UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Aline Márcia Marques Braz

Caracterização Imunocelular em Coorte de Pacientes Cirróticos com Resposta Virológica Sustentada Obtida com Drogas de Ação Direta para Hepatite C Crônica.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Giovanni Faria Silva
Coorientadora: Profª. Drª. Márjorie de Assis Golim

Botucatu
(2020)

Aline Márcia Marques Braz

Caracterização Imunocelular em Coorte de Pacientes Cirróticos com Resposta Virológica Sustentada Obtida com Drogas de Ação Direta para Hepatite C Crônica.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Giovanni Faria Silva
Coorientadora: Profª. Drª. Márjorie de Assis Golim

Botucatu
(2020)

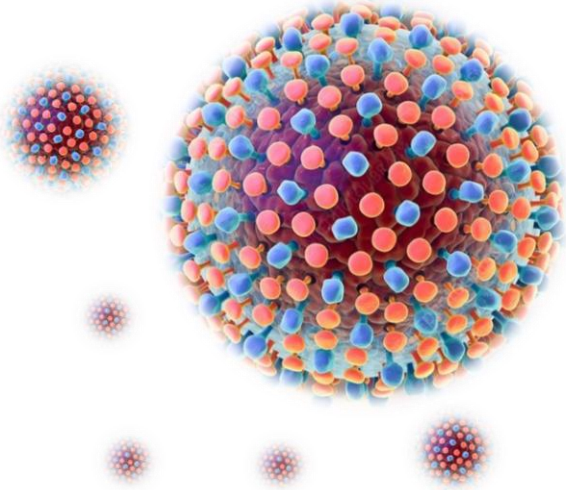
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

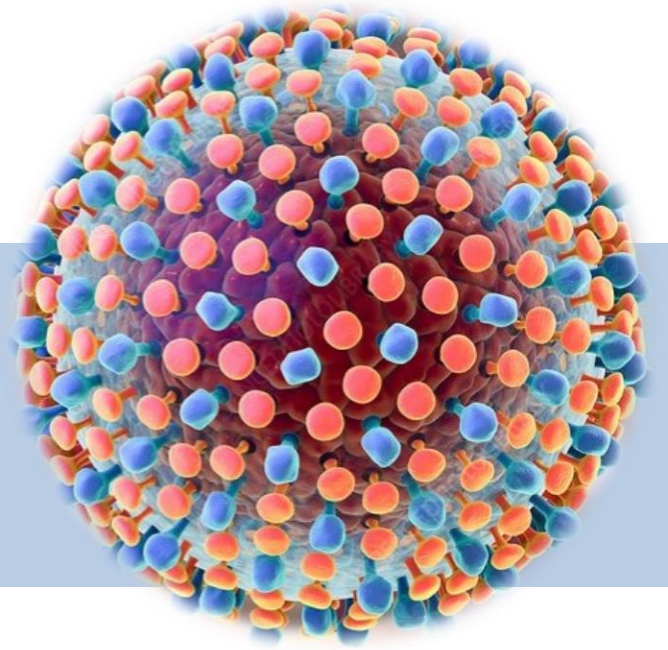
Braz, Aline Márcia Marques.
Caracterização imunocelular em coorte de pacientes cirróticos com resposta virológica sustentada obtida com drogas de ação direta para hepatite C crônica / Aline Márcia Marques Braz. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Giovanni Faria Silva
Coorientador: Márjorie de Assis Golim
Capes: 40101002

1. Fígado - Cirrose. 2. Virologia. 3. Técnicas de imagem por elasticidade. 4. Hepatite C.

Palavras-chave: Cirrose hepática; Elastografia; Hepatite C.





DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

Dedico a concretização deste sonho,

Ao meu esposo Everton,

Pela compreensão,
companheirismo em todos os momentos,
incentivo constante e amor incondicional.

Aos meus filhos Ana Clara e Noah,

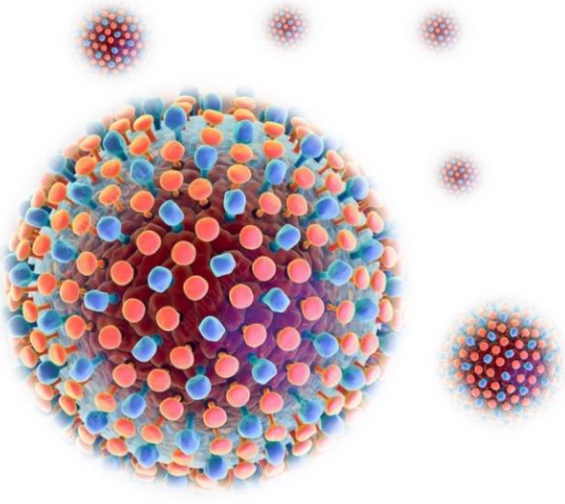
Pela compreensão nos momentos de ausência,
pela força e pelo amor infinito
que me motivaram em cada segundo desta caminhada.

Aos meus pais Fátima e Edvaldo,

Pelos princípios e valores que me ensinaram,
pela formação e oportunidades que me proporcionaram,
e pelo amor incondicional que me dedicaram.

A minha irmã Lilian,

Pela amizade sincera,
companheirismo e amor.



Meus sinceros agradecimentos,

A Deus, todo poderoso, pela proteção e todas as bênçãos a mim concedidas.

Aos pacientes que fizeram parte deste estudo: vocês são a principal motivação de perseverar em fazer ciência. Obrigada pela ajuda, sem vocês nada disso seria possível!

Ao meu orientador Prof. Dr. Giovanni Faria Silva, pela confiança, oportunidades, ensinamentos e todo tempo dedicado ao meu crescimento profissional.

À minha querida coorientadora Prof.ª Dr.ª Márjorie de Assis Golim por acreditar no meu potencial e me conduzir desde a iniciação científica até aqui. Obrigada pelas inúmeras oportunidades proporcionadas, pela disponibilidade irrestrita, por todos os ensinamentos a mim dedicados tanto na vida profissional como pessoal.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado (*in memoriam*), por todo ensinamento, tempo e paciência a mim dedicados. Profissional exemplo de dedicação e competência, ser humano sinônimo de humildade, humanidade e caráter.

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo por me abrir as portas e me acolher de maneira irrestrita. Igualmente aos meus companheiros de laboratório: Léia, Rodrigo, Francielle, Lia, Mariana, Larissa e Guilherme, por todo companheirismo e paciência.

À equipe do Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas de Botucatu: Mari Nilce, Vanessa Gutierrez, Flávia Chiacchio, Vanessa Nogueira e Vera Escábia, por toda ajuda no recrutamento dos pacientes.

À equipe da clínica Vitae pela colaboração na realização dos exames de elastografia.

À minha parceira de doutorado Fernanda Winckler por toda ajuda, paciência e companheirismo. Sem você este trabalho não seria possível.

Ao professor Rafael Plana Simões pela preciosa colaboração neste trabalho.

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu pela oportunidade à minha formação.

Aos funcionários da sessão de pós-graduação da FMB, pela prestatividade e competência.

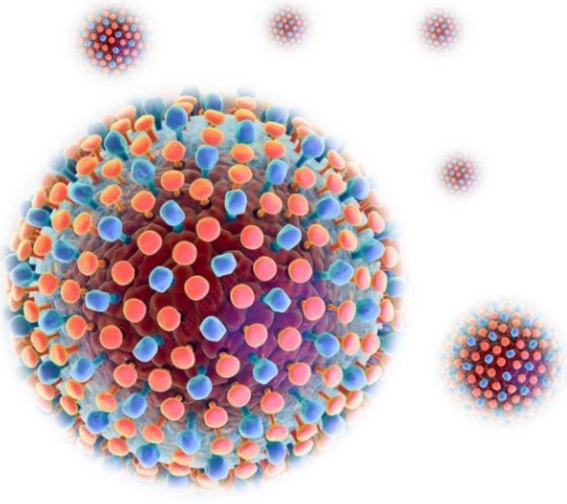
Ao Hospital das Clínicas pela oportunidade de recrutamento dos pacientes inseridos neste trabalho.

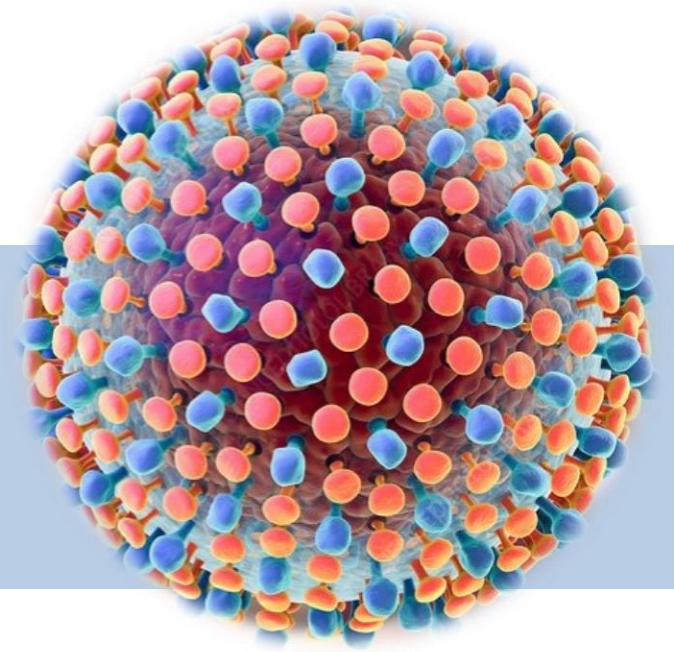
À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou este projeto por meio do processo 2016/25416-3.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que fomentou minha bolsa de estudos durante parte do meu doutorado para que eu pudesse me dedicar exclusivamente à condução deste projeto de pesquisa.

Aos pesquisadores com quem trabalhei durante o período do meu doutorado, obrigada pela confiança e oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

Aos meus familiares por toda compreensão, amor e motivação.





EPÍGRAFE

É magnífico ver a interface entre a ciência e a arte.

Já sabiamente dizia o poeta Hesíodo nos séculos VIII-VII a.C.:

> "...E prendeu com infrágeis peias Prometeu astuciador, cadeias dolorosas passadas ao meio duma coluna, e sobre ele incitou uma águia de longas asas, ela comia o fígado imortal, ele crescia à noite todo igual o que comera de dia a ave de longas asas..."

Prometeu através de Ésquilo (452 e 459 a.C.) assim justificava seu castigo:

> "...Graças a mim, os homens não mais desejam a morte... Dei-lhes uma esperança infinita no futuro... Consegui que eles participem do fogo celeste... E desse mestre aprenderão muitas ciências e artes..."

Que a ciência seja o fogo que arde em nossas vidas para que sejamos semeadores do conhecimento;

Que possamos aprender a arte de ensinar, e reconhecer a necessidade de aprender constantemente;

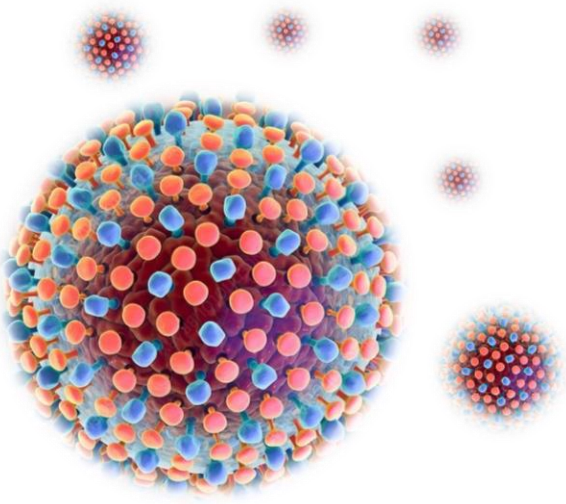
Que a águia que nos for imposta ao longo da jornada, não nos impeça de renovarmos as forças e a esperança na caminhada;

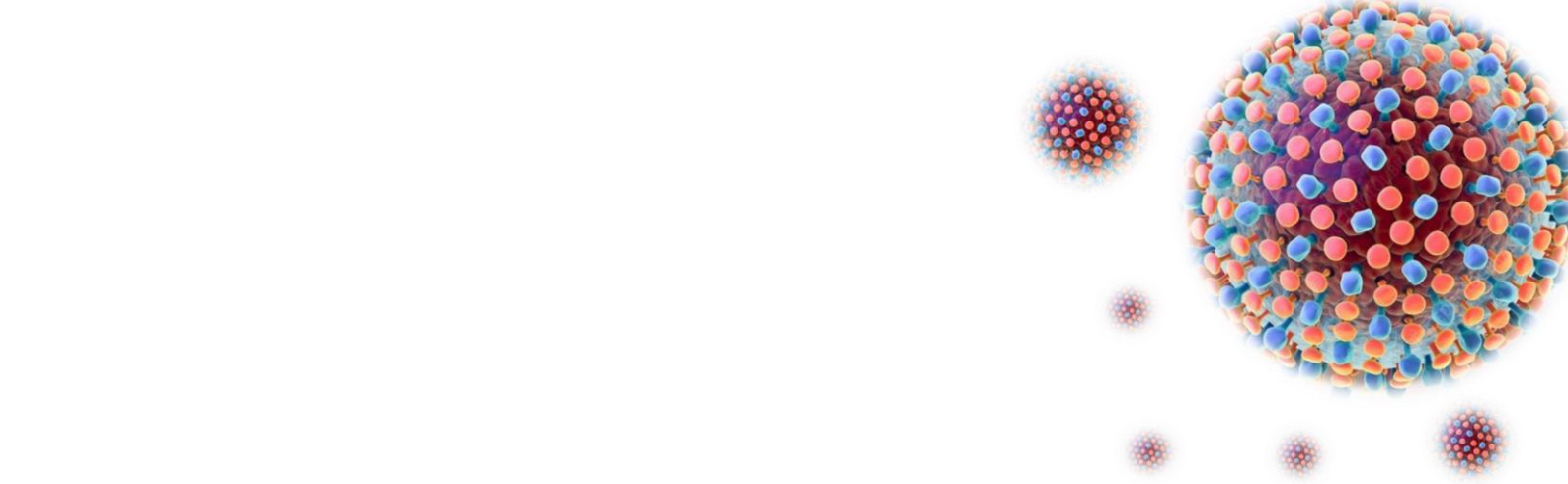
Que a humanidade seja a nossa motivação diária e o amor ao próximo nosso combustível inesgotável;

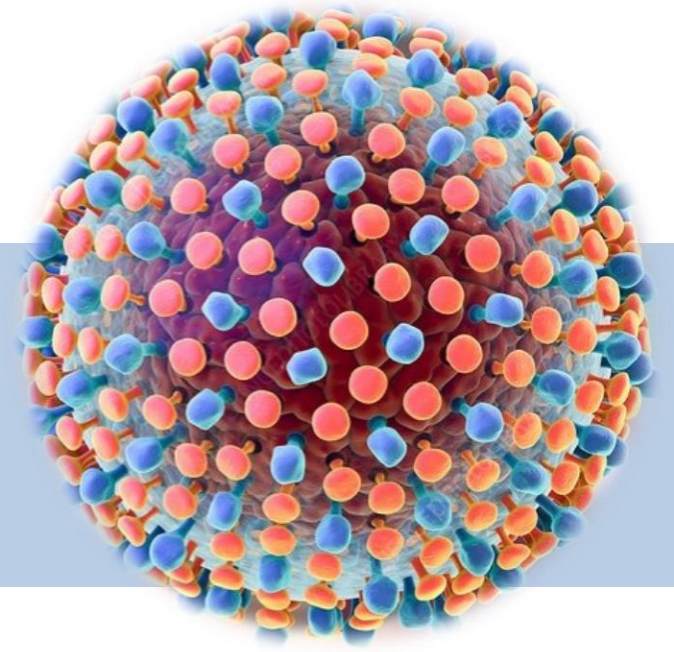
Para que assim como Prometeu, utilizemos o dom que Deus nos deu:

Para que um dia possamos explicar, aquilo que nossos olhos por si só ainda não podem contemplar.

Aline Braz







PREFÁCIO

> *Tanto nas ciências como nas artes, não se trata mais de simples "escolas" ou de "movimentos", em que alguns cientistas ou artistas, compartilhando um mesmo paradigma, continuavam a produzir cada um por conta própria. Trata-se, ao contrário, de verdadeiras criações coletivas, como as telas pintadas a seis mãos por Andy Warhol, Basquiat e Francesco Clemente, nas quais seria inútil distinguir as contribuições pessoais, dado que a grandeza das obras consiste exatamente no conjunto.*
>
> [1]Domenico De Masi (2005).

Vivenciamos aqui a concretização de um trabalho multiprofissional. A convergência de olhares, de experiências, opiniões e contribuições, trazendo a aproximação de diferentes universos, entrelaçando-os em prol da saúde, da ciência, do benefício ao paciente.

A trajetória vivenciada pela aluna, foi galgada na dedicação profícua, abraçando os desafios com determinação, demonstrando vocação científica e criativa, conduzida pelo fascínio em busca do conhecimento. Estas características possibilitaram uma atuação protagonista, desempenhando a articulação necessária à execução de um trabalho coletivo.

A realidade pandêmica que atualmente vivenciamos torna evidente que uma das características fundamentais na formação profissional, especialmente no campo científico, é a capacidade de trabalhar em equipe. O mundo precisou unir-se para tentar mitigar os estragos impostos pelo novo vírus. As maiores contribuições têm emergido da união, das criações conjuntas.

Que esta seja a mola propulsora que venha impulsionar os jovens que se propõem a experimentar a beleza do universo científico. Que aprimorem sempre a interação, que vivenciem o trabalho conjunto, que saibam que quando nos esforçamos juntos conseguimos extrair o melhor de cada um, visando um bem maior. Isso permite inovação, crescimento tecnológico, produção científica e retorno à sociedade. É disso que nosso novo mundo precisa!

Marjorie de Assis Golim

De Masi, D. Criatividade e Grupos Criativos. Vol I. Descoberta e invençãoRio de Janeiro: Ed. Sextante, 2005.

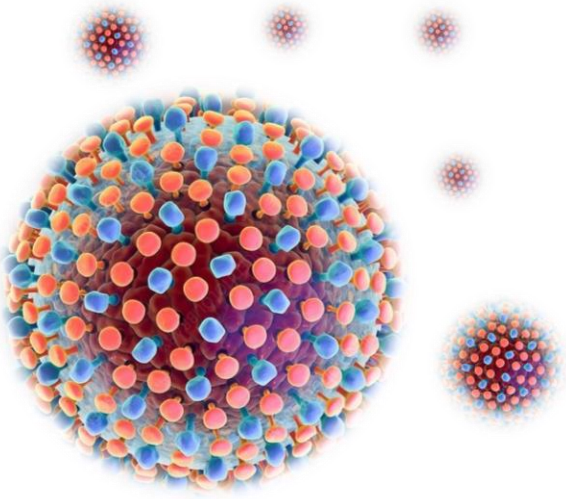
BRAZ, A. M. M. **Caracterização imunocelular em coorte de pacientes cirróticos com resposta virológica sustentada obtida com drogas de ação direta para hepatite C crônica.** 2020. 119 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

RESUMO

Pacientes cirróticos com hepatite C crônica, mesmo após resposta virológica sustentada (RVS), devem ser monitorados para avaliação da função hepática e rastreamento do carcinoma hepatocelular (CHC) a cada seis meses por toda a vida. Após o tratamento e depuração viral, inicia-se a fase de resolução da inflamação e regressão da fibrose. No entanto, avaliações por elastografia demonstram que 30 a 40% dos pacientes não apresentam diminuição da rigidez hepática após RVS. Este foi um estudo de *coorte* em pacientes cirróticos para identificar fatores imunológicos envolvidos na regressão da rigidez hepática na hepatite C crônica e caracterizar possíveis biomarcadores séricos de valor prognóstico. O universo amostral foi composto por 31 pacientes cirróticos que realizaram imunofenotipagem leucocitária, quantificação de citocinas/quimiocinas e inibidores de metaloproteinase (TIMP 1, 2, 3) no pré-tratamento (M1) e na avaliação da RVS (M2) (análise retrospectiva). Os critérios de inclusão foram: infecção pelo genótipo 1 do VHC, diagnóstico de cirrose, ausência de comorbidades de origem infecciosa, inflamatória ou neoplásica, não uso de imunossupressor e confirmação de RVS em M2. Os critérios de exclusão foram: transplante de fígado e/ou desenvolvimento de nódulos ou CHC durante o período de seguimento, ausência de exame de elastografia em M1 ou M3 (24 meses após RVS), resultado de elastografia hepática incompatível com cirrose e perda de seguimento. Os 16 pacientes incluídos foram novamente avaliados por imunofenotipagem, análises multiplex e elastografia 24 meses após RVS (M3) e classificados em regressores (R) e não-regressores (NR) (diminuição ≥25% de rigidez) (análise prospectiva). Os resultados da curva ROC, aprendizado de máquina (ML) e análise discriminante linear mostraram que a quantificação absoluta dos linfócitos TCD4 + foi o biomarcador mais importante para a predição da regressão (AUC = 0,90). Os pacientes NR apresentaram níveis de rigidez inferiores a R desde a quantificação basal (M1), enquanto as células NK aumentaram nos pacientes NR em M1 e M2.

Portanto, conclui-se que há diferença no perfil das células imunes circulantes em pacientes com regressão e não regressão da rigidez hepática, permitindo, assim, o desenvolvimento de um modelo preditivo de regressão da rigidez hepática após a RVS, devendo ser validado em número maior de pacientes prospectivamente.

Palavras-chave: cirrose hepática; elastografia; Hepatite C.



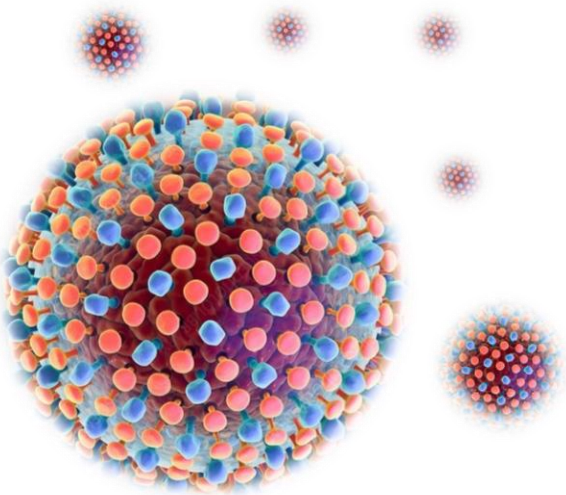
BRAZ, A. M. M. **Immunocellular characterization in a cohort of cirrhotic patients with sustained virological response obtained with direct-acting drugs for chronic hepatitis C.** 2020. 119 p. Thesis (Doctorate) -Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, 2020.

ABSTRACT

Cirrhotic patients with chronic hepatitis C, even after sustained virological response (SVR), should be monitored for the evaluation of liver function and screening of hepatocellular carcinoma (HCC) every six months for life. After treatment and viral clearance, the stage of inflammatory resolution and regression of fibrosis should happen. However, liver examinations by elastography show that 30 to 40% of patients do not exhibit a decrease in liver stiffness. This work was a cohort study in cirrhotic patients whose purpose was to identify immunological factors involved in the regression of liver stiffness in chronic hepatitis C, and characterize possible prognostic value serum biomarkers. The sample universe consisted of 31 cirrhotic patients who underwent leukocyte immunophenotyping, quantification of cytokines / chemokines and metalloproteinase inhibitors (TIMP 1, 2, 3) in the pre-treatment (M1) and in the evaluation of SVR (M2) (retrospective analysis). Inclusion criteria were HCV genotype 1 infection, diagnosis of cirrhosis, absence of comorbidities of infectious, inflammatory or neoplastic origin, non-use of immunosuppressant and confirmation of SVR in M2. Exclusion criteria were: liver transplantation and / or development of nodules or HCC during the follow-up period, absence of elastography examination in M1 or M3 (24 months after SVR), result of liver elastography incompatible with cirrhosis and loss of follow-up. The 16 patients included were again evaluated by immunophenotyping, multiplex analysis and elastography 24 months after SVR (M3) and classified into regressors (R) and non-regressors (NR) (decrease ≥25% stiffness) (prospective analysis). The results from ROC curve, machine learning (ML) and linear discriminant analysis showed that the absolute quantification of TCD4+ lymphocytes is the most important biomarkers for the prediction of the regression (AUC= 0,90). NR patients had levels less than R of stiffness since baseline quantification (M1), whereas NK cells were increased in NR patients at M1 and M2. Therefore, it was concluded that there is a difference in the profile of circulating immune cells in patients with regression and non-regression of liver stiffness, thus allowing the development of a predictive model

of regression of liver stiffness after SVR, and should be validated in greater numbers of patients prospectively.

Keywords: liver cirrhosis; elastography; Hepatitis C.



Lista de Ilustrações

Figura 1 (E-book) - Progressão da fibrose na hepatite C crônica 25

Figura 2 (E-book) - Fatores envolvidos na fibrogênese hepática 29

Figura 3 (E-book) - Classificação de cirrose de Laennec–"*Point of no return*" 59

Figura 1 (Artigo I) - Percentage of reduction in hepatic stiffness with respect to M1 101

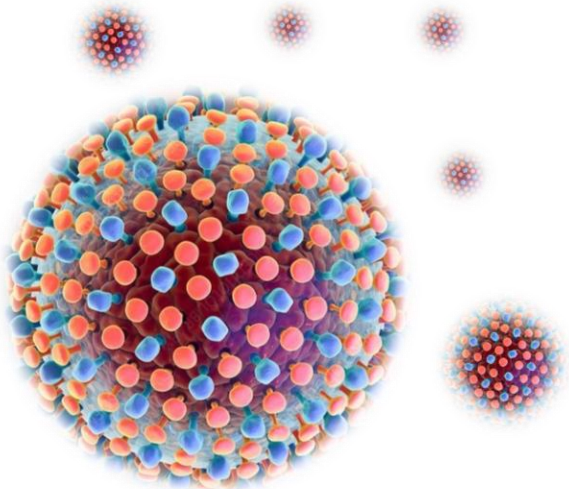
Figura 2 (Artigo I) - Absolute CD4 values in the different groups and moments 102

Figura 3 (Artigo I) - Decision tree (AUC = 100%) 103

Figura 4 (Artigo I) - Discriminant function (model) containing the combination of absolute TCD4 lymphocyte values and total NK 103

Figura 5 (Artigo I) - ROC curve of the discriminant function combining the absolute CD4 and total NK, for M1 and/or M2 104

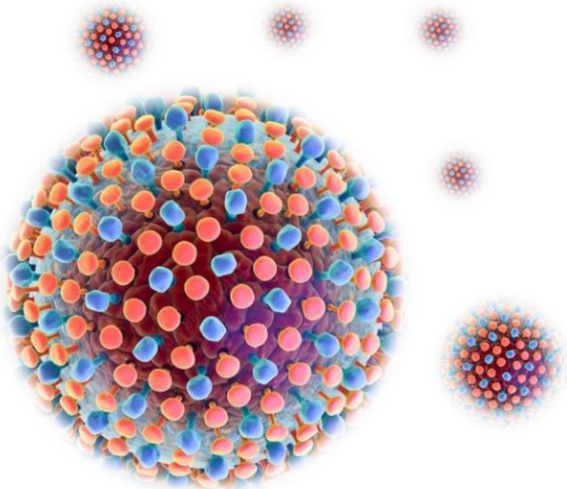
Figura 6 (Artigo I) - Total NK cell values in the different groups and moments 105



Lista de Tabelas

Tabela 1 (E-book) - Sensibilidade e especificidade de testes não-invasivos bioquímicos para predição de cirrose 48

Tabela 1 (Artigo I) - Demographic characterization of the samples 100



Lista de Abreviaturas

AADs: Antivirais de Ação Direta

ALT: Alanina Aminotransferase

APRI: Índice da Razão de AST/Plaquetas

ARFI: *Acustic Radiation Force Impulse*

AUC: *Area Under the ROC Curve*

CEH: Células Estreladas Hepáticas

CHC: Carcinoma Hepatocelular

DAMPs: Padrões Moleculares Associados ao Perigo

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FIB: 4: *Fibrosis-4*

Gama-GT: Gama Glutamiltransaminase

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN: Interferon

kPa: *Kilopascal*

LDA: *Linear Discriminant Analysis*

ML: *Machine Learning*

NK: *Natural killer*

NLRs: Receptores de Ligação a Nucleotídeos contendo domínio com sequência de resíduos do aminoácido leucina

NR: Non-Regressors (não-regressores)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PCDT: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas

PRRs: Receptores de Reconhecimento Padrão

pSWE: *Point-Shear Wave*

R: *Regressors* (Regressores)

RVS: Resposta Virológica Sustentada

TE: *Transient Elastography*

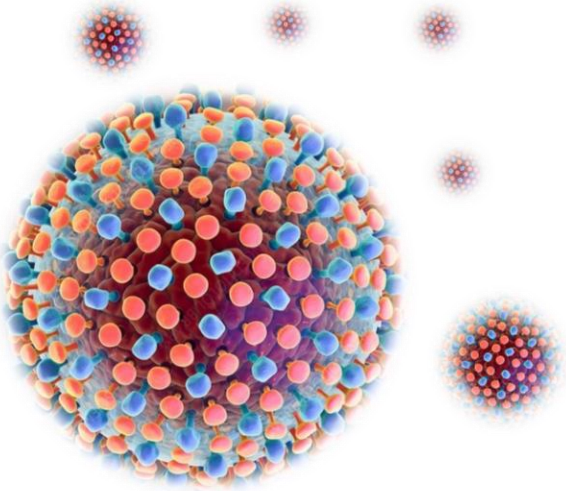
TGF-β: Fator Transformador do Crescimento-β

TLRs: *Toll-Like Receptors*

TNF: Fator de Necrose Tumoral

US: Ultrassonografia

VHC: Vírus da Hepatite C



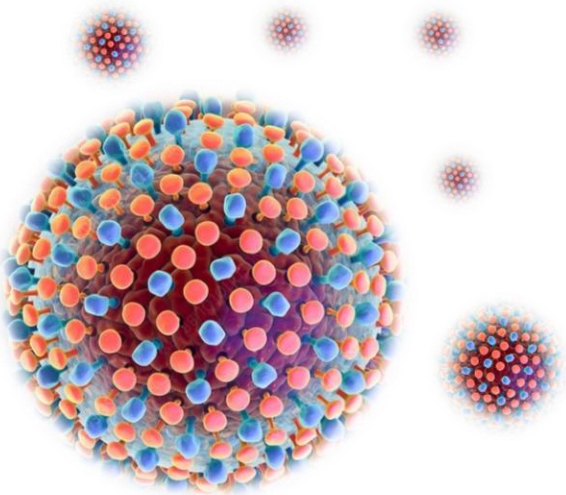
SUMÁRIO

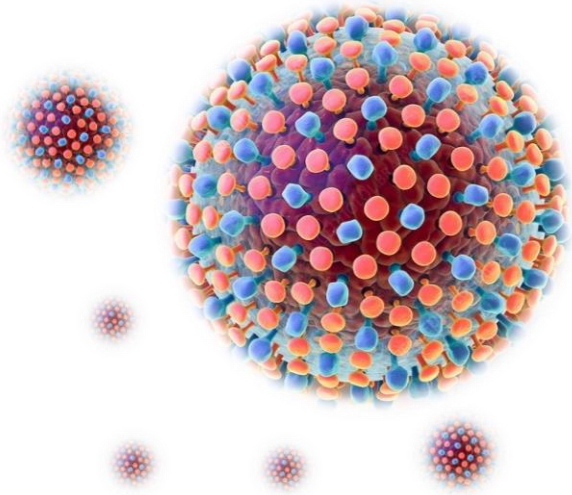
E-book: Hepatite C crônica, inflamação e fibrose 20

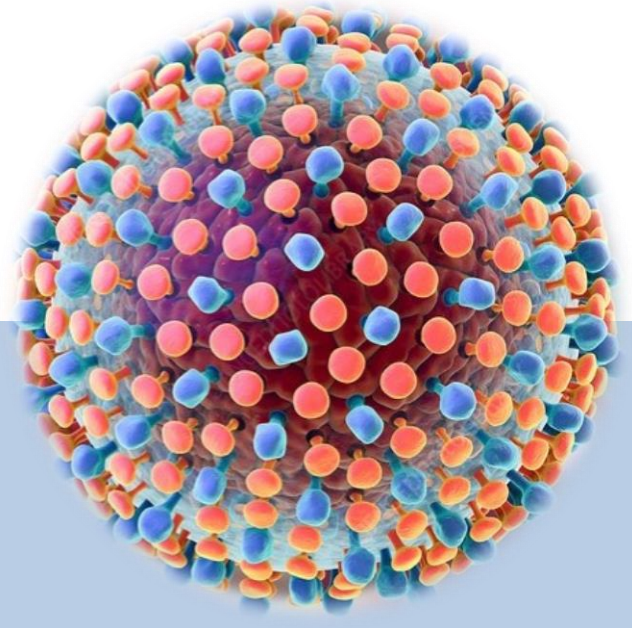
Artigo I: Inflammation Response and Liver Stiffness: Predictive model of regression of hepatic stiffness after sustained virological response in cirrhotics patients with chronic hepatitis C 90

Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e esclarecido – Pacientes VHC+ – Estudo retro-prospectivo 115

Anexo A: Parecer consubistanciado do Comitê de Ética em Pesquisa 117







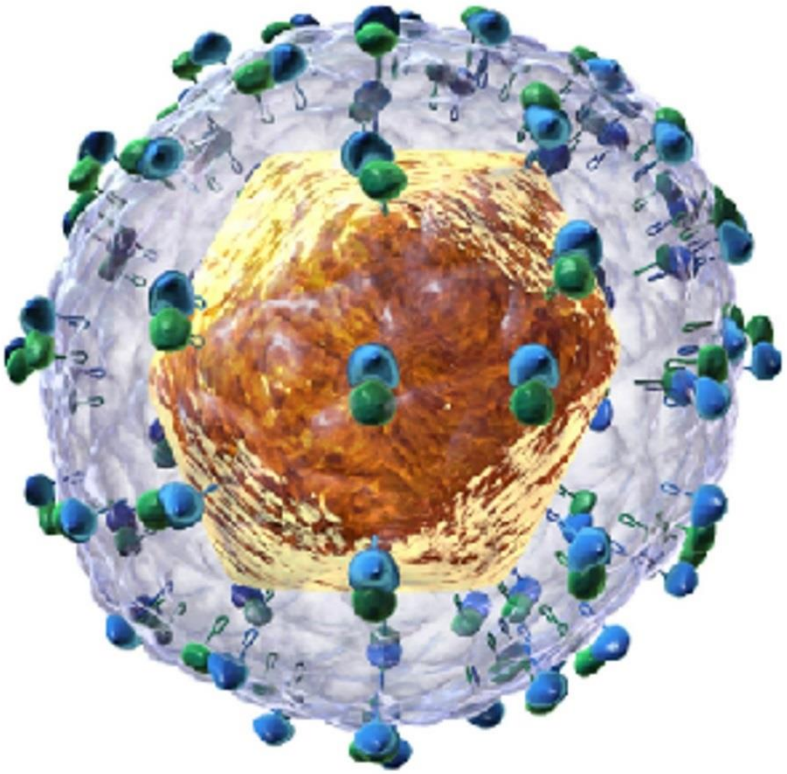
Hepatite C crônica, inflamação e fibrose

[E-book]

Status: Publicado

Disponível em: <https://books.apple.com/br/book/hepatite-c-cr%C3%B4nica-inflama%C3%A7%C3%A3o-e-fibrose/id1545445421>.

Hepatite C crônica, inflamação e fibrose



Aline Márcia Marques Braz

Márjorie de Assis Golim

Giovanni Faria Silva

Autores:

Aline Márcia Marques Braz

Márjorie de Assis Golim

Giovanni Faria Silva

Editoração e Diagramação:

Ana Silvia S. B. S. Ferreira

Braz, Aline Márcia Marques.
Hepatite C crônica, inflamação e fibrose / Autores: Aline Márcia Marques Braz, Márjorie de Assis Golim, Giovanni Faria Silva; Editoração e diagramação: Ana Silvia Sartori Barruviera Seabra Ferreira. – Botucatu : NEAE.TIS, FMB-UNESP, 2020.
(PUD

Inclui bibliografia
ISBN: 978-65-86433-22-7

1. Fígado – Inflamação. 2. Hepatite C crônica. 3. Cirrose hepática. 4. Sistema imunológico. 5. Resposta imune. I. Título. II. Golim, Márjorie de Assis. III. Silva, Giovanni Faria. IV. Ferreira, Ana Silvia Sartori Barruviera Seabra. V. Núcleo de Educação a Distância e Tecnologias da Informação em Saúde. VI. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu.

CDD 616.3473

Título: Hepatite C crônica, inflamação e fibrose
ISBN: 978-65-86433-22-7
Formato: Livro Digital
Veiculação: Digital

Sumário

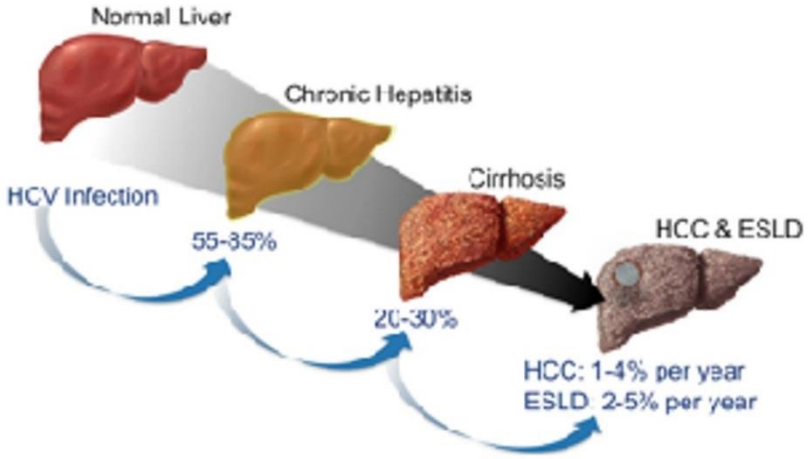
Lesão hepática induzida pelo vírus da hepatite C	3
Fibrogênese hepática	8
O sistema imunológico	10
O processo inflamatório na hepatite C	18
Avaliação da Fibrose Hepática	25
Biópsia hepática	25
Métodos não invasivos	26
Métodos bioquímicos	26
Métodos físicos	29
Terapia para hepatite C	35
A regressão da fibrose hepática na hepatite C	40

Lesão hepática induzida pelo vírus da hepatite C

A injúria hepática crônica pode ter diversas etiologias, como as hepatites virais, alcoolismo, doença hepática gordurosa não alcoólica, doenças autoimunes (hepatites autoimunes e colangite biliar primária), podendo resultar em cirrose, redução de função do órgão, hipertensão portal e risco elevado de carcinoma hepatocelular (CHC) [1–3].

A hepatite C é uma das principais causas de doença inflamatória crônica do fígado, apresentando taxas de progressão variáveis para fibrose e cirrose hepática [4–8]. Estima-se que atualmente existam aproximadamente 71 milhões de pessoas com infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC) [9], porém este número pode ser ainda maior em virtude da subnotificação e casos não diagnosticados. Uma relevante parcela da população afetada (de 20 a 30% ou mais) pode apresentar condições clínicas agravadas pelo desenvolvimento de cirrose, com risco de evolução para CHC (Figura 1) [10–12]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2016 ocorreram 399.000 mortes relacionadas à infecção pelo VHC, principalmente por complicações da cirrose e CHC [9].

Figura 1- Progressão da fibrose hepática na hepatite C crônica



Legenda: Evolução do processo de fibrogênese na hepatite C crônica ao longo dos anos.
Fonte: <https://www.livertransplantpune.com/chronic-liver-failure/>.

O VHC é um vírus de RNA de cadeia simples de polaridade positiva, medindo 9,7 kilobases de comprimento (50 nm de diâmetro), envelopado, pertencente ao gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae* [13–15]. Uma de suas principais características é a heterogeneidade genética, existindo atualmente oito genótipos maiores do VHC e 86 subtipos, porém 60% dos casos ocorrem devido à infecção

pelos subtipos 1a e 1b [16,17], sendo de maior frequência no Brasil os genótipos 1 (mais de 70% dos casos de infecção crônica), genótipo 3 e genótipo 2, respectivamente [18–21].

O período de incubação do VHC varia de duas semanas a seis meses pós-exposição, caracterizando a hepatite C aguda. Nessa fase, aproximadamente 80% dos casos são assintomáticos e, portanto, difíceis de diagnosticar e estabelecer precisamente a data do início da infecção. Quando a resposta sintomática ocorre, caracteriza-se por sintomas como febre, fadiga, diminuição do apetite, náuseas, vômitos, dor abdominal, urina escura, fezes de cor cinza/esbranquiçada, dor nas articulações, geralmente associados a elevados níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e icterícia [9,22,23].

Aproximadamente 15% a 45% dos infectados realizam *clearance* viral espontâneo em cerca de seis meses de infecção sem qualquer tratamento [9,24,25], portanto, de 65 a 80% dos indivíduos evoluem para a fase crônica da doença, com risco de progressão para fibrose hepática. Aproximadamente 20% destes desenvolvem cirrose em 20 anos e, de 1 a 4% dos cirróticos desenvolvem CHC anualmente [12,22,26–29]. Mesmo na fase crônica da doença, caracterizada pela presença de anticorpos anti-VHC, RNA do VHC detectável, podendo ter ou não a elevação dos níveis séricos de ALT por mais de seis meses,

a maioria dos pacientes continua assintomática até o aparecimento da cirrose e suas complicações [22].

Ao longo da progressão da doença, diferentes mecanismos imunológicos são desencadeados com o objetivo de controlar a infecção pelo VHC, incluindo a inflamação, levando ao aumento do número de células fagocíticas no foco infeccioso, ampliando assim, as chances de eliminação do vírus. Neste processo, ocorre liberação de citocinas ativadoras de macrófagos por linfócitos T *helper*. Os macrófagos e células *natural killer* (NK), então ativados, potencializam a capacidade de eliminar microrganismos, principalmente em infecções causadas por parasitas intracelulares, como vírus. Por outro lado, a ativação persistente pode induzir fibrose [7,30].

O reconhecimento imunológico da célula infectada, bem como sua destruição, leva à formação de lesões hepáticas. O processo inflamatório contínuo e ineficaz na tentativa de erradicação viral induz o acúmulo de matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanos) pelas células estreladas hepáticas (CEH), que após ativação, adquirem fenótipo semelhante a miofibroblastos e em substituição ao tecido hepático normal que sofreu injúria, depositam tecido fibroso. Os miofibroblastos além de produzirem colágeno, também induzem a produção de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que

controlarão a degradação da matriz fibrótica pelas metalopreoteinases (MMPs). É neste contexto que o equilíbrio entre a produção de tecido cicatricial e a degradação da matriz fibrótica por metaloproteinases, culminará na recuperação tecidual ou na evolução progressiva para a cirrose hepática [31–37].

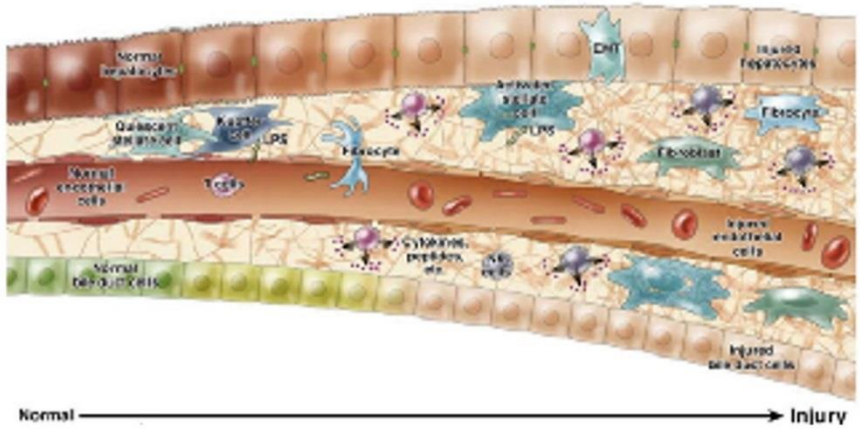
A progressão da fibrose tem sido associada a diversos fatores virais (genótipo e subtipos) e do hospedeiro, como gênero (sexo masculino), idade no momento da infecção, duração da infecção, *diabetes mellitus*, obesidade, consumo de álcool, coinfecção com outros vírus, fatores genéticos, perfil da resposta imunológica, entre outros [28,38–43].

Fibrogênese hepática

Durante a infecção crônica pelo VHC, a tentativa contínua e ineficaz de eliminação viral leva a lesões teciduais. Neste processo, células residentes e células inflamatórias, respondendo ao dano hepatocelular, são recrutadas e através de uma cascata de sinalizadores autócrinos e parácrinos iniciam o processo fibrogênico. Células do sistema imune infiltradas no fígado constituem importante fonte de Fator de Transformação de

Crescimento beta (TGF-β), que regula fatores-chave da função e fenótipo de CEHs, as quais ativadas adquirem características de miofibroblastos, principais produtores de colágenos fibrilares (colágeno I e III), que caracterizam fibrose patológica [2,7,44,45] (Figura 2).

Figura 2 - Fatores envolvidos na fibrogênese hepática.



Fonte: Adaptado de A ROCKEY, DC. Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. Clin Gastroenterol Hepatol., v. 11, n. 3, p.224-31, mar. 2013.

Quando há desequilíbrio entre os fatores pró e anti-fibrogênicos devido a deposição excessiva de tecido fibroso, ocorre a diminuição das fenestrações entre as células endoteliais (espaço de Disse) e da vascularização tecidual e, à medida que a fibrose progride, há formação de septos alterando a angiogênese e ainda mais a arquitetura hepática, levando à perda progressiva da função do órgão

(45,46).

Mesmo após se modificarem para o estado de quiescência, as CEHs previamente ativadas possuem capacidade de se reativar de forma mais rápida e eficiente em resposta a lesões repetitivas (45).

Sabe-se que o equilíbrio entre fibrose autolimitada e deposição de tecido cicatricial em excesso é regulado pela interação de uma série de fatores, moléculas e sistemas, e está associado com a duração e persistência da lesão. Existem várias células descritas como participantes da remodelação da fibrose hepática como hepatócitos, CEH, células endoteliais, e células do sistema imunológico (7,45,46).

O sistema imunológico

Conceitualmente, o sistema imunológico é dividido em dois tipos de imunidade: a inata e a adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo, atuando rapidamente a uma grande quantidade de estímulos. É composta por barreiras físicas (pele, mucosas), células especializadas e moléculas solúveis, estando presente independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores. Em contrapartida,

a resposta imune adaptativa consiste de uma resposta específica ao agente que a desencadeou, necessitando de ativação de células altamente especializadas (linfócitos), que conduzirão o tipo e intensidade da resposta através da liberação de mediadores, culminando na formação de memória imunológica [47].

A imunidade inata é um importante mecanismo no combate às infecções, pois possui habilidade de atuar de maneira independente da imunidade celular adquirida, ao passo que possui a capacidade de induzir linfócitos T a agirem e amplificarem a resposta ao agente infeccioso [48]. São importantes componentes da resposta imune inata as barreiras epiteliais, sistema complemento, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e células NK [49].

O monócito é a maior célula normal do sangue periférico, com morfologia apresentando núcleo em forma de ferradura, citoplasma com contorno irregular e grânulos finos podendo estar vacuolizado ou não. Correspondem a cerca de 5 a 10% dos leucócitos do sangue periférico, possuindo capacidade de se diferenciarem em células dendríticas ou macrófagos (nos tecidos). Atuam como células apresentadoras de antígenos (APCs), possuindo várias funções e papel essencial em processos infecciosos e inflamatórios [50,51].

Além da capacidade de fagocitar e apresentar

antígenos, os monócitos são produtores de enzimas (lisozima, ativador de plasminogênio, colagenase, elastase), proteínas do sistema complemento, proteína C reativa e citocinas [50]. Estas células participam da interface entre as respostas imunes inata e adaptativa, visto que ao apresentarem antígenos aos linfócitos T, ativam-os, induzindo o desencadeamento da resposta imune adaptativa, culminando na produção de anticorpos específicos pelos linfócitos B. Além disso, citocinas produzidas por monócitos podem induzir a ativação de outros tipos celulares e do inflamassoma através de outras vias [30,51].

As subpopulações de monócitos humanos são caracterizadas de acordo com a expressão de receptores de superfície celular, os quais definem o fenótipo destas células. São mais estudados os monócitos clássicos ($CD14^+/CD16^-$) e pró-inflamatórios ($CD14^+CD16^+$) [52].

Monócitos clássicos apresentam como característica prevalente a citotoxicidade através da liberação de espécies reativas de oxigênio, o chamado *burst* oxidativo (espécies reativas de oxigênio com ação microbicida). Em contrapartida, a subpopulação pró-inflamatória parece estar mais relacionada a produção de citocinas [52].

Durante a hepatite C crônica macrófagos

derivados de monócitos se concentram no tecido hepático participando do processo inflamatório e consequentemente da fibrogênese. Neste contexto, acredita-se que suas subpopulações atuem de maneira diferente na formação da fibrose, bem como na fibrólise após a remoção da injúria [30,51,52].

As células *natural killer* são componentes importantes do sistema imune inato. Possuem a característica citotóxica com capacidade de lisar células-alvo através da liberação de grânulos de granzimas e perforinas, atuando principalmente na destruição de células tumorais ou infectadas por vírus, além de serem importantes produtoras de citocinas imunorregulatórias [53–57].

Células NK humanas são caracterizadas pelo imunofenótipo CD3-CD16+ CD56+ e correspondem a cerca de 5 a 20% dos linfócitos circulantes, sendo morfologicamente ligeiramente maiores do que os linfócitos T e B, apresentando citoplasma granular. No entanto, apesar de se originarem na medula óssea a partir de precursores linfóide, funcionalmente diferem dos demais linfócitos integrantes da imunidade adaptativa por reagirem de maneira rápida, por não expressarem em sua membrana receptores com especificidade antigênica e não necessitarem que haja apresentação dos antígenos através

de APCs para que exercerem sua função. No fígado, células NK correspondem a cerca de 30% das células mononucleares [49,55,58–60].

Células NK podem ser divididas em duas subpopulações, *dim e bright*, de acordo com a densidade de expressão de superfície do CD56. Células NK *bright* ($CD3^{-}CD56^{+bright}CD16^{-}$) correspondem a cerca de 10% das NK totais, caracterizam-se pela alta expressão de CD56. Após ativação, possuem capacidade de produzir altos níveis de citocinas/quimiocinas [48,53–55,57,58,61].

Cerca de 90% das NK totais expressam baixos níveis de CD56, caracterizando a subpopulação *dim* ($CD3^{-}CD56^{+dim}CD16^{+}$). Esta possui a característica de citotoxidade acentuada e capacidade reduzida de produção de citocinas [48,53–55,57,58,61]. No entanto, as proporções das subpopulações podem variar de acordo com a condição do microambiente onde se encontram [60].

Durante a infecção pelo VHC ocorre aumento do número de células NK intrahepáticas, visto que são recrutadas através da produção de citocinas pelas células de Kupffer, endoteliais e sinusoidais. No fígado, sua atuação pode ser modulada através da secreção/inibição de citocinas [55].

Diferentemente das células do sistema imune inato, os linfócitos T, componentes fundamentais da

resposta imune adquirida, requerem maior tempo após a infecção para iniciarem resposta imune efetiva [50].

Os linfócitos T são produzidos na medula óssea e posteriormente migram para o timo onde passarão por processo de maturação e tolerância imunológica. Durante sua ontologia no timo, inicialmente estas células têm fenótipo duplo-negativos ($CD3^+CD4^-CD8^-$), visto que não expressam em sua membrana nenhum dos dois receptores que determinam suas subpopulações: CD4 ou CD8. Após sofrerem rearranjo do receptor de células T (do inglês *T-cell receptor*, sigla TCR) passam a expressar os dois receptores apresentando o imunofenótipo de timócitos ($CD3^+CD4^+CD8^+$). Com o avanço do processo de maturação celular e após serem submetidos a processo de seleção positiva e negativa (tolerância imunológica), os linfócitos T perdem um destes receptores, tornando-se linfócitos T auxiliares ($CD3^+CD4^+$) ou T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$), sendo então, encaminhados para o sangue periférico [62].

Linfócitos T citotóxicos, além de serem importantes produtores de citocinas, exercem papel fundamental na eliminação de células tumorais e infectadas por agentes patogênicos intracelulares, induzindo lise através da liberação de granzimas e perforinas (63,64). Cerca de 5 a 10% dos linfócitos T CD8+ efetores

diferenciam-se em células T CD8+ de memória, no entanto, este percentual pode variar de acordo com o estímulo que induziu a resposta e com a intensidade do processo inflamatório [63].

As células T CD4+ são consideradas “orquestradoras” da resposta imune adaptativa, conduzindo para um perfil específico de acordo com os diferentes agentes agressores. Estas células podem se diferenciar em diferentes subpopulações (Th1, Th2, Th17, T regulatórias (Treg), Th9, Th22, T foliculares - Tfh), que serão caracterizadas através das diferentes combinações de citocinas secretadas. Dentre esses perfis de resposta destacam-se as mais estudadas: Th1, Th2, Th17 e Treg [65–68]:

- Linfócitos Th1: comumente são diferenciados em resposta a patógenos intracelulares. Este perfil de resposta geralmente é considerado pró-inflamatório, podendo ser induzido por citocinas como Interleucina-2 (IL-2), interferon-γ (IFN-γ) e IL-12, produzidas por diferentes tipos celulares, como células NK e dendríticas. A resposta imune de perfil Th1 resulta principalmente na produção de fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e liberação de quimiocinas, com intuito de amplificar a atuação das células da resposta imune inata, bem como o processo inflamatório [65,68–70].

- Linfócitos Th2: estão relacionados predominantemente a respostas contra patógenos extracelulares e reações alérgicas, sendo esta resposta induzida por IL-25, IL-23 e IL-4, culminando na liberação de maior quantidade de IL-4, bem como IL-5, IL-13, IL-9 e IL-10, induzindo forte resposta imune humoral (produção de anticorpos) [65,68–70].

- Linfócitos Th17: esta subpopulação celular parece estar relacionada a respostas contra patógenos presentes em superfícies mucosas, como bactérias extracelulares e fungos, no entanto, há relatos de sua atuação também em infecções virais e doenças auto-imunes. Sua diferenciação pode ser desencadeada pela liberação de IL-23 e TGF-β, na ausência de IL-4 ou IL-12, resultando na produção de IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F e IL-22 [65,68–70].

- Linfócitos Treg: recentemente, o papel das células T regulatórias tem sido amplamente estudado, visto que sua função primordial é proporcionar a homeostase do sistema imune através da supressão de células T autorreativas, reduzindo a inflamação e induzindo a tolerância periférica. Sua diferenciação celular pode ser induzida por IFN-α e por

altas concentrações de TGF-β, e para que sua função supressora seja realizada, a expressão intracitoplasmática de *Forkhead box protein P3* (Foxp3) é imprescindível [65,71].

O desfecho da infecção crônica pelo VHC é influenciado pela ação coordenada dos diferentes tipos celulares, incluindo as células do sistema imune. Neste contexto, a magnitude, amplitude e qualidade das respostas das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ podem ser cruciais nas diferentes fases do processo infeccioso, incluindo a fibrogênese [71,72]. A depender do perfil de resposta induzido, das citocinas produzidas e das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ predominantes, pode haver disfunção das células T $CD8^+$ específicas contra o vírus, bem como a imunomodulação do microambiente hepático, influenciando inclusive no processo fibrogênese/fibrólise [68,71].

O Processo inflamatório na hepatite C

Na infecção pelo VHC ocorre inflamação persistente resultante da ação da resposta imune contra o vírus, o que pode perdurar por muitos anos, até mesmo décadas. Esse processo inflamatório contínuo leva à doença hepática progressiva que varia da inflamação leve à

fibrose grave, podendo avançar para cirrose e/ou CHC [7,73,74].

A inflamação, inicialmente, tem papel benéfico: além de auxiliar no processo de destruição de células infectadas pelo VHC, permite o reparo tecidual do fígado danificado e induz a remoção de estímulos prejudiciais produzidos pelas células do paciente, como os estímulos fibrogênicos [75].

Com a presença viral, uma série de eventos são desencadeados pela resposta imunológica do hospedeiro contra os componentes virais, incluindo a ativação da resposta imune inata e adaptativa [7].

Este processo inflamatório pode variar entre os diferentes tipos celulares. Apesar de hepatócitos serem a principal população celular do fígado, outras células hepáticas como células de Kupffer (CK) e CEHs exercem importante papel durante a hepatite C crônica. As CKs são macrófagos hepáticos residentes, compreendem cerca de 15% do total de células do órgão, são fagócitos produtores de *burst* oxidativo e citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, as CEHs estão mais relacionadas ao processo de fibrogênese propriamente dito, sendo que após ativação, adquirem características de miofibroblastos, principais produtores de colágeno, contribuindo para a remodelação anormal da matriz extracelular. A interação de

hepatócitos infectados, CEHs e células do sistema imune, potencializam ainda mais a resposta inflamatória à infecção pelo VHC [3,76].

O processo inflamatório também contribui de forma efetiva para a fibrogênese hepática, levando à ativação de CEHs através de várias populações celulares, como células NK, linfócitos T, CK, macrófagos, dendríticas e células endoteliais. A ativação de CK, por sua vez, estimula a expressão de fator nuclear kappa B (NF-kB), levando a produção de mais citocinas pró-inflamatórias [3,75].

A inflamação é desencadeada por meio de vários mecanismos, como produção de quimiocinas intra-hepáticas, ativação do inflamassoma e estresse oxidativo, com produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) [74–76].

A presença de proteínas virais e a depleção de moléculas antioxidantes induzem hepatócitos ao estresse oxidativo através da produção EROs. Dentre as EROs mais comumente encontradas, podemos citar ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Estas moléculas parecem estar envolvidas na ativação de caspase, apoptose celular via mitocôndrial e diminuição de células T periféricas, contribuindo para a manutenção do ciclo inflamatório [77].

Outras moléculas de relevância na intensificação

do processo inflamatório são as quimiocinas. Estas citocinas são responsáveis por regularem a inflamação através do controle da migração (quimiotaxia) de células do sistema imunológico para o fígado, inclusive aquelas caracterizadas como fibrogênicas, levando ao aumento do número de células, e consequentemente da inflamação no tecido hepático. As quimiocinas são produzidas por células do sistema imune e células hepáticas infectadas, e a interação destas com seus respectivos receptores presentes em leucócitos recrutados para o local de infecção, pode induzir o microambiente hepático a um perfil pró ou anti-fibrogênico, podendo atuar no processo de fibrogênese [3,78].

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo frente a infecções por microrganismos, sendo um mecanismo inespecífico importante para que haja ativação da resposta imune adaptativa. Algumas populações celulares, como macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais e NK possuem Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) específicos para o reconhecimento de Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais são sequências moleculares preservadas presentes em microrganismos durante a evolução [74,75,79,80].

Toll-Like Receptors (TLRs), expressos na

membrana plasmática ou estruturas endossomais, e os Receptores de Ligação a Nucleotídeos contendo domínio com sequência repetida de resíduos do aminoácido leucina (NLRs) (intracitoplasmáticos), são considerados os principais receptores de reconhecimento de PAMPs [3,81].

A ativação de células da resposta imune inata não está baseada apenas no reconhecimento de PAMPs, mas também de sinais de perigo, denominados Padrões Moleculares Associados a Dano (DAMPs), biomoléculas endógenas liberadas durante estresse e/ou lesão celular, que podem ser reconhecidas por receptores TLRs, constituindo importante processo em respostas inflamatórias do tipo estéril, ou seja, independente de patógenos [82,83].

A liberação de DAMPs é comum durante lesões teciduais e lise celular, e o reconhecimento destes pelo sistema imune pode culminar no recrutamento de mais células para o local da infecção, bem como servir de "gatilho" para o reparo do tecido lesionado [76,79].

O inflamassoma é uma plataforma multiproteica intracelular, descrita pela primeira vez em 2002 por Martinon, Burns e Tschopp [79], composta por várias moléculas, como NLRs, proteína adaptadora ASC (do inglês *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) e enzima caspase-1. Ela é

responsável por controlar a inflamação através do reconhecimento de PAMPs e DAMPs, e pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Durante a ativação do inflamassoma, o domínio PYD do NLRP3 se liga na região PYD da proteína adaptadora ASC, enquanto que o domínio CARD de ASC se liga à pró-caspase-1, ativando-a em caspase-1, a qual converterá pró-IL-1β e pró-IL-18 em suas formas ativas, resultando na liberação de IL-1β e IL-18 [74,79,83,84].

O RNA do VHC e as proteínas virais são reconhecidos por TLRs presentes nas células do sistema imune inato do hospedeiro, induzindo a ativação do inflamassoma e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e IL-18). Além disso, as proteínas do VHC podem ser detectadas por outras estruturas celulares, ativando vias inflamatórias alternativas, levando à produção de IL-8, RANTES, MIP-1, CXCL-10 e IFN-β. O processo de replicação viral intenso durante a infecção desencadeia uma série de reações complexas no indivíduo, podendo levar ao desequilíbrio da resposta inflamatória, desde a inflamação intensa e descontrolada, até o processo ineficaz de eliminação viral [73,76].

Acredita-se que IL-1-β, principal produto da ativação do inflamassoma NRLP-3, tenha importante atuação na infecção pelo vírus da hepatite C, mediando

ações inflamatórias, induzindo a expressão de genes pró-inflamatórios, recrutamento de células imunes para o local da infecção, bem como ações efetoras. Além disso, por sua ação pleiotrópica, esta citocina tem sido vista também como indutora da produção de mediadores pró-fibrogênicos, estando presente tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da doença viral [85].

Assim como IL-1β, a IL-18 é sintetizada como precursor inativo e requer maturação proteolítica pela caspase-1 para desenvolver sua atividade biológica. IL-18 induz a produção de IFN-γ por células T e NK, juntamente com a IL-12 [86,87]. Desse modo, essa citocina ativa a função de macrófagos, aumentando o *burst* oxidativo, levando à produção de mais EROs e estimulando a apresentação de antígeno [36,76].

A infecção também induz a apoptose celular, sendo as células apoptóticas fagocitadas. O material genético de hepatócitos em processo de morte celular interage com receptores presentes na membrana de CEHs e, junto com produtos do processo inflamatório, induzem a ativação e migração de outras CEHs ao sítio de infecção, resultando na produção de colágeno intra-hepático [3].

Os processos de fibrogênese e reparo tecidual hepático compreendem algumas fases como inflamação, formação de tecido cicatricial através da proliferação de

células inflamatórias produtoras de matriz, culminando no reparo ou formação de fibrose. Na infecção crônica pelo VHC, a deposição da matriz é maior que a reabsorção, devido ao desequilíbrio entre fibrogênese e fibrólise, levando à formação de septos no lugar de tecido hepático normal [88].

Avaliação da Fibrose Hepática

Biópsia hepática

A biópsia hepática é o método padrão-ouro na classificação dos estadios de fibrose, permitindo identificar o grau de comprometimento histológico, estadiamento estrutural e necroinflamatório hepático [89–94]. O escore METAVIR é o mais utilizado para determinar estadiamento e graduação do dano hepático. Na classificação METAVIR a estratificação da fibrose é avaliada numa escala de cinco pontos (F0 = sem fibrose; F1 = fibrose portal sem septos; F2 = poucos septos, F3 = numerosos septos sem cirrose; F4 = cirrose) [95–98].

A biópsia é um procedimento invasivo, com possibilidade de causar dor intensa e sangramento, requerendo equipe altamente qualificada para execução e análise histológica. Ademais, a biópsia usualmente é

realizada apenas no momento diagnóstico, para definição e estadiamento do comprometimento hepático, sua repetição geralmente não é aplicável, devido a sua característica invasiva e baixa aceitação dos pacientes, portanto estudos para avaliar evolução da fibrose por meio de biópsias seriadas não procedem [99,100].

Métodos não invasivos

Vários testes não invasivos incluindo métodos de imagem (ultrassonografia, elastografia) e biomarcadores séricos [índice da razão aspartato aminotransferase (AST)/ plaquetas – APRI; fibrosis-4 (FIB-4); Fibrotest®] têm sido desenvolvidos em alternativa à realização da biópsia hepática, com intuito de diferenciar os graus de comprometimento hepático pré-tratamento, bem como monitorar a progressão da doença, até mesmo após a resposta virológica sustentada (RVS) [32,100].

Métodos bioquímicos

Apesar de FIB-4 e o APRI serem os escores baseados em biomarcadores séricos mais comumente utilizados na prática clínica [23], existem outros reportados na literatura como preditores do grau de fibrose hepática,

dos quais alguns serão abordados abaixo.

O índice AP trata-se de um escore baseado na combinação de idade e contagem de plaquetas, variando de 0 a 10. Neste índice, o valor de corte que corresponde ao comprometimento histológico hepático com presença de lesões necroinflamatórias moderadas a grave e/ou fibrose portal com septos à cirrose, é ≥ 6 [101].

O Fibrotest® combina marcadores bioquímicos clássicos, sendo considerados como mais informativos alfa2-macroglobulina, alfa2-globulina (ou haptoglobina), gamaglobulina, apolipoproteína A1, gama-glutamiltransaminase (gama-GT) e bilirrubina total [102], entretanto este teste é patenteado e tem custo elevado em nosso país.

O escore Forns é constituído pela combinação de idade, gama-GT, colesterol total e contagem de plaquetas, tem como objetivo classificar pacientes em fibrose significativa e não-significativa [34].

O escore APRI é baseado na razão de ALT e plaquetas, sendo este e FIB-4 os escores mais utilizados mundialmente. O índice FIB-4, foi desenvolvido com intuito de avaliar o grau de comprometimento hepático em coinfecção por HIV/VHC. Considera parâmetros como idade, níveis de AST, ALT e contagem de plaquetas, com a finalidade de excluir fibrose significativa, sendo hoje amplamente adotado [102].

Tabela 1: Sensibilidade e especificidade de testes não-invasivos para a predição de cirrose.

Teste	Fibrose	Sensibilidade	Especificidade	Ponto de corte	AUC
Fibrotest®	F4	63 - 71%	81 - 84%	0.74	0.82 - 0.87
FIB-4	F4	90%	58%	1.45 - 3.25	0.87 (0.83-0.92)
APRI	F4	77 - 48%	75 - 94%	1.0 - 2.0	0.84 (0.54-0.97)

Adaptado de: European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. J Hepatol. 2018;69: 461–511. doi:10.1016/j. jhep.2018.03.026

O *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções* (PCDT) [23] recomenda que seja feito o estadiamento da lesão hepática de todos os pacientes utilizando os métodos disponíveis: APRI, FIB-4, biópsia e/ou elastografia hepática. No entanto, os métodos não invasivos APRI e FIB-4 são preferencialmente indicados, devido a não necessidade de equipamento específico e profissional altamente qualificado para realização.

Métodos físicos

Dentre os métodos não invasivos de avaliação de fibrose a elastografia tem se destacado nos últimos anos. Este método avalia a rigidez tecidual em doenças crônicas, permitindo estimar o grau de fibrose hepática. A primeira tecnologia por este método disponível foi a elastografia transitória (*Transient Elastography* - TE), demonstrando eficácia na identificação de fibrose significativa (> F2) e cirrose (F4) em pacientes VHC crônicos. Com os avanços, técnicas de elastografia por ondas de cisalhamento foram acopladas aos aparelhos convencionais de ultrassom, aliando a precisão na avaliação da fibrose à visualização do tecido hepático, possibilitando ao operador avaliar a janela acústica adequada para a realização do exame, bem como rastrear lesões focais no órgão [103].

A elastografia por ondas de cisalhamento (*Shear wave*) gera ondas no tecido hepático utilizando transdutor de ultrassom montado no eixo de um vibrador, havendo propagação das ondas através da pele e dos tecidos adjacentes até chegar ao fígado. O aparelho monitora e calcula a velocidade de propagação destas ondas por ultrassom tipo *Doppler* medindo em metros por segundo (m/s) ou em Kilopascal (kPa) [8,103].

A fibrogênese resulta na alteração do tecido hepático normal por tecido fibroso, e consequentemente da rigidez do órgão, levando à maior resistência a compressão quando exercida força sobre ele. O princípio das técnicas de elastografia é de que a velocidade de uma onda que se propaga através dos tecidos sofre influência da rigidez do órgão. Quanto maior a rigidez, maior a velocidade com que a onda passa, permitindo estimar se o tecido está normal, fibrótico ou cirrótico [92,94,104,105].

O termo elastografia foi utilizado pela primeira vez por OPHIR e colaboradores no início dos anos 90 (106). É um exame não invasivo que tem como vantagens bom custo-benefício, ser indolor, de rápida execução, com possibilidade de acompanhamento ao longo do tempo. No entanto, apresenta especificidade e sensibilidade limitadas, devendo ser executado por profissional devidamente treinado. Além disso, os equipamentos disponíveis para realização do exame ainda são escassos, limitando-se aos grandes centros [92].

Existem diferentes tipos de técnicas de elastografia:

- ***Strain* elastografia**

Uma das primeiras técnicas de elastografia é a *Strain* (elastografia por compressão). Nesta metodologia, o

profissional executante realiza compressão manual do tecido a ser avaliado, produzindo deformações neste. Devido a esta particularidade, trata-se de uma metodologia com várias limitações como: baixa reprodutibilidade, análise subjetiva dependendo diretamente da experiência e habilidade do operador, além de ser contraindicada para avaliação de órgãos mais profundos, como o fígado [107].

- **Elastografia por "*Acoustic Radiation Force Impulse*" (ARFI)**

A tecnologia ARFI utiliza força de radiação acústica (dinâmica) através de um transdutor acoplado a aparelho ultrassonográfico para avaliar a rigidez tecidual. Com o aumento da frequência acústica ocorre o deslocamento do órgão, gerando uma onda de cisalhamento. A partir do cálculo da velocidade desta onda, pode-se estimar quantitativamente a rigidez do tecido avaliado [107–109].

A tecnologia ARFI serviu de base para o desenvolvimento de outras metodologias como elastografia transitória (FibroScan®), elastografia *point-shear wave* (pSWE) e elastografia por ondas de cisalhamento bidimensional (2D-SWE) [108,109].

- **Elastografia transitória unidimensional**

É denominada elastografia transitória, e surgiu em 2003. É realizada através de equipamento que possui vibrador acoplado a transdutor com frequência de 50hz, no entanto, não utiliza equipamento de ultrassonografia (US) [107,110]. Atualmente é a técnica de elastografia mais utilizada para avaliar rigidez hepática [94].

Nesta técnica, a sonda do transdutor é acoplada ao eixo de um vibrador, que emite pulsos vibratórios, induzindo a produção de ondas de cisalhamento de baixa frequência que se propagam ao longo dos tecidos do órgão. Esta propagação é detectada, a velocidade com que a onda se propaga é calculada, e através desta velocidade é possível estimar a rigidez hepática [92–94,110,111].

Apesar do bom desempenho na avaliação de fibrose e cirrose avançada, esta metodologia apresenta algumas limitações como: área tecidual para avaliação muito restrita, ausência de visualização do órgão através de imagens de ultrassonografia (o que pode prejudicar a escolha da área apropriada para realizar as medições), além de ter eficiência limitada na avaliação de pacientes obesos, com ascite e espaços intercostais estreitos [93,104].

- **Elastografia *point-shear wave***

A p-SWE ou elastografia por ondas de

cisalhamento, é uma tecnologia que permite a análise em tempo real do tecido hepático. Esta técnica utiliza o princípio da ARFI, com algumas modificações: uma sonda curvilínea é posicionada na região a ser analisada, o equipamento automaticamente seleciona a frequência adequada e emite pulsos de ultrassonografia para induzir deslocamento tecidual lateralmente ao foco do estímulo (ponto único), produzindo ondas de cisalhamento através da absorção de energia acústica. A velocidade das ondas geradas é calculada e fornecida em metros por segundo (m/s) ou convertidas em kPa [92,94,108,110,112].

Por ser uma técnica acoplada ao equipamento de US convencional, a p-SWE permite avaliar o fígado morfologicamente, bem como realizar exame de Doppler hepático, além de permitir a melhor campo de avaliação, evitando áreas como vasos e outras estruturas que podem comprometer o procedimento [110].

O ElastPQ® (Philips Medical Systems®, Bothell, WA, EUA) é um equipamento que utiliza a tecnologia p-SWA, e foi disponibilizado no mercado por volta de 2015. Ele permite o uso de imagens em tempo real como orientação para que seja localizada a área de interesse. É gerado pulso eletrônico, transmitido ao transdutor, que o converte em onda de pressão ultrassônica [107].

- **Elastografia *shear wave* bidimensional (2D-SWE)**

A elastografia 2D-SWE, assim como a p-SWE, utiliza o princípio da ARFI, porém emite pulsos de ultrassonografia em vários pontos focais, levando à formação de ondas de cisalhamento e posteriormente, o cálculo da velocidade da onda. Esta técnica permite a visualização em tempo real de um elastograma quantitativo colorido sobreposto a imagem ultrassonográfica em modo B (2-D), fornecendo informações de rigidez anatômica e tecidual do órgão [107,108,110,112].

- **Elastografia por ressonância magnética (MRE)**

Elastografia por ressonância magnética (MRE) é a metodologia que utiliza ondas de cisalhamento acústicas associadas ao contraste da ressonância magnética, permitindo visualizar a propagação das vibrações e calcular valores quantitativos para parâmetros teciduais [92,113], avaliando de maneira não invasiva não somente a rigidez hepática, mas também o gradiente da pressão venosa hepática (hipertensão portal), e consequentemente a gravidade da doença [107]. Esta metodologia permite avaliar maior amplitude do fígado, e pode ser realizada em pacientes com ascite ou obesidade. No entanto, é um exame de alto custo, não sendo recomendado para pacientes com sobrecarga de ferro, devido a geração de

interferência sinal/ruído nesta condição [94].

Terapia para hepatite C

A terapia contra o VHC tem como objetivo principal atingir níveis plasmáticos indetectáveis de carga viral, caracterizando RVS em 12 ou 24 semanas após o término do tratamento [23,99,114]. A RVS na semana 12 pós-tratamento tem sido considerada como a mais aceitável (com 99% de concordância) para a representação de “cura” à infecção pelo VHC [115,116].

A nova onda de medicamentos utilizados na terapia anti-VHC tem proporcionado melhorias significativas, tendo impacto sob o aumento das taxas de RVS [12,117,118].

Tratamentos denominados de "velha geração" caracterizavam-se por terapias baseadas no uso da citocina interferon-alfa (IFN-α) associada à ribavirina [12,119]. Esta terapia tinha como alvo a ativação da transcrição de genes estimulados por interferon (ISGs), responsáveis por regular uma série de efeitos biológicos, incluindo o bloqueio da replicação do vírus em diversas fases do ciclo viral, como por exemplo, a inibição da síntese de nucleotídeos, interrompendo a síntese de RNA viral necessária para a replicação do VHC [12,120].

Além disso, sabe-se que o IFN-α exerce

diferentes funções modulando o sistema imunológico, principalmente na resposta imune inata, incluindo células NK, que possuem maior nível de degranulação e citotoxicidade na presença desta citocina [120,121], além de levar a alteração da frequência e função das subpopulações de NK [121].

Em 2011, foram disponibilizadas as primeiras drogas antivirais de ação direta (AADs) (telaprevir e boceprevir), tendo como alvos componentes essenciais para o ciclo de vida do VHC [12]. No entanto, tais medicamentos possuíam limitações significativas relacionadas a posologia, realizada três vezes por dia, efeitos colaterais relevantes, risco de resistência viral e ineficiente ação contra diferentes genótipos virais, além da necessidade de serem associadas a interferon e ribavirina [12,116,122]. Além disso, cerca de 25% dos pacientes *naive* com infecção pelo genótipo 1 e, 71% daqueles que não obtiveram resposta à terapia anterior (interferon/ribavirina), não atingiram RVS quando submetidos aos regimes baseados em inibidores de protease de primeira geração [123].

Uma segunda onda de AADs, disponibilizada aqui no Brasil em 2015, tem proporcionado tratamento com melhor esquema de administração e tolerância, oferecendo vantagens sobre as anteriores, como farmacocinética,

possibilitando esquema de dosagem única diária, efeitos colaterais mais toleráveis, atividade antiviral abrangendo os diferentes genótipos e baixa resistência viral [116,122]. Estudos demonstram que tais drogas têm culminado em taxas de RVS superiores a 90% em pacientes não cirróticos e, altos índices tanto em pacientes com doença hepática avançada (60 a 75%) quanto naqueles caracterizados como "não respondedores nulos" a tratamentos anteriores (cerca de 80%) [117,124–126].

Dentre os AADs mais utilizados cita-se o sofosbuvir, um inibidor de ação direta da polimerase NS5B do VHC, região altamente conservada, atuando como terminador de cadeia, causando efeito que não depende diretamente do genótipo viral, tendo aplicabilidade em diferentes genótipos [12,20,116,123].

Outro medicamento é o simeprevir, inibidor de protease NS3/4A de administração oral, dose única diária, que interrompe o processamento da poliproteína codificada do VHC bloqueando o ciclo de vida viral [12,122]. Possui atividade antiviral contra vários genótipos e menor incidência de efeitos colaterais (como erupção cutânea e anemia) [122]. Segundo Majumdar, Kitson e Roberts (2016) [116] simeprevir e sofosbuvir quando administrados em associação demonstraram eficácia elevada contra genótipo 1, proporcionando RVS em mais de 90% dos pacientes cirróticos compensados.

O medicamento daclatasvir é um inibidor da

proteína viral NS5A que atua sobre diferentes fases do ciclo viral, como na replicação e montagem, levando ao rápido declínio dos níveis de carga viral [12,116].

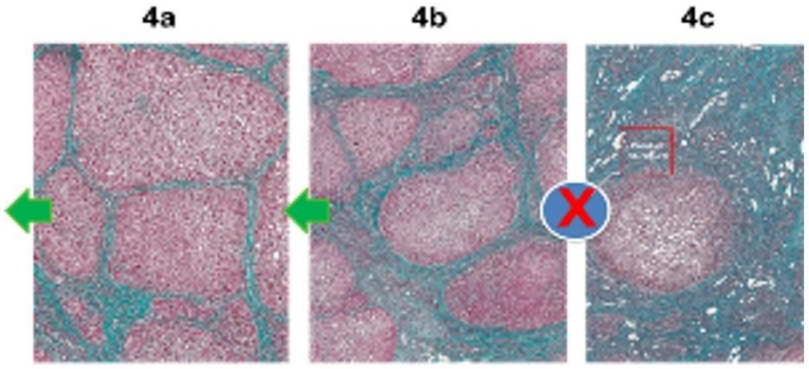
De maneira geral, a nova onda de medicamentos possui função de atuar diretamente no vírus, não interferindo de forma direta na resposta imunológica do hospedeiro, como na inflamação. Segundo Gane et al. (2013) [123], tais medicamentos podem solucionar diversas particularidades terapêuticas ainda pendentes em muitos pacientes, os quais têm se beneficiado de terapias de curta duração, via oral e livres de interferon. Existem novas opções de DAAs disponíveis, dentre elas medicações pangenotípicas e esquemas que conseguem resgatar falhas terapêuticas ocorridas com os DAAs iniciais. Estes podem ser utilizados em combinações como Sofosbuvir+Ledipasvir; Sofobusvir+Velpatasvir; Sofosbuvir+Velpastavir+Voxilaprevir; Grazoprevir+Elbasvir; Glecaprevir+Pribentasvir [127].

Embora a terapia antiviral revele que reduzindo o dano causado pela hepatite possa haver melhora da fibrose hepática, há populações nas quais a fibrose e a função hepática não melhoram (2). Curry et al. (2015) [128] reportaram que durante a terapia antiviral para hepatite C, 58% dos pacientes não tiveram melhora da função (escore *Child-Pugh*) após RVS.

No que concerne ao processo fibrótico, sabe-se que a cirrose é um processo reversível, no entanto, há o denominado "*point of no return*" (Figura 3), ou seja,

deposição do tecido fibrótico e o consequente desarranjo arquitetural com alterações na microcirculação que podem ser tão avançadas que não permitem uma restituição da integridade. Existe a hipótese de que o tipo de colágeno envolvido na fibrogênese implique na capacidade de regressão, de que a fibrose hepática constituída por acúmulo de colágeno 3 é mais susceptível a fibrinólise e, consequentemente regressão, enquanto a fibrose caracterizada pela deposição de colágeno 1 leva a um processo menos favorável à regressão [99].

Figura 3- Classificação de cirrose de Laennec – "*Point of no return*".



Legenda: Subclassificação da cirrose em tecido hepático de paciente VHB+. Os autores utilizaram a classificação de Laenec da cirrose onde 4a corresponde a cirrose com nódulos grandes e septos finos; 4b: cirrose com nódulos medianos com septos maiores; 4c: cirrose atrófica com nódulo pequeno e septos fibrosos grandes ("*point of no return*").

Adaptado de: BEDOSSA, P. Reversibility of hepatitis B virus cirrhosis after therapy: who and why? Liver Int., v. 35, n. 1, p. 78-81, jan. 2015.

Acredita-se que pacientes com maior risco de

desenvolvimento de CHC após RVS são aqueles com fibrose avançada e cirrose [117], e compreender a fisiopatologia da hepatite C pós-RVS pode elucidar melhor os fatores que influenciam pacientes curados a desenvolver ou não CHC anos após o término do tratamento, e outros não.

A regressão da fibrose hepática na hepatite C

O tratamento contra a hepatite C visa à eliminação viral, agente causador do dano hepático. Após a sua remoção, inicia-se a fase de regressão da fibrose, através da regeneração hepatocelular. Durante esta fase, as células estreladas ativadas sofrem apoptose ou modificam-se fenotipicamente para um estado de quiescência, e a matriz colágena depositada é degradada e removida pela ação de metaloproteinases. Tem sido demonstrado que tanto células residentes hepáticas quanto células recrutadas da circulação estão envolvidas na atenuação da fibrose e estimulação do processo de regeneração hepática após remoção da causa da injúria [2,45,129].

Devido à dinâmica do processo de modelação da fibrose acredita-se que o microambiente seja fator

fundamental na sua resolução, e que macrófagos derivados de monócitos, recrutados para o tecido hepático durante a fase inflamatória da lesão, contribuam para a regulação da degradação de matriz extracelular durante a resolução da fibrose, através da produção de metaloproteinases, incluindo colagenases (ex.: metaloproteinase 13), capaz de fazer a primeira clivagem de colágeno nativo, e as gelatinases (metaloproteinases 2 e 9), capazes de degradar completamente o colágeno parcialmente desnaturado [129]. A diminuição de macrófagos durante a fase de regressão da fibrose parece diminuir a degradação da matriz, sugerindo que estas células sejam as orquestradoras do processo de resolução da fibrose [2].

Subpopulações de leucócitos podem atuar no processo fibrótico, alterando as condições do microambiente hepático. Em estudo recente (dados não publicados em virtude do potencial de obtenção de produto - patente), buscando biomarcadores úteis ao monitoramento da fibrose hepática em pacientes, nosso grupo identificou biomarcadores celulares circulantes associados com diferentes graus de fibrose hepática (leve/ avançada), dentre eles destacam-se as subpopulações de linfócitos. Desta forma, elaboramos um algoritmo associando estas variáveis e a outras sabidamente correlacionadas à fibrose. Este algoritmo está em fase de

validação, testando prospectivamente um maior número de pacientes.

A fibrose hepática é considerada um processo dinâmico e contínuo de remodelação tecidual, e apesar disso, sabe-se que sua regressão é lenta necessitando de acompanhamento prolongado [8,46,99].

Recentes estudos abordando fibrose hepática têm destacado a complexa interação celular e molecular que merece ser explorada, visando o potencial terapêutico para reversão da fibrose hepática patológica. O termo "regressão da fibrose" tem sido usado para descrever o padrão de degradação de matriz extracelular e restituição da massa de hepatócitos, os quais estão associados com retorno da histologia e função hepática para o padrão normal ou próximo ao normal [45]. O conceito de “reversão da cirrose” ou estágio de cirrose reversível foi dado por Poynard et al. (2002) [130], que analisando 3010 pacientes tratados com interferon-alfa associado a ribavirina observaram que a conclusão da terapia estava relacionada com significativa melhora histológica, melhora da atividade necroinflamatória e das alterações estruturais (fibrose).

Apesar das baixas taxas de cura proporcionadas pela terapia baseada no uso de interferon-α, os dados disponíveis sugerem que a RVS leva à regressão da fibrose com melhora histológica hepática, no entanto, ainda não

está evidente se, na nova terapia com AADs livres de interferon, a fibrose é reversível em pacientes cirróticos (8), visto que para comprovar isto, seriam necessários estudos que realizassem biópsia hepática pós-RVS para comprovar a regressão ou não, o que não é eticamente viável pela caracteristica invasiva do método [100].

A realização de elastografia pode ser uma alternativa ao monitoramento, no entanto, alguns autores sugerem que a diminuição da rigidez hepática pós-RVS está mais relacionada a diminuição da necroinflamação do que à regressão da fibrose hepática propriamente dita [99,100,131].

De modo geral, a regressão da fibrose em pacientes cirróticos está associada a benefícios clínicos significativos como a melhora da sobrevida, redução do risco de desenvolver CHC, redução das taxas de descompensação hepática e sangramento de varizes. Isto nos leva a avaliar a necessidade de acompanhamento da cirrose residual em pacientes crônicos após RVS, com o objetivo de estimar um prognóstico e direcionar a conduta clínica [132–134].

No cenário atual, pacientes cirróticos que alcançaram RVS apresentam risco anual de 0,6% a 1,2% de desenvolver CHC, por isso, recomenda-se monitorar a condição hepática destes pacientes por ultrassonografia

abdominal a cada seis meses durante toda a vida. A avaliação do prognóstico de regressão do grau de lesão hepática/inflamação após RVS possibilitaria estimar intervalos de vigilância individualizados, visto que o risco de CHC em regressores parece ser menor do que o dos não-regressores [132,135,136].

O entendimento dos mecanismos *in vivo* que asseguram a regulação homeostática dos hepatócitos tem sido objeto de investigação [137]. Neste contexto, a compreensão das diferenças fisiopatológicas entre os indivíduos que conseguem regressão da rigidez hepática espontaneamente após RVS e, indivíduos que não conseguem reestabelecer esta recuperação necroinflamatória/histológica, torna-se importante, assim como a busca de futuros alvos prognósticos e terapêuticos. A caracterização imunológica pode fornecer informações que possibilitem: identificar potenciais biomarcadores que seriam úteis à predição da regressão da rigidez hepática; o desenvolvimento de teste não invasivo prognóstico desta regressão (algoritmo); identificar o diferencial entre pacientes regressores e não-regressores.

Neste contexto, o desenvolvimento de estudos translacionais que busquem induzir imunomodulação de pacientes não-regressores, direcionando a um perfil semelhante aos regressores, podem ser muito relevantes à

prática clínica, trazendo benefícios aos pacientes tratados para hepatite C crônica.

Referências

1. Zhang C-Y, Yuan W-G, He P, Lei J-H, Wang C-X. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. World J Gastroenterol [Internet]. 2016;22(48):10512.
2. Terai S, Tsuchiya A. Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis: overcoming the “point of no return” in advanced liver cirrhosis. J Gastroenterol. 2017;52(2):129–40.
3. Aydin MM, Akcali KC. Liver fibrosis. Turkish J Gastroenterol. 2018;29(1):14–21.
4. Anjo J, Café A, Carvalho A, Doroana M, Fraga J, Gíria J, et al. O impacto da hepatite C em Portugal. GE J Port Gastrenterologia [Internet]. 2014;21(2):44–54.
5. Baskic D, Vukovic V, Popovic S, Jovanovic D, Mitrovic S, Djurdjevic P, et al. Chronic hepatitis C: Conspectus of immunological events in the course of fibrosis evolution. PLoS One. 2019;14(8):1–16.
6. Eisenhardt M, Glässner A, Krämer B, Körner C, Sibbing B, Kokordelis P, et al. The CXCR3(+)CD56Bright Phenotype Characterizes a Distinct NK Cell Subset with Anti-Fibrotic Potential That Shows Dys-Regulated Activity in Hepatitis C. Sandberg JK, editor. PLoS One [Internet]. 2012 Jul 5 [cited 2019 Nov 13];7(7):e38846. Available from: www.plosone.org
7. Irshad M, Gupta P, Irshad K. Immunopathogenesis of Liver Injury during Hepatitis C Virus Infection. Viral Immunol. 2019;32(3):112–20.

8. Knop V, Hoppe D, Welzel T, Vermehren J, Herrmann E, Vermehren A, et al. Regression of fibrosis and portal hypertension in HCV-associated cirrhosis and sustained virologic response after interferon-free antiviral therapy. J Viral Hepat [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2019 Dec 16];23(12):994–1002. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12578
9. OMS OM da S. Hepatitis C [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 3]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c
10. Pybus OG, Thézé J. Hepacivirus cross-species transmission and the origins of the hepatitis C virus. Curr Opin Virol [Internet]. 2016 Feb;16:1–7. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625715001443
11. Mathew S, Faheem M, Ibrahim SM, Iqbal W, Rauff B, Fatima K, et al. Hepatitis C virus and neurological damage. World J Hepatol. 2016;8(12):545–56.
12. Spera AM, Eldin TK, Tosone G, Orlando R. Antiviral therapy for hepatitis C: Has anything changed for pregnant/lactating women? World J Hepatol [Internet]. 2016;8(12):557. Available from: http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v8/i12/557.htm
13. Carlsen THR, Scheel TKH, Ramirez S, Foung SKH, Bukh J. Characterization of Hepatitis C Virus Recombinants with Chimeric E1/E2 Envelope Proteins and Identification of Single Amino Acids in the E2 Stem Region Important for Entry. J Virol. 2013;87(3):1385–99.
14. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM,

Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. Hepatology. 2014;59(1):318–27.

15. Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Yoshimoto T, Zhang H, Murao K. Roles of lipoprotein receptors in the entry of hepatitis C virus. World J Hepatol. 2015;7(24):2535–42.
16. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, et al. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: Expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. J Infect Dis. 2018;218(11):1722–9.
17. Hedskog C, Parhy B, Chang S, Zeuzem S, Moreno C, Shafran SD, et al. Identification of 19 novel hepatitis C virus subtypes-further expanding HCV classification. Open Forum Infect Dis [Internet]. 2019 Mar 1;6(3):1–9. Available from: https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofz076/5362553
18. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. In: Annals of Internal Medicine [Internet]. 2000. p. 296–305. Available from: http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-132-4-200002150-00008
19. Sklan EH, Charuworn P, Pang PS, Glenn JS. Mechanisms of HCV survival in the host [Internet]. Vol. 6, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. 2009 [cited 2019 Dec 16]. p. 217–27. Available from: http://www.nature.com/articles/nrgastro.2009.32

20. Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, Gordon SC, et al. Sofosbuvir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Infection. N Engl J Med [Internet]. 2013 May 16 [cited 2019 Dec 16];368(20):1878–87. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1214853
21. Strauss E. Hepatite C. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2001 Feb;34(1):69–82. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822001000100011&lng=pt&tlng=pt
22. Aman W, Mousa S, Shiha G, Mousa SA. Current status and future directions in the management of chronic hepatitis C. Virol J [Internet]. 2012;9(1):57. Available from: http://www.virologyj.com/content/9/1/57
23. Ministério da Saúde do Brasil. Procotolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Minist Da Saude. 2019;1.
24. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013;10(9):553–62.
25. Halliday J, Klenerman P, Barnes E. Vaccination for hepatitis C virus: Closing in on an evasive target. Expert Rev Vaccines. 2011;10(5):659–72.
26. Ostojić R. Hepatitis C [Hepatitis C]. Medicus [Internet]. 2006 [cited 2019 Nov 12];15(1):113–20. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c
27. Ozaras R, Tahan V. Acute hepatitis C: prevention and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther [Internet]. 2009

Apr 10 [cited 2019 Dec 16];7(3):351–61. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.09.8

28. Silva GF, Grotto RMT, Verdichio-Moraes CF, Corvino SM, Ferrasi AC, de Arruda Silveira LV, et al. Human platelet antigen genotype is associated with progression of fibrosis in chronic hepatitis C. J Med Virol [Internet]. 2012 Jan [cited 2019 Dec 16];84(1):56–60. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.22191
29. Veldt BJ, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, Zeuzem S, et al. Sustained virologic response and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. Ann Intern Med. 2007;147(10):677–84.
30. Saha B, Szabo G. Innate immune cell networking in hepatitis C virus infection. J Leukoc Biol [Internet]. 2014 Nov [cited 2019 Dec 17];96(5):757–66. Available from: http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.4MR0314-141R
31. Rockey DC. Translating an Understanding of the Pathogenesis of Hepatic Fibrosis to Novel Therapies. Clin Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2013 Mar;11(3):224-231.e5. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356513000062
32. Patel K, Remlinger KS, Walker TG, Leitner P, Lucas JE, Gardner SD, et al. Multiplex Protein Analysis to Determine Fibrosis Stage and Progression in Patients With Chronic Hepatitis C. Clin Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2014 Dec 1;12(12):2113-2120.e3. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356514006727

33. Alhetheel A, Albarrag A, Shakoor Z, Alswat K, Abdo A, Al-Hamoudi W. Assessment of pro-inflammatory cytokines in sera of patients with hepatitis C virus infection before and after anti-viral therapy. J Infect Dev Ctries. 2016;10(10):1093–8.
34. Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. Hepatology. 2002;36(4I):986–92.
35. Gäbele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. Front Biosci [Internet]. 2003;8(4):887. Available from: https://www.bioscience.org/2003/v8/d/887/list.htm
36. Martínez-Esparza M, Tristán-Manzano M, Ruiz-Alcaraz AJ, García-Peñarrubia P. Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. World J Gastroenterol. 2015 Nov 7;21(41):11522–41.
37. Friedman SL. Liver fibrosis - From bench to bedside. Vol. 38, Journal of Hepatology, Supplement. 2003.
38. Baskic D, Vukovic V, Popovic S, Jovanovic D, Mitrovic S, Djurdjevic P, et al. Chronic hepatitis C: Conspectus of immunological events in the course of fibrosis evolution. Shankar EM, editor. PLoS One [Internet]. 2019 Jul 18;14(7):e0219508. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0219508
39. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. Hepatology [Internet]. 2002 Nov [cited 2019 Dec 16];36(5B):s35–46. Available from: http://doi.wiley.com/

10.1053/jhep.2002.36806

40. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: Detection and significance. Semin Liver Dis. 2000;20(1):47–56.
41. Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: A critical appraisal. Hepatology. 2003;37(3):493–503.
42. Romero-Gómez M, Montes-Cano MA, Otero-Fernández MA, Torres B, Sánchez-Muñoz D, Aguilar F, et al. SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C. Gut. 2004;53(3):446–50.
43. Fartoux L, Poujol-Robert A, Guéchot J, Wendum D, Poupon R, Serfaty L. Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. Gut [Internet]. 2005 [cited 2019 Dec 17];54(7):1003–8. Available from: www.gutjnl.com
44. Toson ESA, Shiha GE, El-Mezayen HA, El-Sharkawy AM. Diagnostic performance of T lymphocyte subpopulations in assessment of liver fibrosis stages in hepatitis C virus patients: Simple noninvasive score. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2016;28(8):931–9.
45. Campana L, Iredale J. Regression of Liver Fibrosis. Semin Liver Dis [Internet]. 2017 Feb 15;37(01):001–10. Available from: http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0036-1597816
46. Schuppan D, Kim YO. Review series: Evolving therapies for liver fibrosis. J Clin Invest. 2013;123(5):1887–901.

47. Cruvinel W de M, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS de, Silva NP da, et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Rev Bras Reumatol [Internet]. 2010 Aug;50(4):434–47. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042010000400008&lng=pt&nrm=iso&tlng=en

48. Villani R, Vendemiale G, Serviddio G. Molecular Mechanisms Involved in HCC Recurrence after Direct-Acting Antiviral Therapy. Int J Mol Sci [Internet]. 2018 Dec 22;20(1):49. Available from: http://www.mdpi.com/1422-0067/20/1/49

49. Jobim M, Jobim LFJ. Natural killer cells and immune surveillance. J Pediatr (Rio J). 2008;84(4 SUPPL.):58–67.

50. Verrastro T, Lorenzi TF, Wendel-Neto S. Hematologia e Hemoterapia. 1 ed. Atheneu, editor. São Paulo; 2005. 91–103 p.

51. Yang Y, Tu ZK, Liu XK, Zhang P. Mononuclear phagocyte system in hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol. 2018;24(44):4962–73.

52. Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, Trautwein C, et al. Interleukin-8 Is Activated in Patients with Chronic Liver Diseases and Associated with Hepatic Macrophage Accumulation in Human Liver Fibrosis. Bertoletti A, editor. PLoS One [Internet]. 2011 Jun 22;6(6):e21381. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021381

53. Almeida-oliveira A, Diamond HR. Atividade Antileucêmica das Células Natural Killer (NK) Antileukemic Activity of Natural Killer (NK) Cells. Rev Bras Cancerol [Internet]. 2008;54(3):297–305. Available from: https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n_54/v03/pdf/revisao_4_pag_297a305.pdf
54. Fathy A, Eldin MM, Metwally L, Eida M, Abdel-Rehim M, Esmat G. Interferon therapy shifts natural killer subsets among Egyptian patients with chronic hepatitis C. Brazilian J Infect Dis. 2010;14(4):398–405.
55. Yoon JC, Yang CM, Song Y, Lee JM. Natural killer cells in hepatitis C: Current progress. World J Gastroenterol. 2016;22(4):1449–60.
56. Poznanski SM, Barra NG, Ashkar AA, Schertzer JD. Immunometabolism of T cells and NK cells: metabolic control of effector and regulatory function. Inflamm Res [Internet]. 2018;67(10):813–28. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s00011-018-1174-3
57. Zimmer CL, Cornillet M, Solà-Riera C, Cheung K-W, Ivarsson MA, Lim MQ, et al. NK cells are activated and primed for skin-homing during acute dengue virus infection in humans. Nat Commun [Internet]. 2019 Dec 29;10(1):3897. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11878-3
58. Lin AW, Gonzalez SA, Cunningham-Rundles S, Dorante G, Marshall S, Tignor A, et al. CD56+dim and CD56+bright cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. Clin Exp Immunol. 2004;137(2):408–16.
59. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried

E, Bader P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2016;65(4):477–84.

60. Strunz B, Hengst J, Deterding K, Manns MP, Cornberg M, Ljunggren H-G, et al. Chronic hepatitis C virus infection irreversibly impacts human natural killer cell repertoire diversity. Nat Commun [Internet]. 2018 Dec 11;9(1):2275. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04685-9
61. Krämer B, Körner C, Kebschull M, Glässner A, Eisenhardt M, Nischalke HD, et al. Natural killer p46 High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. Hepatology. 2012;56(4):1201–13.
62. Kumar B V, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life [Internet]. Vol. 48, Immunity. 2018. p. 202–13. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761318300281
63. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. Nat Rev Immunol. 2012;12(11):749–61.
64. Kurachi M. CD8 + T cell exhaustion. Semin Immunopathol. 2019;41(3):327–37.
65. Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4 + T Cell Subsets. Biomed Res Int [Internet]. 2015;2015:1–13. Available from: http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/521957/

66. Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. Int Immunol. 2016;28(4):163–71.
67. Read KA, Powell MD, Sreekumar BK, Oestreich KJ. In Vitro Differentiation of Effector CD4+ T Helper Cell Subsets. In: Allen I (eds): Mouse Models of Innate Immunity, Methods in Molecular Biology [Internet]. 2019. p. 75–84. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9167-9_6
68. Wan Z, Zhou Z, Liu Y, Lai Y, Luo Y, Peng X, et al. Regulatory T cells and T helper 17 cells in viral infection. Scand J Immunol. 2020;91(5):1–14.
69. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. Cytom Part A. 2014;85(1):36–42.
70. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. Cytokine [Internet]. 2015;74(1):5–17. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011
71. Ouaguia L, Moral O, Aoudjehane L, Wychowski C, Delhem N, Moralès O, et al. Hepatitis C Virus Improves Human Tregs Suppressive. Cells [Internet]. 2019;8(10):1296. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31652598%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6829901
72. Quarleri JF, Oubiña JR. Hepatitis c virus strategies to evade the specific-T cell response: A possible mission

favoring its persistence. Ann Hepatol [Internet]. 2016;15(1):17–26. Available from: http://dx.doi.org/10.5604/16652681.1184193

73. Moosavy SH, Dvoodian P, Nazarnezhad MA, Nejatizaheh A, Ephtekhar E, Mahboobi H. Epidemiology, transmission, diagnosis, and outcome of Hepatitis C virus infection. Electron Physician. 2017;9(10):5646–56.
74. Schietroma I, Scheri GC, Pinacchio C, Statzu M, Petruzziello A, Vullo V. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: Pathogenetic Mechanisms and Impact of Direct-Acting Antivirals. Open Virol J. 2018;12(1):16–25.
75. Patra T, Ray R, Ray R. Strategies to Circumvent Host Innate Immune Response by Hepatitis C Virus. Cells. 2019;8(3):274.
76. Li H, Huang MH, Jiang JD, Peng ZG. Hepatitis C: From inflammatory pathogenesis to antiinflammatory/hepatoprotective therapy. World J Gastroenterol. 2018;24(47):5297–311.
77. Barathan M, Mohamed R, Yong Y, Kannan M, Vadivelu J, Saeidi A, et al. Viral Persistence and Chronicity in Hepatitis C Virus Infection: Role of T-Cell Apoptosis, Senescence and Exhaustion. Cells. 2018;7(10):165.
78. Larrubia JR, Benito-Martínez S, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra-Cid T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection [Internet]. Vol. 14, World Journal of Gastroenterology. 2008 [cited 2019 Dec 17]. p. 7149–59. Available from: http://www.wjgnet.com/

1007-9327/full/v14/i47/7149.htm

79. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. Annu Rev Immunol [Internet]. 2009 Apr;27(1):229–65. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.021908.132715

80. Paiva-Oliveira EL, Silva AC, Silva RM, Sevenini LA, Melo HA, Lagrota-Candido JM, et al. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. Rev Ciências Médicas e Biológicas [Internet]. 2012 Sep 24;11(1):96. Available from: https://portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/6245

81. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, et al. Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. Immunity. 2011;34(2):213–23.

82. Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. Science (80-) [Internet]. 2002 Apr 12;296(5566):301–5. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1071059

83. Kubes P, Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver. Gastroenterology [Internet]. 2012;143(5):1158–72. Available from: http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.008

84. Chattergoon MA, Latanich R, Quinn J, Winter ME, Buckheit RW, Blankson JN, et al. HIV and HCV Activate the Inflammasome in Monocytes and Macrophages via Endosomal Toll-Like Receptors without Induction of Type 1 Interferon. Paludan SR, editor. PLoS Pathog [Internet].

2014 May 1;10(5):e1004082. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004082

85. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DTY, Doehle B, Papic N, et al. IL-1β Production through the NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. PLoS Pathog. 2013;9(4):1–13.
86. Dinarello CA. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2019 Oct 12;15(10):612–32. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41584-019-0277-8
87. dos Santos G, Rogel MR, Baker MA, Troken JR, Urich D, Morales-Nebreda L, et al. Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome. Nat Commun [Internet]. 2015 May 12;6(1):6574. Available from: http://www.nature.com/articles/ncomms7574
88. Ramadori G, Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: Specific or nonspecific, this is the question. Gastroenterology [Internet]. 2004 Sep;127(3):997–1000. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508504013496
89. Castera L. Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease. Best Pract Res Clin Gastroenterol [Internet]. 2011;25(2):291–303. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2011.02.003
90. Fernandes FF, Piedade J, Guimaraes L, Nunes EP, Chaves U, Goldenzon R V., et al. Effectiveness of direct-acting agents for hepatitis C and liver stiffness changing

after sustained virological response. J Gastroenterol Hepatol. 2019;34(12):2187–95.

91. Patel K, Remlinger KS, Walker TG, Leitner P, Lucas JE, Gardner SD, et al. Multiplex Protein Analysis to Determine Fibrosis Stage and Progression in Patients With Chronic Hepatitis C. Clin Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2014;12(12):2113-2120.e3. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2014.04.037
92. Srinivasa Babu A, Wells ML, Teytelboym OM, Mackey JE, Miller FH, Yeh BM, et al. Elastography in Chronic Liver Disease: Modalities, Techniques, Limitations, and Future Directions. RadioGraphics [Internet]. 2016 Nov;36(7):1987–2006. Available from: http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.2016160042
93. Deffieux T, Gennisson JL, Bousquet L, Corouge M, Cosconea S, Amroun D, et al. Investigating liver stiffness and viscosity for fibrosis, steatosis and activity staging using shear wave elastography. J Hepatol [Internet]. 2015;62(2):317–24. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.09.020
94. Mihăilă RG. Liver stiffness in chronic hepatitis C virus infection. Rom J Intern Med. 2019;57(2):85–98.
95. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. Hepatology [Internet]. 1996 Aug [cited 2019 Dec 19];24(2):289–93. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/hep.510240201
96. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, et al. Randomised trial of interferon α2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon

α2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. Lancet. 1998;352(9138):1426–32.

97. Garcia-Pagán JC, Buscarini E, Janssen HLA, Leebeek FWG, Plessier A, Rubbia-Brandt L, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Vascular diseases of the liver. J Hepatol. 2016;64(1):179–202.
98. Sharma S, Khalili K, Nguyen GC. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. World J Gastroenterol [Internet]. 2014 [cited 2019 Dec 16];20(45):16820–30. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4258552/
99. Dolmazashvili E, Abutidze A, Chkhartishvili N, Karchava M, Sharvadze L, Tsertsvadze T. Regression of liver fibrosis over a 24-week period after completing direct-acting antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C receiving care within the national hepatitis C elimination program in Georgia: Results of hepatology clinic HEPA exper. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2017;29(11):1223–30.
100. Fernandes FF, Piedade J, Guimaraes L, Nunes EP, Chaves U, Goldenzon R V., et al. Effectiveness of direct-acting agents for hepatitis C and liver stiffness changing after sustained virological response. J Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2019 Jun 26;2019:jgh.14707. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jgh.14707
101. Poynard T, Bedossa P, Bioulac-Sage P, Callard P, Chevallier M, Degott C, et al. Age and platelet count: A

simple index for predicting the presence of histological lesions in patients with antibodies to hepatitis C virus. J Viral Hepat. 1997;4(3):199–208.

102. Chrostek L, Przekop D, Gruszewska E, Gudowska-Sawczuk M, Cylwik B. Noninvasive Indirect Markers of Liver Fibrosis in Alcoholics. Biomed Res Int [Internet]. 2019 May 5;2019:1–9. Available from: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/3646975/
103. Ferraioli G, Tinelli C, Lissandrin R, Zicchetti M, Bello BD, Filice G, et al. Point shear wave elastography method for assessing liver stiffness. World J Gastroenterol. 2014 Apr 28;20(16):4787–96.
104. Gherlan GS. Liver ultrasound elastography: More than staging the disease. World J Hepatol. 2015;7(12):1595–600.
105. Procopet B, Berzigotti A. Diagnosis of cirrhosis & portal hypertension: Imaging, non-invasive markers of fibrosis & liver biopsy [Internet]. Vol. 5, Gastroenterology Report. 2017 [cited 2019 Dec 19]. p. 79–89. Available from: https://academic.oup.com/gastro/article-lookup/doi/10.1093/gastro/gox012
106. Ophir J, Céspedes I, Ponnekanti H, Yazdi Y, Li X. Elastography: A Quantitative Method for Imaging the Elasticity of Biological Tissues. Ultrason Imaging [Internet]. 1991 Apr 2;13(2):111–34. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/0161-7346(91)90079-W
107. Schmillevitch J, Mincis R, Mincis R, Mincis D. Atualização tecnológica da elastometria do fígado [Internet]. Vol. 35, GED - Gastrenterologia Endoscopia

Digestiva. 2016 [cited 2019 Dec 19]. p. 36–9. Available from: http://files.bvs.br/upload/S/0101-7772/2016/v35n1/a5598.pdf

108. Moraes PHDM, Sigrist R, Takahashi MS, Schelini M, Chammas MC. Ultrasound elastography in the evaluation of thyroid nodules: Evolution of a promising diagnostic tool for predicting the risk of malignancy. Vol. 52, Radiologia Brasileira. Colegio Brasileiro de Radiologia; 2019. p. 247–53.
109. Sigrist RMS, Liau J, Kaffas A El, Chammas MC, Willmann JK. Ultrasound elastography: Review of techniques and clinical applications [Internet]. Vol. 7, Theranostics. 2017 [cited 2019 Dec 19]. p. 1303–29. Available from: http://www.thno.org
110. da Silva L de CM, de Oliveira JT, Tochetto S, de Oliveira CPMS, Sigrist R, Chammas MC. Ultrasound elastography in patients with fatty liver disease. Radiol Bras. 2020;53(1):47–55.
111. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. Gastroenterology. 2005;128(2):343–50.
112. Bouchet P, Gennisson J-L, Podda A, Alilet M, Carrié M, Aubry S. Artifacts and Technical Restrictions in 2D Shear Wave Elastography. Ultraschall der Medizin - Eur J Ultrasound [Internet]. 2020 Jun 21;41(03):267–77. Available from: http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-0805-1099

113. Sohail A, Bég OA, Li Z, Celik S. Physics of fractional imaging in biomedicine [Internet]. Vol. 140, Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2018. p. 13–20. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079610717303115
114. Toyoda H, Tada T, Yasuda S, Mizuno K, Ito T, Kumada T. Dynamic Evaluation of Liver Fibrosis to Assess the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Who Achieved Sustained Virologic Response. Clin Infect Dis. 2020;70(6):1208–14.
115. van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, Wedemeyer H. Association Between Sustained Virological and Advanced Hepatic Fibrosis. J Am Med Assoc [Internet]. 2012;308(24):2584–93. Available from: http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=1487498
116. Majumdar A, Kitson MT, Roberts SK. Systematic review: Current concepts and challenges for the direct-acting antiviral era in hepatitis C cirrhosis. Aliment Pharmacol Ther. 2016;43(12):1276–92.
117. Trivedi HD, Lin SC, Lau DTY. Noninvasive assessment of fibrosis regression in hepatitis c virus sustained virologic responders. Gastroenterol Hepatol. 2017;13(10):587–95.
118. Yamada R, Hiramatsu N, Oze T, Urabe A, Tahata Y, Morishita N, et al. Incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma change over time in patients with hepatitis C virus infection who achieved sustained virologic response. Hepatol Res. 2019;49(5):570–8.
119. Hill A, Cooke G. Hepatitis C can be cured globally, but at what cost? Science (80-) [Internet]. 2014 Jul

11;345(6193):141–2. Available from: https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1257737

120. Markova AA, Mihm U, Schlaphoff V, Lunemann S, Filmann N, Bremer B, et al. PEG-IFN Alpha but Not Ribavirin Alters NK Cell Phenotype and Function in Patients with Chronic Hepatitis C. Polyak SJ, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Apr 21;9(4):e94512. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0094512
121. Wang XX, Luo BF, Jiang HJ, Cong X, Jin Q, Ma DL, et al. Recovery of natural killer cells is mainly in post-treatment period in chronic hepatitis C patients treated with sofosbuvir plus ledipasvir. World J Gastroenterol. 2018;24(40):4554–64.
122. Clark VC, Peter JA, Nelson DR. New therapeutic strategies in HCV: Second-generation protease inhibitors [Internet]. Vol. 33, Liver International. 2013 [cited 2019 Dec 16]. p. 80–4. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/liv.12061
123. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Ding X, Svarovskaia E, Symonds WT, et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. N Engl J Med. 2013;368(1):34–44.
124. Jiménez Galán R, Albacete Ramírez Á, Monje Agudo P, Borrego Izquierdo Y, Morillo Verdugo R. Nuevos fármacos en el abordaje terapéutico de la hepatitis C. Vol. 38, Farmacia Hospitalaria. 2014. p. 231–47.
125. Hill A, Khoo S, Fortunak J, Simmons B, Ford N. Minimum Costs for Producing Hepatitis C Direct-Acting Antivirals

for Use in Large-Scale Treatment Access Programs in Developing Countries. Clin Infect Dis [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2019 Dec 16];58(7):928–36. Available from: https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciu012

126. Jiménez-Macías FM, Cabanillas-Casafranca M, Maraver-Zamora M, Romero-Herrera G, García-García F, Correia-Varela-Almeida A, et al. Experiencia en práctica clínica real con los nuevos antivirales de acción directa en hepatitis crónica C. Med Clin (Barc) [Internet]. 2017 Nov 9 [cited 2019 Dec 21];149(9):375–82. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025775317302282
127. Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. J Hepatol [Internet]. 2018;69(2):461–511. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026
128. Curry MP, O'Leary JG, Bzowej N, Muir AJ, Korenblat KM, Fenkel JM, et al. Sofosbuvir and velpatasvir for HCV in patients with decompensated cirrhosis. N Engl J Med. 2015;373(27):2618–28.
129. Iredale JP, Bataller R. Identifying molecular factors that contribute to resolution of liver fibrosis. Gastroenterology. 2014;146(5):1160–4.
130. Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology. 2002;122(5):1303–

13.
131. Suda T, Okawa O, Masaoka R, Gyotoku Y, Tokutomi N, Katayama Y, et al. Shear wave elastography in hepatitis C patients before and after antiviral therapy. World J Hepatol. 2017;9(1):64–8.
132. D'Ambrosio R, Colombo M. Should surveillance for liver cancer be modified in hepatitis C patients after treatment-related cirrhosis regression? Liver Int. 2016;36(6):783–90.
133. Mauro E, Crespo G, Montironi C, Londoño MC, Hernández-Gea V, Ruiz P, et al. Portal pressure and liver stiffness measurements in the prediction of fibrosis regression after sustained virological response in recurrent hepatitis C. Hepatology. 2018;67(5):1683–94.
134. Chen Yi Mei SLG, Thompson AJ, Christensen B, Cunningham G, McDonald L, Bell S, et al. Sustained virological response halts fibrosis progression: A long-term follow-up study of people with chronic hepatitis C infection. Liu C-H, editor. PLoS One [Internet]. 2017 Oct 24;12(10):e0185609. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0185609
135. Huang CF, Yeh ML, Huang CI, Liang PC, Lin YH, Lin ZY, et al. Post-treatment fibrotic modifications overwhelm pretreatment liver fibrosis in predicting HCC in CHC patients with curative antivirals. Hepatol Int [Internet]. 2018 Nov 13;12(6):544–51. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s12072-018-9908-4
136. Piñero F, Mendizabal M, Ridruejo E, Herz Wolff F, Ameigeiras B, Anders M, et al. Treatment with direct-

acting antivirals for HCV decreases but does not eliminate the risk of hepatocellular carcinoma. Liver Int. 2019 Jun 1;39(6):1033–43.

137. Forbes SJ, Gupta S, Dhawan A. Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. J Hepatol [Internet]. 2015;62(S1):S157–69. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.040

Imagem da capa:

Hepatitis C Online. Natural History of Hepatitis C Infection. Avaliable from: https://www.hepatitisc.uw.edu/pdf/evaluation-staging-monitoring/natural-history/core-concept/all. Apud: Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. Gastroenterol Clin North Am. 2015;44:717-34.

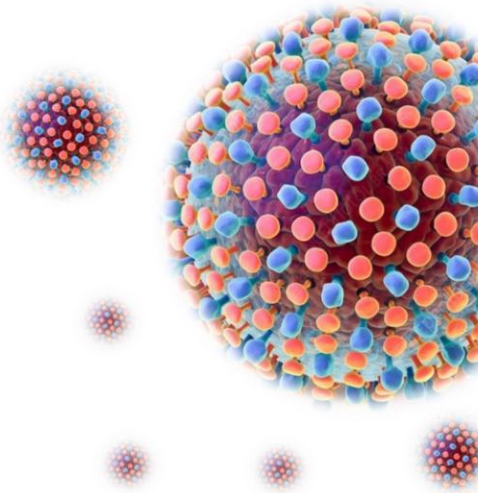
ISBN: 978-65-86133-22-7

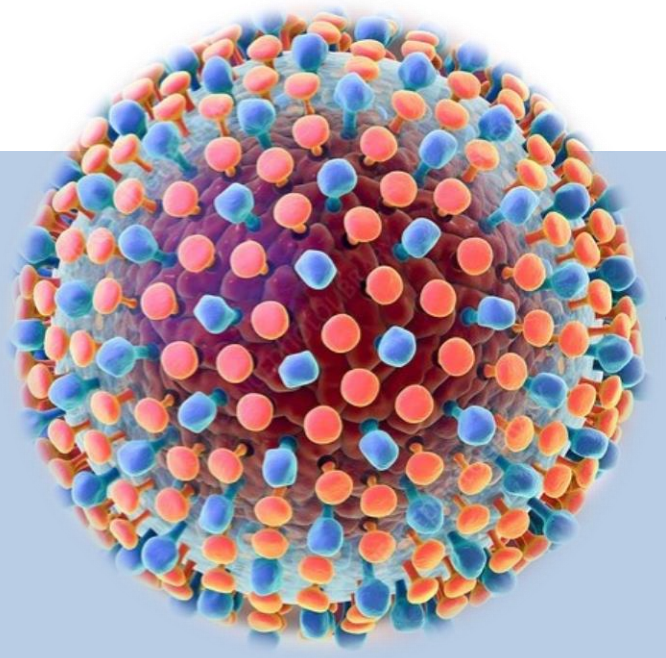


NEAD.TIS

FMB

unesp





Inflammation Response and Liver Stiffness: Predictive model of regression of hepatic stiffness after sustained virological response in cirrhotics patients with chronic hepatitis C.

[ARTIGO I]

Status: submetido a Periódico Internacional

Inflammation Response and Liver Stiffness: Predictive model of regression of hepatic stiffness after sustained virological response in cirrhotics patients with chronic hepatitis C

Aline Márcia Marques Braz[1,2*], Fernanda Cristina Winckler[1], Larissa Sarri Binelli[2], Luis Guilherme Chimeno[2,3], Lia Beatriz Mantovani Lopes[2,3], Rodrigo Santos Lima[4], Rafael Plana Simões[3,5], Rejane Maria Tommasini Grotto[3,4,5], Márjorie de Assis Golim[2,3], Giovanni Faria Silva[1,3]

1 Graduate Program in Pathophysiology in Clinical Medicine, Department of Clinical Medicine, Medical School of Botucatu - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

2 Flow Cytometry Laboratory, Applied Biotechnology Laboratory, Clinical Hospital of Botucatu Medical School, Botucatu, São Paulo State, Brazil

3 Graduate Program in Research and Development (Medical Biotechnology), Botucatu Medical School - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

4 Graduate Program in Pathology, Department of Pathology, Botucatu Medical School - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

5 Department of Biotechnology and Bioprocess Engineering, Faculty of Agronomic Sciences - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

*Corresponding author
E-mail: aline.braz@unesp.br (AMMB)

Author Contributions

Conceptualization: Aline Márcia Marques Braz, Rafael Plana Simões, Márjorie de Assis Golim, Giovanni Faria Silva

Data curation: Aline Márcia Marques Braz, Fernanda Cristina Winckler, Rafael Plana Simões, Márjorie de Assis Golim, Giovanni Faria Silva
Formal analysis: Aline Márcia Marques Braz, Rafael Plana Simões, Márjorie de Assis Golim, Giovanni Faria Silva
Investigation: Aline Márcia Marques Braz, Rejane Maria Tommasini Grotto, Márjorie de Assis Golim, Giovanni Faria Silva
Methodology: Aline Márcia Marques Braz, Fernanda Cristina Winckler, Larissa Sarri Binelli, Luis Guilherme Chimeno, Lia Beatriz Mantovani Lopes, Rafael Plana Simões, Márjorie de Assis Golim, Giovanni Faria Silva
Supervision: Márjorie de Assis Golim, Giovanni Faria Silva
Writing – original draft: Aline Márcia Marques Braz, Rodrigo Santos Lima, Rafael Plana Simões, Rejane Maria Tommasini Grotto, Márjorie de Assis Golim, Giovanni Faria Silva
Writing – review & editing: Aline Márcia Marques Braz, Rodrigo Santos Lima, Rejane Maria Tommasini Grotto, Márjorie de Assis Golim, Giovanni Faria Silva

Abstract

Cirrhotic patients with chronic hepatitis C, even after sustained virological response (SVR), should be monitored for the evaluation of liver function and screening of hepatocellular carcinoma (HCC). After treatment and viral clearance, the stage of inflammatory resolution and regression of fibrosis should happen. However, liver examinations by elastography show that 30 to 40% of patients do not exhibit a decrease in liver stiffness. This work was a cohort study in cirrhotic patients whose purpose was to identify immunological factors involved in the regression of liver stiffness in chronic hepatitis C and characterize possible prognostic value serum biomarkers. The sample universe consisted of 31 cirrhotic patients who underwent leukocyte immunophenotyping, quantification of cytokines/chemokines and metalloproteinase inhibitors in the pretreatment

(M1) and in the evaluation of SVR (M2). Inclusion criteria: HCV genotype 1, diagnosis of cirrhosis, absence of infectious, inflammatory or neoplastic comorbidities, non-use of immunosuppressant and confirmation of SVR in M2. Exclusion criteria: liver transplantation and/or nodules or HCC (follow-up), absence of elastography in M1 or M3 (24 months after SVR), result of liver elastography incompatible with cirrhosis, loss of follow-up. The 16 patients included were again evaluated in M3 (like M1) and classified into regressors (R) or non-regressors (NR), decrease or not ≥25% stiffness, respectively. The results from ROC curve, machine learning (ML) and linear discriminant analysis showed that TCD4+ lymphocytes (absolute) is the most important biomarkers for the prediction of the regression (AUC= 0,90). NR patients had levels less than R of stiffness since baseline, whereas NK cells were increased in NR (M1 and M2). Therefore, it was concluded that there is a difference in the profile of circulating immune cells in R and NR, thus allowing the development of a predictive model of regression of liver stiffness after SVR, and should be validated in greater numbers of patients.

Keywords: liver cirrhosis; elastography; Hepatitis C.

Introduction

Hepatitis C is one of the main causes of chronic inflammatory liver disease, such as inflammation-induced liver fibrosis, and it can progress to cirrhosis and/or HCC . Different immune mechanisms are triggered after exposure to the hepatitis C virus in order to control the infection. The persistent activation, however, could induce fibrosis .

The balance of fibrogenesis is regulated by the interaction of a number of factors, molecules, and systems, and is associated with the duration and persistence of the lesion.

Several cells have been described as participants in liver fibrosis remodeling, such as hepatocytes, hepatic stellate cells (HSCs), hepatic endothelial and sinusoidal cells, and immune system cells .

Liver biopsy is the gold standard method for evaluating fibrosis and classifying fibrosis stages . However, biopsy is not considered applicable to evaluate the evolution of fibrosis after treatment/SVR due to its invasive characteristic, low acceptance among patients, requiring highly qualified staff and histological analysis . Currently, noninvasive tests have been indicated as alternatives to liver biopsy to differentiate the degrees of liver involvement pretreatment, as well as to monitor the progression of the disease even post-SVR . Thus one of the most widely used is elastography .

The regression stage of fibrosis starts through hepatocellular regeneration once treatment is concluded and the aggressor agent is removed. It has been shown that both liver resident cells and cells recruited from the circulation are involved in the attenuation of fibrosis and stimulation of the liver regeneration process .

Although antiviral therapy reveals that reducing the damage caused by hepatitis can improve liver fibrosis, however in some populations fibrosis and liver function do not improve . It is known that cirrhosis is also a reversible process; albeit, there is the so-called "point of no return" . Due to the dynamics of this fibrosis modeling process, it is believed that the microenvironment is a fundamental factor in its resolution .

For this reason, it would be interesting to evaluate if the presence or absence of regression of liver stiffnness and if this outcome is associated with peripherical inflammatory response. It is critical to understand the pathophysiological differences and immunological characterization of individuals who achieve regression of hepatic stiffness spontaneously after injury removal and in individuals who fail to reestablish this necroinflammatory/histological recovery, as well as to search for future prognostic and therapeutic targets.

Materials and Methods

This was a retroprospective cohort study in cirrhotic patients whose purpose was to identify immunological factors involved in the regression of liver stiffness in chronic hepatitis C, and to characterize possible prognostic value serum biomarkers. The sample universe of the study was composed of 31 cirrhotic patients who had immunophenotyping of subpopulations of peripheral blood leukocytes and plasma frozen in a freezer at -80º C to quantify the chemokines/cytokines and metalloproteinase inhibitors (TIMPs) 1, 2, 3 by multiplex analysis in the pretreatment (M1) and the time of SVR (M2) (retrospective analysis). The patients included were again evaluated by immunophenotyping, multiplex analysis and elastography 24 months after SVR (M3) (prospective analysis).

Inclusion criteria were cirrhotics HCV genotype 1, absence of comorbidities of infections, inflammatory or neoplastic origin, non-use of immunosuppressive drug and confirmation of SVR in M2 with DAAs (direct-acting antivirals).

Exclusion criteria were: liver transplantation and / or development of nodules or HCC during the follow-up period, absence of elastography examination in M1 or M3, result of liver elastography incompatible with cirrhosis and loss of follow-up.

Of the 31 patients, 8 presented no results of hepatic elastography using point shear wave technology (pSWE) in the pretreatment assessment, 1 underwent liver transplantation during follow-up, 2 presented a result of elastography in the pretreatment below the value considered as cirrhosis (F4), 1 developed a liver nodule during follow-up, 2 did not return after SVR and 1 was unable to perform the M3 elastography exam. Therefore, 16 patients were followed during and after therapy with DAAs (Simeprevir or Daclatasvir and Sofosbuvir

+/- Ribavirin) and were characterized after SVR as non-regressors or regressors of liver stiffness.

Cirrhosis diagnostic was determined through a clinical evaluation (presence of ascites, jaundice), imaging (ultrasound or computed tomography), presence of esophageal varicose veins through endoscopy) , or liver elastography (measured in kPa-ElastPQ® - Philips) or liver biopsy (METAVIR score) .

This study was approved by the Research Ethics Committee of Botucatu Medical School, UNESP (protocol nº.2.810.759). All the included patients signed the informed consent form.

Experimental Design

The patients were evaluated in three moments:

Moment 1 (M1) (retrospective analysis) - pretreatment evaluation; moment 2 (M2) (retrospective analysis) - viral clearance - SVR evaluation (12 weeks after the end of treatment) ; moment 3 (M3) (prospective analysis) - characterization of regressors *vs* non-regressors of fibrosis by Elastography (24 months post-SVR).

For the analyses, samples of peripheral blood were collected (5ml) in EDTA tube. The immunophenotyping was processing at all moments. Plasma aliquots were frozen at -80ºC for further processing of cytokine/chemokine.

Flow cytometry immunophenotyping

The frequencies of the subpopulations of circulating monocytes (classical monocytes $CD14^{++}/CD16^{-}$; non-classical monocytes: $CD14^{+}/CD16^{+}$) and a subpopulation of NK cells (dim NK cells - $CD3^{-}/CD16^{+}/CD56^{+}$; bright NK cells $CD3^{-}/CD16^{+}/CD56^{++}$) were evaluated

155 at all times during the study (CD14-FITC: Biolegend®, clone: M5E2; CD16-APC:
156 Biolegend®, clone: 3G8; CD3-FITC: Biolegend®, clone: HIT3a); CD16-APC: Biolegend®,
157 clone: 3G8; CD56-PE: Biolegend®, clone: 5.1H11). Aliquots of 100 µl of whole blood were
158 inserted into polystyrene tubes (12X75mm), incubated with monoclonal antibodies for 30
159 minutes at room temperature and protected from light. After marking, the red blood cells
160 were lysed with 1ml of Lysing Solution® - BD to optimize the acquisition of leukocytes.
161 After 30 minutes of incubation, the sample was centrifuged at 200g for 10 minutes. The
162 supernatant was removed, 500µl of PBS (0.015M pH 7.4) was added, and the washing
163 process repeated. Then, 500µL of PBS was added to resuspend the cells and proceed to read
164 on a flow cytometer FACSCalibur® (BD) 4 colors. Data were acquired and analyzed using
165 CellQuestPRO™ software.
166

167 **Absolute quantification of LT $CD4^+$ and $CD8^+$**

168 To determine the absolute count and percentage of subpopulations of T lymphocytes
169 (helper T lymphocytes: $CD3^+/CD4^+/CD8^-$; cytotoxic T lymphocytes: $CD3^+/CD4^-/CD8^+$), 20µl
170 of BD Multitest™ (CD3 FITC; CD8 PE; CD45 PerCP; CD4 APC) was pipetted into BD
171 TruCOUNT™ (BD) tubes containing fluorescent microspheres of known quantity. Then, total
172 blood samples were homogenized by inversion and, by reverse pipetting, 50µl of total blood
173 was added. The tubes were then vortexed and incubated at room temperature in the dark for
174 15 minutes. Then, 450µl of FACS Lysing Solution™- BD was added and the tubes were
175 vortexed and incubated again at room temperature, in the dark, for 15 minutes. The
176 FACSCalibur™- BD cytometer was read using MultiSet™ software.
177

178 **Doses of chemokines**

Chemokines were quantified by flow cytometry using the CBA Human Chemokine Kit™ (IL-8, RANTES, MIG, MCP-1, IP-10), according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using FCAP Array™ software.

Doses of cytokines and TIMPs expression through LEGENDplex™ Immunoassay

Cytokines were quantified using the kits LEGENDplex™ Hu Essential Immune Response Panel (13-plex), which covers the following cytokines: IL-4, IL-2, IL-1β, TNF-α, IL-17A, IL-6, IL-10, IFN-γ, IL-12P70, MCP-1, TGF-β, and Human TIMP Panel (3-plex) for TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3. The reagents, standard curve, and washing buffer solution were prepared following the instructions. The samples were analyzed in BD FACSCalibur flow cytometer 4-color. Data were analyzed using LEGENDplex v8.0 software.

Elastography test (ElastPQ®)

The patients were tested with ElastPQ® - Philips, liver elastography equipment, which uses the pSWE technique. (performed in two moments: M1 and M3). Patients with a ≥ 25% reduction in the elastography value in the M3 and M1 comparison were considered regressors (R) and non-regressors (NR) with <25% (adapted from Singh et al. 2018) .

For the test, patients were placed in a supine position, with the right arm raised under the head to increase the intercostal acoustic window. Ten to fifteen measurements were made to obtain the mean value of kPa. The tests were performed by a qualified gastroenterologist.

Statistical Analyses

Statistical analyses and techniques to inference of predictive models were conducted to identify biomarkers that could be (independently or in combination) associated with the regression of hepatic stiffness of the study patients. Due to the reduced sample number, specific analyses [including machine learning (ML) approaches] with low dependence of the sample size were performed.

Initially, the variables were submitted to Shapiro-Wilk normality tests. Subsequently, we performed univariate analyses. The area under the ROC curve (AUC) for all variables in our dataset was determined. Therefore, each biomarker was evaluated independently as a possible predictor for the binary information of presence (or not) of hepatic stiffness regression (R or NR), which was pre-determined by elastography. These calculations were performed using the pROC library of the R software . We also performed the Spearman correlation. For these tests, the variations of elastic stiffness of the liver (named as ΔkPa) were calculated considering two moments: pretreatment (M1) and two years post-SVR (M3). We evaluated the correlation of the variable ΔkPa against all the other variables quantified in this study in the three different moments (M1, M2, and M3). Potential biomarkers were those with statistically significant correlation with ΔkPa (p-value ≤ 0.05).

Multivariate and ML analyses were performed to identify possible combinations of biomarkers that could be associated with elastic stiffness regression. Due to the large number of variables in this study, it was necessary a pre-selection of the most relevant attributes for predicting fibrosis regression. For this, the attribute evaluator called InfoGainAttributeEval from Weka software was used . The ten most significant attributes for each moment of the study (M1, M2, and M3) were selected for subsequent tests. Two multivariate analyses were then performed. The first analysis was the inference of decision trees using the J48 algorithm of the Weka software . We considered as models with significant predictive power those with AUC ≥ 0.75.

The second evaluation was linear discriminant analysis (LDA), which combined pairs of biomarkers to discriminate the classes R or NR, assessed by elastography. Those with AUC ≥ 0.75 were considered as significant LDA functions. The package *lda* of the R software was used for the LDAs . This analysis provides a mathematical function which combines two biomarkers to predict response to treatment. The qualitative date were analized performed Fisher's exact test.

RESULTS

Sixteen cirrhotic patients, genotype 1 were included in the present study. The demographic and clinic profile of the groups is summarized in the table below (Table 1).

S`akd 0- Bg`q`bsdqy`shnmnesgd r`l okdr -

	Total	Regressors	Non-Regressors	*p*-value
Patients Evaluated	16	11 (69%)	5 (31%)	-
Male (%)	7 (44%)	5 (45%)	2 (40%)	1.0
Female (%)	9 (56%)	6 (55%)	5 (45%)	1.0
Portal Hypertension (%)	10 (63%)	7 (64%)	3 (60%)	1.0
Esophageal Varices (%)	10 (63%)	7 (64%)	3 (60%)	1.0
Ascites (%)	2 (12,5%)	1 (9%)	1 (20%)	1.0
Child-Pugh A (%)	94% (15)	100% (11)	80% (4)	0.3125
Child-Pugh B (%)	6% (1)	0% (0)	20% (1)	0.3125
MELD (average)	9,5	8,91	10,8	0.0728
Platelets (average)	108500	123000	76600	0.0987
Leukocytes (average)	4557	5074	3420	0.1352
APRI (average)	2,07	2,00	2,21	0.7340
FIB-4 (average)	5,41	4,95	6,41	0.3973
Pretreatment Elastography (kPa)	26,46	20,19	29,30	0.0544
Age (average)	60	57	64	0.1090

In the present study, the results showed that 69% of patients presented regression of liver stiffness, while 31% did not, as shown in Fig 1.

The results showed similar percentages of gender, age, portal hypertension, esophageal varices and ascites among the groups evaluated. Child-Pugh A classification was predominant among patients, with only one NR classified as Child-Pugh B. Although there was a difference in MELD values, peripheral blood platelet count, and pretreatment elastography, this difference not be statistically significant.

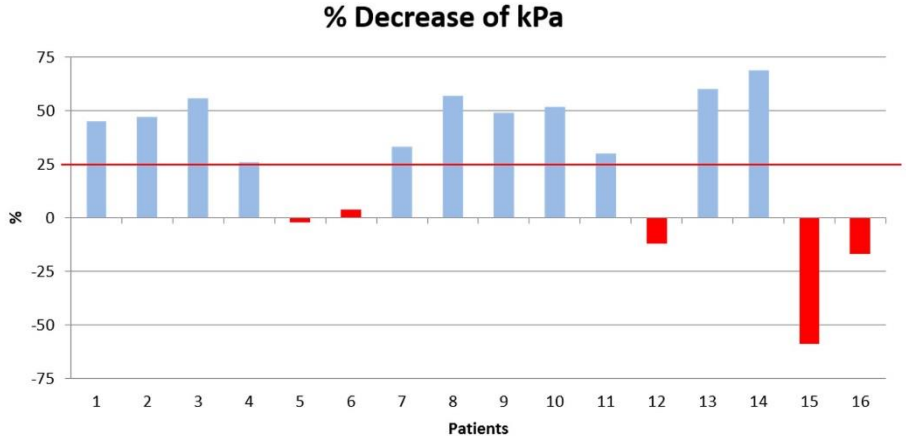
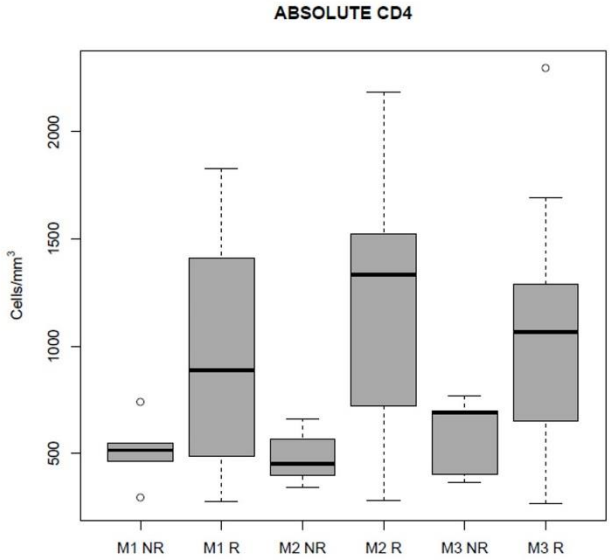


Fig 1. Percentage of reduction in hepatic stiffness with respect to M1.

Legend: Patients who presented decrease ≥25% in elastography value (in blue) in M3 when compared with M1 and patients who presented less than 25% or who did not present a decrease in kPa values (in red).

The cells subpopulations, cytokines/chemokines, and TIMPs were analyzed. However, among all the variables evaluated by ROC analysis (AUC≥0.75), at different times, only absolute CD4 (AUC=0.79) and absolute CD3 (AUC=0.76) presented significative predictive power. The other variables (cytokines and TIMPs) showed no statistically significant

258 difference. Fig 2 shows the boxplots of absolute CD4 for groups R and NR in M1, M2, and
259 M3.
260



261

262 **Fig 2. Absolute CD4 values in the different groups and moments.**
263 Legend: Regressors for liver stiffness have higher values of absolute CD4 T lymphocytes from
264 baseline, while non-regressors have low levels of this cell in all evaluated moments.
265

266 The decision trees obtained from the ML analyses again revealed the significance of
267 CD4 T lymphocytes in predicting the absence regression of hepatic stiffness, associating this
268 subpopulation with the decrease of kPa. The selected tree, i.e. the best ML model, showed
269 AUC=1 using absolute CD4 and absolute CD8 (Fig 3) to discriminate the classes R and NR.
270 In this figure, it is observed that the main branch of the tree is the absolute CD4 biomarker,
271 which reveals that CD4 is the most important predictor of the model.

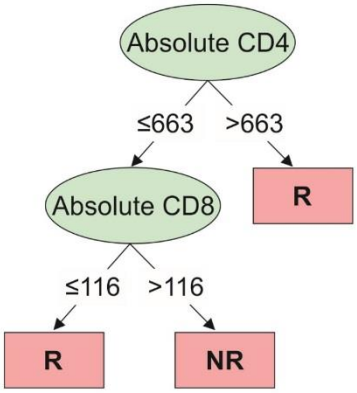


Fig 3. Decision tree (AUC=1).

Legend: Absolute CD4 T lymphocytes suggested as the variable that best differentiates regressors from non-regressors of liver stiffness, while absolute CD8 increases the predictive power of absolute CD4.

LDA showed that the combination of absolute CD4 and total NK resulted in the best variables association to predict reduction stiffness, with AUC=0.87 when evaluated in M1 and AUC=0.92 when evaluated in M2. This linear discriminant analysis resulted in a mathematical function (model) (Fig 4) combining the absolute TCD4 lymphocyte values and the total NK, which can be applied in both M1 and M2, resulting on an average AUC=0.90 (Fig 5).

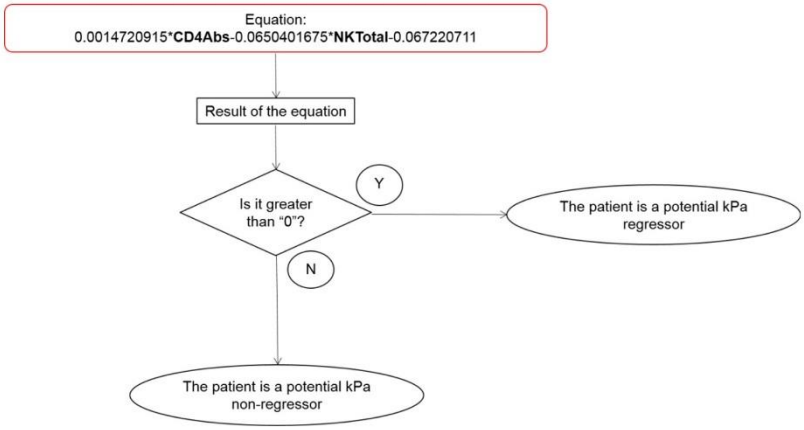


Fig 4. Discriminant function (model) containing the combination of absolute TCD4 lymphocyte values and total NK.

Legend: If the result of the equation is >0, the patient is a potential kPa regressor, however, if the result obtained is <0, the patient is a potential non-regressor.

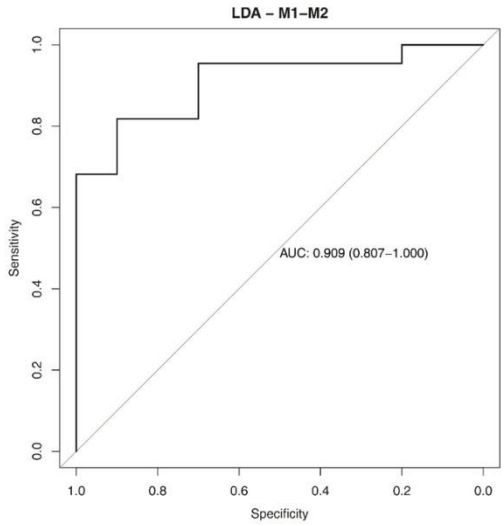


Fig 5. ROC curve of the discriminant function combining the absolute CD4 and total NK, for M1 and/or M2.

Legend: Legend: ROC curve demonstrating high sensitivity and specificity of the combination of CD4 T lymphocytes and total NK cells in predicting patients who will be regressors and non-regressors of liver stiffness after SVR.

When analyzing NK cells, unlike $TCD4^{+}$ lymphocytes, it was observed that they are elevated in M1 and M2 of NR, whereas in regressors, the levels are lower. NR patients appear to peak of NK total in M2, while R patients maintain values remarkably similar in all moment (Fig 6).

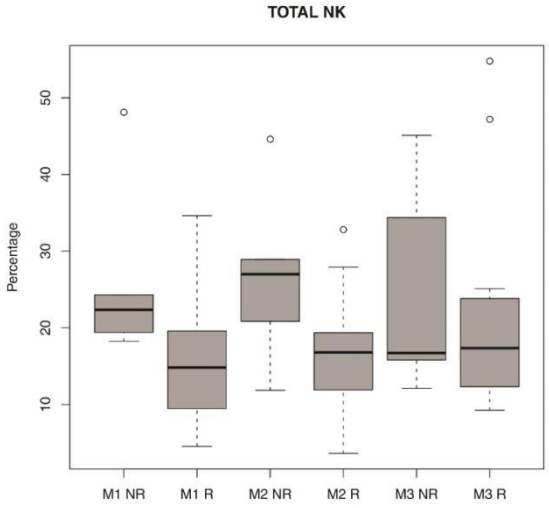


Fig 6. Total NK cell values in the different groups and moments.

Legend: Increased NK cell levels in M1 and M2 of patients with non-regression of liver stiffness.

DISCUSSION

In the present study that consisted of patients with HCV cirrhosis, 69% of patients presented regression of liver stiffness. Similarly, Dolmazashvili et al. (2017) observed that 65% of patients evaluated had reduced elastography's values. Another study PAN et al. (2018) found that 62% of HCV patients with advanced fibrosis or cirrhosis had decreased liver stiffness two years post-SVR, treated with DAAs.

On the other hand, 31% of our patients did not present regression of liver stiffness; a fact that deserves attention, since we know that cirrhotics with SVR are not free to develop hepatocellular carcinoma, and means that these patients who do not regress stiffness, may be more prone to develop complications of cirrhosis. More recently, a study using a non-invasive method of assessing fibrosis, demonstrated that there was a high incidence of HCC in patients who did not return FIB-4 values after SVR .

317 Available data demonstrated that patients with SVR had a cumulative incidence of
318 HCC of 1.6%, 2.6%, and 3.0% in 3, 5, and 7 years, respectively, and patients without SVR
319 had higher percentages (5.1%, 9.1%, and 12.9%) in the same studied periods . In addition,
320 there is a hypothesis that cirrhotic patients without fibrosis regression have a higher incidence
321 of complications from cirrhosis, including HCC , however, this study evaluated patients
322 treated with interferon and through by liver biopsy.

323 Despite recent advances in imaging methods to assess liver stiffness, it may not be
324 causally related to fibrosis. It is known that around 60% to 70% of patients present regression
325 of hepatic stiffness after treatment; however, this regression may be related to suppression of
326 hepatic necroinflammation after viral elimination, with reduction of edema, rather than
327 regression of fibrosis itself . In this context, and due to the complexity of the fibrotic process,
328 the inflammatory nature of chronic hepatitis C should be taken into account, since it can be
329 influenced by the resolution of the inflammatory process and reduction of tissue edema , thus
330 influencing the results obtained by shear wave elastography .

331 When analyzing the levels of cytokines, chemokines and TIMPs in peripheral blood,
332 we observed that none of these variables showed a statistically significant difference. This
333 may be related to the fact that these molecules are distributed in the total blood volume of the
334 patient, and may not reproduce the condition of the liver microenvironment.

335 Among the variables analyzed in our study, the quantification of absolute $TCD4^{+}$
336 lymphocytes had the best predictive performance in all statistical and ML analyses. T helper
337 lymphocytes play the role of orchestrators of the adaptive immune response, activating
338 cytotoxic T lymphocytes and HCV-specific B lymphocytes. This subpopulation can induce
339 immune responses of the type Th1 (IFN-γ, TNF-α, and IL-2), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17), and T
340 regulator (IL-10 and TGF-β). The Th17 immune response profile provides a proinflammatory
341 environment, while Tregs (regulatory T cells) lead to an immunosuppressive condition.

However, this process is dynamic and can be modulated by the microenvironment, including cytokine secretion .

At the beginning of the disease, when there is still no fibrosis, cells of the immune system are recruited to the site of infection, and secretion of proinflammatory cytokines occurs . As the disease progresses, Tregs begin to proliferate and become abundant, leading to suppression of the immune response and the number of peripheral T lymphocytes as the disease progresses . Our results has showed that NR patients have lower levels of absolute $TCD4^+$ lymphocytes than R patients in all the evaluated moments. Patients regressors, on the other hand, present higher $CD4^+$ cell counts in M2 (end of treatment) than in M1 (still with viral presence). The lower absolute CD4 values in the pretreatment moment suggest that these cells may be influenced by the immune response profile (Th1, Th2, Th17, Tregs) under induced by viral presence, although statistical differences were not observed among the evaluated plasma cytokines. In addition, the lack of significance in the difference from baseline leukometry of patients reinforces this hypothesis.

After SVR, however, we observed that regressors show a significant increase in the number of $TCD4^+$ lymphocytes in peripheral blood. Therefore, through viral clearance after treatment, a remodeling of the immune response may occur in the liver microenvironment, with a change in the cellular response profile, leading to the proliferation of subpopulations of T helper lymphocytes. Similarly, Langhans et al., 2017 , highlighted the importance of identifying whether the number of circulating Tregs cells are normalized after successful treatment with DAAs since they directly interfere with the cellular response profile.

Evidences have shown that regulatory T cells (Treg=$CD4^+$ subpopulation) are increased in peripheral blood and liver tissue of chronic individuals and that they inhibit the proliferation of activated effector T cells and induce their apoptosis, thus impairing the cellular immune response. Regulatory T cells may play a pivotal role in the persistence of

infection and may contribute to fibrosis through the production of intrahepatic cytokines, including TGF-β .

This remodeling, however, may not be occurring in NR, as its levels of $TCD4^{+}$ lymphocytes remained unchanged in all the evaluated moments. These findings, associated with the hypothesis of the role of Tregs in the induction of immune response in chronic patients, contribute to the data of Langhans et al., 2017 . According to these authors, the percentage of Treg lymphocytes does not return to a similar level to the level of healthy individuals after SVR, in part of the patients, suggesting that the persistence of Tregs in the long term may provide a deficient immune response, leading to susceptibility to reinfections and increased risk of developing HCC.

During chronic HCV infection, NK cells play an important role because of their ability to lyse infected cells and secrete proinflammatory cytokines. Moreover, the high production of IL-10 and TGF-β by NK cells can activate hepatic stellate cells, favoring the fibrogenesis , which could explain the higher percentages of this subpopulation in NR patients found in our study.

NK cells constitute an important cellular subpopulation of intrahepatic lymphocytes. Furthermore, they mediate innate immune responses against various pathogens and form the interface between the innate and adaptive immune response. They also play an important role in the front line of defense against viral infections, due to their ability to recognize and kill cells infected by viruses even at the beginning of infection. NK cells secrete cytotoxic granules used for lysis of infected cells and are important producers of proinflammatory cytokines such as interferon (IFN-γ) and tumor necrosis factor (TNF-α). These cytokines are able to act on the components of the adaptive immune system, including T cells .

HCV appears to alter the innate immune response at various levels, from allowing HCV-infected cells to avoid lysis by NK cells in the initial stage of infection, to leading to the

activation of Treg cells that will produce cytokines capable of modulating the local immune response . In contrast, these cytokines produced at the site of the lesion can act on NK cells, as they are influenced by the microenvironment and the time of exposure to this, generating an activation cycle .

The results reveal a difference in the immune system cell profile of regressors and non-regressors of liver stiffness in chronic hepatitis C: NR patients had levels less than R since baseline quantification (M1), whereas NK cells were increased in NR patients at M1 and M2. This allowed the creation of a predictive algorithm for regression of liver elastography values after SVR. The algorithm can be potentially applied in M1, that is, before starting antiviral treatment, and in M2, during the characterization of sustained virological response. Recently published studies have used the combination of different variables to increase the predictive power of tests, and analyzes involving inflammatory processes have shown promise in predicting prognosis / outcomes in different pathologies .

CONCLUSION

The results demonstrated a difference in the profile of circulating immune cells in patients with liver stiffness regression and non-regression, and an association of TCD4+ and NK cells with kPa values, thus allowing the generation of a predictive model of regression of liver elastography and should be validate a larger number of patients prospectively.

References

2. Anjo J, Café A, Carvalho A, Doroana M, Fraga J, Gíria J, et al. O impacto da hepatite C em Portugal. GE J Port Gastrenterologia. 2014;21: 44–54. doi:10.1016/j.jpg.2014.03.001

3. Knop V, Hoppe D, Welzel T, Vermehren J, Herrmann E, Vermehren A, et al. Regression of fibrosis and portal hypertension in HCV-associated cirrhosis and sustained virologic response after interferon-free antiviral therapy. J Viral Hepat. 2016;23: 994–1002. doi:10.1111/jvh.12578
4. Baskic D, Vukovic V, Popovic S, Jovanovic D, Mitrovic S, Djurdjevic P, et al. Correction: Chronic hepatitis C: Conspectus of immunological events in the course of fibrosis evolution (PLoS ONE (2019)14:7 (e0219508)doi:10.1371/journal.pone.0219508). PLoS One. 2019;14: 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0221142
5. Irshad M, Gupta P, Irshad K. Immunopathogenesis of Liver Injury during Hepatitis C Virus Infection. Viral Immunol. 2019;32: 112–120. doi:10.1089/vim.2018.0124
6. Grotto RMT, Santos FM, Picelli N, Silva GF, Ferrasi AC, Sarnighausen VCR, et al. HPA-1a/1b could be considered a molecular predictor of poor prognosis in chronic hepatitis C. Rev Soc Bras Med Trop. 2019;52: 0–2. doi:10.1590/0037-8682-0427-2017
7. Saha B, Szabo G. Innate immune cell networking in hepatitis C virus infection. J Leukoc Biol. 2014;96: 757–766. doi:10.1189/jlb.4mr0314-141r
8. Patra T, Ray R, Ray R. Strategies to Circumvent Host Innate Immune Response by Hepatitis C Virus. Cells. 2019;8: 274. doi:10.3390/cells8030274
9. Schuppan D, Kim YO. Review series: Evolving therapies for liver fibrosis. J Clin Invest. 2013;123: 1887–1901. doi:10.1172/JCI66028.Fibrosis
10. Alhetheel A, Albarrag A, Shakoor Z, Alswat K, Abdo A, Al-Hamoudi W. Assessment of proinflammatory cytokines in sera of patients with hepatitis C virus infection before and after anti-viral therapy. J Infect Dev Ctries. 2016;10: 1093–1098. doi:10.3855/jidc.7595
11. Campana L, Iredale J. Regression of Liver Fibrosis. Semin Liver Dis. 2017;37: 001–010. doi:10.1055/s-0036-1597816
12. Aydin MM, Akcali KC. Liver fibrosis. Turkish J Gastroenterol. 2018;29: 14–21. doi:10.5152/tjg.2018.17330
13. Castera L. Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2011;25: 291–303. doi:10.1016/j.bpg.2011.02.003
14. Patel K, Remlinger KS, Walker TG, Leitner P, Lucas JE, Gardner SD, et al. Multiplex Protein Analysis to Determine Fibrosis Stage and Progression in Patients With Chronic

Hepatitis C. Clin Gastroenterol Hepatol. 2014;12: 2113-2120.e3. doi:10.1016/j.cgh.2014.04.037

15. Fernandes FF, Piedade J, Guimaraes L, Nunes EP, Chaves U, Goldenzon R V., et al. Effectiveness of direct-acting agents for hepatitis C and liver stiffness changing after sustained virological response. J Gastroenterol Hepatol. 2019;34: 2187–2195. doi:10.1111/jgh.14707

16. Dolmazashvili E, Abutidze A, Chkhartishvili N, Karchava M, Sharvadze L, Tsertsvadze T. Regression of liver fibrosis over a 24-week period after completing direct-acting antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C receiving care within the national hepatitis C elimination program in Georgia: Results of hepatology clinic HEPA exper. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2017;29: 1223–1230. doi:10.1097/MEG.0000000000000964

17. Srinivasa Babu A, Wells ML, Teytelboym OM, Mackey JE, Miller FH, Yeh BM, et al. Elastography in Chronic Liver Disease: Modalities, Techniques, Limitations, and Future Directions. RadioGraphics. 2016;36: 1987–2006. doi:10.1148/rg.2016160042

18. Ferraioli G, Tinelli C, Lissandrin R, Zicchetti M, Bello BD, Filice G, et al. Point shear wave elastography method for assessing liver stiffness. World J Gastroenterol. 2014;20: 4787–4796. doi:10.3748/wjg.v20.i16.4787

19. Iredale JP, Bataller R. Identifying molecular factors that contribute to resolution of liver fibrosis. Gastroenterology. 2014;146: 1160–1164. doi:10.1053/j.gastro.2014.03.019

20. Terai S, Tsuchiya A. Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis: overcoming the “point of no return” in advanced liver cirrhosis. J Gastroenterol. 2017;52: 129–140. doi:10.1007/s00535-016-1258-1

21. Curry MP, O’Leary JG, Bzowej N, Muir AJ, Korenblat KM, Fenkel JM, et al. Sofosbuvir and velpatasvir for HCV in patients with decompensated cirrhosis. N Engl J Med. 2015;373: 2618–2628. doi:10.1056/NEJMoa1512614

22. Silva GF, de ANDRADE VG, Moreira A. Waiting DAAs list mortality impact in HCV cirrhotic patients. Arq Gastroenterol. 2018;55: 343–345. doi:10.1590/s0004-2803.201800000-76

23. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. Hepatology. 1996;24: 289–293. doi:10.1053/jhep.1996.v24.pm0008690394

24. Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of

484 Hepatitis C 2018. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. J
485 Hepatol. 2018;69: 461–511. doi:10.1016/j. jhep.2018.03.026
486 25. Singh S, Facciorusso A, Loomba R, Falck-Ytter YT. Magnitude and Kinetics of
487 Decrease in Liver Stiffness After Antiviral Therapy in Patients With Chronic Hepatitis
488 C: A Systematic Review and Meta-analysis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2018;16: 27-
489 38.e4. doi:10.1016/j.cgh.2017.04.038
490 26. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J, et al. pROC : an open-
491 source package for R and S + to analyze and compare ROC curves. BMC
492 Bioinformatics. 2011;12: 77. doi:10.1186/1471-2105-12-77
493 27. Witten IH, Frank E, Hall MA, Pal CJ. Data Mining: Practical Machine Learning Tools
494 and Techniques. Fourth. Kaufmann M, editor. Elsevier; 2017. doi:10.1016/C2015-0-
495 02071-8
496 28. Chang J. Collapsed Gibbs Sampling Methods for Topic Models. In: RDocumentation.
497 Ida Package [Internet]. 2015 [cited 2 Oct 2020]. Available:
498 https://www.rdocumentation.org/packages/lda/versions/1.4.2
499 29. Pan JJ, Bao F, Du E, Skillin C, Frenette CT, Waalen J, et al. Morphometry Confirms
500 Fibrosis Regression From Sustained Virologic Response to Direct-Acting Antivirals
501 for Hepatitis C. Hepatol Commun. 2018;2: 1320–1330. doi:10.1002/hep4.1228
502 30. Toyoda H, Tada T, Yasuda S, Mizuno K, Ito T, Kumada T. Dynamic Evaluation of
503 Liver Fibrosis to Assess the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic
504 Hepatitis C Who Achieved Sustained Virologic Response. Clin Infect Dis. 2020;70:
505 1208–1214. doi:10.1093/cid/ciz359
506 31. Yamada R, Hiramatsu N, Oze T, Urabe A, Tahata Y, Morishita N, et al. Incidence and
507 risk factors of hepatocellular carcinoma change over time in patients with hepatitis C
508 virus infection who achieved sustained virologic response. Hepatol Res. 2019;49: 570–
509 578. doi:10.1111/hepr.13310
510 32. Mallet V, Gilgenkrantz H, Serpaggi J, Verkarre V, Vallet-Pichard A, Fontaine H, et al.
511 Brief Communication: The Relationship of Regression of Cirrhosis to Outcome in
512 Chronic Hepatitis C. Ann Intern Med. 2008;149: 399. doi:10.7326/0003-4819-149-6-
513 200809160-00006
514 33. Suda T, Okawa O, Masaoka R, Gyotoku Y, Tokutomi N, Katayama Y, et al. Shear
515 wave elastography in hepatitis C patients before and after antiviral therapy. World J
516 Hepatol. 2017;9: 64–68. doi:10.4254/wjh.v9.i1.64

34. Hamada K, Saitoh S, Nishino N, Fukushima D, Horikawa Y, Nishida S, et al. Shear wave elastography predicts hepatocellular carcinoma risk in hepatitis C patients after sustained virological response. PLoS One. 2018;13: 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0195173

35. Rios DA, Valva P, Casciato PC, Frias S, Soledad Caldirola M, Gaillard MI, et al. Chronic hepatitis C liver microenvironment: Role of the Th17/Treg interplay related to fibrogenesis. Sci Rep. 2017;7. doi:10.1038/s41598-017-13777-3

36. Medel MLH, Reyes GG, Porras LM, Bernal AR, Luna JS, Garcia AP, et al. Prolactin Induces IL-2 Associated TRAIL Expression on Natural Killer Cells from Chronic Hepatitis C Patients In vivo and In vitro. Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets. 2019;19: 975–984. doi:10.2174/1871530319666181206125545

37. Winckler FC, Braz AMM, da Silva VN, Golim M de A, de Andrade VG, Machado PE de A, et al. Influence of the inflammatory response on treatment of hepatitis C with triple therapy. Rev Soc Bras Med Trop. 2018;51: 731–736. doi:10.1590/0037-8682-0137-2018

38. Langhans B, Nischalke HD, Krämer B, Hausen A, Dold L, van Heteren P, et al. Increased peripheral CD4+ regulatory T cells persist after successful direct-acting antiviral treatment of chronic hepatitis C. J Hepatol. 2017;66: 888–896. doi:10.1016/j.jhep.2016.12.019

39. Abdelwahab SF. Cellular immune response to hepatitis-C-virus in subjects without viremia or seroconversion: Is it important? Infect Agent Cancer. 2016;11: 1–12. doi:10.1186/s13027-016-0070-0

40. de Groen RA, Boltjes A, Hou J, Liu BS, Mcphee F, Friborg J, et al. IFN-λ-mediated IL-12 production in macrophages induces IFN-γ production in human NK cells. Eur J Immunol. 2015;45: 250–259. doi:10.1002/eji.201444903

41. Yang CM, Yoon JC, Park JH, Lee JM. Hepatitis C virus impairs natural killer cell activity via viral serine protease NS3. Ray R, editor. PLoS One. 2017;12: e0175793. doi:10.1371/journal.pone.0175793

42. Fugier E, Marche H, Thélu MA, Jílková ZM, Van Campenhout N, Dufeu-Duchesne T, et al. Functions of liver natural killer cells are dependent on the severity of liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. Bartosch B, editor. PLoS One. 2014;9: e95614. doi:10.1371/journal.pone.0095614

43. Zhu Z, Cai T, Fan L, Lou K, Hua X, Huang Z, et al. Clinical value of immune-

550 inflammatory parameters to assess the severity of coronavirus disease 2019. Int J Infect
551 Dis. 2020;95: 332–339. doi:10.1016/j.ijid.2020.04.041
552 44. da Silva Neto P V, S de Carvalho JC, Pimentel VE, Pérez MM, Carmona-Garcia I,
553 Neto NT, et al. Prognostic value of sTREM-1 in COVID-19 patients: a biomarker 1 for
554 disease severity and mortality Corresponding: 40. medRxiv. 2020; 1–28.
555 doi:10.1101/2020.09.22.20199703

Apêndices

Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e esclarecido – Pacientes VHC+ – Estudo retro-prospectivo.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

RESOLUÇÃO 466/2012

(Pacientes VHC+: Estudo Retro-prospectivo)

CONVIDO, o senhor (a) _____ _____ portador do RG nº: _____, residente na _____ _____ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Caracterização Imunocelular em Coorte de Pacientes Cirróticos com Resposta Virológica Sustentada Obtida com Drogas de Ação Direta para Hepatite C Crônica”, que será desenvolvido por mim Aline Márcia Marques Braz, biomédica, com orientação do profissional médico e Professor (a) Dr. Giovanni Faria Silva da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e co-orientação da Prof.ª Drª Márjorie de Assis Golim.

Estou estudando a Hepatite C Crônica. Como o senhor (a) já participa de outro estudo do nosso grupo gostaria de saber se posso utilizar o que sobrar das amostras já coletadas no início e após término do seu tratamento para o trabalho intitulado “Influência do perfil imunológico na resposta virológica sustentada de pacientes com Hepatite C Crônica durante a terapia com antivirais de ação direta”, para realizar outras análises neste novo trabalho. Além disso, para que eu possa obter resultados, preciso que o senhor (a) me autorize a coletar 10ml do seu sangue em um único momento: de 12 a 24 meses após a Resposta Virológica Sustentada (“cura”). Pretendo avaliar células e substâncias do sangue que estão presentes nos diferentes momentos: durante a infecção (M1), 12 semanas após o final do tratamento (M2) e de um a dois anos depois da retirada do vírus (M3). Como para o outro projeto nosso grupo já coletou sua amostra nos dois primeiros momentos, precisaremos coletar apenas mais uma vez. O sangue coletado será utilizado logo após a coleta para a realização de testes em células do sangue, e do restante será separado o plasma, o qual será congelado em freezer a -80ºC e armazenado em biorrepositório localizado no laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu, para posterior análise.

O risco com a coleta de sangue será a picada da agulha e uma possível mancha roxa que desaparecerá bem rapidamente.

Solicito também seu consentimento para consultas a seu prontuário médico com a finalidade de coletar outras informações lá contidas como (grau de fibrose, genótipo viral,

resultados de exames laboratoriais, evolução clínica, resultado de elastografia hepática, etc) referentes a consultas feitas anteriormente pelo (a) Senhor (a).

Seu benefício em participar será contribuir para melhor entendimento da hepatite C, colaborando com o acompanhamento de futuros pacientes, após os pesquisadores terem o conhecimento dos resultados da pesquisa.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retira-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contrato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu,_____/___/_____

_____ _____

Pesquisador Participante da Pesquisa

Nome: Aline Márcia Marques Braz
Endereço: Distrito de Rubião Júnior S/Nº - Botucatu – SP
Telefone: 3811-6041 ramal 231

Nome: Prof. Dr. Giovanni Faria Silva
Endereço: Distrito de Rubião Júnior S/Nº - Botucatu – SP
Telefone:3811-6041

Nome: Prof.ª Dr.ª Márjorie de Assis Golim
Endereço: Distrito de Rubião Júnior S/Nº - Botucatu – SP
Telefone:3811-6041

Anexos

Anexo A: Parecer consubistanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNESP -FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização Imunocelular em Coorte de Pacientes Cirróticos com Resposta Virológica Sustentada Obtida com Drogas de Ação Direta para Hepatite C Crônica

Pesquisador: Aline Márcia Marques Braz
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 94128318.1.0000.5411
Instituição Proponente: Departamento de Clínica Médica
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.810.759

Apresentação do Projeto:
Com os recentes avanços na terapia da Hepatite C, a resposta virológica sustentada (padrão de "cura") é obtida na maioria dos pacientes. Porém, naqueles que já estão cirróticos, pode ocorrer ou não regressão da lesão hepática. Os autores se propõem a acompanhar coorte de 60 indivíduos cirróticos tratados para Hepatite C, diferenciando aqueles que apresentam ou não a regressão da lesão. Serão avaliadas subpopulações de monócitos e linfóticos T circulantes, produção de quimiocinas e citocinas, e proteínas plasmáticas (proteômica). O objetivo é identificar marcadores que identifiquem aqueles sujeitos que apresentarão melhora da fibrose hepática.

Objetivo da Pesquisa:
Identificar perfis de proteínas e fatores imunológicos envolvidos na regressão de fibrose hepática na hepatite C crônica e possíveis biomarcadores séricos de valor prognóstico e terapêutico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Os riscos são pequenos, pois a avaliação só incluirá aumento do volume de coleta de sangue. Os benefícios podem ser diretos (pela identificação de marcadores de prognóstico e resposta terapêutica) e indiretos (possibilitando aprimoramento do tratamento da hepatite C).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Trata-se de um estudo coerente, relevante e factível nas condições propostas.

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

UNESP -FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Continuação do Parecer: 2.810.759

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentam-se autorizações do hemocentro, ambulatório de gastroenterologia, superintendência do HCFMB, termo de anuência institucional, norma de biorrepositório e 2 TCLEs: um dirigido a sujeitos incluídos prospectivamente e outro para aqueles incluídos retrospectivamente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa apresentado encontra-se APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 06 de agosto 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_1171024.pdf	16/07/2018 16:18:21		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Assinada.pdf	16/07/2018 16:11:57	Aline Márcia Marques Braz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_Ciencia_e_Anuencia_Ambulatorio_Gastroenterologia.pdf	16/07/2018 16:09:13	Aline Márcia Marques Braz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_Ciencia_e_Anuencia_Hemocentro.pdf	16/07/2018 16:08:51	Aline Márcia Marques Braz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Autorizacao_Hemocentro.pdf	16/07/2018 16:08:19	Aline Márcia Marques Braz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_HCFMB.pdf	16/07/2018 16:07:01	Aline Márcia Marques Braz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_Anuencia_Institucional.pdf	16/07/2018 16:06:17	Aline Márcia Marques Braz	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

UNESP -FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Continuação do Parecer: 2.810.759

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_de_Ciencia_e_Anuencia_Biorrepositorio.pdf	16/07/2018 15:05:26	Aline Márcia Marques Braz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES_VHC_Pospectivo.pdf	16/07/2018 15:00:31	Aline Márcia Marques Braz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES_VHC_Retro_prospectivo.pdf	16/07/2018 15:00:17	Aline Márcia Marques Braz	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Biorrepositorio.pdf	16/07/2018 14:59:18	Aline Márcia Marques Braz	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_Atividades.pdf	16/07/2018 14:55:53	Aline Márcia Marques Braz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Aline_Marcia_Marques_Braz.pdf	16/07/2018 14:55:35	Aline Márcia Marques Braz	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BOTUCATU, 09 de Agosto de 2018

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

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