

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2025.



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

Rodrigo Santos Lima

**Abordagem inovadora de método não invasivo para
avaliação de fibrose hepática na hepatite C crônica usando
biomarcadores sanguíneos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento -
Biotecnologia Médica.

Orientador(a): Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Plana Simões

**Botucatu
2019**

Rodrigo Santos Lima

Abordagem inovadora de método não invasivo para
avaliação de fibrose hepática na hepatite C crônica
usando biomarcadores sanguíneos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Pesquisa e Desenvolvimento -
Biotecnologia Médica.

Orientador (a): Profa).Dra. Márjorie de Assis Golim
Coorientador: Prof.Dr. Rafael Plana Simões

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lima, Rodrigo Santos.

Abordagem inovadora de método não invasivo para
avaliação de fibrose hepática na hepatite C crônica usando
biomarcadores sanguíneos. / Rodrigo Santos Lima. -
Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Márjorie de Assis Golim

Coorientador: Rafael Plana Simões

Capes: 90400003

1. Hepatite C. 2. Fígado - Biópsia. 3. Biomarcadores.
4. Cirrose hepática.

Palavras-chave: biomarcadores; biópsia hepática; fibrose
hepática; hepatite C.

Dedico este trabalho,

À minha família,

Meus pais, irmã e tio Adílson,

Motivo de inspiração, sabedoria e persistência.

A vocês, com muito amor e carinho.

Meus sinceros agradecimentos,

À Professora Dra. Márjorie de Assis Golim, minha orientadora, por todas as oportunidades proporcionadas desde a minha chegada à Botucatu, por toda sabedoria compartilhada, atenção dada durante a realização deste trabalho, como também pelos sábios conselhos, tanto profissionais como também pessoais. Meu muito obrigado por ser uma inspiração diária de cientista comprometida em realizar trabalhos de excelência.

Ao Professor Dr. Rafael Plana Simões, meu coorientador, por me fazer acreditar que eu seria capaz de aprender conhecimentos matemáticos que jamais imaginei, além de toda disponibilidade e atenção.

À Léia, pela sua dose de humor diário e sabedoria compartilhada durante grande parte deste trabalho.

Às minhas companheiras do laboratório de Citometria de Fluxo, Francielle Ramalho, Lia Mantovani, Aline Braz, Mariana Puatto e Luana Barbosa por toda ajuda, companheirismo, humor, conhecimento compartilhado e atenção comigo. Vocês não poderiam ser uma equipe melhor.

À Fernanda Winckler por toda ajuda e disponibilidade fornecida em partes muito importantes deste trabalho. Meu muito obrigado.

Ao Dr. Giovanni Faria Silva, pela disponibilidade e conselhos fundamentais e preciosos na área da hepatologia.

Ao Dr. Jaime Olbrich Neto, por todo seu apoio médico-científico, além de sua dose imperdível de humor.

À Hérica Sola, pela sincera amizade e apoio desde minha chegada,

Aos amigos do Laboratório de Imunohematologia do Doador, Marquinhos e Denise pela amizade diária no Hemocentro.

À minha namorada Jéssica Scudeller, pelo apoio, incentivo e compreensão durante a parte final deste trabalho,

Ao meu tio Adílson, por ser minha inspiração e por me incentivar a seguir os melhores caminhos para minha carreira.

À minha família, a razão de eu ser quem sou hoje, obrigado por toda compreensão e apoio, mesmo longe, dado durante toda esta trajetória, por todos os conselhos e pela inspiração para que eu sempre busque o melhor para o meu futuro. Jamais estaria aqui hoje se não tivesse o apoio de vocês. Minha eterna gratidão.

“Lembre-se de olhar para o alto, para as estrelas, e não para baixo, para os seus pés”.

Stephen Hawking

RESUMO

O vírus da hepatite C (VHC) é responsável por causar hepatite C nas formas aguda ou crônica, sendo a fibrose hepática uma possível consequência da evolução da lesão. Na avaliação da fibrose o método considerado padrão ouro é a biópsia hepática. Com a necessidade de se desenvolver metodologias alternativas à biópsia hepática, escores utilizando biomarcadores séricos têm sido validados, de modo que possam servir para o acompanhamento de indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C. Realizou-se estudo retrospectivo, incluindo 94 pacientes portadores crônicos do VHC, genótipo 1, pré-tratamento (*naive*) ou retratados. Os pacientes foram separados em grupos conforme os resultados da classificação METAVIR dos graus de fibrose (F0 à F4), seja por biópsia hepática ou por elastografia hepática por quantificação de ponto. Além disso, os pacientes foram classificados em grupos de fibrose leve G1 (F1-F2) e fibrose avançada G2 (F3-F4). Metodologias não-invasivas como FIB-4 e APRI foram comparadas ao método denominado FibMaster desenvolvido neste estudo através de análises multivariadas e aprendizado de máquina para elaborar um modelo preditivo de fibrose hepática baseado em variáveis sanguíneas possivelmente associadas ao dano hepático. Os parâmetros estatisticamente mais significantes foram alfa-fetoproteína (AFP), apresentando AUROC de 0.890 para a classificação de fibrose F3-F4 e 0.772 para classificação dos grupos G1-G2, ureia com AUROC de 0.723 para fibrose F2-F3, FIB-4 (AUROC de 0.836 para fibrose F3-F4 e 0.757 para os grupos G1-G2, e por último o APRI com AUROC de 0.909 para fibrose F3-F4 e 0.648 para os grupos G1-G2. O número absoluto de linfócitos T-CD8⁺ elevou significativamente a performance do FIB-4, apresentando uma AUROC de 0.921 para fibrose F3-F4, e para o APRI com linfócitos T-CD8⁺ uma AUROC de 0.913 para a mesma classificação. Este estudo proporcionou uma nova abordagem para a avaliação de fibrose hepática baseada em metodologias não invasivas compostas por biomarcadores sanguíneos. Demonstrou-se que a combinação de escores prévios com novos biomarcadores pode ser uma estratégia relevante para o desenvolvimento de novas metodologias não invasivas.

Palavras-chave: hepatite C, biópsia hepática, biomarcadores, fibrose hepática.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is responsible for causing both acute hepatitis C and chronic form, where the last is commonly associated with liver fibrosis. The evaluation of fibrosis is currently performed mainly through liver biopsy, which is the methodology considered as gold standard in the classification of fibrosis stages. With the necessity of developing new alternative methodologies to hepatic biopsy, scores using serum biomarkers have been validated, thus they can be used to monitor infected individuals with the hepatitis C virus. A retrospective study was carried out including 94 chronic HCV, genotype 1, pre-treatment (naive) or retreated patients. Patients were separated into groups according to the METAVIR classification of degrees of fibrosis (F0 to F4), either by hepatic biopsy or point shear wave-elastography exam. Moreover, patients were classified into groups of mild fibrosis G1 (F1-F2) and advanced fibrosis G2 (F3-F4). Non-invasive methodologies such as FIB-4 and APRI were compared to the method named FibMaster, which was proposed in this study through multivariate analyzes and machine learning, in order to elaborate a predictive model for hepatic fibrosis based on blood biomarkers possibly associated with hepatic injury. The most statistically significant parameters were alpha-fetoprotein (AFP), presenting AUROC of 0.890 for fibrosis classification F3-F4 and 0.772 for the classification of groups G1-G2, urea with an AUROC of 0.723 for fibrosis F2-F3, FIB-4 (AUROC of 0.836 for F3-F4 fibrosis and 0.757 for G1-G2 groups, and finally APRI with an AUROC of 0.909 for F3-F4 fibrosis and 0.648 for G1-G2 groups. The absolute number of T-CD8⁺ lymphocytes significantly increased the performance of FIB-4, presenting an AUROC of 0.921 for F3-F4 fibrosis, and an AUROC of 0.913 for the APRI with T-CD8⁺ lymphocytes in the same classification. This study provided a new approach for the evaluation of hepatic fibrosis based on non-invasive methodologies, which was composed by blood biomarkers. This work demonstrated that combining previous scores with new biomarkers could be a relevant strategy for the development of new non-invasive methodologies.

Keywords: hepatitis C, liver biopsy, biomarkers, liver fibrosis.

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract.....	7
Sumário	8
1. Introdução	9-19
1.1 Hepatite C e Epidemiologia	9
1.2 Avaliação de Fibrose Hepática	11
1.3 Metodologias Não Invasivas para Avaliação de Fibrose Hepática	13
Article	20-36
1. Introduction	21
2. Methods	23
2.1 Subjects	23
2.2 Inclusion Criteria	23
2.3 Exclusion Criteria	23
2.4 Multivariate Analyzes	24
3. Results	27
4. Discussion	33
Reference (Article)	37
Referências	40
Anexos	43

1. Introdução

1.1 Hepatite C e Epidemiologia

As hepatites virais caracterizam-se como grave problema de saúde pública no mundo. Segundo estimativas, bilhões de pessoas já tiveram contato com os vírus das hepatites e milhões são portadores crônicos. As hepatites são doenças infecciosas sistêmicas que afetam o fígado, sendo que além de apresentarem como alvo comum o tecido hepático, as hepatites também compartilham outra característica, a semelhança dos aspectos clínico-laboratoriais. Estas doenças são diferenciadas nos quesitos epidemiológicos e quanto ao prognóstico de cada tipo de hepatite especificamente, além do fato que avanços importantes foram conquistados nas últimas décadas em relação à caracterização dos agentes virais, na elaboração de novos testes laboratoriais, na triagem de pessoas infectadas e na produção de drogas mais eficazes para tratamento, quando indicado. (FERREIRA; SILVEIRA, 2004; SEBASTIANI; GKOUVATSOS; PANTOPOULOS, 2014; WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

Apesar dos avanços conquistados no tratamento da hepatite C, ainda não descobriu-se a cura para a cirrose, tornando o diagnóstico precoce e o tratamento de fibrose, etapas fundamentais para se aumentar não somente a qualidade de vida dos pacientes, como também reduzir a necessidade de transplante hepático (CROSSAN et al., 2015).

O vírus da hepatite C (VHC) é responsável por causar tanto a hepatite C aguda, como também a forma crônica, sendo a fibrose hepática uma possível consequência da evolução da lesão. O patógeno é disseminado por meio de transmissão sanguínea, seja por contato inadequado com agulhas contaminadas, esterilização, falha de instrumentos médicos ou até mesmo por transfusão de bolsas de sangue/hemocomponentes contaminados. Estimou-se em 2015 que a população de indivíduos com hepatite C crônica no mundo seja em torno de 71 milhões. Além disso, uma relevante parcela pode apresentar suas condições clínicas agravadas pelo desenvolvimento de cirrose e câncer hepático, sendo que em 2015 a taxa de óbitos mundial decorrente dos agravos da doença era de 399.000 indivíduos (ANJO et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Segundo a OMS (2018), o tratamento atual para a hepatite C é capaz de curar cerca de 90% das pessoas acometidas pela doença, no entanto, ainda não se têm vacinas disponíveis. Apesar do tratamento eficaz com as drogas de ação direta (DAA), a viabilidade do tratamento pode ser afetada pelo alto índice de pessoas infectadas, pois uma elevada parcela destas desconhece a presença da infecção e não são tratadas, além de casos de pacientes diagnosticados, que mesmo com planos de saúde privados, passam por restrições por parte dos mesmos, devido ao custo das medicações antivirais (HOFMEISTER et al., 2018). De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções (PCDT) (2019), indica-se o tratamento para todos pacientes infectados pelo VHC, independentemente do estadiamento de fibrose hepática.

A prevalência da infecção pelo VHC é indicada pela positividade de anticorpos contra o vírus e também pela positividade de RNA. No entanto, é afirmado que este dado é dependente de vários fatores como a quantidade de pessoas com infecção crônica (RNA positivo por mais de 6 meses após infecção aguda), a incidência, a quantidade de pessoas que obtiveram clearance viral espontâneo ou curadas pelo tratamento e pela taxa de mortalidade (HOFMEISTER et al., 2018; MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011).

Recente estudo americano destacou que apesar da elevada eficiência do tratamento, cerca de metade dos indivíduos infectados desconhecem que estão doentes. Reportou-se que durante 2013-2016 cerca de 4,1 milhões de adultos apresentaram sinais de infecção prévia ou atual pelo VHC na população norte-americana (HOFMEISTER et al., 2018).

Na Europa, estima-se que a prevalência do VHC seja de aproximadamente 2,4% na Europa Ocidental e 2,9% na Europa Oriental, o que corresponde aproximadamente 19 milhões de pessoas de um total de 740 milhões de indivíduos. A mortalidade na Espanha decorrente do VHC é cerca de 11,25 pessoas em cada 100 mil pessoas, sendo que 95% dos indivíduos foram constatados como cirróticos no momento do óbito (NEGRO, 2014).

Em 2013, foram reportados no Brasil cerca de 11.200 casos de novas infecções causadas pelo VHC, estimando-se que os agravos relacionados à doença, como cirrose e óbitos associados com alteração hepática, atinjam o pico de prevalência entre 2028 e 2032 (FERREIRA et al., 2015). Nas grandes cidades brasileiras a soroprevalência é estimada em 1,38%, de acordo com análises de anti-VHC

(VIVANCOS; MORENO; QUEREDA, 2017). A fim de se evitar tais consequências, são necessários planos de saúde pública que visem à elaboração de ações efetivas para minimizar estes índices (FERREIRA et al., 2015).

1.2 Avaliação de Fibrose Hepática

A hepatite C é comumente diagnosticada durante sua fase crônica, uma vez que a fase aguda (cerca de 6 meses) é na maioria dos casos considerada subclínica, podendo progredir por anos sem diagnóstico. A inflamação persistente pode levar à cronificação em cerca de 60-85% dos casos (PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA HEPATITE C E COINFECÇÕES, 2019; SPAAN; JANSSEN; BOONSTRA, 2012).

Indivíduos infectados pelo VHC podem apresentar complicações da doença como fibrose ou podem evoluir desta condição para cirrose e/ou carcinoma hepatocelular (CH). A avaliação da fibrose é realizada principalmente através de biópsia hepática, metodologia considerada como padrão ouro na classificação dos estágios de fibrose (CASTERA, 2011). Esta metodologia foi implantada por Paul Erlich, em 1883, na Alemanha, podendo o tamanho da amostra variar entre 1 e 3 cm de comprimento por 2 mm de diâmetro, representando aproximadamente uma proporção de 1/50.000 da totalidade do órgão hepático. Previamente à execução da biópsia hepática, recomenda-se a realização de exame de ultrassonografia para uma possível detecção de lesões hepáticas ocultas, para a definição da anatomia do órgão, como também para a identificação da posição relativa de outros órgãos como pulmões, vesícula biliar e rins (BRAVO; SHETH; CHOPRA, 2001).

O PCDT (2019) descreveu que não é necessário biópsia hepática ou metodologia alternativa para a indicação de tratamento em pacientes que apresentem achados ecográficos e/ou clínicos relacionados com cirrose hepática. Um dos escores mais utilizados para definir o estadiamento de fibrose hepática é o escore METAVIR (BEDOSSA; POYNARD, 1996).

Este escore baseia-se em uma escala de cinco pontos:

Tabela 1. Classificação de fibrose hepática segundo escore METAVIR.

Fibrose	Características
F0	Ausência de fibrose.
F1	Fibrose portal sem septos.
F2	Poucos septos.
F3	Numerosos septos sem cirrose.
F4	Cirrose.

Fonte: (BEDOSSA; POYNARD, 1996; SHARMA; KHALILI; NGUYEN, 2014)

A biópsia hepática é capaz de fornecer informações importantes para o diagnóstico diferencial de doenças hepáticas que podem ocorrer de modo concomitante com a hepatite viral crônica, como por exemplo a esteatose hepática, sobrecarga hepática de ferro e esteato-hepatite (CASTERA, 2011; Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções, 2019). No entanto, é relatado no PCDT (2019) a característica invasiva da biópsia hepática, com possibilidade de causar dor intensa e sangramento, requerendo, portanto, equipe altamente qualificada para sua execução.

Apesar de ser o principal método de avaliação do dano hepático na hepatite C, o procedimento de biópsia hepática pode apresentar elevada variabilidade de resultados. Como consequência, este viés apresenta uma influência negativa significativa no estadiamento de fibrose hepática. Segundo a “Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado” (AASLD), biópsias de tamanhos insuficientes podem levar a um errôneo estadiamento de fibrose em pacientes com hepatites virais, podendo os resultados serem subestimados (TUBLIN et al., 2018). A falta de reprodutibilidade e acurácia implica na necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos. O tamanho da amostra retirada na biópsia é inversamente proporcional à porcentagem de erro da análise patológica, sugerindo-se que amostras maiores poderiam produzir resultados mais fidedignos da lesão hepática (RATZIU et al., 2005). Essas limitações já foram reportadas em um estudo francês, onde constatou-se que dentre os pacientes com hepatite C crônica, 35% dos exames de biópsia hepática com 15 mm foram classificados erroneamente. O mesmo estudo então sugeriu que amostras hepáticas devem conter no mínimo 25 mm de comprimento com o objetivo

de garantir uma avaliação semi-quantitativa mais precisa (BEDOSSA; DARGERÉ; PARADIS, 2003). No entanto, tal procedimento nem sempre é factível com apenas uma punção durante o procedimento da biópsia, contribuindo para um maior índice de complicações e desconforto para o paciente (CROSSAN et al., 2015).

1.3 Metodologias Não Invasivas para Avaliação de Fibrose Hepática

Com a necessidade de se desenvolver metodologias alternativas à biópsia hepática, escores utilizando biomarcadores séricos têm sido validados de modo que possam servir para o acompanhamento de indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C. A utilização de metodologias não invasivas tem sido uma alternativa à biópsia hepática, sendo muito importante na prática clínica para o estadiamento de fibrose hepática, com destaque para casos de pacientes infectados pelo VHC (CROSSAN et al., 2015).

Diversos estudos têm avaliado e validado a aplicação de biomarcadores, nos quais demonstraram resultados de elevada relevância para a detecção de fibrose hepática severa em indivíduos com hepatite C e, portanto, as aplicações em pesquisa tem sido cada vez mais transferidas para o cenário clínico (TANWAR et al., 2016). As vantagens do uso de biomarcadores em comparação com a biópsia incluem a ausência quase completa de reações adversas, redução do risco de erro de amostragem, objetividade na interpretação de resultados, maior reprodutibilidade das avaliações e disponibilidade de acesso em serviços de saúde que não disponham da presença de patologistas (DUARTE-ROJO; ALTAMIRANO; FELD, 2012).

A utilização de biomarcadores sanguíneos tem sido recomendada tanto pela AASLD como também pela OMS, enfatizando as vantagens advindas de sua utilização como recurso alternativo (CHUNG et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Além disso, recomendações para a utilização de metodologias não invasivas para avaliar a severidade do dano hepático foram propostas pela "Associação Europeia para o Estudo do Fígado - Associação Latino-Americana para o Estudo do Fígado (EASL-ALEH), sendo afirmado que quando o resultado de exame de elastografia transitória (ET) e o resultado de um escore baseado em marcadores sanguíneos estão em concordância, torna-se aceitável um

resultado de fibrose significativa, e em caso de discordância, a biópsia hepática deve ser considerada (CALÈS et al., 2017). Estas recomendações indicam que a biópsia não deverá ser abolida, porém indicada de modo mais específico.

A estratégia de utilizar metodologias não invasivas combinadas pode ser até 15 vezes mais econômica se comparada à estratégia baseada em biópsias hepáticas em cada paciente, concluindo que além da combinação de testes ser mais econômica, também adiciona precisão e confiança às avaliações clínicas. No entanto, estes métodos apresentam certas limitações, como variável grau de sobreposição entre diferentes estágios nos escores de fibrose, falta de aplicabilidade para outras doenças hepáticas e cenários clínicos (CALÈS et al., 2017, DUARTE-ROJO; ALTAMIRANO; FELD, 2012).

Dentre os principais escores baseados em biomarcadores comumente utilizados, destacam-se o índice de plaquetas e idade (AP), escore discriminante de cirrose (CDS) (SORESI, 2014). Outros escores como o Fibrotest®, Forns, índice da razão AST/plaquetas (APRI) e Fibrosis-4 (FIB-4) foram desenvolvidos após a implantação dos primeiros escores citados, sendo o APRI e FIB-4 atualmente utilizados na prática clínica (PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA HEPATITE C E COINFECÇÕES, 2019; SORESI, 2014).

Dos painéis de biomarcadores indiretos (relacionados com a função hepática) disponíveis, incluem-se o APRI (sensibilidade = 81%, especificidade = 55% para o diagnóstico de fibrose), o Fibrotest®, metodologia composta por 5 marcadores bioquímicos e 2 clínicos (alfa-2 macroglobulina, haptoglobina, bilirrubina total, gama glutamil transpeptidase (GGT), idade e gênero), com sensibilidade e especificidade de 77% e 82%, respectivamente, para o diagnóstico de cirrose. Além dos biomarcadores indiretos citados, destacam-se o FIB-4, metodologia baseada na idade, aspartato aminotransferase (AST), contagem de plaquetas e alanina aminotransferase (ALT) (sensibilidade = 74% para fibrose severa, especificidade = 97% para o diagnóstico de cirrose), o escores de fibrose "non-alcoholic fat liver" NAFLD, associando a análise do diabetes, taxa de glicemia de jejum prejudicada, idade, AST, ALT, plaquetas, índice de massa corporal (IMC) e albumina (especificidade = 98% para a avaliação de fibrose avançada ou cirrose), e por último o Fibroindex, metodologia que analisa a contagem de plaquetas, AST e GGT (área sob a curva ROC de 0,82 para fibrose significativa) (SHARMA; KHALILI; NGUYEN, 2014).

Entre as metodologias baseadas em marcadores diretos (relacionados com a renovação da matriz extracelular), incluem-se o ácido hialurônico (AH) (sensibilidade = 98% para exclusão de cirrose quando < 60 mcg/L, especificidade = 78% quando > 110mcg/L), o peptídeo amino terminal do procolágeno do tipo III (PIIINP) (AUC = 0,88 para cirrose), o inibidor de metalopeptidase (TIMP-1) (sensibilidade = 75%, especificidade = 70% na utilização do cut-off 1300 ng/mL para o diagnóstico de fibrose extensa), a glicoproteína YKL-40 (sensibilidade = 80%, especificidade = 71% para o diagnóstico de cirrose) e o escore "enhanced liver fibrosis" (ELF), composto da combinação das análises de fatores como idade, AH, TIMP1 e PIIINP (sensibilidade = 90%, especificidade = 69% para predição de cirrose) (SHARMA; KHALILI; NGUYEN, 2014).

Tabela 2. Performance de escores baseados em biomarcadores indiretos.

Escores	Sensibilidade	Especificidade	Tipo de lesão
APRI	81%	55%	Fibrose avançada
Fibrotest®	77%	77%	Cirrose
FIB-4	74%	97%	Fibrose severa, cirrose, respectivamente
NAFLD	N/C	98%	Fibrose avançada ou cirrose

APRI: índice da razão AST/plaquetas, FIB-4: Fibrosis-4, NAFLD: non-alcoholic fat liver disease N/C: não consta.

Fonte: (SHARMA; KHALILI; NGUYEN, 2014)

Tabela 3. Performance de escores baseados em biomarcadores diretos.

AH	44%	78%	Cirrose
TIMP-1	75%	70%	Fibrose extensa
YKL-40	80%	71%	Cirrose
ELF	90%	69%	Cirrose

AH: ácido hialurônico, TIMP-1: inibidor de metalopeptidase, YKL-40: glicoproteína YKL-40, ELF: enhanced liver fibrosis.

Fonte: (SHARMA; KHALILI; NGUYEN, 2014).

Estudo recente comparando o potencial de biomarcadores para avaliação de dano hepático nas hepatites crônicas B (CHB) e C (CHC), reportou que o escore APRI apresentou resultados melhores que os métodos FIB-4 e ET e, desta forma, diferindo dos resultados anteriormente citados (HOUOT et al., 2016). A utilização de biomarcadores sanguíneos para o cenário clínico requer a validação dos mesmos, de modo que através de combinações variadas de biomarcadores, torna-se possível

e elevar o valor diagnóstico dos testes, uma vez que quando aplicados individualmente seu valor diagnóstico costuma não exceder 80% (KOKSAL et al., 2018).

De acordo com Koksall et al. (2018) uma das grandes vantagens em se realizar a combinação de testes distintos é o aumento da capacidade preditiva dos testes quando associados, proporcionando maior especificidade. Estudo recente ressalta que a utilização de escores associados desempenham importante papel na ausência de disponibilidade de equipamentos de ET, podendo contribuir para decisões, além de auxiliar na definição do tratamento antiviral em pacientes cirróticos (KNOP et al., 2018). A identificação da presença de fibrose em pacientes que adiam o tratamento é importante, visto que o tratamento universal para a hepatite C nem sempre está disponível, deste modo, a estratificação do nível de fibrose hepática continua a ser essencial para a determinação do prognóstico dos indivíduos infectados pelo VHC, uma vez que estes podem evoluir com maior facilidade para os estágios avançados de fibrose hepática se comparados com indivíduos que já recebem tratamento (KNOP et al., 2018).

Outras metodologias também são utilizadas para avaliação de fibrose e cirrose, entre elas destacam-se a ultrassonografia convencional (US), ultrassonografia Doppler, ultrassonografia com contraste, ET e força de impulso de imagem de radiação acústica (ARFI) (SORESI, 2014). Em estudo de Beers e colaboradores (2015), foram reportadas vantagens do uso de metodologias de imagem não invasivas como ultrassonografia e ressonância magnética (RM) na avaliação de doenças hepáticas. Ambas as técnicas fornecem tanto resultado anatômico qualitativo como quantitativo, além de resultados relacionados à função hepática. No entanto, ainda é necessário um aperfeiçoamento das técnicas de imagem, para que estas atinjam níveis satisfatórios que levem sua validação para a avaliação de estágios intermediários de fibrose hepática, principal desafio dos métodos não invasivos, visto que a maioria deles é capaz de distinguir entre fibrose leve e avançada, porém os estágios intermediários nem sempre são categorizados com precisão (CASTERA; BEDOSSA, 2011).

No estudo de Sharma e colaboradores (2014) reportou-se a sensibilidade e especificidade de diversas técnicas radiológicas disponíveis para a detecção de fibrose hepática como o (US) (sensibilidade e especificidade de 80% para fibrose hepática), a tomografia computadorizada (TC) (sensibilidade = 77%, especificidade = 67% para fibrose hepática), a RM (sensibilidade = 85%, especificidade = 100% para

cirrose e sensibilidade = 89%, especificidade = 80% para o estadiamento da fibrose). Apesar do elevado desempenho da RM, esta técnica é classificada como de alto custo, além de requerer recursos humanos altamente qualificados. Além dessas técnicas, destaca-se a ET, com sensibilidade de 83% e especificidade de 89% para o diagnóstico de cirrose.

Para fins de comparação de um novo método para estadiamento da fibrose hepática em relação à biópsia, é necessário avaliar parâmetros como sensibilidade e especificidade. Uma forma de se avaliar esses fatores é analisar a curva ROC (*receiver operator characteristic curve*), ferramenta utilizada para avaliar o desempenho de testes diagnósticos (CASTERA, 2011).

Estudo anterior demonstrou que metodologias não invasivas previamente validadas para clínica como o APRI ou FIB-4 podem categorizar uma significativa quantidade de pacientes nas classificações intermediárias de fibrose hepática (zona cinza) (HOUOT et al., 2016). Tal fato destaca a necessidade de que mais estudos sejam necessários para que se torne possível aperfeiçoar as metodologias existentes, evitando a necessidade da execução da biópsia hepática nestes casos.

A descoberta de novos biomarcadores sanguíneos que possam prever o nível de fibrose hepática em indivíduos infectados pelo VHC, pode contribuir para a composição de novas metodologias não invasivas, como também poderia elevar a performance de metodologias existentes. Além dos biomarcadores hepáticos diretos e indiretos citados anteriormente, determinadas células do sistema imune apresentam comprovada relação com a fisiopatologia da hepatite C, como por exemplo linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (SCHMIDT; BLUM; THIMME, 2013). Schmidt e colaboradores (2013), relataram que a mediação da resposta imune por estes linfócitos pode influenciar tanto a fase aguda da doença, como por exemplo em pacientes que atingem a cura espontânea durante a fase aguda (representada por intensa atividade destas células), como também a fase crônica (relacionada com uma resposta mais tardia destes linfócitos). Levando em consideração as características destes linfócitos em relação ao VHC, a investigação sobre uma possível existência de associação entre a quantidade destas células com diferentes estágios de fibrose hepática torna-se interessante, ao passo que estas células poderiam passar a ser utilizadas como novos biomarcadores sanguíneos preditores de fibrose na hepatite C.

Outros biomarcadores sanguíneos como a alfa-fetoproteína (AFP) e a ureia já foram estudados em relação à associação com alterações hepáticas, incluindo fibrose hepática causada pelo VHC (CALÈS et al., 2005; KOBEISY et al., 2012).

Kobeisy et al. (2012) descreve a AFP como um marcador sanguíneo comumente encontrado em níveis elevados em pacientes com CH, porém também pode ser detectado níveis crescentes em pacientes que apresentam cirrose, com ausência de CH. No mesmo trabalho reportou-se que a elevação da AFP apresenta uma correlação positiva com estágios de fibrose hepática avançados (F3-F4).

No estudo de Calès e colaboradores (2005), relata-se que apesar da função da ureia com fibrose hepática não ter sido relatada na literatura, sua taxa de síntese é reduzida em indivíduos cirróticos. Tais achados justificam futuras investigações dessas moléculas para se conhecer mais a relação de seus níveis plasmáticos em relação aos estágios de fibrose hepática e, portanto, podendo apresentar um potencial de compor metodologias não invasivas para a avaliação de lesão hepática.

O presente projeto apresentou como objetivo comparar a acurácia de métodos não invasivos baseados em biomarcadores sanguíneos de predição de fibrose hepática comparados à biópsia hepática e ou à elastografia por quantificação de ponto. Além disso, este estudo se propôs a validar um novo método usando biomarcadores sanguíneos, denominado FibMaster. Tanto os marcadores quanto o modelo matemático utilizado para elaboração do método foram testados para avaliação das performances, tanto isoladas das variáveis testadas como também na associação das mesmas com metodologias não invasivas baseadas em biomarcadores sanguíneos, previamente validadas para clínica médica.

Referências (Introdução)

ANJO, J. et al. O impacto da hepatite C em Portugal. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 21, n. 2, p. 44–54, 2014.

BEDOSSA, P.; DARGERRE, D.; PARADIS, V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 6, p. ajhep09022, dez. 2003.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v. 24, p. 289–293, 1996.

BEERS, B. E. VAN; DAIRE, J.-L.; GARTEISER, P. New imaging techniques for liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 3, p. 690–700, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRAVO, A. A.; SHETH, S. G.; CHOPRA, S. Liver biopsy. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 7, p. 495–500, 2001.

CALÈS, P. et al. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. **Hepatology**, v. 42, n. 6, p. 1373–1381, dez. 2005.

CALÈS, P. et al. Liver fibrosis diagnosis by blood test and elastography in chronic hepatitis C: agreement or combination? **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 45, n. 7, p. 991–1003, 2017.

CASTERA, L. Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 291–303, abr. 2011.

CASTERA, L.; BEDOSSA, P. How to assess liver fibrosis in chronic hepatitis C: Serum markers or transient elastography vs. liver biopsy? **Liver International**, v. 31, n. SUPPL. 1, p. 13–17, 2011.

CHUNG, R. T. et al. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 62, n. 3, p. 932–954, set. 2015.

CROSSAN, C. et al. Cost-effectiveness of non-invasive methods for assessment and monitoring of liver fibrosis and cirrhosis in patients with chronic liver disease: systematic review and economic evaluation. **Health Technology Assessment**, v. 19, n. 9, p. 1–410, jan. 2015.

DUARTE-ROJO, A.; ALTAMIRANO, J. T.; FELD, J. J. Noninvasive markers of

fibrosis: Key concepts for improving accuracy in daily clinical practice. **Annals of Hepatology**, v. 11, n. 4, p. 426–439, 2012.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. DA. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da preven. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 473–87, 2004.

FERREIRA, P. R. A. et al. Disease burden of chronic hepatitis C in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 19, n. 4, p. 363–8, 2015.

FOX, J.; BOUCHET-VALAT, M. **Rcmdr: R Commander**, 2018. Disponível em: <<http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Misc/Rcmdr/>>

GUIDELINES FOR THE SCREENING, CARE AND TREATMENT OF PERSONS WITH HEPATITIS C INFECTION. **Geneva: World Health Organization**; 2018 Jul. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee.

HOFMEISTER, M. G. et al. Estimating Prevalence of Hepatitis C Virus Infection in the United States, 2013–2016. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, 6 nov. 2018.

HOUOT, M. et al. Systematic review with meta-analysis: direct comparisons of biomarkers for the diagnosis of fibrosis in chronic hepatitis C and B. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 43, n. 1, p. 16–29, 2016.

KNOP, V. et al. Estimation of liver fibrosis by noncommercial serum markers in comparison with transient elastography in patients with chronic hepatitis C virus infection receiving direct-acting antiviral treatment. **Journal of Viral Hepatitis**, n. April, p. 1–7, 8 nov. 2018.

KOBEISY, M. A. et al. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in patients with chronic hepatitis C without hepatocellular carcinoma in upper EGYPT. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 2, p. 49–53, jun. 2012.

KOKSAL, I. et al. Diagnostic value of combined serum biomarkers for the evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection: A multicenter, noninterventional, observational study. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 4, p. 464–472, 29 jun. 2018.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON, L. DE L. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)**, v. 57, n. 1, p. 105–110, jan. 2011.

NEGRO, F. Epidemiology of hepatitis C in Europe. **Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 46 Suppl 5, p. S158–64, 15 dez. 2014.

RATZIU, V. et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 128, n. 7, p. 1898–1906, 2005.

SCHMIDT, J.; BLUM, H. E.; THIMME, R. T-cell responses in hepatitis B and C virus infection: similarities and differences. **Emerging Microbes & Infections**, v. 2, n. 3, p. e15–e15, 27 mar. 2013.

SEBASTIANI, G.; GKOUVATSOS, K.; PANTOPOULOS, K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 32, p. 11033–11053, 2014.

SHARMA, S.; KHALILI, K.; NGUYEN, G. C. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 45, p. 16820–16830, 2014.

SORESI, M. Non invasive tools for the diagnosis of liver cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 48, p. 18131, 2014.

SPAAN, M.; JANSSEN, H. L. A.; BOONSTRA, A. Immunology of hepatitis C virus infections. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 26, n. 4, p. 391–400, ago. 2012.

TANWAR, S. et al. Biomarkers of Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis C. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 51, n. 3, p. 1, jul. 2016.

TUBLIN, M. E. et al. Prospective Study of the Impact of Liver Biopsy Core Size on Specimen Adequacy and Procedural Complications. **American Journal of Roentgenology**, v. 210, n. 1, p. 183–188, jan. 2018.

VIVANCOS, M. J.; MORENO, A.; QUEREDA, C. Treatment of hepatitis C virus with direct-acting antivirals: Practical aspects and current situation. **Revista Clínica Española (English Edition)**, 2017.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S58–S68, nov. 2014.