, podendo conter ou não timerosal (MS, 2019).

Assim, a vacinação leva a produção de anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (anti-HBs), sendo a soroproteção determinada quando os títulos de anticorpos anti-HBs alcançam níveis maiores que 10UI/L.

De acordo com Moraes, Luna e Grimaldi (2010) pode-se obter numa resposta inicial, logo após vacinação, atingindo soroproteção de até 93,7% em lactentes, 100% em crianças, 95,1% em adolescentes e 91,8% em adultos entre 20 e 30 anos. No ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica da FMB-UNESP, devido a fatores de risco como história de violência sexual, contato com perfurocortantes, entre outras causas, realiza-se análise sorológica para hepatite B, tendo sido observado anti-HBs não reagente em cerca de 57% destes indivíduos. Estes dados contrastam com a literatura, que relata que após administração da vacina mais de 90% dos adultos saudáveis e 95% dos bebês, crianças e adolescentes têm concentrações séricas de anticorpos anti-HBs protetores (MORAES; LUNA; GRIMALDI, 2010; POLAND; JACOBSON, 2004). Talvez esta realidade se aplique ao perfil sorológico logo após vacinação, mas esta

imunoproteção não parece ser duradoura, havendo redução dos níveis séricos ao longo dos anos, conforme temos observado.

De acordo com o Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais, 2019, no Brasil não é indicado reforço em pessoas imunocompetentes vacinadas, exceto na falha na resposta primária - com anti-HBs <10 UI/L no período 30 a 90 dias após a última dose, sendo indicado revacinação com esquema completo. Porém, a resposta é avaliada apenas em indivíduos em risco, com possibilidade de contágio, como os pacientes já citados, vítimas de abuso sexual, ou os profissionais de saúde ocupacionalmente expostos, devido principalmente ao alto valor dos testes sorológicos, um dos motivos inclusive da não avaliação entre uma dose e outra na revacinação.

Alguns fatores que podem afetar a resposta à vacina incluem: modo de conservação, local da aplicação, sexo, idade, obesidade, fumo, fatores genéticos, ligados a determinados haplotipos de HLA., doenças crônicas e condição nutricional e imunológica (SBP, 2006; MS, 2019)

Tabela 1 – Cobertura da Vacina Hepatite B no Brasil em 2019.

REGIÃO	HEPATITE <30DIAS	HEPATITE	PENTAVALENTE
NORTE	52,07%	49,67%	48,12%
NORDESTE	49,25%	54,10%	50,63%
SUDESTE	44,70%	55,47%	46,94%
SUL	49,55%	66,43%	55,72%
CENTRO OESTE	55,59%	55,18%	52,18%

Fonte: PNI, 2019.

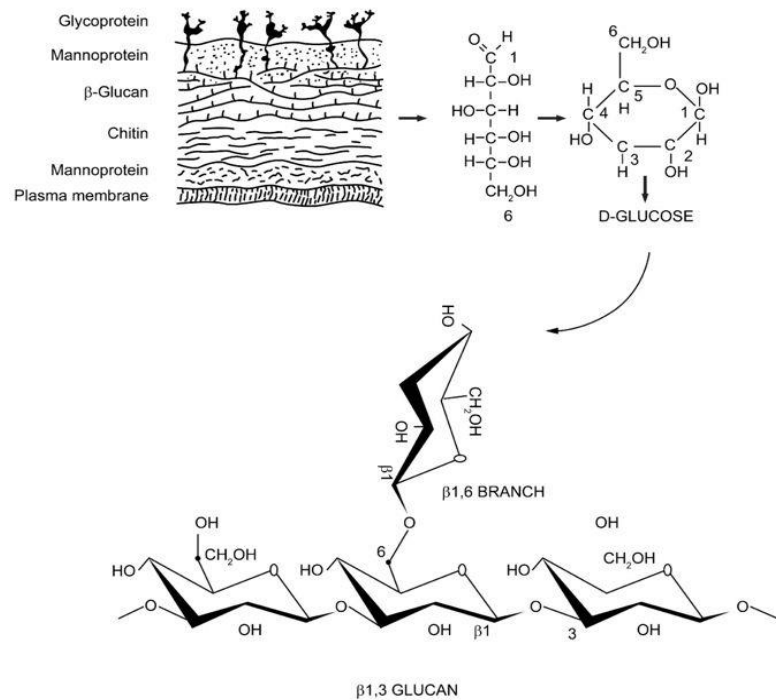
1.4 β -GLUCANAS

As β -glucanas são estruturas com capacidade de estimular o sistema imune para reconhecer e responder a presença de um microrganismo, deste modo aumentar a resistência a doenças causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos. São consideradas como potentes imunomoduladores, com efeito tanto no sistema imune inato quanto adaptativo.

As β -glucanas são polissacarídeos encontrados na parede celular de bactérias e fungos, dentre eles a *Saccharomyces cerevisiae*. Estão ligadas entre si por um núcleo linear da cadeia β -glicosídica 1,3; diferem pelo comprimento e estruturas de ramificação. Os ramos derivados do núcleo da cadeia glicosídica são altamente variáveis e os dois principais grupos de ramificação são 1 \rightarrow 4 ou 1 \rightarrow 6

cadeias glicosídicas, sendo específicas da espécie: as β -glucanas do fungo têm ramos laterais 1 \rightarrow 6 e as oriundas de bactérias têm ramos laterais 1 \rightarrow 4 (GANEM; PRINCE, 2004; BURG et al 2016; CHAN; CHAN; SZE, 2009; LEHNE et al., 2006)

Figura 2 – Estrutura e composição das β -glucanas.



Fonte: Chan et al (2009)

Após administração oral, β -glucanas entram rapidamente no intestino delgado proximal e são capturadas por macrófagos, sendo internalizadas e fragmentadas em menor tamanho, transportadas para a medula e sistema reticular endotelial. Os pequenos fragmentos de β -glucanas, glucana solúvel, são então liberados pelos macrófagos e absorvidos por granulócitos, monócitos, células dendríticas, entre outras células em circulação, induzindo ativação imunológica (CHAN et al. 2009).

As β -glucanas são polissacarídeos zwitteriônicos (polissacarídeos que carregam cargas positivas e negativas) e podem ativar células TCD4⁺ através da via endocítica do MHC-II. Assim, também podem ser processadas em carboidratos de baixo peso molecular por mecanismo mediado por óxido nítrico. Esses carboidratos se ligam ao MHC-II dentro das células apresentadoras de

antígenos, como as células dendríticas, para apresentação às células T auxiliares (CHAN et al., 2009).

Em estudo utilizando modelo experimental, foi demonstrado aumento de IgG anti-HBc específicas em camundongos, quando estes foram imunizados com vacina de DNA contra hepatite B, usando β -glucanas como adjuvante (WANG et al., 2010). Outro estudo, de Soares e colaboradores (2019), evidenciou que a vacinação subcutânea de camundongos com antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) mostrou aumento da IgG sérica para partículas de β -glucanas em comparação com o HBsAg sozinho.

A β -glucana pode atuar em uma variedade de receptores de membrana encontrados nas células imunológicas, isoladamente ou em combinação com outros ligantes (HERRE, 2004). Entre os receptores, as dectinas são os principais responsáveis pelo reconhecimento de β -glucanas, especialmente $\beta(1,3)$ -glucanas, componentes da parede celular da maioria dos fungos, consideradas como os principais padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) envolvidos na interação fungo-hospedeiro (TSONI; BROWN, 2008; BOWMAN; FREE, 2006).

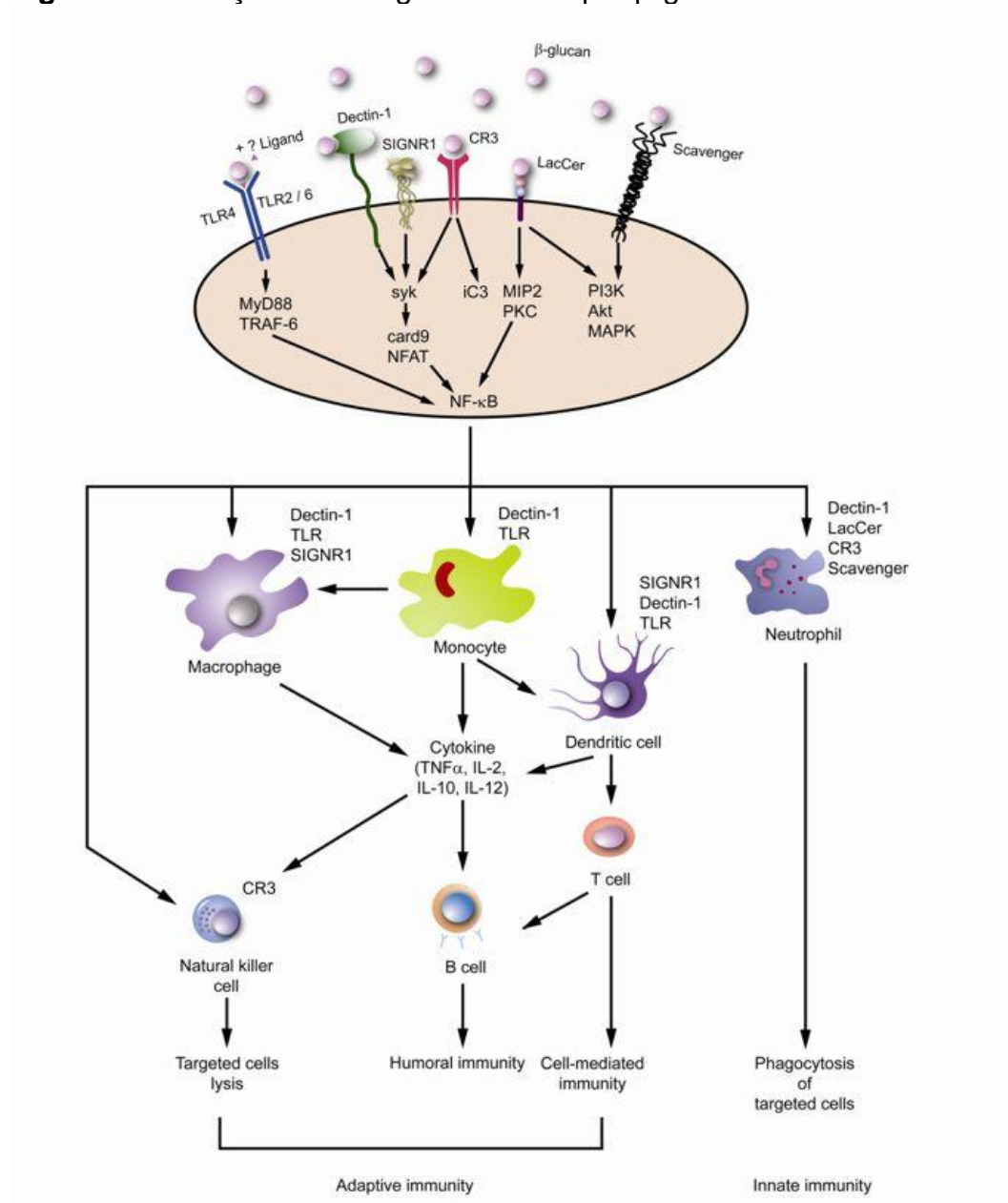
Anteriormente, acreditava-se que a dectina-1 era um receptor específico de células dendríticas (DC), mas atualmente sabe-se que trata-se de um receptor expresso por muitas outras células, incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e subpopulações de células T e B, embora não seja expressa nessas células em todos os tecidos (BROWN; GORDON, 2003). A Dectina-I, um receptor de proteína transmembranário tipo II, se liga a β -1,3 e β -1,6 glucanas, podendo iniciar e regular resposta imune inata efetiva, ativando mecanismos como fagocitose e produção de fatores pro-inflamatórios, induzindo a eliminação de agentes infecciosos (CHAN; CHAN; SZE, 2009 ;BROWN & GORDON, 2003). Nas vias de entrada de patógenos, como pulmão e intestino, a dectina-1 é expressa em altos níveis, sugerindo um papel potencial desse receptor na vigilância imunológica (BROWN, 2005; THOMPSON; OYSTON; WILLIAMSON, 2010).

Após a ligação, a dectina-1 é fosforilada por uma tirosina quinase. Syk é então ativado e induz o complexo CARD9-Bcl10-Malt1, que medeia a ativação de NF- κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-10 (THOMPSON; OYSTON; WILLIAMSON, 2010).

Dentre outros receptores de β -glucana que se destacam está o

receptor do complemento ativado 3 (CR3), também conhecido como CD11b/CD18, encontrado em monócitos/macrófagos, neutrófilos, células NK, dendríticas e algumas células T e B. Essa via é responsável pelo reconhecimento opsônico das β -glucanas, levando à fagocitose e lise celular. Outros receptores de que também podem ser citados são os receptores *scavengers*, encontrados em células mielóides e endoteliais e receptores lactosilceramida (LacCer ou CDw17), localizado na membrana plasmática de muitos tipos celulares (CHAN; CHAN; SZE, 2009; BROWN, 2005; THOMPSON; OYSTON; WILLIAMSON, 2010).

Figura 3 – Ativação imunológica induzida por β -glucanas.



Fonte: Chan et al., 2009.

Deste modo, a vacinação com HBsAg associada com β -glucana induz a uma assinatura de citocinas de quase todos os subconjuntos de células Th conhecidos até o momento: Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-18 e RANTES), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), Th17 (IL-17A e GM-CSF), Treg (IL-2) e Th22 (IL-6 e IL-22) (SOARES; GROOTHUISMINK; BOONSTRA; BORGES, 2019).

Com base no exposto, a proposta do presente estudo consistiu em avaliar a frequência de doadores de sangue imunizados para hepatite B e a capacidade imunoestimulatória de β -glucanas, oralmente administradas, na imunidade humoral obtida após *booster* contra hepatite B em doadores não imunes. Deste modo, os resultados poderiam otimizar os protocolos de vacinação, com diminuição do número de doses de reforço e/ou mudança no intervalo de aplicação, diminuindo gastos e efeitos colaterais vacinais nos indivíduos com anti-HBs não reagente. Além disso, a aplicabilidade de β -glucanas na imunomodulação, explora o potencial de um produto essencialmente usado como suplemento alimentar, sem efeitos colaterais e de fácil acesso.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

- I. Avaliar a resposta imune contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B, contido nas vacinas, em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.
- II. Avaliar a resposta ao *booster* (reforço).
- III. Avaliar o uso de β -glucanas, utilizada como suplemento alimentar, como capaz de melhorar a resposta imune.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de estudo clínico de coorte populacional, longitudinal, com intervenção, e análise de desfecho.

3.1 LOCAL DE ESTUDO E APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Todas as atividades tiveram início após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o CAAE de número 03033318.3.0000.5411.

O projeto foi encaminhado ao CEP, e após aprovação do mesmo foi iniciado convite para a participação dos doadores (idade entre 18 anos completos e 25 anos completos), sendo obtido a anuência através da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – em todas as etapas os pesquisadores estavam à disposição para esclarecimentos.

Foi elaborado um questionário para coleta de dados, que foi aplicado a cada participante individualmente. O questionário consistiu das seguintes informações: dados de identificação, epidemiológicos e de situações imunodebilitantes (doenças crônicas, uso de medicamentos, imunodeficiências), vícios (tabagismo). A coleta de dados foi realizada em ficha clínica (Anexo 1).

A informação sobre a situação vacinal anti-VHB foi confirmada pelo exame do cartão individual de vacinas de cada participante.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A abordagem dos participantes foi realizada entre os doadores que compareceram para doação de sangue, sendo informados sobre o estudo. Foram incluídos 46 doadores atendidos no Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, com idade entre 18 e 25 anos completos, todos do sexo masculino (visando minimizar influência de fatores hormonais, apesar de não haver evidências científicas que certifiquem que a existência de diferença na produção de anticorpos entre os gêneros), previamente vacinados para hepatite B com três doses. Os critérios de exclusão foram apresentar doenças crônicas, uso de corticoides ou imunossupressores, alergias a qualquer

componente da vacina, da cápsula dura de gelatina ou do suplemento, porém nenhum participante foi excluído do estudo por estes critérios.

3.3 DESENHO DO ESTUDO

Todos os doadores que consentiram participar, tiveram uma alíquota de 1ml de soro separada para o estudo. Esta alíquota foi obtida das amostras de sangue colhidas para exames de rotina dos doadores, sendo utilizada para identificar a presença, ou não, de anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (anti-Hbs), visto que os doadores eram vacinados com três doses na infância. Este teste é conhecido como anti-HBs, e não é feito de rotina no sangue dos doadores – os exames de rotina para hepatite B são HBsAg e anti-HBc.

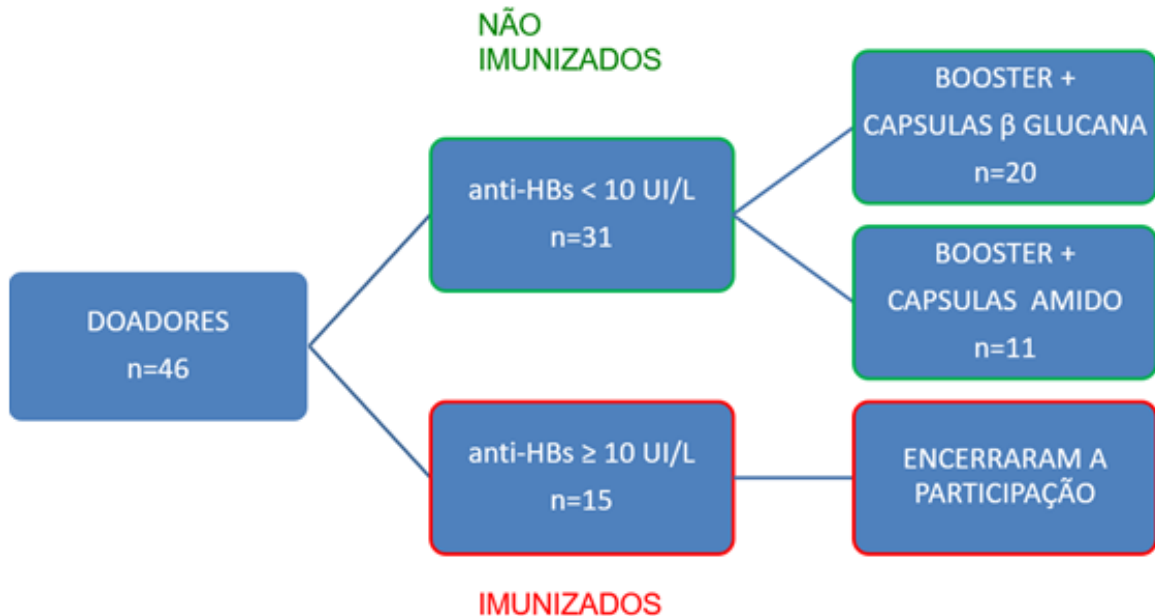
Aqueles que apresentaram anti-HBs reagente, acima de 10UI/L, foram considerados imunes, e a participação deles no estudo encerrou-se nesta etapa.

Os que tiveram o anti-HBs abaixo de 10UI/mL foram considerados não imunes e participaram das próximas etapas do estudo. Foram avaliados quanto a presença de antígeno de superfície HBsAg e anticorpo contra proteína do core (anti-HBc). Os negativos para anti-HBs, HBsAg, e anti-HBc, neste caso todos os participantes, seguiram para as próximas etapas, conforme exposto na figura 4.

Os participantes não imunizados foram divididos em dois grupos, de forma aleatória, sendo que um recebeu *booster* de vacina e cápsulas de 500mg de amido/dia - placebo (grupo controle); e outro grupo recebeu *booster* de vacina e cápsulas de suplementação com β -glucana – 500mg/dia, durante duas semanas, conforme exposto acima.

Foi considerado como dia zero, a data de início de administração de β -glucana /placebo, sete dias antes da aplicação do *booster* (vacina). Após a vacina, os participantes continuaram a receber as doses diárias de β -glucana /placebo por mais sete dias, totalizando 14 dias de suplementação. Nem os participantes, nem os pesquisadores de campo tinham a identificação dos participantes dos grupos. Por segurança, as informações sobre qual suplemento foi oferecido via cápsula ficou restrita a dois pesquisadores, para intervenções caso necessário.

Figura 4 – Desenho do estudo com divisão dos participantes em grupos: imunizados (anti-HBs \geq 10 UI/L) e não imunizados (anti-HBs $<$ 10 UI/L).



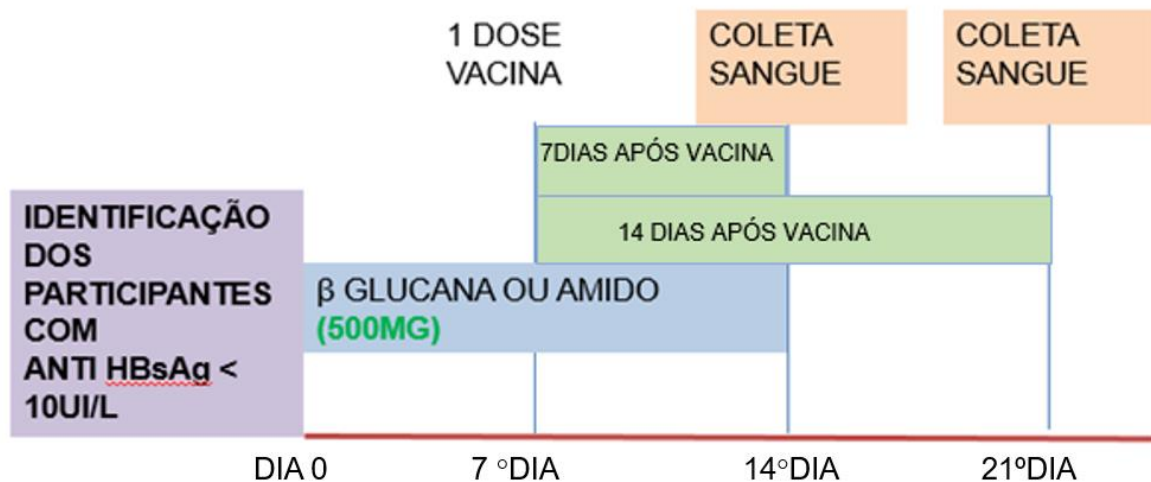
Fonte: o próprio autor

A suplementação utilizada foi com β -glucana 1-3, 1-6 obtida de *Saccharomyces cerevisiae*, comercial, em doses de 500mg, disponibilizadas em cápsulas duras (gelatina pura), com caracterização físico-química e certificação de qualidade para uso como suplemento alimentar. Foi utilizada a dose de 500mg/dia, dentro do limite preconizado na Europa, que estabelece como segura a dose máxima de 1275mg/dia para crianças maiores de 12 anos e adultos (European Food Safety Authority – EFSA1).

Em nosso estudo, a suplementação foi realizada durante 14 dias, dos quais 10 foram administrados diariamente pelos pesquisadores e quatro administrados por conta própria, pelos participantes, aos finais de semana.

As coletas de sangue foram realizadas nos dias 7 e 14 após *booster*. Cerca de 5ml de sangue foi colhido em tubo seco, para dosagem de anti-HBs, sendo centrifugadas e armazenadas em -70°C para serem processadas em um mesmo momento, após a última coleta. A determinação quantitativa do anticorpo contra o antígeno de superfície do VHB (anti-HBs) foi realizada pelo método de quimioluminescência, no Laboratório de Sorologia do Hemocentro de Botucatu.

Figura 5 – Esquema cronológico do estudo: dia zero contando a partir da data inicial da suplementação, terminado com a última coleta de sangue após 2 semanas do booster.



Fonte: o próprio autor

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE ANTI-HBS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA

As quantificações plasmáticas do título de anticorpos anti-HBS foram realizadas através de quimioluminescência utilizando o KIT ARCHITECT Anti-HBs 7C18, da marca Abbott. Trata-se de um imunoensaio de duas etapas que utiliza a tecnologia quimioluminescência por micropartículas.

Na primeira etapa, micropartículas paramagnéticas revestidas com antígeno HBsAg recombinante (rHBsAg) são incubadas com a amostra. Os anticorpos anti-HBs se presentes na amostra, se ligam as micropartículas.

Após lavagem, inicia-se a segunda etapa onde o conjugado de rHBsAg marcado com acridina é adicionado. É realizada outra lavagem, e então as soluções pré-trigger (pré-ativadora - contendo peróxido de hidrogênio) e trigger (ativadora - contendo hidróxido de sódio) são adicionadas. Ocorre a reação quimioluminescente, e seu resultado é medido em unidades relativas de luz (RLUs). A quantidade de RLUs é diretamente proporcional a quantidade anticorpos anti-HBs presentes na amostra. A concentração de anti-HBs na amostra é calculada através do uso da curva de calibração ARCHITECT Anti-HBs criada anteriormente.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software Minitab. A análise estatística foi feita pelo teste qui-quadrado de Fisher.

Os dados foram analisados pelo método de análise estatística descritiva simples, permitindo uma visão global da variação e descrevendo os dados por meio de tabelas e gráficos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos quarenta e seis (n=46) doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp incluídos no estudo, 69,56% não estavam imunizados, apresentando níveis anti-HBs < 10UI/L, apesar de terem sido vacinados com três doses de vacina Hepatite B na infância, conforme orientação do Ministério da Saúde.

Estes dados superam a taxa observada em pacientes atendidos no ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, com anti-HBs não reagente, quando indicada a necessidade de avaliação sorológica. Nestes pacientes, 57% não estavam imunes numa aferição anos após a administração do esquema completo da vacina hepatite B com 3 doses.

De modo semelhante, um estudo de Wang e colaboradores (2016) demonstrou que 50% dos indivíduos vacinados, com idade de 11 a 17 anos, não apresentavam níveis de anti-HBs detectáveis. Assim como Lu et al. (2009), que concluiu que a taxa de soropositividade anti-HBs diminuiu para 50% em 15 anos após a vacinação e em Jan et al (2010) que afirmou que a taxa de soropositividade do anticorpo para HBsAg (anti-HBs) diminuiu de 99% em 1 ano para 83% em 5 anos, 71,1% em 7 anos, 37,4% em 12 anos e 37% em 15-17 anos.

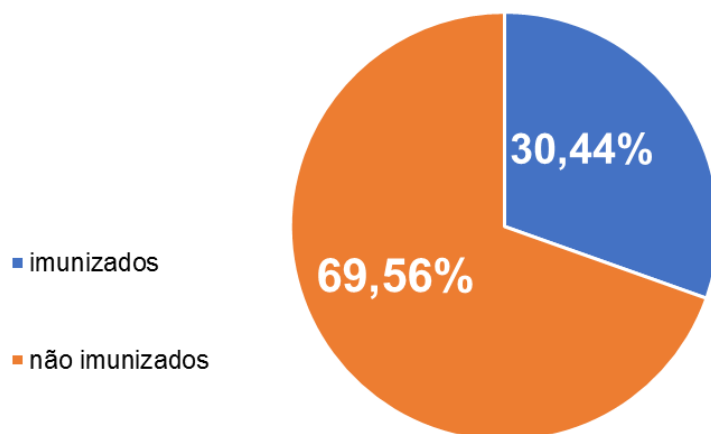
Um estudo na Alemanha avaliou a persistência de anticorpos contra hepatite B em indivíduos entre 14 e 15 anos de idade, vacinados com quatro doses administradas nos primeiros dois anos de vida. Apesar destes participantes terem recebido uma dose adicional de vacina comparado ao número de doses do nosso estudo, ainda assim apresentaram valores de soropositividade de apenas 53,7% (SCHWARZ, 2018).

A Sociedade Brasileira de Pediatria (2006) reportou em artigo publicado que os títulos de anticorpos podem cair, até mesmo em níveis indetectáveis, tornando os indivíduos vacinados com todas as doses recomendadas, suscetíveis a infecção.

Poland e Jacobson (2004) afirmaram que indivíduos que tinham nível de anticorpo adequado após a vacinação recente, perderam essa proteção ao longo do tempo, e 1 a 9% destes desenvolveram infecção para VHB (anti-HBc positivos).

Deste modo, a frequência de indivíduos não imunes encontrada em nosso estudo (69,56%) revela uma preocupação de saúde pública, visto que os dados do último boletim epidemiológico das Hepatites virais no Brasil (2019) demonstram aumento 5,12 vezes maior da taxa de detecção de casos de hepatite B em homens na faixa etária de 20 a 24 anos (4,1%), quando comparados à faixa de 15 a 19 anos (0,8%). Ou seja, após início da vida sexual aumenta significativamente a taxa de infecção pelo vírus B. Em mulheres o aumento de casos ocorre na mesma faixa etária (Brasil, 2019).

Gráfico 2 – Imunidade contra o vírus da Hepatite B de 46 doadores de sangue, vacinados com 3 doses na infância.



Fonte: o próprio autor

Assim, os dados obtidos contrariam estudos como de Poland e Jacobson (2004), que afirmam haver respostas adequadas de anticorpos, maior que 90% em adultos jovens e maior que 95% das crianças e adolescentes, e em contraponto com Moraes, Luna e Grimaldi (2010) que demonstraram uma soroproteção de 98,6% com a vacina VrHB-IB (Instituto Butantan) e de 95,6% com a vacina de referência (Engerix B®, Glaxo Smith Kline).

No entanto, vale ressaltar que a avaliação da soroproteção em nosso estudo foi cerca de 19 anos após a última dose, enquanto a maioria dos estudos realiza uma avaliação imediata cerca de um a três meses após a última dose da vacina.

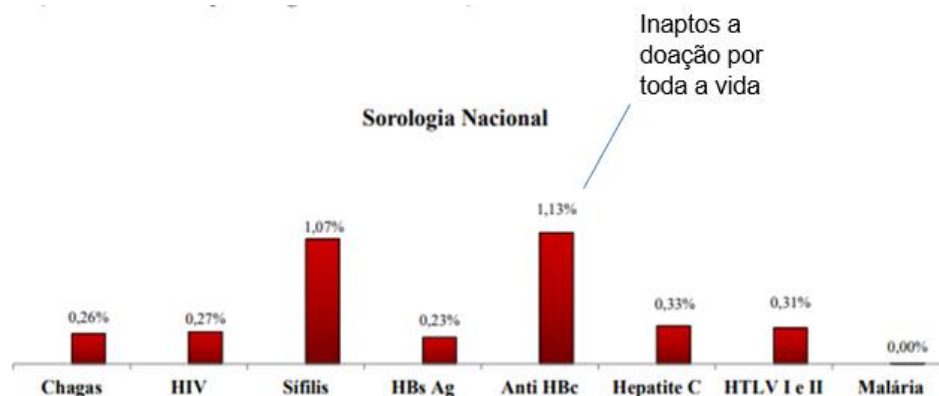
Geralmente a avaliação da resposta do anticorpo é realizada excepcionalmente em pessoas com fatores de risco, por falta de resposta ou,

naqueles com alto risco de exposição a sangue ou fluidos corporais, como profissionais de saúde. Assim, a resposta do anticorpo não é frequentemente testada após anos, com o intuito de avaliar a persistência da soroproteção a longo prazo.

No Brasil, o Ministério da Saúde não indica reforço em pessoas imunocompetentes vacinadas com três doses, como no caso dos nossos participantes, exceto na falha da resposta primária - com anti-HBs < 10 UI/L no período 30 a 60 dias após a última dose. Se caracterizada falha, indica-se revacinação em esquema completo. Não é protocolo nacional avaliar a soroproteção após cada dose. No entanto, atingida a imunização, não se faz necessário completar as três doses.

Analisando estes indivíduos na condição de doadores de sangue, apesar de não se mostrar um risco aos receptores de sangue, já que são realizados testes sorológicos para detecção da infecção (HBsAg e anti-HBc), estes indivíduos, antes potenciais doadores, acabam por serem caracterizados como inaptos à doação definitivamente. Além disso, a infecção para hepatite B é a principal doença transmissível a causar inaptidão para a doação de sangue (1,13%), conforme dados da ANVISA no ano de 2018.

Gráfico 3– Distribuição percentual nacional da inaptidão sorológica para os marcadores de doenças transmissíveis pelo sangue no Brasil em percentual.



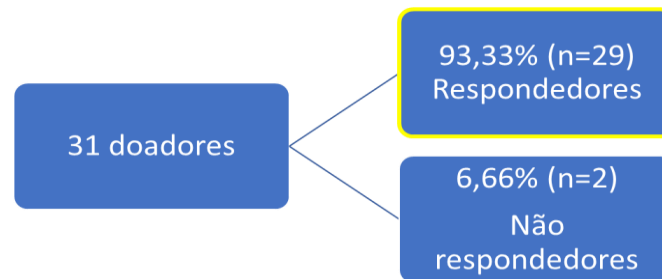
Fonte: ANVISA (2018).

Todos os participantes não imunes foram submetidos ao *booster*, sendo obtida soroproteção em 93,33% deles após duas semanas da primeira dose da revacinação. Jan et al. (2010) apresentou taxas soroprotetoras de anti-HBs após

booster de 20,5% após 7 a 10 dias da primeira dose; 75,6% após um mês (momento da realização da segunda dose); 94,5% após seis meses (realização da terceira dose) e 99,2% após sete meses da realização primeira dose *booster*. Deste modo, obteve-se em nosso estudo, soroproteção com uma dose *booster* equiparável a taxa da segunda dose deste estudo, nos levando a acreditar que não há real necessidade de novas doses de revacinação.

Em nosso estudo, dos 31 doadores com anti-HBs<10UI/L após a última dose da primovacinação, 29 responderam a primeira dose, independente do uso de β -glucana, apresentando níveis anti-HBs>10UI/L. Desta forma, não realizamos as demais doses de revacinação com um e seis meses após a primeira dose.

Figura 6 – Divisão entre respondedores e não respondedores, 2 semanas após a dose *booster*.



Fonte: próprio autor.

Lu et al. (2009) avaliaram 722 adolescentes, previamente vacinados, que tinham anti-HBs<10UI/L, e revacinaram com três doses de vacina hepatite B. Eles reportaram que 100% tornaram-se reagentes, porém não foram realizadas aferições entre as doses.

Na evolução da resposta ao *booster*, após uma semana de administração, foram avaliados 29 participantes, visto que no dia da coleta dois participantes faltaram. Do total, oito (n=8) indivíduos atingiram resposta satisfatória, sendo que sete apresentaram anti-Hbs na faixa de 10 a 100UI e um indivíduo teve quantificação acima de 100UI. Na análise intergrupos, a maioria dos indivíduos era do grupo suplementado com β -glucana (62,5%), ao passo que três (37,5%)

pertenciam ao grupo controle (placebo). No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=1$).

Na avaliação na segunda semana, foram incluídos 30 participantes, havendo abstenção de um indivíduo, que já havia apresentado soroproteção desde análise da primeira semana. Já aqueles indivíduos que faltaram na primeira avaliação, foram incluídos na segunda. Do total, 46,66% (14/30) atingiram níveis de anti-Hbs entre 10 – 100 UI, e outros 46,66% (14/30) tiveram quantificação acima de 100UI, totalizando 93,33% de participantes imunes. Apenas dois (6,67%) não atingiram resposta protetora com uma dose de vacina, sendo mantido nestes o protocolo de vacinação. No entanto, não se monitorou neste estudo, a soroproteção após as demais doses.

Resultados semelhantes foram verificados por Wang e colaboradores (2016), sendo reportaram que 3 a 7% de pessoas não são respondedoras ou são produtoras de níveis muito baixos de anti-HBs, assim como em estudo da Alemanha, por Schwarz et al. (2018), no qual 7% dos participantes soronegativos antes da vacinação *booster* não atingiram concentrações de anticorpos soroprotetores após a primeira dose da revacinação e foram considerados não respondedores.

Na análise intergrupos, 89,47% dos participantes do grupo suplementado com β -glucanas desenvolveram soroproteção na segunda semana pós-*booster*, e 100% do grupo placebo também obteve. Na análise estatística não houve diferença do uso de β -glucanas na obtenção de resposta ($p=0,519$).

Tabela 2 – Evolução da resposta a uma dose de vacina Hepatite B, em doadores vacinados na infância e não imunes, segundo estímulo recebido (frequência absoluta e relativa).

	UMA SEMANA PÓS VACINA						DUAS SEMANAS PÓS VACINA					
	<10UI		10 a100UI		>100UI		<10UI		10 a100UI		>100UI	
GLUCANA	13	72,2%	5	27,78%	0	0%	2	10,53%	13	68,42%	4	21,05%
PLACEBO	7	70%	2	20%	1	10%	0	0%	1	9%	10	91%

A significativa resposta ao *booster*, 93,33% em apenas duas semanas, leva a crer que em situações de exposições de risco ao VHB, indivíduos com três doses completas, porém com anti-HBs<10UI/L, podem se beneficiar apenas com uma dose de *booster*, devido a resposta amnésica rápida, sem a necessidade de imunoglobulina, a qual nem sempre está facilmente disponível, principalmente em lugares menos desenvolvidos e longe de grandes centros. Schwarz et al. (2018) corrobora este fato ao demonstrar que, mesmo na ausência de níveis de anticorpos soroprotetores a proteção contra a hepatite B após a exposição ao vírus é montada por uma resposta amnésica, obtendo valores de soroproteção iguais aos de nosso estudo (93,3%), com um mês após a dose *booster* com a vacina monovalente hepatite B.

Apesar da ausência de diferença entre o uso de β -glucana e o placebo neste estudo, não se descarta o potencial uso desta como imunomodulador e no aprimoramento das respostas às vacinas, pois devido a rápida resposta da memória imunológica não se pôde avaliar adequadamente esta influência. A avaliação da β -glucana como adjuvante oral nas doses iniciais de vacinação, condições de ausência de memória imunológica, representa um grande potencial.

Em nosso estudo não foram observados efeitos colaterais com a suplementação de 500mg/diária de β -glucana, no período de 14 dias, sendo muito bem tolerado pelos participantes. Podendo estes dados contribuir para o uso como suplemento oral na função de estimulante do sistema imune. Leentjens et al. (2014), em estudo clínico avaliando o efeito da β -glucana na resposta imune inata de humanos, utilizaram 1000mg/dia (em duas doses de 500mg), não sendo observadas complicações. Em outro estudo para avaliação da segurança e tolerabilidade de uma forma solúvel de β -glucanas orais, foram administradas diferentes doses (100mg/dia, 200mg/dia ou 400mg/dia), respectivamente, por 4 dias consecutivos, sem serem observados eventos adversos relacionados ao suplemento, com aumento da concentração de imunoglobulina A na saliva apenas na dose de 400mg/dia, sugerindo um efeito imunológico sistêmico a partir desta dose (LEHNE et al. 2006). Os efeitos toxicológicos indesejáveis referentes a β -glucana apenas foram relatados em administrações intravenosas, não havendo relatos de complicações por administração oral. A segurança das β -glucanas também pode ser deduzida a partir do modo de ação, já que não atacam diretamente as células infectadas ou os

agentes causadores da infecção, mas modulam o mecanismo de defesa do hospedeiro (STIER; EBBESKOTTE; GRUENWALD, 2014).

Com base nos achados, e considerando que Hepatite B é a principal doença transmissível a causar inaptidão para a doação de sangue, seria relevante incluir uma dose da vacina de reforço de rotina para todos os doadores, na primeira doação, ou seja, no momento em que apresentam anti-HBs, HBsAg e anti-HBc negativos, visando a preservação destes doadores e a segurança transfusional. Outra possibilidade seria a inclusão de dose de reforço após 5 ou 10 anos da última dose, para prevenção antes da iniciação sexual e/ou contato com outros fatores de risco e evitar perda de possíveis doadores no futuro.

Os dados do último boletim epidemiológico das Hepatites virais que demonstra relevante aumento do número de casos de hepatite B após os 19 anos, também corroboram à necessidade de reforço vacinal, que pode ser proposta por volta dos 15 anos, visto que a faixa etária de 15 a 19 anos apresenta baixos índices (0,8%).

Essa resposta ao *booster*, também direciona a uma reavaliação dos protocolos de revacinação contra hepatite B com três doses, possibilitando diminuir custos e facilitando a adesão ao diminuir o número de doses na revacinação para uma dose, já que a soroproteção pôde ser observada em 93,33% dos participantes, enquanto a taxa de falha de imunização (6,67%) equiparou-se a taxa de não respondedores à vacina, independente do número de doses administradas.

Quanto ao uso da β -glucana como imunomodulador, nossos resultados indicam que o modelo de vacinação proposto deve ser revisto, sugerindo o uso como adjuvante oral em primovacinação, onde não há resposta imunológica de memória, podendo neste cenário, haver maior influência da ação imunostimulatória da β -glucana.

5 CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados concluímos que:

I. Nos doadores de sangue avaliados, todos com esquema vacinal completo para hepatite B, a resposta imune contra o antígeno de superfície do VHB está ausente em 69,56%, levando a um questionamento sobre a verdadeira proteção contra a hepatite B na população.

II. A maior parte da população é considerada respondedora a vacina, com níveis de não respondedores compatíveis a dados epidemiológicos internacionais. Apresentando também uma rápida resposta ao *booster* devido à memória imunológica, com apenas uma dose de reforço (93,33%).

III. Não se pôde avaliar a influência de β -glucana, utilizada como suplemento alimentar, na capacidade de melhorar a resposta imune, possivelmente devido a memória imunológica presente e com rápida resposta. Não houve diferença na proporção de respondedores em relação a soroproteção com 7 e 14 dias, quando comparados os grupos de suplementação com placebo e β -glucana .

REFERÊNCIAS

- ANVISA .6° Boletim de Produção Hemoterápica 2018. **Hemoprod 2017**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, Novembro de 2018.
- BOWMAN, Shaun M.; FREE, Stephen J.. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, [s.l.], v. 28, n. 8, p.799-808, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20441>.
- BRASIL. **Boletim Epidemiológico** – Hepatites Virais, v50, n.17, Brasília, DF; 2019. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2019>
- BROWN, Gordon D.. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.33-43, 18 nov. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1745>.
- BURG, Ashley R. et al. Orally administered β -glucan attenuates the Th2 response in a model of airway hypersensitivity. **Springerplus**, [s.l.], v. 5, n. 1, 21 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-016-2501-1>.
- CHAN, Godfrey et al. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal Of Hematology & Oncology**, [s.l.], v. 2, n. 1, 2009. Springer Nature. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-25>
- DENNEHY, Kevin M.; BROWN, Gordon D.. The role of the β -glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. **Journal Of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 82, n. 2, p.253-258, 2 maio 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1206753>.
- DIENSTAG, Jules L.. Hepatitis B Virus Infection. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 359, n. 14, p.1486-1500, 2 out. 2008. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra0801644>.
- GANEM, Don; PRINCE, Alfred M.. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 350, n. 11, p.1118-1129, 11 mar. 2004. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra031087>.
- GANTNER, Benjamin N. et al. Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 197, n. 9, p.1107-1117, 28 abr. 2003. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20021787>
- HERRE, J. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. **Molecular Immunology**, [s.l.], v. 40, n. 12, p.869-876, fev. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.007>.

JAN, Chyi-feng et al. Determination of immune memory to hepatitis B vaccination through early booster response in college students. **Hepatology**, [s.l.], v. 51, n. 5, p.1547-1554, 28 jan. 2010. Wiley. <https://doi.org/10.1002/hep.23543>

LEENTJENS, Jenneke et al. The Effects of Orally Administered Beta-Glucan on Innate Immune Responses in Humans, a Randomized Open-Label Intervention Pilot-Study. *Plos One*, [s.l.], v. 9, n. 9, 30 set. 2014. Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2501-1>

LEHNE, G. et al. Oral administration of a new soluble branched beta-1,3-D-glucan is well tolerated and can lead to increased salivary concentrations of immunoglobulin A in healthy volunteers. **Clinical And Experimental Immunology**, [s.l.], v. 143, n. 1, p.65-69, jan. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02962.x>.

LI, Ming-hui et al. Predictors of sustained functional cure in hepatitis B envelope antigen-negative patients achieving hepatitis B surface antigen seroclearance with interferon-alpha-based therapy. **Journal Of Viral Hepatitis**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.32-41, jul. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jvh.13151>.

LU, John Jenn-yenn et al. Hepatitis B immunity in adolescents and necessity for boost vaccination: 23 years after nationwide hepatitis B virus vaccination program in Taiwan. **Vaccine**, [s.l.], v. 27, n. 47, p.6613-6618, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.007>.

MAST F. et al. Hepatitis B vaccine. In: **Plotkin SA**, Orenstein WA (eds.), *Vaccines*, 4th ed., WB Saunders, Philadelphia. 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico** - Programa Nacional de Imunizações: aspectos históricos dos calendários de vacinação e avanços dos indicadores de coberturas vacinais, no período de 1980 a 2013, v46, n.30; 2015, Available from: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/14/besvs-pni-v46-n30.pdf>

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. **Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais**, 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Available from: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/11/manual-centros-referencia-imunobiologicos-especiais-5ed.pdf>

MORAES, José Cássio de; LUNA, Expedito José de Albuquerque; GRIMALDI, Rosária Amélia. Imunogenicidade da vacina brasileira contra hepatite B em adultos. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.353-359, abr. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89102010000200017>.

MURPHY, e Angela; DAVIS, J Mark; CARMICHAEL, Martin D. Immune modulating effects of β -glucan. **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.656-661, nov. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mco.0b013e32833f1afb>.

POLAND, Gregory A.; JACOBSON, Robert M.. Prevention of Hepatitis B with the Hepatitis B Vaccine. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 351, n. 27, p.2832-2838, 30 dez. 2004. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmcp041507>.

SALEHI, Maryam et al. Effect of tetanus-diphtheria vaccine on immune response to Hepatitis b vaccine in low-responder individuals. **International Journal Of Preventive Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 1, 2016. Medknow. <http://doi.org/10.4103/2008-7802.186586>

SCHWARZ, Tino F. et al. Long-term antibody persistence against hepatitis B in adolescents 14–15-years of age vaccinated with 4 doses of hexavalent DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine in infancy. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [s.l.], p.1-7, 17 ago. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2018.1509658>.

SOARES, Edna; GROOTHUISMINK, Zwier M.a.; BOONSTRA, André; BORGES, Olga. Glucan Particles Are a Powerful Adjuvant for the HBsAg, Favoring Antiviral Immunity. *Molecular Pharmaceutics*, [s.l.], v. 16, n. 5, p. 1971-1981, 9 abr. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01322>.

SOARES, Edna; JESUS, Sandra; BORGES, Olga. Chitosan: β -glucan particles as a new adjuvant for the hepatitis b antigen. : β -glucan particles as a new adjuvant for the hepatitis B antigen. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, [s.l.], v. 131, p. 33-43, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.018>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Vacina contra hepatite B. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.288-289, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42302006000500009>.

STIER, Heike; EBBESKOTTE, Veronika; GRUENWALD, Joerg. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. **Nutrition Journal**, [s.l.], v. 13, n. 1, 28 abr. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-13-38>

SUCHECKA, Dominika et al. Hepato- and gastro- protective activity of purified oat 1–3, 1–4- β - d -glucans of different molecular weight. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 91, p.1177-1185, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.062>.

THOMPSON, Iain J; OYSTON, Petra Cf; WILLIAMSON, Diane e. Potential of the β -glucans to enhance innate resistance to biological agents. **Expert Review Of Anti-infective Therapy**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.339-352, mar. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.10.10>.

TSONI, S. Vicky; BROWN, Gordon D.. β -Glucans and Dectin-1. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1143, n. 1, p.45-60, nov. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1443.019>.

VOLMAN, Julia J. et al. Dietary (1→3), (1→4)- β -d-glucans from oat activate nuclear factor- κ B in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. **Nutrition Research**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.40-48, jan. 2010. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.10.023>.

WANG, Jing et al. β -Glucan Oligosaccharide Enhances CD8+T Cells Immune Response Induced by a DNA Vaccine Encoding Hepatitis B Virus Core Antigen. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, [s.l.], v. 2010, p.1-10, 2010. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/645213>

WANG, Zhen et al. Prevalence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in a blood donor population born prior to and after implementation of universal HBV vaccination in Shenzhen, China. **Bmc Infectious Diseases**, [s.l.], v. 16, n. 1, 20 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1834-2>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Media Centre** . Hepatitis B. 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>>. Acesso em: 9fev. 2019.

YUEN, Man-fung et al. Hepatitis B virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-1, jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.35>.

ANEXOS

ANEXO A

Questionário

1. Nome: _____
2. Idade: _____ anos
3. Endereço _____
4. Telefone para contato: _____
5. Sexo: feminino masculino
6. Altura: _____ Peso: _____
7. Profissão: _____
8. Carteira vacinal está atualizada? Sim Não
Se não, sabe qual está desatualizada? _____
Foi vacinado contra hepatite B? Sim Não
Com que idade? _____
9. Recebeu quantas doses? 3 doses 2 doses 1 dose
 nenhuma Não sei
10. Realizou exame para avaliar resposta da vacinação (Anti HBsAg)? Sim Não
Qual resultado?
 Positivo (Anti HBsAg > 10UI/L) Negativo (Anti HBsAg < 10UI/L) Não sei
Quando? _____
11. Já foi exposto ao Vírus da hepatite B? Sim Não Quando? _____
Realizou tratamento? Sim Não Quando? _____
12. Apresenta alguma alergia: Sim Não
 Alimentar A qual alimento? _____
 Medicamentosa A quais medicamentos? _____
 Outras _____
13. Já tomou alguma vacina que te deu reação? Sim Não Qual vacina?

Qual tipo de reação? _____
Apresenta alguma doença/comorbidade? Sim Não
Qual? _____
14. Faz uso de alguma medicação? Sim Não
Qual? _____
15. Histórico familiar de algum problema de saúde? Sim Não
Qual? _____
16. Tem a carteira de vacinação ? Sim Não
Se sim, podemos ver? Sim Não
Anotação do pesquisador: data das doses de vacina contra hepatite B
1ª dose ____/____/____ 2ª dose ____/____/____ 3ª dose ____/____/____
4ª dose ____/____/____

ANEXO B**Parecer Consubstanciado do CEP****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Resposta imune à vacina contra hepatite B com suplementação de Beta glucana.

Pesquisador: PAULA FRANCO OBA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03033318.3.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.094.586

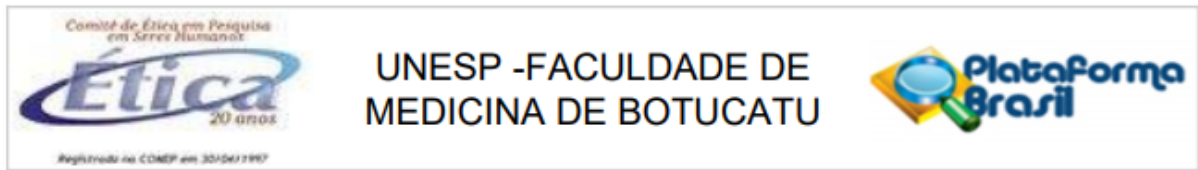
Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos Apresentação do Projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios foram retiradas dos documentos submetidos e informações inseridas pelo pesquisador responsável na Plataforma Brasil.

Os pesquisadores referem que Beta-glucanas são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais, como do *Saccharomyces cerevisiae*. Sendo que a - glucana apresenta potencial para melhorar a resposta a antígenos, inclusive no aumento da ativação de células T e B em resposta ao HBsAg, antígeno da vacina contra o vírus da hepatite B. Na população vários indivíduos apresentam anti-HBs não reagente (imunidade não efetiva), mesmo tendo recebido anteriormente 3 doses de vacina, sendo necessário a realização de três novas doses da vacina, de acordo com o Ministério da Saúde. Trata-se de estudo clínico de coorte populacional, longitudinal, com intervenção, e análise de desfecho. Destaca-se que todas as atividades só terão início após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu. Critério de Inclusão: Doadores de sangue do hemocentro, com idade entre 18 anos completos e 25 anos completos, com AntiHBs10UI/L serão excluídos da revacinação e suplementação alimentar com beta glucana ou placebo.

Tamanho amostral: 200 participantes (grupo3=140; grupo2=30; grupo1=30)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609
CEP: 18.618-970
E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.094.586

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem como objetivos avaliar os dados epidemiológicos da vacinação contra o vírus da Hepatite B e sua efetividade em doadores do Hemocentro de Botucatu, assim como se a resposta ao *booster* com novas doses é aumentada com o uso de beta-glucana como suplemento alimentar, e a depender dos resultados, sugerir ou não mudanças de conduta em relação ao *booster*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Risco de dor, inerente ao ato, e extravasamento de sangue (raro com profissional experiente), durante a coleta de sangue. Risco com beta glucana – é um suplemento, cujo componente faz parte do processo de produção da vacina; reações alérgicas são raríssimas, mas serão monitorizadas. Risco de reações locais com a vacina contra hepatite B. Em relação ao amido, como faz parte da alimentação, não se espera evento adverso com o uso. Assim como com a cápsula de gelatina, que também faz parte da alimentação, não se espera evento adverso com o uso, porém pessoas com alergia à gelatina serão excluídas durante questionário. **Benefícios:** Os benefícios do estudo serão para futuros pacientes, após os pesquisadores terem o conhecimento dos resultados da pesquisa: se com o uso de beta glucana como suplemento for suficiente uma dose para atingir níveis de resposta maior que sem beta glucana, pode-se discutir novos esquemas de vacinação, além de fornecer dados epidemiológicos sobre grupo de doadores imunizados contra hepatite B. Para o doador, o benefício será ficar sabendo que não se não estava com níveis de defesa adequados, recebendo novas doses de vacina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa com metodologia adequada para sua execução. O pesquisador apresenta um custo de R\$ 5.000,00, com financiamento próprio. Será obtida uma alíquota de 1 ml de soro a partir das amostras de sangue colhido para os exames de rotina dos doadores. Há informação que haverá armazenamento deste soro, apresentado o "Regulamento Funcional do Biorrepositório".

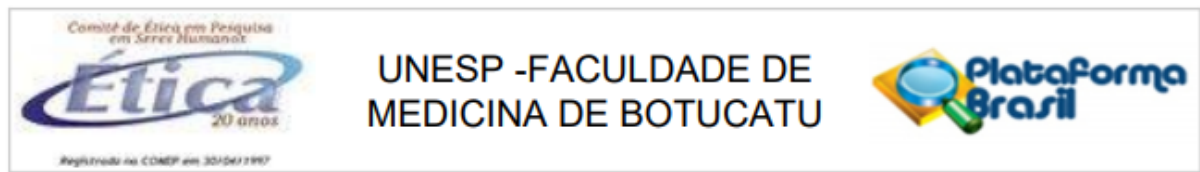
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados. O TCLE encontra-se adequado e em forma de convite. Há informação que haverá armazenamento deste soro e foi apresentado o "Regulamento Funcional do Biorrepositório".

1. Recomendações:

Não há

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.094.586

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em reunião extraordinária, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião extraordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 18 de dezembro de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

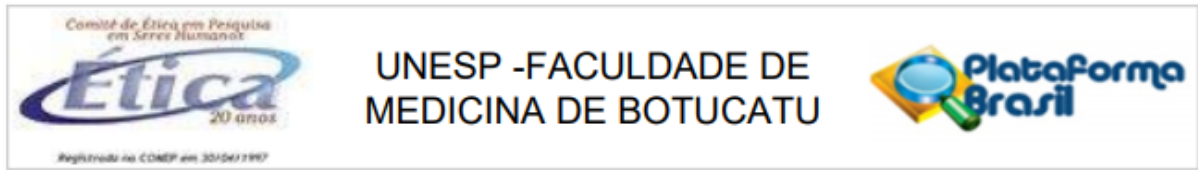
Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1248716.pdf	11/12/2018 11:50:32		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	oficiocep.pdf	11/12/2018 11:49:02	PAULA FRANCO OBA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositoriopdf.pdf	11/12/2018 11:48:33	PAULA FRANCO OBA	Aceito
Outros	TermoHemocentro.pdf	12/11/2018 16:51:30	PAULA FRANCO OBA	Aceito
Outros	CRIE.pdf	12/11/2018 16:50:41	PAULA FRANCO OBA	Aceito
Outros	SIPE.pdf	12/11/2018 16:49:22	PAULA FRANCO OBA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	12/11/2018 16:47:50	PAULA FRANCO OBA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuencialInstitucional.pdf	12/11/2018 16:47:30	PAULA FRANCO OBA	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	12/11/2018 16:41:49	PAULA FRANCO OBA	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE.pdf	12/11/2018	PAULA FRANCO	Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.094.586

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	16:41:34	OBA	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	12/11/2018 16:41:10	PAULA FRANCO OBA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 19 de Dezembro de 2018

Assinado por:

SILVANA ANDREA MOLINA LIMA

(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

Município: BOTUCATU

E-mail: cep@fmb.unesp.br