

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS SOLÚVEIS
COMO PREDITORES DE ALTERAÇÕES
HISTOLÓGICAS HEPÁTICAS E RESPOSTA
TERAPÊUTICA NA INFECÇÃO CRÔNICA PELO
VÍRUS DA HEPATITE C**

Alexandre Sampaio Moura

Belo Horizonte

2008

ALEXANDRE SAMPAIO MOURA

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS SOLÚVEIS
COMO PREDITORES DE ALTERAÇÕES
HISTOLÓGICAS HEPÁTICAS E RESPOSTA
TERAPÊUTICA NA INFECÇÃO CRÔNICA PELO
VÍRUS DA HEPATITE C**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção de título de Doutor.

Área de concentração: Ciências da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha.

Co-orientadores: Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira.
Dr. Ricardo Andrade Carmo.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Jaime Arturo Ramirez

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR

Prof. Francisco José Penna

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Carlos Faria Santos Amaral

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Prof. Dirceu Bartolomeu Greco

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Coordenador)

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior (Subcoordenador)

Prof. Antônio Luiz de Pinho Ribeiro

Prof. Carlos Mauricio de Figueiredo Antunes

Prof. José Roberto Lambertucci

Fátima Lúcia Guedes Silva (Representante Discente)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha, mestre e amigo, pelas marcas indelévels deixadas na minha formação não apenas científica, mas também clínica e pessoal ao longo desses vários anos de convivência.

Ao Dr. Ricardo Andrade Carmo, por ter despertado em mim o interesse pelas hepatites virais, pelo imenso apoio em todas as fases do projeto e por representar um referencial ético em minha trajetória acadêmica e profissional.

Ao Prof. Antônio Lúcio Teixeira, pela dedicação na construção da interface entre a ciência clínica e a ciência básica e pela inestimável ajuda na mensuração dos marcadores inflamatórios e discussão da sua importância na hepatite C crônica.

À Profa. Virgínia Hora Rios Leite, pelos ensinamentos na interpretação dos achados histológicos hepáticos e pela revisão das amostras de biópsia hepática deste projeto.

Ao Prof. Mauro Texeira, pela oportunidade de utilizar o laboratório de Imunofarmacologia da UFMG para realização das dosagens dos marcadores inflamatórios.

Aos acadêmicos Hugo Almeida Chaves de Resende, Luís Eduardo Rias Cardoso, Lorena Bicalho de Moravia, Caroline Machado, Priscila Rabelo Penido, Renata Saliba e Thaís Brasil, pelo auxílio na coleta de dados e pela agradável convivência ao longo da realização do projeto.

Ao acadêmico Felipe Barbosa, pela grande ajuda no âmbito computacional.

Ao Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial à Dra. Dora Mendes Del Castillo e à Nara de Oliveira Carvalho, pelo apoio no processamento e armazenamento das amostras plasmáticas.

Aos médicos Jaqueline Ferreira de Oliveira e Rodney Martins Neto, pela colaboração na coleta de dados e inclusão de pacientes.

Aos funcionários do CTR-Orestes Diniz, em especial a Maria Cristina Dias, Eni Nunes Corrêa e Rosângela Luiza Rocha, pelo apoio logístico na condução do trabalho.

À colega Renata Eliane de Ávila, pela troca de experiências ao longo de toda a condução deste projeto.

Aos meus pais e a minha irmã, por estarem sempre dispostos a compartilhar os momentos felizes, confortar minhas angústias e estimular continuamente meu crescimento profissional.

A minha esposa Juliana e meus filhos, Henrique e Mariana, pelo amor e alegria proporcionados e que fazem minha vida valer a pena.

RESUMO

A progressão da doença hepática e a resposta terapêutica de pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) parecem ter relação com a resposta imune do hospedeiro. A ativação do sistema imune envolve a liberação de citocinas e de seus receptores, que podem ser dosados em amostras plasmáticas. O objetivo deste estudo foi analisar a associação entre níveis plasmáticos de quimiocinas e de receptores solúveis do fator de necrose tumoral com alterações histológicas hepáticas de pacientes portadores crônicos do HCV e com resposta ao tratamento combinado, utilizando interferon alfa e ribavirina. Dos 220 pacientes avaliados em serviço público de referência em hepatites virais de Belo Horizonte, MG, no período de junho de 2005 a dezembro de 2007, foram elegíveis 73 portadores crônicos do HCV, virgens de tratamento e com fragmento de biópsia hepática disponível para revisão. Dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais foram coletados e realizou-se dosagem plasmática dos seguintes marcadores inflamatórios solúveis: CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, CXCL9, CXCL10, sTNFR1 e sTNFR2. Os fragmentos de biópsia hepática foram revisados e classificados de acordo como o sistema de escore METAVIR, com posterior estratificação dos graus de atividade necro-inflamatória e os de fibrose da seguinte forma: A \leq 1 (atividade ausente/leve) e A \geq 2 (atividade moderada/intensa); F \leq 1 (fibrose ausente/leve) e F \geq 2 (fibrose moderada/intensa). Observou-se que os níveis plasmáticos de CXCL9, sTNFR1 e sTNFR2 associaram-se de maneira significativa à fibrose hepática ($p=0,014$; $p=0,012$; $p=0,009$, respectivamente), sendo que os pacientes com fibrose hepática moderada/intensa apresentaram medianas mais elevadas dos níveis plasmáticos desses marcadores se comparadas às encontradas em pacientes com fibrose ausente/leve. Os níveis de sTNFR2 associaram-se de maneira significativa também à atividade necro-inflamatória hepática, com mediana mais elevada sendo encontrada em pacientes com atividade necro-inflamatória moderada/intensa se comparada à encontrada em indivíduos com atividade ausente/leve (2,34 ng/mL vs. 1,99 ng/mL; $p=0,019$). O total de 41 pacientes submeteu-se a tratamento com interferon alfa e ribavirina no período do estudo e os níveis desses marcadores inflamatórios puderam ser analisados em relação à resposta terapêutica. Os níveis plasmáticos pré-tratamento de CXCL10 estiveram significativamente mais elevados entre pacientes que não apresentaram resposta virológica precoce (RVP), se comparados àqueles com RVP - (512,9 pg/mL vs 179,1 pg/mL; $p=0,011$), e entre os que não apresentaram resposta virológica sustentada (RVS), se comparados aos que apresentaram RVS - (289,9 pg/mL vs. 142,7 pg/mL; $p=0,045$). A acurácia da CXCL10 como preditora de ausência de RVP e RVS foi de 0,79 (IC95%: 0,59-0,99) e 0,69 (IC95%: 0,51 - 0,87), respectivamente. Concluiu-se que os níveis plasmáticos de CXCL9, sTNFR1 e sTNFR2 associaram-se de maneira significativa e independente a alterações histológicas hepáticas, sugerindo um possível papel da ativação do sistema TNF e da resposta do tipo Th1 na patogênese da infecção pelo HCV. Além disso, níveis plasmáticos pré-tratamento elevados de CXCL10 foram preditores de ausência tanto de RVP quanto de RVS ao tratamento com interferon e ribavirina, podendo ser potencialmente úteis na avaliação da indicação de terapia específica de pacientes infectados pelo HCV.

Palavras-chave: Hepatite C. Quimiocinas. Receptores do fator de necrose tumoral. Interferon alfa e ribavirina. Fibrose hepática.

ABSTRACT

Host immune response seems to be responsible for progression of liver disease among patients chronically infected with hepatitis C virus (HCV), but is also crucial for successful clearance of the virus following specific therapy. Activation of the immune system involves the release of cytokines and their receptors that can be measured in plasmatic samples. The present study aimed to evaluate the association between chemokines and soluble tumor necrosis factor receptors (sTNFR) plasmatic levels and both liver histological changes and therapeutic response to interferon- α and ribavirin. From June 2005 to December 2007, 73 treatment-naïve patients, chronically infected with HCV and with an available liver biopsy fragment were included in the study. Socio-demographic, clinical and laboratory data were collected and plasmatic levels were assessed for CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, CXCL9, CXCL10, sTNFR1 e sTNFR2. Histological findings of the liver fragment were reviewed and classified according to the METAVIR scoring system and stratified as following: A \leq 1 (none or mild inflammatory activity) e A \geq 2 (moderate or severe inflammatory activity); F \leq 1 (none or mild fibrosis) e F \geq 2 (moderate or sever fibrosis). Plasmatic levels of CXCL9, sTNFR1 and sTNFR2 were significantly associated with liver fibrosis with higher median levels among those with moderate/severe fibrosis if compared to those with no or mild fibrosis (p=0,014; p=0,012; p=0,009, respectively). Plasmatic sTNFR2 levels were significantly associated with liver necro-inflammatory activity with higher median leves among those with moderate/severe activity if compared to those with no or mild activity (2,34 ng/mL vs. 1,99 ng/mL; p=0,019). Forty one patients were treated with interferon- α and ribavirin during the study period and the association between the levels of these inflammatory markers and therapeutic response was analyzed. Pre-treatment CXCL10 levels were significantly higher among patients without early or sustained virologic response if compared to non-reponders (512,9 pg/mL vs 179,1 pg/mL; p=0,011 and 289,9 pg/mL vs. 142,7 pg/mL; p=0,045, respectively). Accuracy of CXCL10 as predictor of absence of EVR and SVR was 0,79 (CI95%: 0,59-0,99) and 0,69 (CI95%: 0,51 - 0,87), respectively. In conclusion, plasmatic leves of CXCL9, sTNFR1 and sTNFR2 were independetly associated with liver histological changes suggesting a role of TNF activation and Th1-type cell-mediated immune response in the pathogenesis of HCV infection. In addition, pre-treatment CXCL10 levels were predictor of both early and sustained virologic response to interferon- α and ribavirin and might be potentially useful in the evaluation of candidates for therapy.

Keywords: Hepatitis C. Chemokines. Tumor necrosis factor receptor. Interferon-alpha. Liver fibrosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação de características clínico-demográficas entre sujeitos elegíveis (N=73) e não-elegíveis (N=147).....	58
Tabela 2	Comparação da mediana e da amplitude interquartil (AIQ) dos níveis de mediadores inflamatórios solúveis entre portadores crônicos do HCV e o grupo-controle.....	60
Tabela 3	Comparação da mediana e amplitude interquartil (AIQ) dos mediadores inflamatórios solúveis (em pg/mL) entre pacientes com infecção crônica pelo HCV apresentando atividade necro-inflamatória ausente/leve (METAVIR A \leq 1) e aqueles apresentando atividade moderada/intensa (METAVIR A \geq 2) à biópsia hepática.....	62
Tabela 4	Comparação da mediana e amplitude interquartil (AIQ) dos mediadores inflamatórios solúveis (em pg/mL) entre pacientes com infecção crônica pelo HCV apresentando fibrose ausente/leve (METAVIR F \leq 1) e aqueles apresentando fibrose moderada/intensa (METAVIR F \geq 2) à biópsia hepática.....	63
Tabela 5	Associação entre fatores sociodemográficos e histológicos contínuos, representados como média (\pm dp) e atividade necro-inflamatória hepática de acordo com a classificação de METAVIR em pacientes com infecção crônica pelo HCV.....	67
Tabela 6	Associação entre fatores sociodemográficos, clínicos e virológicos categóricos e atividade necro-inflamatória hepática de acordo com a classificação de METAVIR em pacientes com infecção crônica pelo HCV.....	68
Tabela 7	Associação entre fatores sociodemográficos e histológicos contínuos, representados como média (\pm dp), e fibrose hepática de acordo com a classificação de METAVIR, em pacientes com infecção crônica pelo HCV.....	69
Tabela 8	Associação entre fatores clínico-virológicos e fibrose hepática de acordo com a classificação de METAVIR em pacientes com infecção crônica pelo HCV.....	69

Tabela 9	Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória (METAVIR A \geq 2) à biópsia hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV.....	71
Tabela 10	Análise da correlação entre os níveis plasmáticos pré-tratamento de quimiocinas em pacientes com infecção crônica pelo HCV (N=71).....	72
Tabela 11	Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática na infecção crônica pelo HCV, incluindo o marcador inflamatório sTNFR1.....	72
Tabela 12	Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática na infecção crônica pelo HCV, incluindo o marcador inflamatório sTNFR2.....	73
Tabela 13	Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática na infecção crônica pelo HCV, incluindo o marcador inflamatório sTNFR2 e não incluindo a variável atividade necro-inflamatória.....	73
Tabela 14	Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática na infecção crônica pelo HCV, incluindo o marcador inflamatório CXCL9.....	73
Tabela 15	Perfil dos pacientes com hepatite C crônica submetidos a tratamento com interferon e ribavirina (N=41).....	74
Tabela 16	Resposta virológica ao tratamento de pacientes com infecção crônica pelo HCV, global e estratificada por genótipo viral.....	75
Tabela 17	Associação dos níveis plasmáticos pré-tratamento de quimiocinas e receptores solúveis de TNF com resposta virológica precoce (RVP).....	78
Tabela 18	Associação dos níveis plasmáticos pré-tratamento de quimiocinas e receptores solúveis de TNF com resposta virológica ao final do tratamento (RVF).....	78
Tabela 19	Associação dos níveis plasmáticos pré-tratamento de quimiocinas e receptores solúveis de TNF com resposta virológica sustentada.....	79
Tabela 20	Associação entre níveis plasmáticos de CXCL10 e resposta virológica precoce (RVP).....	81

Tabela 21	Associação entre níveis plasmáticos de CXCL10 e resposta virológica precoce (RVP).....	81
Tabela 22	Associação entre níveis plasmáticos de CXCL10 e resposta virológica sustentada (RVS).....	81
Tabela 23	Associação entre níveis plasmáticos de CXCL10 e resposta virológica sustentada (RVS).....	82
Tabela 24	Associação entre fatores clínico-demográficos e resposta virológica precoce em pacientes com infecção crônica pelo HCV (apenas genótipo 1).....	82
Tabela 25	Associação entre fatores clínico-demográficos e resposta virológica ao final do tratamento em pacientes com infecção crônica pelo HCV.....	84
Tabela 26	Associação entre fatores clínico-demográficos e resposta virológica sustentada.....	85
Tabela 27	Comparação dos níveis plasmáticos pré-tratamento dos marcadores inflamatórios pré-tratamento com interferon e ribavirina e na 12 ^a semana de tratamento (n=25).....	86
Tabela 28	Comparação dos níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios pré-tratamento e ao final do tratamento com interferon e ribavirina em pacientes com hepatite C crônica (n=13).....	87
Tabela 29	Comparação dos níveis pré-tratamento e na 12 ^a semana de tratamento entre pacientes com hepatite C crônica sem resposta precoce a interferon e ribavirina (n=8).....	88
Tabela 30	Comparação dos níveis dos marcadores inflamatórios plasmáticos pré-tratamento e na 12 ^a semana de tratamento entre pacientes com hepatite C crônica apresentando resposta precoce ao tratamento com interferon e ribavirina (n=17).....	88
Tabela 31	Comparação dos níveis dos marcadores inflamatórios plasmáticos pré-tratamento e na 12 ^a semana de tratamento entre pacientes com hepatite C crônica sem resposta sustentada (n=13).....	89
Tabela 32	Comparação dos níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios pré-tratamento e na 12 ^a semana de tratamento entre pacientes com hepatite C crônica apresentando resposta sustentada (n=9).....	89

Tabela 33	Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória hepática.....	117
Tabela 34	Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória hepática depois da retirada das variáveis “idade”, “uso de medicamento hepatotóxico”, “hábito recente de ingestão etílica moderada /intensa”	117
Tabela 35	Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória hepática depois da retirada das variáveis “idade”, “uso de medicamento hepatotóxico”, “hábito recente de ingestão etílica moderada/intensa” e “aumento de ALT \geq 1,5x LSN”..	118
Tabela 36	Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória hepática.....	118
Tabela 37	Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR1.....	119
Tabela 38	Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR1, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática” e “genótipo viral 1”	119
Tabela 39	Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR1, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática”, “genótipo viral 1” e “idade”	120
Tabela 40	Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR1.....	120
Tabela 41	Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2.....	120
Tabela 42	Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2” e “esteatose hepática”	121

Tabela 43	Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática” e “genótipo viral 1”.....	121
Tabela 44	Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática”, “genótipo viral 1” e “níveis de sTNFR2”.....	122
Tabela 45	Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2.....	122
Tabela 46	Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, e não incluindo a variável “atividade necro-inflamatória”.....	122
Tabela 47	Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, e não incluindo a variável “atividade necro-inflamatória”, depois da retirada da variável “diabetes tipo 2”.....	123
Tabela 48	Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, e não incluindo a variável “atividade necro-inflamatória”, depois da retirada da variável “diabetes tipo 2” e “genótipo viral 1”.....	123
Tabela 49	Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, e não incluindo a variável “atividade necro-inflamatória”.....	123
Tabela 50	Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório CXCL9.....	124
Tabela 51	Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório CXCL9, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática” e “genótipo viral 1”.....	124

Tabela 52	Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório CXCL9, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática”, “genótipo viral 1” e “idade”	125
Tabela 53	Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório CXCL9	125

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Desenho cronológico do estudo “Marcadores inflamatórios solúveis como preditores de alterações histológicas hepáticas e resposta terapêutica na infecção crônica pelo vírus da hepatite C”, Belo Horizonte, MG, 2002-2007.....	40
Figura 2	Diagrama do momento da coleta de amostras de plasma para análise da associação entre níveis de mediadores inflamatórios solúveis e alterações histológicas hepáticas na infecção crônica pelo vírus da hepatite C.....	42
Figura 3	Diagrama do momento de coleta de amostras de plasma para análise da associação entre níveis de mediadores inflamatórios solúveis e resposta virológica ao tratamento na infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV), tanto para pacientes com genótipo viral 1 do quanto para pacientes com genótipos 2 e 3.....	43
Figura 4	Fluxograma de análise da elegibilidade dos pacientes.....	59
Gráfico 1	Níveis plasmáticos de sTNFR2 no grupo-controle e estratificados por diferentes graus de atividade necro-inflamatória hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV.....	63
Gráfico 2	Níveis plasmáticos de sTNFR1 no grupo-controle e estratificados por diferentes graus de fibrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV.....	64
Gráfico 3	Níveis plasmáticos de sTNFR2 no grupo-controle e estratificados por diferentes graus de fibrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV.....	64
Gráfico 4	Níveis plasmáticos de CXCL9 no grupo-controle e estratificados por diferentes graus de fibrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV.....	65
Gráfico 5	Curva ROC dos níveis plasmáticos de CXCL9 como preditores de fibrose hepática moderada/avançada (METAVIR \geq F2).....	65

Gráfico 6	Curva ROC dos níveis plasmáticos de sTNFR1 como preditores de fibrose hepática moderada/avançada (METAVIR \geq F2).....	66
Gráfico 7	Curva ROC dos níveis plasmáticos de sTNFR2 como preditores de fibrose hepática moderada/avançada (METAVIR \geq F2).....	66
Gráfico 8	Níveis plasmáticos de CXCL10 em pacientes com hepatite C crônica estratificados por resposta virológica precoce.....	77
Gráfico 9	Níveis plasmáticos de CXCL10 em pacientes com hepatite C crônica estratificados por resposta virológica sustentada.....	77
Gráfico 10	Curva ROC dos níveis plasmáticos de CXCL10 como preditores de ausência de resposta virológica precoce.....	79
Gráfico 11	Curva ROC dos níveis plasmáticos de CXCL10 como preditores de ausência de resposta virológica sustentada.....	80
Gráfico 12	Níveis plasmáticos de CXCL10 estratificado por resposta virológica sustentada em pacientes com tempo entre coleta da amostra e início do tratamento superior a 365 dias.....	80
Quadro 1	Classificação histopatológica da infecção pelo HCV segundo os critérios estabelecidos pelo METAVIR.....	46
Quadro 2	Classificação semiquantitativa de esteatose hepática.....	47
Quadro 3	Definição operacional das variáveis sociodemográficas e epidemiológicas.....	51
Quadro 4	Definição operacional das variáveis indicadoras de exposição a fatores de risco para doença hepática.....	52
Quadro 5	Definição operacional das variáveis laboratoriais.....	52
Quadro 6	Definição operacional das variáveis histológicas.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIQ	Amplitude interquartil
ALT	Alanina aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno central (core) do vírus da hepatite B
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
Anti-HIV	Anticorpo contra o vírus da imunodeficiência humana
BSA	Albumina de soro bovino
CCL	Quimiocina da subfamília CC
CCR	Receptor de quimiocinas CC
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias
CXCL	Quimiocina da subfamília CXC
CXCR	Receptor de quimiocinas CXC
dp	Desvio-padrão
EIA	Imunoenzimática
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
FAN	Fator antinuclear
FIG	Figura
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HAI	Índice de atividade histológica
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSC	Células estelares hepáticas
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IMC	Índice de massa corpórea
IP-10	<i>Interferon-gamma inducible protein 10</i>
LSN	Limite superior da normalidade
LTC	Linfócito T citotóxico
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>

MIG	<i>Monokine induced by ifn-gamma</i>
MIP-1	<i>Macrophagic inflammatory protein 1</i>
MMP	Metaloproteinase
NaCl	Cloreto de sódio
NK	<i>Natural killer</i>
NT	Nucleotídeo
NUPAD	Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico
OR	<i>Odds ratio</i>
PBMC	Células mononucleares periféricas
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RBV	Ribavirina
RNA	Ácido ribonucléico
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
rpm	Rotações por minuto
RVF	Resposta virológica final
RVP	Resposta virológica precoce
RVS	Resposta virológica sustentada
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
sTNFR1	Receptor solúvel de fator de necrose tumoral tipo 1
sTNFR2	Receptor solúvel de fator de necrose tumoral tipo 2
TAB	Tabela
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF	Fator de crescimento e transformação
Th	<i>T helper</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Hipótese.....	21
2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA.....	22
2.1 Aspectos gerais da infecção pelo vírus da hepatite C.....	22
2.2 Citocinas e inflamação hepática.....	23
2.3 Citocinas e fibrogênese.....	25
2.4 Marcadores inflamatórios solúveis de alterações histológicas hepáticas.....	26
2.4.1 Quimiocinas e doença hepática.....	26
2.4.2 Fator de necrose tumoral, seus receptores solúveis e dano hepatocelular.....	29
2.5 Tratamento na hepatite C crônica.....	31
2.5.1 Associação entre níveis de quimiocinas e resposta ao tratamento da hepatite C crônica.....	32
2.5.2 TNF- α , seus receptores solúveis e resposta terapêutica na hepatite C crônica..	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivos principais.....	37
3.2 Objetivos secundários.....	37
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	38
4.1 Desenho.....	38
4.2 Local do estudo.....	39
4.3 Obtenção e armazenamento das amostras de plasma.....	41
4.4. Mensuração dos marcadores inflamatórios solúveis.....	44
4.5 Realização e análise de biópsia hepática.....	45
4.6 Tratamento da hepatite crônica.....	47
4.7 Critérios de inclusão e de exclusão.....	48
4.8 Definição dos eventos e classificação operacional das variáveis.....	49
4.9 Coleta e análise dos dados.....	53
4.10 Cálculo amostral.....	54

4.11 Revisão da literatura.....	55
4.12 Normas de redação.....	55
4.13 Ética.....	55
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Análise descritiva.....	57
5.2 Comparação dos níveis dos mediadores inflamatórios solúveis entre pacientes com hepatite C e o grupo-controle.....	60
5.3 Fatores preditores de alterações à biópsia hepática.....	61
5.3.1 Mediadores inflamatórios solúveis e alterações histológicas hepáticas.....	61
5.3.2 Fatores clínico-viológicos e alterações histológicas hepáticas.....	67
5.3.3 Análise multivariada dos fatores associados com atividade necro-inflamatória hepática.....	70
5.3.4 Análise multivariada dos fatores associados à fibrose hepática.....	71
5.4 Fatores associados à resposta terapêutica.....	74
5.4.1 Análise da associação entre marcadores inflamatórios solúveis e resposta virológica ao tratamento.....	76
5.4.2 Associação entre fatores clínico-demográficos e resposta virológica ao tratamento.....	82
5.4.3 Análise da cinética dos mediadores inflamatórios solúveis após início do tratamento.....	86
6 DISCUSSÃO.....	90
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	98
8 CONCLUSÕES.....	100
9 PROPOSIÇÕES.....	101
REFERÊNCIAS.....	102
APÊNDICES E ANEXOS.....	115

1 INTRODUÇÃO

A hepatite C é responsável por significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo, sendo uma das principais causas de cirrose hepática e indicações de transplante de fígado (PERZ *et al.*, 2006). A taxa mundial de prevalência da hepatite C é estimada em 2% (SHEPARD; FINELLI; ALTER, 2005), semelhante à observada em estudos de base populacional realizados no Brasil, nos quais essa taxa tem se situado em torno de 1,5% (FOCACCIA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 1995; ZARIFE *et al.*, 2006).

A gravidade da inflamação e da fibrose hepática varia entre os pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) e fatores como sexo masculino, idade mais avançada no momento da infecção e consumo excessivo de álcool estão associados à maior intensidade da inflamação e fibrose hepáticas (POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997; POYNARD *et al.*, 2001). Uma progressão mais rápida da doença é encontrada também em pacientes co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (BENHAMOU *et al.*, 1999) ou com o vírus da hepatite B (BENVEGNUM *et al.*, 1994) e aqueles que apresentam esteatose hepática (LEANDRO *et al.*, 2006) e resistência à insulina (HUI *et al.*, 2003).

O tratamento combinado de interferon com ribavirina tem demonstrado a interrupção e até mesmo a reversão do processo de fibrose quando existe resposta virológica sustentada (POYNARD *et al.*, 2002). Infelizmente, as taxas de resposta são baixas, especialmente entre pacientes infectados pelo genótipo 1 do HCV e aqueles com idade mais avançada ou com fibrose mais acentuada (FRIED *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2002; MANNES *et al.*, 2001; MIHM *et al.*, 2006). A identificação de candidatos apropriados para o tratamento é de suma importância devido ao alto custo dos medicamentos e ao risco de eventos adversos potencialmente graves com a terapia atualmente disponível.

A avaliação do estadiamento hepático em pacientes infectados pelo HCV é essencial para estabelecer prognóstico e avaliar a necessidade de terapia antiviral. A biópsia hepática é, atualmente, o padrão-ouro para avaliação da fibrose hepática, mas técnicas de imagem como o Fibroscan e painéis de marcadores hematológicos/bioquímicos como o Fibrotest e o APRI (índice de razão entre aspartato aminotransferases e plaquetas) estão sendo cada vez mais utilizadas (SHAHEEN; WAN; MYERS, 2007; WAI *et al.*, 2003). A disponibilidade de marcadores hepáticos não-invasivos é desejável pelos riscos

associados à biópsia hepática, principalmente em pacientes com distúrbios da hemostasia (STRASSBURG; MANN, 2006).

A importância do padrão da resposta inflamatória tanto na fibrogênese hepática quanto na resposta ao tratamento da hepatite C está bem estabelecida (APOLINARIO; GARCIA-MONZON, 2003; CERNY; CHISARI, 1999; CHANG; REHERMANN; CHISARI, 1997; FRIEDMAN, 1999; NEUMAN *et al.*, 2001). No entanto, em grande parte desses estudos o padrão inflamatório é avaliado por métodos tecnicamente complexos, como análise da expressão intra-hepática ou em cultura de leucócitos de marcadores inflamatórios, o que as torna de pouca utilidade na prática clínica. Desta forma, a disponibilidade de técnicas mais simples e que possam ser padronizadas para análise do processo inflamatório na hepatite C crônica como, por exemplo, a dosagem imunoenzimática periférica de mediadores inflamatórios plasmáticos e de receptores solúveis de citocinas pode representar importante avanço.

O uso de marcadores inflamatórios solúveis como preditores de alterações histológicas hepáticas e de resposta virológica em pacientes com hepatite C crônica vem sendo estudado na última década. Entre as citocinas, a análise dos níveis periféricos da quimiocina CXCL10 e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) parece promissora (NEUMAN *et al.*, 2001; NEUMAN *et al.*, 2002a). A associação dos níveis periféricos de outras quimiocinas como a CXCL9, CCL11, CCL24 e dos receptores solúveis do fator de necrose tumoral (sTNFR) com alterações histológicas hepáticas ainda precisa ser melhor compreendida (APOLINARIO *et al.*, 2002; KALLINOWSKI *et al.*, 1998; SHIELDS *et al.*, 1999; ZYLBERBERG *et al.*, 1999). Além disso, há poucas pesquisas sobre marcadores inflamatórios solúveis como preditores de resposta terapêutica à combinação de interferon com ribavirina fora do ambiente extremamente controlado dos ensaios clínicos randomizados (DIAGO *et al.*, 2006).

1.1 Hipótese

Níveis plasmáticos de quimiocinas e receptores solúveis de fator de necrose tumoral estão associados com atividade necro-inflamatória e fibrose hepática e também com resposta virológica ao interferon e ribavirina em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da infecção pelo vírus da hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV), identificado em 1989, é pequeno, com aproximadamente 50 nm, envelopado, e contém genoma constituído por fita simples de ácido ribonucléico (RNA) - (CHOO *et al.*, 1989). Pertence à família *Flaviviridae* e é subdividido em seis genótipos principais que se diferenciam em relação à distribuição geográfica e à susceptibilidade ao tratamento (WONG; LEE, 2006). O genótipo 1 é o mais prevalente no Brasil, incluindo Minas Gerais, e na maior parte do mundo, sendo sua forma crônica a de mais difícil erradicação com o tratamento combinado de interferon e ribavirina (CAMPIOTTO *et al.*, 2005; CARMO *et al.*, 2002; PERONE *et al.*, 2008; ZEIN, 2000).

A principal forma de transmissão do HCV é a via parenteral e, desta forma, os principais fatores de risco são o uso de drogas injetáveis e hemotransusão antes de 1992, momento no qual os hemoderivados passaram a ser rastreados para presença de anticorpos contra o HCV (WONG; LEE, 2006). A transmissão do HCV pode também ocorrer pela via sexual ou vertical, mas de forma bem menos eficiente do que pela via parenteral (LAUER; WALKER, 2001; WONG; LEE, 2006).

A fase aguda da infecção pelo HCV é geralmente assintomática e, por isto, pouco detectada (WONG; LEE, 2006). Devido à sua alta taxa replicativa, elevada mutagênese e sua capacidade de subverter tanto a resposta imune inata quanto a adquirida, o HCV é capaz de persistir no hospedeiro, causando infecção crônica em cerca de 70% dos pacientes infectados (KANTO; HAYASHI, 2006; REHERMANN; NASCIMBENI, 2005). Apesar de pouco citopático, o HCV estimula uma agressão imunomediada ao parênquima hepático que, ao longo de décadas, pode resultar em cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (ALTER; SEEFF, 2000). Dos pacientes cronicamente infectados pelo HCV, aproximadamente 15% evoluem para cirrose hepática ao longo de um período que pode variar entre 10 e 30 anos e, nos pacientes com cirrose hepática, o hepatocarcinoma ocorre na taxa de 1 a 4% ao ano (LAUER; WALKER, 2001). O vírus da hepatite C é responsável por quase um quarto dos casos de cirrose hepática e de carcinoma hepatocelular em todo o

mundo e resulta em mais de 350.000 óbitos ao ano decorrentes dessas complicações (PERZ *et al.*, 2006).

A evolução para cirrose, quando acontece, geralmente é lenta e assintomática (LAUER; WALKER, 2001). Diversos fatores parecem favorecer a evolução mais rápida da doença e, entre eles, destacam-se idade mais avançada no momento da infecção, ingestão moderada ou intensa de álcool e presença de co-infecções pelo vírus da hepatite B ou pelo vírus da imunodeficiência humana (SEEFF, 2002). A importância do padrão de ativação do sistema imunológico na progressão da doença será motivo de discussão nas seções subseqüentes.

2.2 Citocinas e inflamação hepática

As citocinas constituem um grupo de pequenas proteínas regulatórias responsáveis pela sinalização intercelular. No fígado, elas são secretadas por diversos tipos celulares e ligam-se a receptores específicos na membrana da célula-alvo, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares importantes para a regulação da resposta imune ao HCV (JACOBSON BROWN; NEUMAN, 2001; MAHER, 1999). Na resposta inata ao HCV, a expressão de IFN- α e de genes induzidos pelo IFN está elevada e ocorre secreção de IFN- γ por células *natural killer* (NK) ativadas (KANTO; HAYASHI, 2006). Ainda nessa fase de resposta, células dendríticas hepáticas processam antígenos virais, maturam e migram para tecidos linfóides, onde estimulam linfócitos T e B, dando início à resposta imune adquirida (KANTO; HAYASHI, 2006). Como parte da resposta adquirida, linfócitos T ativados específicos para o HCV migram para o fígado e anticorpos contra o HCV passam a ser detectados no soro (KANTO; HAYASHI, 2006).

As citocinas desempenham importante papel importante na modulação da resposta imune, direcionando-a para um padrão em que predominará a resposta estimulada por linfócitos T-auxiliares do tipo 1 (Th1) ou do tipo 2 (Th2) - (JACOBSON BROWN; NEUMAN, 2001; SYRBE; SIVEKE; HAMANN, 1999). Células Th1 secretam fator de necrose tumoral (TNF), IFN- γ e interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18), que estimulam a imunidade celular a partir da ativação de células NK, macrófagos e produção de linfócitos T citotóxicos (CHANG; REHERMANN; CHISARI, 1997). A resposta tipo Th2, desencadeada pela secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estimula a imunidade humoral e, conseqüentemente, a produção de anticorpos.

Os linfócitos T citotóxicos (LTC) exercem papel fundamental na resposta imune celular ao HCV, reconhecendo os antígenos virais em associação com moléculas HLA classe I na superfície dos hepatócitos e eliminando o vírus do fígado (GUIDOTTI; CHISARI, 2001). Essa eliminação ocorre por meio de dois mecanismos principais: um citolítico, no qual o LTC induz apoptose do hepatócito infectado, e um não-citolítico, mediado por citocinas como IFN- γ e TNF- α , no qual a supressão da replicação viral se dá pela inibição da síntese protéica no hepatócito (GUIDOTTI; CHISARI, 2001). A imunidade humoral, apesar de ter potencial para atuar no controle inicial da infecção pelo HCV, tem pouca efetividade na erradicação do vírus, provavelmente pela emergência de cepas virais resistentes à neutralização pelos anticorpos (SHIMIZU *et al.*, 1994).

A qualidade da resposta do tipo Th1 parece ser o principal determinante da evolução da infecção aguda pelo HCV. Pacientes com infecção resolvida têm ampla resposta Th1, multiespecífica, vigorosa e sustentada, enquanto a ativação da resposta Th2 parece favorecer a cronificação da infecção (CRAMP *et al.*, 2000; DAY *et al.*, 2002; THIMME *et al.*, 2001; TSAI *et al.*, 1997). Embora importante para a resolução da infecção durante a fase aguda e para o controle da infecção em sua fase crônica, a presença de citocinas Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α) e a ação dos linfócitos T citotóxicos parecem estar relacionadas à inflamação, necrose e fibrose cicatricial hepática (BANNER *et al.*, 1997; FAN *et al.*, 1998; HIROISHI *et al.*, 1997; LEROY *et al.*, 2003; NAPOLI *et al.*, 1996).

Técnicas de imuno-histoquímica mostram que 1 a 10% dos hepatócitos estão infectados em algum momento (HIRAMATSU *et al.*, 1992; NOURI-ARIA *et al.*, 1995), mas a ação dos linfócitos T citotóxicos, por meio de FasL, TNF- α e perforina, pode levar à morte também células hepáticas não infectadas, ampliando o potencial de dano hepatocelular (ANDO *et al.*, 1997). As citocinas Th2 inibem os efeitos deletérios da resposta citotóxica e podem ter papel de proteção ao hospedeiro contra as conseqüências deletérias das células Th1 (JACOBSON BROWN; NEUMAN, 2001). Desta forma, a resposta Th2 atuaria de maneira a proteger o fígado, reduzindo o dano hepatocelular, embora diminuiria também a chance de eliminação do vírus, resultando em cronificação na maior parte dos pacientes infectados (TSAI *et al.*, 1997).

2.3 Citocinas e fibrogênese

A fibrogênese hepática é desencadeada principalmente a partir da ativação das células hepáticas estreladas que se convertem de células peri-sinusoidais quiescentes, ricas em vitamina A para células proliferativas, contráteis e fibrogênicas (IREDALE, 2003). As células estreladas ativadas secretam maiores quantidades de substâncias que compõem a matriz extracelular, como colágeno (I, III, IV, VI, XIV, XVIII), proteoglicanos, proteínas ácidas secretadas ricas em cisteína (SPARC) e glicoproteínas (fibronectina, laminina) (FRIEDMAN, 1999). Essas substâncias se acumulam no interstício e, com o passar do tempo, podem subverter a arquitetura lobular e prejudicar a função hepática. Além do aumento da quantidade, há alteração também na qualidade do colágeno secretado pelas células estreladas, que passam de colágeno IV e VI (não formadores de fibrila) para I e III (formadores de fibrila), que contribuem para uma ativação ainda maior das células estreladas (FRIEDMAN, 1999).

O fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) parece ser a mais potente citocina fibrogênica (BLOBE; SCHIEMANN, 2000; GUTIERREZ-RUIZ; GOMEZ-QUIROZ, 2007). Ele é secretado principalmente pela própria célula estrelada (efeito autócrino), mas é também produzido por macrófagos hepáticos (células de Kupffer) ativados (FRIEDMAN, 1999). As células de Kupffer têm participação fundamental no desencadeamento da fibrogênese e seu acúmulo no fígado precede a ativação das células estreladas (FRIEDMAN, 1999). As células endoteliais, plaquetas e os próprios hepatócitos também reagem à agressão hepática, secretando, além do TGF- β , substâncias como fibronectina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e peróxidos lipídicos que também estimulam a ativação das células estreladas (FRIEDMAN, 1999).

A degradação da matriz extracelular é regulada por metaloproteinases (MMP), por enzimas que ativam MMP latentes (plasmina, estromelisina e MMP tipo membrana) e por inibidores específicos tissulares das MMP (TIMP) - (FRIEDMAN, 1999; GUTIERREZ-RUIZ; GOMEZ-QUIROZ, 2007). As células estreladas e as células de Kupffer, principais envolvidas no processo de fibrogênese, contribuem para a degradação da matriz extracelular, secretando MMP.

2.4 Marcadores inflamatórios solúveis de alterações histológicas hepáticas

O dano hepatocelular na hepatite C crônica resulta principalmente da resposta imunocelular Th1 (NAPOLI *et al.*, 1996; SOBUE *et al.*, 2001), que é também o principal fator de progressão da fibrose hepática (GHANY *et al.*, 2003). A resposta Th1 está muito ativada em pacientes com infecção crônica pelo HCV e os LTC, na tentativa de clarear a infecção, acabam desempenhando importante papel na destruição hepatocitária (CHANG; REHERMANN; CHISARI, 1997; WEJSTAL, 1995). A avaliação da intensidade da ativação imune a partir da dosagem periférica de marcadores inflamatórios solúveis pode, portanto, auxiliar na predição de dano hepático.

2.4.1 Quimiocinas e doença hepática

As quimiocinas constituem um subgrupo de pequenas citocinas envolvidas na quimiotaxia leucocitária e importantes na regulação do equilíbrio das respostas Th1/Th2 (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1997; CHARO; RANSOHOFF, 2006; GERARD; ROLLINS, 2001; KUNKEL, 1999; LUSTER, 1998; MACKAY, 1997; ONO *et al.*, 2003). A partir de um processo denominado haptotaxia, os leucócitos se movem em direção a concentrações mais altas de quimiocinas e migram para locais de infecção ou são direcionados aos linfonodos. Além da quimioatração, as quimiocinas também estão envolvidas na ativação leucocitária, diferenciação linfocitária, angiogênese e fibrogênese (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1997; CHARO; RANSOHOFF, 2006; GERARD; ROLLINS, 2001; KUNKEL, 1999; LUSTER, 1998; MACKAY, 1997; ONO *et al.*, 2003).

Mais de 50 quimiocinas já foram identificadas e agrupadas em quatro subfamílias de acordo a posição dos pares de resíduos de cisteína em sua estrutura (ROT; VON ANDRIAN, 2004). As duas subfamílias mais importantes são a CC, a maior delas, na qual os primeiros dois resíduos de cisteína (C) são adjacentes; e a CXC, que possuiu esses resíduos de cisteína separados por um aminoácido (X). As quimiocinas são denominadas de acordo com a subfamília, seguidas da letra L (ligante) e de um número corresponde ao gene que a codifica (ex: CCL5 ou CXCL10). A nomenclatura dos receptores de quimiocinas segue a mesma regra, com a substituição da letra L pela letra R (receptor) - (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000). Ressalta-se que, embora os receptores sejam

específicos para quimiocinas de determinadas subfamílias, cada receptor geralmente se liga a mais de uma quimiocina.

Em processos inflamatórios crônicos, as quimiocinas CC são importantes para a atração de monócitos para os locais de inflamação, enquanto as da subfamília CXC parecem ser mais importantes na atração de linfócitos T ativados (CHARO; RANSOHOFF, 2006; LUSTER, 1998; ROLLINS, 1997). Como a resposta Th1 está particularmente envolvida no dano hepatocelular de pacientes com hepatite C crônica, existe especial interesse nas quimiocinas que se ligam aos receptores CCR5 e CXCR3, expressos em células inflamatórias relacionadas a esse tipo de resposta (BONECCHI *et al.*, 1998; QIN *et al.*, 1998). Entre essas quimiocinas, destacam-se a CCL2 (*monocyte chemotactic protein-1*, MCP-1), CCL3 (*macrophagic inflammatory protein 1 alpha*, MIP-1 alpha), CCL4 (*macrophagic inflammatory protein 1 beta*, MIP-1beta), CCL5 (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*, RANTES), CXCL9 (*monokine induced by ifn-gamma*, MIG) e CXCL10 (*interferon-gamma inducible protein*, IP-10).

No fígado, as quimiocinas são produzidas principalmente por monócitos ativados, células de Kupffer, células endoteliais e hepatócitos (APOLINARIO; GARCIA-MONZON, 2003; KOZIEL, 1999). Em consonância com a predominância de uma resposta imune Th1, as células endoteliais dos tratos portais de pacientes infectados pelo HCV secretam CCL3, CCL4 e CCL5, enquanto os linfócitos que os infiltram expressam intensamente o receptor CCR5 (SHIELDS *et al.*, 1999). As quimiocinas CXCL9 e CXCL10 são expressas principalmente pelos hepatócitos e associam-se com a infiltração intra-hepática de linfócitos que apresentam receptor CXCR3 (ZEREMSKI *et al.*, 2008).

A expressão desses receptores de quimiocinas em linfócitos T intra-hepáticos parece associar-se à lesão hepatocelular. Larrubia *et al.* (2007) mostraram que a maioria dos LTC infiltrando o fígado apresentava fenótipo com elevada expressão de CCR5 e CXCR3 e que esta expressão associou-se à atividade inflamatória hepática periportal e lobular. Reforçando a importância do CCR5 na patogênese da doença, pacientes com hepatite C crônica evidenciando mutações que resultam em um CCR5 menos funcional têm menos inflamação hepática (GOULDING *et al.*, 2005; HELLIER *et al.*, 2003).

Embora relevante para a compreensão dos mecanismos de inflamação hepática na hepatite C crônica, a avaliação da expressão intra-hepática de quimiocinas e/ou de receptores linfocitários é tecnicamente difícil e não pode ser amplamente utilizada. Por outro lado, os níveis de quimiocinas podem ser medidos com mais facilidade no soro ou plasma usando-se técnicas imunoenzimáticas padronizadas e comercialmente disponíveis.

Os níveis de quimiocinas periféricas geralmente refletem um excedente da produção nos locais de inflamação e são interpretados como marcadores indiretos da atividade inflamatória local (BUTERA *et al.*, 2005). O papel *in vivo* das quimiocinas na circulação periférica ainda não está estabelecido. Embora possam representar apenas subprodutos não-funcionais, alguns autores têm especulado que essas quimiocinas séricas ou plasmáticas poderiam antagonizar a migração leucocitária, regulando negativamente os receptores na membrana dos leucócitos (LARRUBIA *et al.*, 2007) e/ou interferindo no gradiente de sinalização responsável pela quimiotaxia dos leucócitos periféricos (CLARK-LEWIS *et al.*, 2003; HECHTMAN *et al.*, 1991).

Apesar do papel incerto das quimiocinas circulantes e embora elas possam refletir também produção extra-hepática (BUTERA *et al.*, 2005), a utilização dos níveis periféricos desse subgrupo de citocinas como marcadores de dano hepatocelular em pacientes com hepatite C crônica vem sendo amplamente estudada.

A associação entre níveis de CXCL10 circulante e infecção pelo HCV foi inicialmente demonstrada em 1997 (NARUMI *et al.*, 1997) em um estudo que ressaltou aumento dos níveis séricos dessa quimiocina em portadores crônicos do HCV comparados aos encontrados em voluntários sadios. Estudos adicionais revelaram que, além de estarem elevados (BUTERA *et al.*, 2005), os níveis de CXCL10 periféricos (tanto séricos quanto plasmáticos) estiveram associados de forma dose-resposta a inflamação e fibrose hepáticas (APOLINARIO *et al.*, 2004; HARVEY *et al.*, 2003). No fígado infectado pelo HCV, a CXCL10 é produzida por células linfóides, hepatócitos e células endoteliais sinusoidais em resposta ao interferon- γ , TNF- α e às proteínas do HCV como a NS5A e proteína core (APOLINARIO *et al.*, 2005; NARUMI *et al.*, 1997; NARUMI *et al.*, 2000; ZEREMSKI *et al.*, 2008). Além de atrair monócitos e células T, a CXCL 10 influencia também na fibrogênese. As células estelares hepáticas (HSC), protagonistas do processo de fibrogênese hepática (IREDALE, 2003), expressam CXCR3 e migram seguindo um gradiente de CXCL10 (BONACCHI *et al.*, 2001).

A expressão intra-hepática de CXCL9, uma quimiocina que se liga ao mesmo receptor da CXCL10 e que tem funções semelhantes, está também aumentada em pacientes com hepatite C e correlaciona-se com inflamação e fibrose hepática (APOLINARIO *et al.*, 2002; SHIELDS *et al.*, 1999; ZEREMSKI *et al.*, 2008). Níveis periféricos de CXCL9 também estiveram significativamente elevados entre pacientes com hepatite C crônica se comparados a controles sadios (APOLINARIO *et al.*, 2004; BUTERA *et al.*, 2005).

Níveis periféricos de outras quimiocinas da subfamília CXC, como CXCL8 (interleukin-8, IL-8) e CXCL11 (interferon-gamma inducible protein-9, IP-9), também estão aumentados em pacientes com hepatite C (APOLINARIO *et al.*, 2002; BUTERA *et al.*, 2005). A expressão de CXCL8 é estimulada pela presença intracelular de proteínas virais não-estruturais (e.g. NS5A) - (WERTHEIMER *et al.*, 2007) e, além de atuar como quimiocina pró-inflamatória, exerce efeito pró-viral a partir da inibição da atividade antiviral do interferon (KHABAR *et al.*, 1997; POLYAK *et al.*, 2001a; 2001b). Alguns autores demonstraram que os níveis séricos de CXCL8 aumentam significativamente em pacientes com atividade histológica mais intensa e estão ainda mais elevados naqueles apresentando cirrose hepática (KAPLANSKI *et al.*, 1997; NEUMAN *et al.*, 2007). Mais recentemente, Tachibana *et al.* (2007) também salientaram a correlação entre níveis desta quimiocina e progressão da doença hepática, enfocando o aparecimento de carcinoma hepatocelular. Esses autores foram capazes de demonstrar significativo aumento dos níveis séricos de CXCL8 entre pacientes com carcinoma hepatocelular, especialmente entre aqueles com metástases à distância, sugerindo que a expressão dessa quimiocina estaria aumentada a partir da transformação maligna dos hepatócitos (TACHIBANA *et al.*, 2007).

Em relação a quimiocinas da subfamília CC, a expressão intra-hepática de CCL5 está aumentada, especialmente nas áreas periportais, e associa-se significativamente ao grau de inflamação hepática e aos níveis de aminotransferases (APOLINARIO *et al.*, 2002; KUSANO *et al.*, 2000; NISCHALKE *et al.*, 2004; SHIELDS *et al.*, 1999). Níveis séricos de CCL5 foram também associados ao índice de atividade histológica (HAI) em pacientes com hepatite C crônica (NEUMAN *et al.*, 2007). A importância dos níveis intra-hepáticos de CCL21 (BONACCHI *et al.*, 2003) e séricos de CCL20 (YAMAUCHI *et al.*, 2002) na inflamação hepática e na modulação de fibrose em pacientes com hepatite C crônica já foi também demonstrada.

2.4.2 Fator de necrose tumoral, seus receptores solúveis e dano hepatocelular

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória com importante papel nas respostas aguda e crônica às infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias (BRADLEY, 2008). O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos ativado durante a reação inflamatória que se segue ao reconhecimento de antígenos virais,

mas o estímulo exato para sua produção aumentada na infecção pelo HCV ainda não foi claramente definido (RADKOWSKI *et al.*, 2004).

A bioatividade do TNF- α é desencadeada por sua ligação a receptores celulares específicos (TNF-R), TNF-R1 (p55) e TNF-R2 (p75) - (BRADLEY, 2008), que diferem em peso molecular, localização e função (GEHR *et al.*, 1992; WARE *et al.*, 1991). Enquanto o TNFR1 se distribui amplamente nas células do corpo, o TNFR2 restringe-se a células de origem hematopoiética. O TNFR1 faz a mediação da maioria das repostas celulares induzidas pelo TNF- α , incluindo ativação da transcrição de fatores como o NF- κ B e apoptose (KALLINOWSKI *et al.*, 1998; LIU; HAN, 2001).

Esses receptores de membrana podem sofrer clivagem proteolítica e se tornar receptores solúveis que se ligam ao TNF- α circulante e inibem sua atividade (ENGELMANN; NOVICK; WALLACH, 1990; NOPHAR *et al.*, 1990; OLSSON *et al.*, 1989; SECKINGER; ISAAZ; DAYER, 1989; WANG *et al.*, 2003). Essa inibição é o resultado da competição entre receptores de membrana e receptores solúveis pela ligação ao TNF- α e tem importante papel regulador da bioatividade do TNF- α (ADERKA, 1996). Receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) são liberados por neutrófilos e células T ativadas, células mononucleares e fibroblastos (PORTEU; NATHAN, 1990; PORTEU *et al.*, 1991; PORTEU; HIEBLOT, 1994;) em resposta a diferentes substâncias como produtos virais ou bacterianos e diversas citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-6), incluindo o próprio TNF- α (JOYCE *et al.*, 1994; LANTZ *et al.*, 1990; LIEN *et al.*, 1995; PORTEU; NATHAN, 1990).

O TNF- α está envolvido na patogênese de diversas condições hepáticas, incluindo as hepatites virais (KALLINOWSKI *et al.*, 1998; YOSHIOKA *et al.*, 1989). Em pacientes com hepatite C, o TNF- α é um indutor de apoptose em hepatócitos infectados (KOUNTOURAS; ZAVOS; CHATZOPOULOS, 2003) e pode também ser responsável pelo dano causado pelos LTCs aos hepatócitos circunvizinhos não-infectados (KAPLANSKI *et al.*, 1997).

Os níveis séricos de TNF- α correlacionam-se bem com seu padrão imunohistoquímico hepático, sugerindo que os níveis periféricos dessa citocina possam ser usados como marcadores indiretos da sua expressão local, em pacientes com hepatite C crônica (NEUMAN *et al.*, 2007). Níveis séricos de TNF- α estão significativamente mais elevados entre pacientes com hepatite C crônica, se comparados a voluntários sadios (NEUMAN *et al.*, 2001), e estão positivamente associados aos valores de aminotransferases (HASSAN *et al.*, 2007) e à intensidade de inflamação e fibrose hepática

(TILG; VOGEL; DINARELLO, 1995). Mesmo pacientes com inflamação hepática leve apresentam níveis elevados de TNF séricos, sugerindo que essa citocina pode ser utilizada como marcador sensível de inflamação hepática (NEUMAN *et al.*, 2002c). Níveis séricos elevados de TNF- α também estiveram associados à esteatose hepática, possivelmente devido à sua correlação inversa com níveis de adiponectina, um importante regulador do conteúdo lipídico hepático (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2006).

Níveis circulantes de sTNFR parecem refletir ativação do sistema TNF (DIEZ-RUIZ *et al.*, 1995), embora não esteja claro se esses receptores solúveis provêm do fígado e/ou de células mononucleares periféricas (KALLINOWSKI *et al.*, 1998). Como o sTNFR tem mais estabilidade e maior meia-vida que o TNF circulante, tem sido considerado melhor marcador de atividade inflamatória (VAN ZEE *et al.*, 1992).

Assim como em relação ao TNF, os níveis séricos dos receptores solúveis dessa citocina (sTNFR1 e sTNFR2) também se associaram de maneira significativa aos níveis de aminotransferases e ao grau de inflamação e fibrose hepática em diversos estudos envolvendo pacientes com hepatite C crônica (ITOH *et al.*, 1999; KAKUMU *et al.*, 1997; KALLINOWSKI *et al.*, 1998; ZYLBERBERG *et al.*, 1999).

2.5 Tratamento na hepatite C crônica

O tratamento atual dos pacientes com hepatite C crônica é baseado na combinação de interferon- α (IFN- α), em sua forma convencional ou peguilada, e ribavirina (RBV), por 24 a 48 semanas, dependendo do genótipo viral (BRASIL, 2007; DE ARAUJO *et al.*, 2007; STRADER *et al.*, 2004).

O IFN- α exógeno age de maneira similar ao endógeno por meio da indução de genes estimulados pelo interferon (ISGs), que estabelecem um estado antiviral no interior das células (FELD; HOOFNAGLE, 2005; TILG, 1997). Além dessa atividade antiviral, o IFN- α fortalece tanto a resposta imune inata quanto a adquirida de interações com linfócitos T, células NK e células dendríticas (TILG, 1997).

A ribavirina é um análogo de guanosina que parece atuar como um agente antiviral principalmente por meio da indução de mutagênese do HCV, resultando em baixa aptidão replicativa (FELD; HOOFNAGLE, 2005). A ribavirina parece atuar também como imunomoduladora, alterando o balanço Th1/Th2 em favor de uma resposta Th1 (TAM *et al.*, 1999).

Resposta virológica sustentada (RVS), ou seja, HCV RNA sérico indetectável 24 semanas após o término do tratamento, é observada em quase a metade dos pacientes tratados. Fatores como idade, genótipo, carga viral e índice de massa corpórea interferem na taxa de resposta (FRIED *et al.*, 2002; MANNS *et al.*, 2001). O desfecho do tratamento da hepatite C parece ser influenciado também pela capacidade da resposta imunocelular de controlar a replicação viral. Uma resposta Th1 precoce parece ser importante para o clareamento viral durante a hepatite C aguda (GUIDOTTI; CHISARI, 2001; KAMAL *et al.*, 2004; REHERMANN; NASCIMBENI, 2005) e uma resposta de células T HCV-específicas também está associada à resposta terapêutica entre pacientes cronicamente infectados (CRAMP *et al.*, 2000; KAMAL *et al.*, 2002; 2004; NELSON *et al.*, 1998).

2.5.1 Associação entre níveis de quimiocinas e resposta ao tratamento da hepatite C crônica

A atividade intra-hepática dos linfócitos T citotóxicos é fundamental na resposta terapêutica de pacientes com hepatite C crônica (NELSON *et al.*, 1998) e, desta forma, as quimiocinas envolvidas na atração dessas células para o fígado podem desempenhar importante papel na erradicação do HCV.

Como já mencionado, as quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5, mediante sua interação com o receptor CCR5 presente nos leucócitos, são importantes na resposta imune ao HCV. Uma expressão reduzida de CCR5 reduz a resposta de citocinas Th1 em pacientes com hepatite C crônica (LECHNER *et al.*, 2000; WOITAS *et al.*, 1997) e pode, portanto, prejudicar a resposta terapêutica. A expressão de CCR5 é positivamente regulada pelo interferon (YANG *et al.*, 2001) e inibida pela proteína viral de envelope E2 (NATTERMANN *et al.*, 2004).

Para compreender melhor o papel do CCR5 no tratamento de pacientes com hepatite C crônica, alguns estudos foram conduzidos com indivíduos apresentando mutações que impedem a expressão funcional desse receptor. Esses estudos referenciaram que a mutação CCR5-Delta 32 esteve associada à menor resposta à monoterapia com IFN (AHLENSTIEL *et al.*, 2003), embora essa diferença não tenha sido observada quando o interferon foi utilizado em combinação com a ribavirina (GLAS *et al.*, 2003).

As células Th1 efetoras também expressam o receptor CXCR3 (VON ANDRIAN; MACKAY, 2000) e um aumento dos LTCs com alta expressão desse receptor

está associado a melhores taxas de resposta virológica sustentada (LARRUBIA *et al.*, 2007). Esta última pesquisa também demonstrou que todos os pacientes que falharam em aumentar os níveis de LTC com elevada expressão de CXCR3 depois de 24 semanas de tratamento também falharam em obter resposta virológica sustentada (LARRUBIA *et al.*, 2007).

A quimiocina CXCL10, um ligante do CXCR3, está associada à resposta terapêutica de pacientes com hepatite C crônica. Níveis periféricos pré-tratamento de CXCL10 estiveram inversamente associados à resposta à terapia tanto com interferon em monoterapia (BUTERA *et al.*, 2005) como em combinação com a ribavirina (APOLINARIO *et al.*, 2004; DIAGO *et al.*, 2006). A associação entre os níveis periféricos de CXCL10 e desfecho terapêutico foi demonstrada tanto para interferon convencional (NARUMI *et al.*, 1997) quanto para o peguilado (APOLINARIO *et al.*, 2004; BUTERA *et al.*, 2005; LAGGING *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2006), com níveis mais elevados encontrando-se significativamente associados a piores respostas terapêuticas. Essa associação foi constatada tanto para resposta virológica rápida quanto para resposta virológica sustentada (LAGGING *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2006). Dois estudos diferentes mostraram que níveis periféricos de CXCL10 superiores a 600 pg/mL apresentaram valor preditivo negativo para RVS de aproximadamente 80% e que alcançou 100% em pacientes difíceis de serem tratados (e.g. alto índice de massa corpórea e alta carga viral) - (LAGGING *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2006).

Níveis séricos de CXCL10 durante o tratamento também foram preditores de resposta terapêutica. Narumi *et al.* (1997) relataram que uma redução dos níveis de CXCL10 precedeu a resposta terapêutica e que aqueles com resposta virológica sustentada normalizaram completamente seus níveis. Pacientes que não eliminaram o HCV após o tratamento mantiveram níveis elevados de CXCL10, em comparação aos encontrados em respondedores virológicos, mesmo que tenham normalizado as aminotransferases, isto é, que tenham apresentado resposta bioquímica (ITOH *et al.*, 2001).

Diferentes teorias têm sido apresentadas para explicar a relação entre níveis elevados de CXCL10 e baixas taxas de resposta. Níveis elevados de CXCL10 periférico poderiam prejudicar o gradiente de sinalização tanto de CXCL10 quanto de CCL5 (BUTERA *et al.*, 2005) ou poderiam regular negativamente receptores CCR5 em LTC circulantes (LARRUBIA *et al.*, 2007). Uma explicação diferente foi proposta por Diago *et al.* (2006), que sugeriram que os níveis elevados de CXCL10 poderiam resultar em acúmulo de células T efectoras no fígado. Esse acúmulo resultaria em aumento da pressão

seletiva do HCV, promovendo o aparecimento de maior número de mutantes do HCV passíveis de escape da resposta imune, que seriam de mais difícil erradicação com a terapia específica (DIAGO *et al.*, 2006).

Outros dois ligantes do CXCR3 - CXCL9 e CXCL11 - também foram avaliados como preditores de resposta ao tratamento em pacientes com hepatite C crônica. Níveis plasmáticos de CXCL9 apresentaram redução significativa em pacientes com RVS, mas os níveis pré-tratamento não se associaram às taxas de resposta (BUTERA *et al.*, 2005). Os mesmos autores não referiram associação entre níveis plasmáticos pré-tratamento de CXCL11 e resposta terapêutica nem alterações dos níveis durante o tratamento (BUTERA *et al.*, 2005).

CXCL8, uma quimiocina que se liga aos receptores CXCR1 e CXCR2, está envolvida na inibição da ação do interferon. Possivelmente devido a essa ação inibitória, níveis séricos de CXCL8 mais elevados associaram-se à falha na resposta à terapia antiviral em pacientes com hepatite C crônica (MIHM *et al.*, 2004; NEUMAN *et al.*, 1999; POLYAK *et al.*, 2001b).

A cinética das quimiocinas CC durante tratamento de pacientes com hepatite C crônica também foi investigada. Yamauchi *et al.* (2002) descreveram níveis séricos de CCL20 aumentados duas semanas após o início de monoterapia com interferon entre respondedores, enquanto os não-respondedores não manifestaram mudança significativa nos níveis séricos dessa quimiocina. Entretanto, os níveis de CCL20 pré-tratamento foram similares comparando respondedores e não-respondedores, não sendo úteis como preditores de resposta terapêutica (YAMAUCHI *et al.*, 2002).

O papel do CCL2 e de seu receptor, CCR2, como preditores de resposta terapêutica entre pacientes com hepatite C ainda não foi bem esclarecido. Um estudo demonstrou associação entre a cinética dos níveis séricos de CCL2 e taxas de resposta virológica (PANASIUK; PROKOPOWICZ; PANASIUK, 2004), mas outra pesquisa falhou em verificar qualquer associação da resposta virológica com polimorfismos do gene CCL2 e CCR2 (MONTES-CANO *et al.*, 2007).

2.5.2 TNF- α , seus receptores solúveis e resposta terapêutica na hepatite C crônica

O TNF- α parece não estar diretamente envolvido na eliminação do HCV, pois não interfere na síntese protéica ou de RNA do vírus (FRESE *et al.*, 2003). Entretanto,

sabe-se que a síntese de TNF- α é suprimida pelo IFN- α durante o tratamento (ABU-KHABAR; ARMSTRONG; HO, 1992) e essa supressão parece ser um dos mecanismos pelo qual a normalização das aminotransferases pode ocorrer durante o tratamento, mesmo com a persistência da infecção (FABRIS *et al.*, 1999).

Em pacientes com hepatite C crônica recebendo terapia combinada com IFN- α e ribavirina, os níveis séricos de TNF- α reduziram-se significativamente ao final do tratamento e esse declínio acompanhou aquele observado nos níveis de aminotransferases (NEUMAN *et al.*, 2001). Entre os respondedores, os níveis de TNF- α sustentaram-se em valores mais baixos durante o acompanhamento pós-tratamento, enquanto entre os recidivantes retornaram àqueles encontrados antes do tratamento. A queda de TNF- α foi mais acentuada ao final do tratamento entre os que receberam terapia combinada se comparados àqueles que receberam IFN- α em monoterapia (NEUMAN *et al.*, 2002b).

A avaliação dos níveis pré-tratamento do TNF- α parece ser também útil na predição de resposta terapêutica. Pacientes com níveis séricos de TNF- α pré-tratamento mais baixos (NEUMAN *et al.*, 1999) ou menores níveis pré-tratamento de expressão do TNF- α em células mononucleares periféricas (PBMC) - (LARREA *et al.*, 1996) apresentaram melhores taxas de resposta ao tratamento com IFN- α . Um estudo conduzido por Zein *et al.* (2005) usando etanercept, um antagonista TNF- α , nas primeiras 24 semanas de tratamento com IFN- α e ribavirina, resultou em taxas de respostas mais altas durante o tratamento.

Ressalta-se que o papel dos níveis de TNF- α como preditores ainda precisa ser mais bem compreendido, já que um outro trabalho não mostrou diferença entre os níveis pré-tratamento de TNF- α entre respondedores e não-respondedores à monoterapia com IFN- α (KALLINOWSKI *et al.*, 1998).

Em relação aos receptores solúveis de TNF (sTNFR), sua influência na homeostasia do sistema TNF pode contribuir para a ação antiinflamatória do IFN- α . Na infecção pelo vírus da hepatite B, níveis séricos elevados de sTNFR antes da terapia com interferon associaram-se a sucesso terapêutico (MARINOS *et al.*, 1995). Na hepatite C, o papel do sTNFR não está ainda bem esclarecido. Um aumento dos níveis de sTNFR, especialmente no sTNFR1, ocorre poucas horas após administração de IFN- α (TILG; VOGEL; DINARELLO, 1995), mas este aumento parece ser temporário, não sendo encontradas alterações nos níveis séricos tanto de sTNFR1 quanto de sTNFR2 três meses após o início de monoterapia com este medicamento (ZYLBERBERG *et al.*, 1999). Doze meses após o término de monoterapia com IFN- α , os níveis de sTNFR2 reduziram-se em

indivíduos com resposta sustentada, enquanto os níveis entre os não-respondedores permaneceram inalterados (ITOH *et al.*, 1999). Entretanto, os níveis séricos pré-tratamento de sTNFR1 ou sTNFR2 não foram capazes de prever resposta virológica em pacientes tratados em monoterapia com IFN- α (KALLINOWSKI *et al.*, 1998).

Considerando as características do sTNFR, que incluem maior estabilidade na circulação periférica, pesquisas adicionais são necessárias para melhor compreender o papel do sTNFR na predição de resposta terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos principais

- Analisar a associação dos níveis plasmáticos de quimiocinas e receptores solúveis de fator de necrose tumoral com atividade necro-inflamatória e fibrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.
- Analisar a associação dos níveis plasmáticos pré-tratamento de quimiocinas e receptores solúveis de fator de necrose tumoral com resposta virológica ao tratamento com interferon e ribavirina em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

3.2 Objetivos secundários

- Identificar fatores clínicos, epidemiológicos, bioquímicos e virológicos associados à atividade necro-inflamatória e fibrose hepática nos pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.
- Identificar fatores clínicos, epidemiológicos, bioquímicos e virológicos associados à resposta de pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C ao tratamento com interferon e ribavirina.
- Analisar a cinética dos níveis plasmáticos de quimiocinas e receptores solúveis de fator de necrose tumoral após início do tratamento com interferon e ribavirina e sua associação com resposta virológica em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

4 PACIENTES E MÉTODOS

41 Desenho

Trata-se de estudo observacional, coorte prospectivo, com coleta de dados realizada entre junho de 2005 e junho de 2008. A inclusão de pacientes ocorreu de junho de 2005 a dezembro de 2007, período no qual pacientes consecutivos com infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV), atendidos em consultas de acompanhamento no Ambulatório de Hepatites do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas (CTR-DIP) Orestes Diniz, foram triados pelos pesquisadores do estudo (FIG. 1). Os pacientes que preencheram critérios de elegibilidade nessa avaliação de triagem foram convidados a participar da pesquisa e os que aceitaram, após lerem e assinarem termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), tiveram amostras plasmáticas analisadas em relação à concentração dos seguintes marcadores inflamatório solúveis: CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, CXCL9 e CXCL10, sTNFR1 e sTNFR2. Dados sociodemográficos e clínicos foram obtidos pela revisão de prontuário e complementados por entrevista aplicada logo após a consulta clínica.

Realizou-se análise transversal da associação entre os níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios solúveis e o grau de atividade necro-inflamatória e de fibrose presentes em fragmento de biópsia hepática. Procedeu-se à análise longitudinal da associação entre resposta terapêutica e os mesmos marcadores inflamatórios anteriormente descritos, dosados em amostras plasmáticas coletadas antes do início do tratamento, na 12^a semana de tratamento e ao seu final.

Para constituírem o grupo-controle, acompanhantes de pacientes vinculados ao serviço e estudantes de Medicina que atendiam aos critérios de elegibilidade foram convidados a participar. Aqueles que aceitaram, após lerem e assinarem termo de consentimento livre e esclarecido, foram submetidos à coleta de sangue para dosagem plasmática dos mesmos marcadores inflamatórios analisados nos pacientes com hepatite C crônica.

4.2 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) Orestes Diniz, unidade da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte conveniada com a Universidade Federal de Minas Gerais e considerada uma das principais referências públicas do estado de Minas Gerais no atendimento ambulatorial de infectologia.

Os pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do CTR-DIP são encaminhados de hemocentros, unidades básicas de saúde e unidades de referência secundária de todo o estado. De acordo com a rotina do Ambulatório, na primeira consulta de pacientes com sorologia positiva para HCV são solicitados os seguintes exames: hemograma, perfil hepático, função renal, glicemia jejum, três amostras de exame parasitológico de fezes para avaliação de esquistossomose mansônica, ultra-sonografia abdominal, sorologias para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite A e hepatite B, pesquisa de auto-anticorpos (fator antinuclear, anticorpo antimúsculo liso, antimitocôndria) e avaliação da presença de RNA plasmático do HCV por técnica de reação em cadeia da polimerase qualitativa (AMPLICOR[®], Roche Molecular Systems), com limite de detecção de 50 UI/mL. O exame de genotipagem, realizado pela análise comparativa da seqüência obtida de 172 nucleotídeos (nt: 92 a 263) com seqüências de referência dos genótipos do HCV (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4a, 5a e 6a), é realizado em todos os casos nos quais a infecção pelo HCV é confirmada. A quantificação do RNA viral plasmático por técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (AMPLICOR[®], Roche Molecular Systems), com limite de detecção entre 600 UI/mL e 850.000 UI/mL, é realizada em pacientes com genótipo 1, que são submetidos a tratamento. A biópsia hepática percutânea, guiada por ultra-som com agulha tru-cut, é indicada para todos os pacientes com infecção crônica pelo HCV que não apresentem contra-indicação ao procedimento e, ou, que não se manifestem contrários à sua realização.

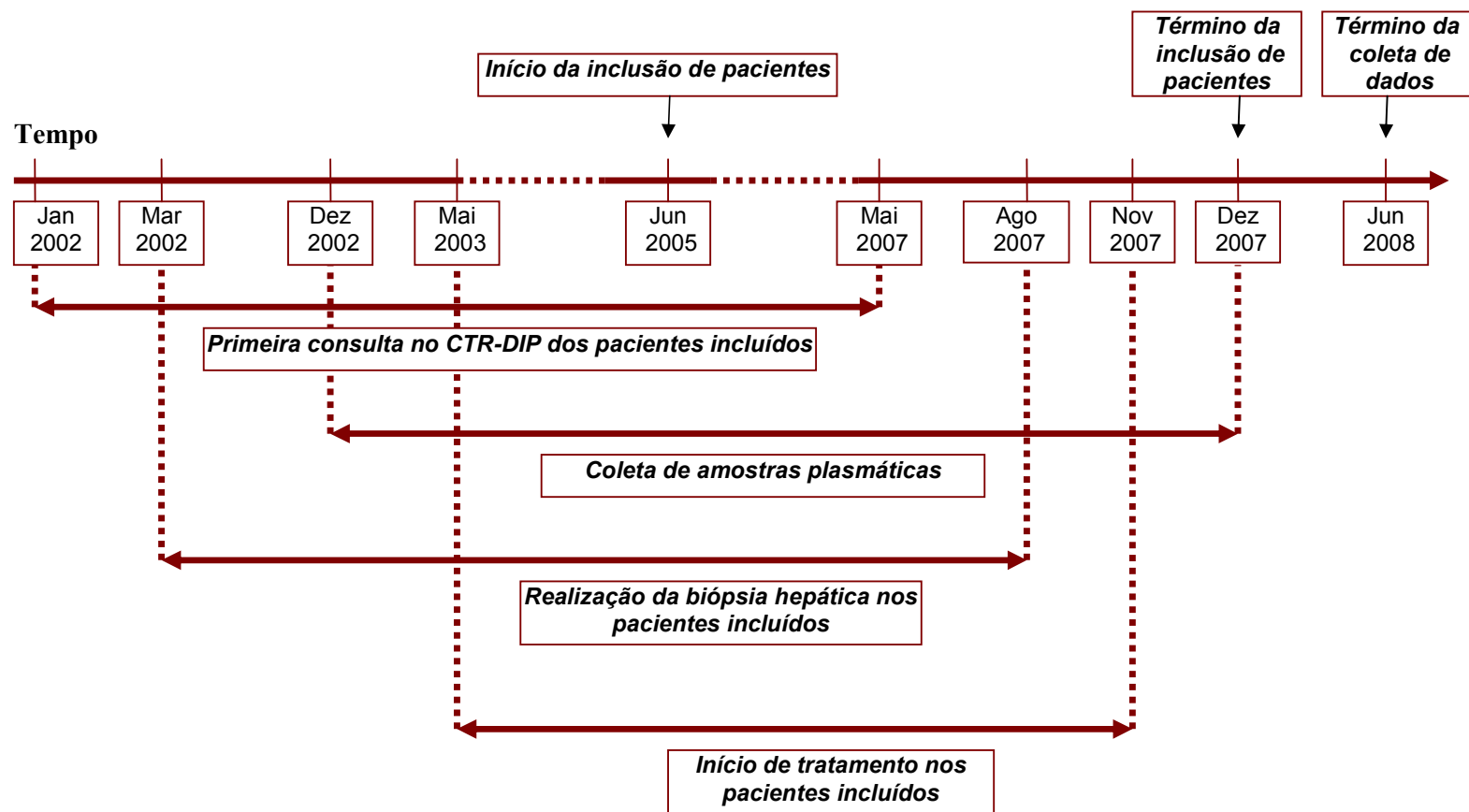


FIGURA 1 - Desenho cronológico do estudo “Marcadores inflamatórios solúveis como preditores de alterações histológicas hepáticas e resposta terapêutica na infecção crônica pelo vírus da hepatite C”, Belo Horizonte, MG, 2002-2007.

4.3 Obtenção e armazenamento das amostras de plasma

As amostras de plasma utilizadas foram coletadas no CTR-DIP Orestes Diniz ou no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG (NUPAD-UFMG). Após a coleta, as amostras foram prontamente enviadas para centrifugação, alíquotagem e armazenamento à temperatura de -70°C no laboratório do NUPAD, sendo descongeladas apenas no momento da análise.

O NUPAD-UFMG realiza, de maneira rotineira, a coleta de amostra plasmática para exame de biologia molecular para detecção plasmática de RNA do HCV, para genotipagem do vírus e para quantificação do RNA viral plasmático dos pacientes cadastrados no CTR-DIP Orestes Diniz. Também na própria rotina do laboratório, o excedente de plasma utilizado na realização desses exames fica armazenado à temperatura de -70°C para fins de pesquisa e, ou, controle de qualidade do laboratório.

Os pacientes com biópsia hepática realizada anteriormente ao início do estudo e cuja amostra de plasma congelada estava disponível no NUPAD-UFMG foram também convidados a participar da pesquisa. Para análise da associação entre os mediadores inflamatórios solúveis e alterações histológicas hepáticas, utilizaram-se apenas amostras plasmáticas cuja coleta não havia sido realizada há mais de 12 meses, anteriormente ou posteriormente à data de realização da biópsia hepática (FIG. 2).

Para a análise da associação entre os marcadores inflamatórios e resposta terapêutica, foram utilizados como valores pré-tratamento aqueles obtidos na análise das amostras coletadas próximo da biópsia hepática. As amostras para análise dos marcadores na 12^a semana de tratamento (pacientes com genótipo 1) e ao final do tratamento (todos os pacientes) foram coletadas no NUPAD, juntamente com a coleta do exame de biologia molecular realizada nesses dois momentos (FIG. 3).

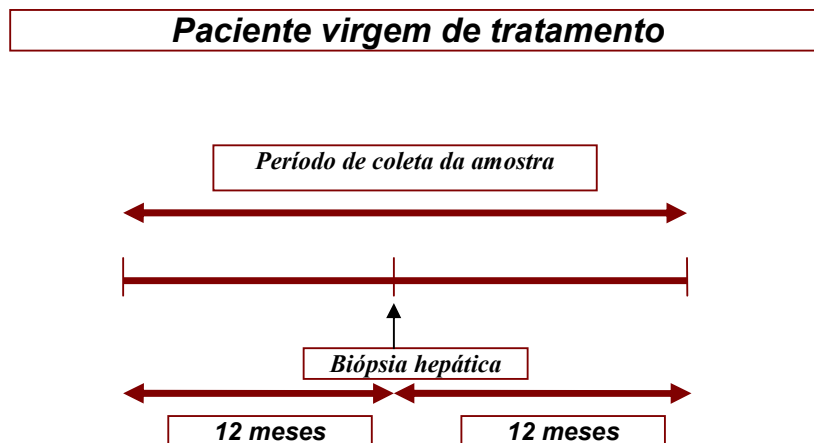


FIGURA 2 - Diagrama do momento de coleta de amostras de plasma para análise da associação entre níveis de mediadores inflamatórios solúveis e alterações histológicas hepáticas na infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

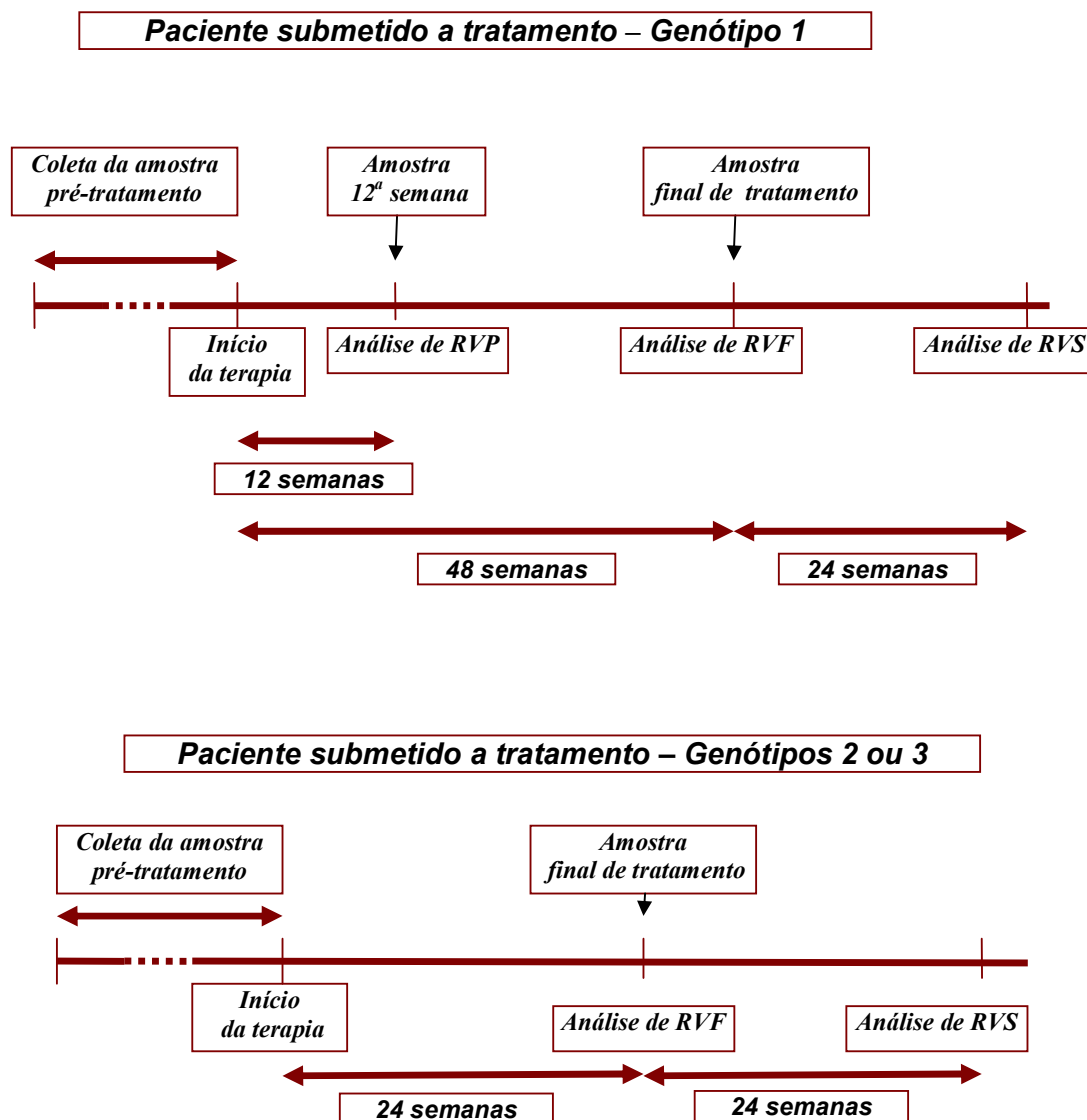


FIGURA 3 - Diagrama do momento de coleta de amostras de plasma para análise da associação entre níveis de mediadores inflamatórios solúveis e resposta virológica ao tratamento na infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV), tanto para pacientes com genótipo viral 1 do quanto para pacientes com genótipos 2 e 3.

RVP: resposta virológica precoce;
 RVF: resposta virológica ao final do tratamento;
 RVS: resposta virológica sustentada.

4.4. Mensuração dos marcadores inflamatórios solúveis

As concentrações plasmáticas de quimiocinas e de receptores solúveis de TNF foram mensuradas no Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, utilizando-se a técnica de imunoenensaio *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA).

Para a análise, as alíquotas de plasma foram deixadas em temperatura ambiente até descongelamento.

Para a dosagem de quimiocinas, o excesso de proteínas foi removido por precipitação pela adição de sal e ácido (SOUSA-PEREIRA *et al.*, 2006). Misturou-se o volume de 200 μ L de plasma a igual volume de solução contendo ácido trifluoracético a 1,2% e cloreto de sódio (NaCl) a 1,35M. Após homogeneização, essas amostras foram deixadas por sete minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante (300 μ L) foi retirado e ajustado em relação ao seu conteúdo de sal (0,14M cloreto de sódio e 0,01M fosfato de sódio) e em relação ao potencial de hidrogênio (pH, 7,4).

Para a dosagem de receptores solúveis de TNF, as amostras foram apenas diluídas em tampão fosfato-salina (PBS), não sendo necessária a remoção do excesso de proteínas.

O anticorpo de captura, na concentração fornecida pelo fabricante (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), foi diluído em PBS e adicionado a cada poço da placa. Todas as placas foram deixadas durante a noite em geladeira, a 4°C. As amostras preparadas também foram deixadas na mesma temperatura durante esse intervalo, em tubos Eppendorf.

Após incubação durante a noite, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de *Tween 20* (Sigma) a 0,05% em PBS. Em seguida, cada poço da placa foi bloqueado com BSA (albumina de soro bovino – *Bovine Serum Albumine*) a 1% em PBS e incubado por uma hora em temperatura ambiente antes de ser submetido a uma nova lavagem, igual à anterior. As amostras foram adicionadas aos poços (100 μ L/poço) e as placas foram deixadas durante a noite em geladeira, a 4°C.

No dia seguinte, as placas foram lavadas, conforme descrito, e o anticorpo de detecção, na concentração fornecida pelo fabricante, foi diluído em PBS e adicionado a cada poço. As placas, então, foram incubadas em temperatura ambiente por duas horas e, em seguida, novamente lavadas, conforme já descrito.

A cada poço adicionou-se, como substrato cromogênico, o reagente *o*-fenilenediamina e a placa foi deixada em recipiente escuro por tempo máximo de 15 minutos. Ao final desse período de repouso, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M a cada poço. A leitura foi realizada por um leitor de placas de ELISA em comprimento de onda de 492 nm (EMax[®] *Precision Microplate Reader*, *Molecular Devices*, California, CA, USA). A transferência dos dados para o computador e sua análise foram feitas pelo programa *SoftMax Pro 5* (*Molecular Devices*, California, CA, USA).

Para a dosagem de sTNFR1 e sTNFR2, foram utilizados *kits* de ELISA sanduíche (DuoSet R&D *Systems*, Minneapolis, MN, USA) com limite de detecção de 5 pg/mL. Para a dosagem de CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, CXCL9 e CXCL10 foram utilizados *kits* semelhantes, do mesmo fabricante, com limite de detecção de 10 pg/mL.

As amostras foram analisadas em duplicata e na mesma placa.

4.5 Realização e análise da biópsia hepática

A indicação de realização da biópsia hepática obedeceu à rotina de atendimento do Ambulatório de Hepatites Virais do CTR-DIP Orestes Diniz, conforme protocolo do serviço, que indica a realização do procedimento em todos os pacientes com infecção crônica pelo HCV, mesmo aqueles que apresentem aminotransferases dentro dos limites da normalidade, que não apresentem contra-indicação ao procedimento e/ou, que não se manifestem contrários à realização do mesmo.

A biópsia hepática percutânea com agulha tru-cut, guiada por ultra-som e sob anestesia local, foi efetuada em diferentes serviços credenciados para realização do procedimento no Sistema Único de Saúde ou pelo convênio médico do paciente.

Os fragmentos de biópsia hepática, corados pela hematoxilina-eosina e por pelo menos uma coloração para tecido conjuntivo (picrosirius e/ou tricrômico de Masson), foram revisados por uma única patologista que atua como referência em histologia hepática no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG. Os achados histológicos foram classificados de acordo com o proposto pelo sistema de score METAVIR (BEDOSSA; POYNARD, 1996) em relação à atividade necro-inflamatória e fibrose hepática (QUADRO 1) e avaliados de forma semiquantitativa em relação à esteatose macrovacuolar (QUADRO 2), conforme proposto por Brunt (2001; 2004).

Fragmentos com menos de cinco tratos portais foram considerados inadequados para uma interpretação confiável dos achados histológicos (BRAVO; SHETH; CHOPRA, 2001).

QUADRO 1

Classificação histopatológica da infecção pelo HCV
segundo os critérios estabelecidos pelo METAVIR

GRADUAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA		
1. Necrose lobular focal		
0 = < 1 foco necro-inflamatório por lóbulo		
1 = pelo menos um foco necro-inflamatório por lóbulo		
2 = vários focos necro-inflamatórios por lóbulo ou necrose confluyente ou necrose em ponte		
2. Inflamação portal		
0 = ausente		
1 = presença de agregados de monucleares em alguns tratos portais		
2 = agregados monucleares em todos os tratos portais		
3 = agregados monucleares grandes e difusos em todos os tratos portais		
3. Necrose em saca-bocados		
0 = ausente		
1 = alteração focal da placa periportal em alguns tratos portais		
2 = alterações difusas da placa periportal em alguns tratos portais ou lesões focais ao redor dos tratos portais		
3 = alterações difusas da placa periportal em todos os tratos portais		
4. Necrose em ponte		
0 = ausente		
1 = presente		
ATIVIDADE HISTOLÓGICA		
Necrose em saca-bocados + necrose lobular = escore da atividade histológica		
0	0 (sem ou leve)	0
0	1 (moderada)	1 (leve)
0	2 (acentuada)	2 (moderada)
1 (leve)	0,1	1
1	2	2
2 (moderada)	0,1	2
2	2	3 (acentuada)
3 (acentuada)	0,1,2	3
FIBROSE		
Escore	Descrição	
0	Sem fibrose	
1	Aumento “estrelado” dos tratos portais sem formação de septos	
2	Aumento do trato portal com raros septos	
3	Vários septos sem cirrose	
4	Cirrose	

Fonte: Bedossa e Poynard (1996).

QUADRO 2
Classificação semiquantitativa de esteatose hepática

ESTEATOSE MACROVACUOLAR	
Classificação	Características
Leve	Menos de 33% dos hepatócitos acometidos
Moderada	Entre 33% e 66% dos hepatócitos acometidos
Intensa	Mais de 66% dos hepatócitos acometidos

Fonte: Brunt (2004).

4.6 Tratamento da hepatite C crônica

A indicação de tratamento e o esquema terapêutico utilizado nos pacientes com hepatite C crônica foram baseados na portaria n° 863, de 04 de novembro de 2002, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002). Além das indicações previstas na referida Portaria, o protocolo do CTR-DIP Orestes Diniz contemplava, no período do estudo, o tratamento de pacientes com aminotransferases normais, independentemente do genótipo, e estendia aos pacientes com genótipo 1 a indicação de tratamento com fibrose à biópsia hepática maior ou igual a F1 na classificação de METAVIR. Em relação ao esquema terapêutico, seguiu-se estritamente o recomendado pela referida portaria, ou seja, pacientes com genótipo 1 utilizaram interferon peguilado por via subcutânea - interferon peguilado α -2a (180mcg/semana) ou α -2b (1,5 μ g/kg/semana), a critério do médico-assistente -, sendo sempre associado à ribavirina oral, ajustada pelo peso do paciente (1.000 mg/d para pacientes com menos de 75 kg e 1.250 mg/d para aqueles com mais de 75 kg), por 48 semanas.

Para avaliação da resposta virológica precoce, todos os pacientes com genótipo 1 tinham o RNA do HCV quantificado no plasma antes do início do tratamento e 12 semanas após seu início, utilizando-se o mesmo teste de reação em cadeia da polimerase quantitativa. Caso não houvesse negatificação do HCV-RNA quantitativo ou queda de pelo menos dois logaritmos na carga viral do HCV na 12^a semana, comparando-se com o valor pré-tratamento, a terapia era suspensa imediatamente. Pacientes com genótipo 2 ou 3 utilizaram interferon convencional, na dose de três milhões de unidades internacionais, três vezes por semana, por via subcutânea, associado à ribavirina oral ajustada pelo peso,

conforme já descrito para genótipo 1, por 24 semanas. Pacientes com genótipos 2 ou 3 não tiveram a carga viral avaliada, pois esta não alteraria o manejo clínico do paciente e não era recomendada pela Portaria nº 863, de 04 de novembro de 2002 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002).

4.7 Critérios de inclusão e de exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes maiores de 18 anos, atendidos no Ambulatório de Referência em Hepatites Virais do CTR-DIP Orestes Diniz e que apresentavam as seguintes características:

- diagnóstico de infecção crônica pelo HCV realizado a partir da detecção de anticorpos anti-HCV por técnica imunoenzimática (EIA) há mais de seis meses e pela detecção qualitativa de RNA do HCV no plasma por reação em cadeia da polimerase (PCR);
- biópsia hepática realizada após o diagnóstico da hepatite C crônica;
- lâmina contendo fragmento hepático de material da biópsia disponível para revisão no serviço de anatomopatologia da UFMG;
- amostra plasmática disponível para análise, coletada em um período máximo de 12 meses, anteriores ou posteriores, da realização da biópsia hepática;
- ausência de ovos de *Schistosoma mansoni* no exame parasitológico de pelo menos três amostras de fezes realizado após o diagnóstico da infecção pelo HCV;
- ausência de reatividade para fator antinuclear (FAN), anticorpo antimúsculo liso e antimitocôndria em exame realizado após o diagnóstico da infecção pelo HCV;
- assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram excluídos do estudo os pacientes selecionados segundo os critérios descritos e que apresentavam as seguintes características:

- uso de qualquer apresentação de interferon, associado ou não à ribavirina, antes da coleta de amostra de plasma disponível para análise;

- co-infecção pelo vírus da hepatite B (positividade do HBsAg) e, ou, vírus da imunodeficiência humana (presença de anticorpos anti-HIV detectados por técnica imunoenzimática em duas amostras diferentes, confirmado pela positividade do exame de imunofluorescência indireta ou de Western Blot em pelo menos uma das amostras);
- relato de diagnóstico de esquistossomose nos 12 meses anteriores à data da biópsia ou da data da coleta da amostra plasmática a ser analisada, se esta tiver sido realizada anteriormente à biópsia;
- uso de medicamentos imunossupressores nos 12 meses anteriores à data da biópsia ou da data da coleta da amostra plasmática a ser analisada, se esta tiver sido realizada anteriormente à biópsia;
- portadores de doença renal crônica dialítica.

Foram excluídos da análise da associação entre marcadores inflamatórios solúveis e alterações histológicas hepáticas pacientes cujo fragmento hepático disponível para revisão era inadequado para análise histológica por conterem menos de cinco tratos portais.

E da análise da associação entre marcadores inflamatórios solúveis e resposta virológica foram excluídos os pacientes que não iniciaram ou não completaram pelo menos 12 semanas de tratamento. Foram excluídos desta análise também aqueles que relataram terem feito uso da medicação prescrita na dosagem incorreta.

Para inclusão no grupo-controle, as pessoas deveriam estar assintomáticas e apresentar sorologia negativa para anti-HIV, anti-HCV e HBsAg realizada em um período máximo de três meses anteriores à coleta da amostra de plasma.

4.8 Definição dos eventos e classificação operacional das variáveis

- **Atividade necro-inflamatória hepática moderada/intensa:** atividade histológica ≥ 2 de acordo com a classificação METAVIR.
- **Fibrose hepática moderada/intensa:** fibrose hepática ≥ 2 de acordo com a classificação METAVIR.

- **Resposta virológica precoce:** indetecção do RNA do HCV no plasma ou redução de pelo menos dois logaritmos na quantificação plasmática do RNA do HCV na 12^a semana de tratamento, comparando-se com níveis pré-tratamento, utilizando-se a mesma metodologia de PCR quantitativa (AMPLICOR®, *Roche Molecular Systems*), conforme especificações do fabricante, com limite de detecção entre 600 e 850.000 UI/mL. Avaliada apenas em pacientes com genótipo viral 1.
- **Resposta virológica final:** indetecção do RNA do HCV no plasma na semana de término do tratamento específico (24^a semana para pacientes com genótipo 2 e 3 e 48^a semana para pacientes com genótipo 1), avaliada por metodologia de PCR qualitativa (AMPLICOR®, *Roche Molecular Systems*), conforme especificações do fabricante, com limite de detecção de 50 UI/mL.
- **Resposta virológica sustentada:** indetecção do RNA do HCV no plasma 24 semanas após o término do tratamento específico, avaliada por metodologia de PCR qualitativa (AMPLICOR®, *Roche Molecular Systems*), conforme especificações do fabricante, com limite de detecção de 50 UI/mL. Avaliada em todos os pacientes submetidos a tratamento, independentemente do genótipo viral.

Os níveis plasmáticos de quimiocinas e de receptores solúveis de TNF constituíram variáveis contínuas e foram quantificadas em pg/mL.

As definições operacionais das outras variáveis utilizadas no estudo estão descritas nos QUADROS 3 a 6.

QUADRO 3

Definição operacional das variáveis sociodemográficas e epidemiológicas

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL
Sexo	Sexo do paciente
Idade no momento da biópsia	Idade no momento de realização da biópsia hepática.
Idade no momento do tratamento	Idade no momento de início do tratamento.
Peso	Peso registrado na consulta mais próxima à data de realização da biópsia hepática.
Estado civil	Estado civil no momento de inclusão no estudo.
Escolaridade	Anos de estudo no momento de inclusão na pesquisa.
Cor/Raça	Cor/raça do paciente, conforme avaliação do médico-assistente no primeiro atendimento ao paciente.
Município de residência	Município de residência no momento de inclusão no estudo.
Categoria de exposição	Categoria de possível exposição (hemotransfusão, uso de droga injetável, uso de droga inalatória, sexual, tatuagem, ocupacional, outra) ao HCV de acordo com registro de prontuário feito pelo médico-assistente no primeiro atendimento e/ou entrevista no momento de inclusão no estudo.

QUADRO 4

Variáveis indicadoras de exposição a fatores de risco para doença hepática

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL
Passado de esquistossomose	Relato de diagnóstico de esquistossomose realizado há mais de 12 meses da data de realização da biópsia e, ou, da data da coleta da amostra de plasma.
Ingestão etílica (≥ 40 g/dia)	Relato de hábito de ingestão de etanol igual ou superior a 40 g por dia em qualquer momento da vida.
Ingestão etílica moderada/acentuada (≥ 40 g/dia) próximo à biópsia hepática	Relato de hábito de ingestão de etanol igual ou superior a 40 g por dia, nos seis meses que precederam a data da biópsia hepática.
Ingestão etílica moderada/acentuada (≥ 40 g/dia) próximo ao início do tratamento	Relato de hábito de ingestão de etanol igual ou superior a 40 g por dia, nos seis meses que precederam a data de início do tratamento.
Uso de medicamento hepatotóxico	Relato de uso prolongado (≥ 30 dias) de medicamento hepatotóxico (ANEXO A) nos 12 meses anteriores à biópsia hepática.
Diabetes mellitus tipo 2	Duas mensurações de glicemia de jejum > 126 mg/dL ou paciente em tratamento dietético ou medicamentoso para diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.

QUADRO 5

Definição operacional das variáveis laboratoriais

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO DA VARIÁVEL
Elevação de ALT $\geq 1,5$x LSN	Aumento dos níveis séricos de alanina aminotransferase superior a 1,5 vez o limite superior da normalidade (LSN) em uma de pelo menos três dosagens realizadas, antes de início do tratamento específico, com intervalo de no mínimo um mês entre elas.
Genotipagem	Genótipo do HCV
Carga viral elevada	Quantificação do RNA do HCV no plasma superior a 600.000 UI/mL.

QUADRO 6

Definição operacional das variáveis histológicas

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO DA VARIÁVEL
Número de tratos portais	Número de tratos portais avaliados na revisão do fragmento hepático.
Cirrose hepática	Cirrose hepática à análise histológica (METAVIR F4).
Esteatose hepática	Esteatose hepática macrovacuolar em qualquer intensidade.

4.9 Coleta e análise dos dados

Os dados sociodemográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais foram obtidos por análise de prontuários que foi complementada com entrevista com os pacientes no momento das consultas no ambulatório CTR-DIP Orestes Diniz. Quatro formulários foram utilizados na coleta de dados (ANEXO B). Foram eles:

- formulário de triagem, ou formulário 1, para coleta de dados de todos os pacientes portadores de hepatite C, atendidos no CTR-DIP Orestes Diniz durante o período estudado, com fins de verificação da sua elegibilidade no estudo;
- formulário 2, preenchido para todos os pacientes elegíveis, para fins de complementação dos dados;
- formulário 3, preenchido para todos os pacientes elegíveis que iniciaram tratamento no período estudado;
- formulário de avaliação do hábito de ingestão etílica, baseado na mensuração global de quantidade/frequência (REHM, 1998), preenchido para todos os pacientes elegíveis.

A coleta dos dados foi realizada pelo pesquisador principal e por médicos e estudantes de Medicina treinados. Essa equipe foi supervisionada de maneira permanente durante a coleta e ocorreram reuniões periódicas durante todo o processo.

As informações obtidas foram armazenadas em banco de dados computadorizado, utilizando-se o *software* Epi Data 3.1 – EpiData Association, Odense, Denmark, 2000-2008.

Para as análises estatísticas, adotou-se o *software* Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 12.0 for windows - SPSS Incorporation, Chicago, Illinois, Estados Unidos da América, 2005.

A análise descritiva das características da população elegível foi realizada a partir da distribuição de frequência das variáveis categóricas e por meio das medidas de tendência central das variáveis contínuas.

Utilizou-se o teste de χ^2 com correção de Yates, ou teste exato de Fisher, para análises univariadas de variáveis categóricas.

Para análise univariada de variáveis contínuas realizou-se o teste t de Student para aquelas com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para as demais.

A correlação entre variáveis contínuas foi analisada pelo coeficiente de correlação de Spearman (Spearman Rho).

O método da curva ROC foi utilizado para avaliação da acurácia dos marcadores inflamatórios solúveis.

A regressão logística binária foi empregada para construção de modelos preditores dos eventos principais com múltiplas variáveis. A análise da evolução do perfil de quimiocinas em amostras pareadas foi feita com base no teste de sinais de Wilcoxon.

A magnitude das associações foi estimada pela *odds ratio* para as análises transversais e pelo risco relativo para análises longitudinais. O intervalo de confiança utilizado foi 95%.

4.10 Cálculo amostral

Para o cálculo amostral, tomou-se como base o estudo de Apolinário *et al.* (2004), que avaliou a dosagem sérica de CXCL10 em pacientes com hepatite C crônica submetidos a tratamento e demonstrou média de 381 pg/mL (\pm 138 pg/mL) para não-

respondedores e de 245 pg/mL (\pm 154pg/mL) para respondedores. De acordo com esses dados, seria necessária uma amostra de 30 pacientes submetidos a tratamento com interferon e ribavirina para demonstrar-se a diferença entre os grupos com nível de significância de 5% e força de 80%. Como a média de resposta ao tratamento é de aproximadamente 50%, esperava-se ter aproximadamente 15 respondedores e outros 15 não-respondedores ao tratamento.

Em relação à análise histológica, escolheu-se como referência os dados de Diago *et al.* (2006), que também analisaram os valores séricos de CXCL10. Esses autores encontraram média de 510,7 pg/mL (\pm 313,4 pg/mL) para pacientes com fibrose moderada/acentuada e de 353,6 pg/mL (\pm 234,1 pg/mL) para aqueles com fibrose ausente ou leve. Desta forma, seriam necessários 72 pacientes, sendo 36 no grupo com fibrose mais intensa e o mesmo número no grupo com fibrose ausente ou leve para demonstração da diferença, com o mesmo nível de significância e força descrito.

Para o cálculo amostral do grupo-controle, foram usados como parâmetro os valores séricos de CXCL10 encontrados por Apolinário *et al.* (2004) para a diferença entre pacientes com hepatite C crônica (303 ± 174 pg/mL) e a população geral (49 ± 15 pg/mL). Com esses valores, um grupo-controle de três pacientes seria suficiente para demonstração da diferença entre os grupos, com o mesmo nível de significância e força descrito.

4.11 Revisão de literatura

O levantamento bibliográfico foi feito a partir dos bancos de dados MEDLINE e LILACS, com consulta em publicações especializadas, seriadas e isoladas e revisão de obras isoladas, tais como livros, referências legislativas, monografias, teses e separatas. As palavras-chave utilizadas foram: *hepatitis C*, *cytokines*, *chemokines*, *tumor necrosis factor-alpha*, *tumor necrosis factor receptors*.

4.12 Normas de redação

O texto foi redigido obedecendo-se às regras ortográficas vigentes. Para utilização das siglas, foram empregados, como referência, termos consagrados na literatura médica, adotando-se algumas delas em língua estrangeira.

4.13 Ética

Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, parecer nº 128/05 (ANEXO C), e do Comitê de Ética em Pesquisa da Prefeitura de Belo Horizonte, protocolo nº 017/2005, estando de acordo com as normas da Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta as atividades de pesquisas em seres humanos.

Todas as informações obtidas de prontuários médicos e de exames laboratoriais foram mantidas em cadastro próprio, de acesso restrito aos pesquisadores, resguardados sob os princípios da confidencialidade e privacidade. Todas as informações deste estudo foram utilizadas exclusivamente no cumprimento dos objetivos propostos.

5 RESULTADOS

5.1 Análise descritiva

Um total de 220 pacientes consecutivos, portadores crônicos do vírus da hepatite C (HCV), atendidos no Centro de Treinamento e Referência Orestes Diniz foi avaliado para inclusão no estudo, no período de junho de 2005 a dezembro de 2007. Desses, 73 (33,2%) foram elegíveis para o estudo. Os principais motivos da não-elegibilidade para a pesquisa foram: não-realização de biópsia hepática (25,2%), ausência de amostra plasmática no período de até 12 meses da realização da biópsia hepática (22,5%), doença renal crônica dialítica (14,3%), uso prévio de interferon (13,6%) e ausência de um ou mais exames para avaliação completa dos critérios de inclusão (12,9%) - (FIG. 4). Outros motivos foram ausência de fragmento hepático para revisão no Departamento de Anatomia Patológica da UFMG (3,4%), infecção pelo HIV (3,4%), positividade do marcador HBsAg (2,0%), uso de medicamento imunossupressor (1,4%) e não-assinatura do termo de consentimento (1,4%).

O grupo elegível não diferiu do grupo não-elegível em relação à idade, sexo, genótipo do HCV e alterações necro-inflamatórias e fibróticas à biópsia hepática (TAB. 1). Maior proporção de pacientes elegíveis apresentou aumento de ALT superior a 1,5 vez o limite superior da normalidade ($p=0,004$).

A média de idade dos pacientes elegíveis para o estudo foi de 43,8 anos, 37 (50,7%) eram do sexo masculino, 41 (56,2%) casados, 37 (50,7%) pardos, 43 (58,9%) residiam em Belo Horizonte e 43 (58,9%) tinham até oito anos de escolaridade. Em relação às formas de exposição ao HCV, 22 (30,1%) relataram ter recebido hemotransfusão antes de 1992, 10 (13,7%) usavam ou tinham história de uso de droga ilícita injetável, cinco (6,8%) usavam ou já haviam usado droga ilícita inalatória, quatro (5,5%) declararam contato sexual com parceiro usuário de drogas ilícitas ou portador do HCV, quatro (5,5%) mencionavam exposição ocupacional progressiva a fluidos potencialmente infectantes e sete (9,6%) eram tatuados. Ressalta-se que alguns pacientes comentaram exposição a mais de um fator de risco e 25 (34,2%) negaram a presença de fatores de risco associados à infecção pelo HCV. A informação sobre a data provável de infecção estava disponível para 29 (39,7%) pacientes, com tempo médio entre a data provável da infecção e a data de realização da biópsia hepática de 19,4 ($\pm 11,0$) anos.

No tocante às características virológicas, o genótipo viral 1 foi encontrado em 54 (73,9%) pacientes e carga viral acima de 600.000 UI/mL em 14 (40,0%) dos 35 com genótipo 1 que haviam realizado a quantificação do RNA viral plasmático. A avaliação histológica hepática mostrou que 65 (89,0%) tinham atividade necro-inflamatória à biópsia, sendo essa atividade moderada ou intensa em 26 (35,6%). No estadiamento da fibrose hepática, 35 (47,9%) tinham fibrose moderada/avançada e 10 (13,7%) tinham cirrose. A ALT apresentava-se alterada, de maneira constante ou flutuante, em 53 (72,6%) pacientes, estando elevada acima de 1,5 vez o limite superior da normalidade em 39 (53,4%) indivíduos.

TABELA 1
Comparação de características clínico-demográficas
entre sujeitos elegíveis (N=73) e não-elegíveis (N=147)

Fator	Elegíveis	Não-elegíveis	valor de p
Sexo masculino (%)	37/73 (50,7%)	85/147 (57,8%)	0,325
Idade em anos (média ± dp)	43,8 (±10,8)	45,3 (±12,8)	0,391
Peso em kg (média ± dp)	68,7 (±13,0)	70,6 (±13,1)	0,464
Genótipo 1 (%)	54/73 (73,9%)	102/125 (81,6%)	0,281
Elevação de ALT (>1,5x LSN) (%)	39/73 (53,4%)	42/125 (33,6%)	0,004
Atividade necro-inflamatória moderada/intensa (%)	26/73 (35,6%)	31/110 (28,2%)	0,251
Fibrose moderada/avançada (%)	35/73 (47,9%)	45/110 (40,9%)	0,543

dp = desvio-padrão.

Quanto à ingestão de bebida alcoólica, 34 (46,6%) pacientes relataram que em algum momento da vida apresentaram hábito de ingestão etílica superior a 40 g de álcool/dia e 17 (23,3%) informaram hábito de ingestão etílica nesta mesma quantidade nos seis meses que precederam a biópsia hepática. História pregressa de tratamento para esquistossomose foi declarada por 13 (17,8%) pacientes.

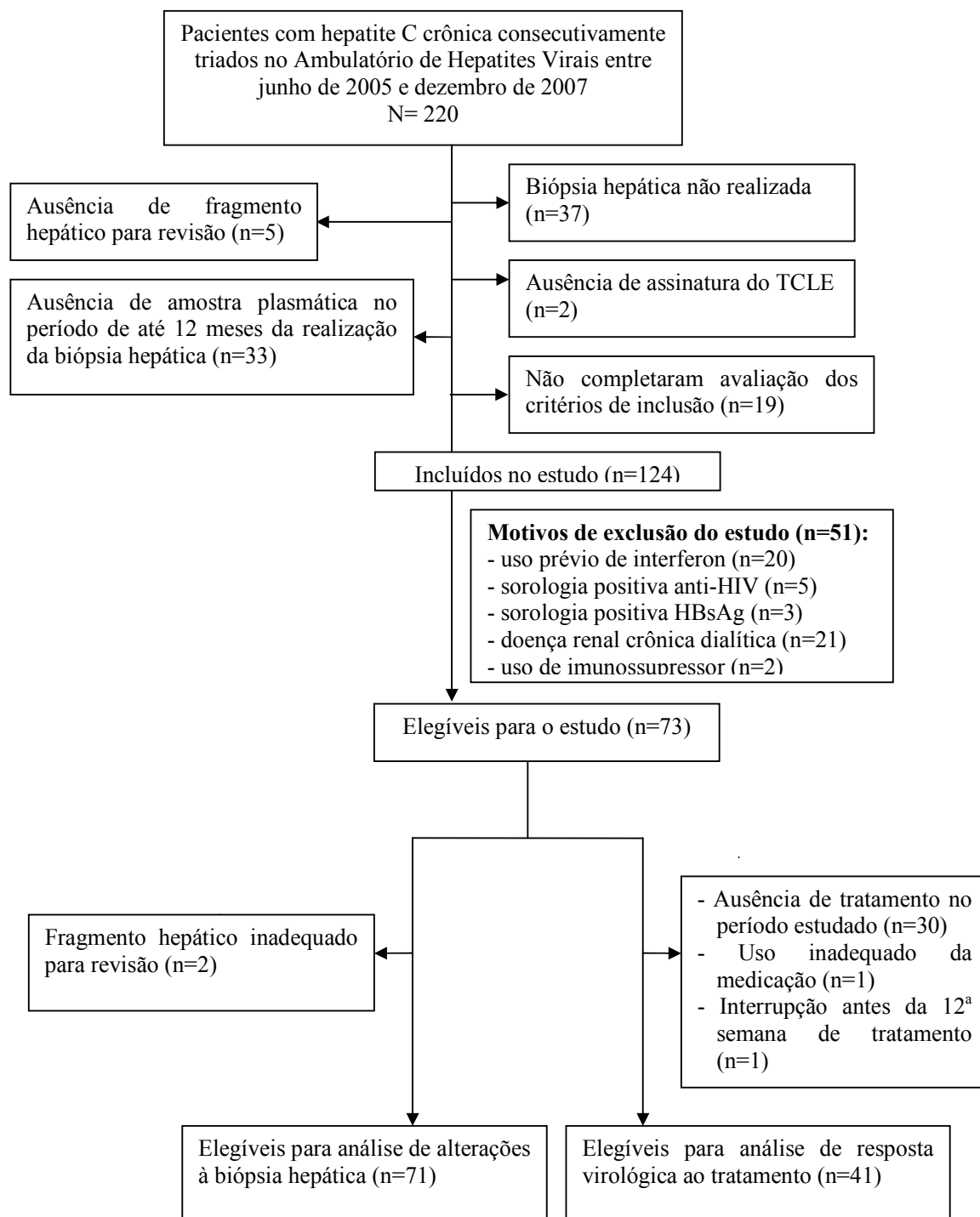


FIGURA 4 - Fluxograma de análise de elegibilidade dos pacientes.

TCLE = Termo de consentimento livre e esclarecido.

5.2 Comparação dos níveis dos mediadores inflamatórios solúveis entre pacientes com hepatite C e o grupo-controle

Oito pacientes foram incluídos no grupo-controle. A mediana de idade do grupo-controle foi significativamente menor do que a do grupo dos pacientes portadores crônicos do HCV (25,0 anos vs. 43,9 anos; $p=0,004$). Apesar da predominância maior do sexo masculino no grupo-controle em relação ao grupo de pacientes incluídos (77,8% vs. 50,7%), essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,173$).

A análise dos níveis plasmáticos de quimiocinas e de sTNFR entre os portadores de hepatite C e no grupo-controle mostrou que os níveis dos receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) estiveram significativamente aumentados nos portadores crônicos do HCV (TAB. 2). A mediana dos níveis plasmáticos de CCL2 e de CXCL10 no grupo de portadores do HCV foi mais de duas vezes superior à encontrada nos pacientes do grupo-controle, mas a grande dispersão dos valores não permitiu que essas diferenças alcançassem significância estatística.

TABELA 2

Comparação da mediana e da amplitude interquartil (AIQ) dos níveis de mediadores inflamatórios solúveis entre portadores crônicos do HCV e o grupo-controle

Mediadores inflamatórios	Controle (n=8) Mediana (AIQ)	HCV (n=73) Mediana (AIQ)	Valor de p
CCL2 (pg/mL)	45,0 (0 – 71,4)	96,1 (18,6-131,6)	0,112
CCL3 (pg/mL)	93,8 (35,8-143,4)	98,5 (35,0-136,6)	0,899
CCL11 (pg/mL)	176,2 (125,8-214,7)	200,4 (167,9-257,8)	0,202
CCL24 (pg/mL)	403,2 (233,8-1222,9)	690,5 (407,5-1068,2)	0,363
CXCL9 (pg/mL)	487,7 (0 – 594,4)	434,4 (5,0 – 1035,1)	0,444
CXCL10 (pg/mL)	68,3 (25,4-227,9)	161,5 (94,2-289,9)	0,096
sTNFR1 (ng/mL)	448,5 (310,3-642,5)	705,7 (498,3-996,7)	0,046
sTNFR2 (ng/mL)	1,4 (1,32-1728,0)	2078,0 (1765,1-2545,2)	0,001

5.3 Fatores preditores de alterações à biópsia hepática

Dos 73 pacientes elegíveis para o estudo, dois apresentavam fragmentos de biópsia hepática inadequados para revisão e foram excluídos da análise da associação entre os mediadores inflamatórios solúveis e alterações histológicas hepáticas. O número médio de tratos portais dos fragmentos hepáticos dos 71 pacientes elegíveis para esta análise foi de 11,9 ($\pm 4,5$) tratos, com mínimo de cinco e máximo de 26.

Em relação às alterações histológicas hepáticas encontradas após revisão, atividade necro-inflamatória moderada ou intensa foi encontrada em 26 (36,6%) pacientes e fibrose hepática moderada ou acentuada em 35 (49,3%), sendo que 10 (14,1%) apresentavam cirrose hepática à análise histológica. Esteatose hepática esteve presente em 30 (42,3%) dos pacientes, sendo que em sete (9,8%) ela era moderada ou intensa.

5.3.1 Mediadores inflamatórios solúveis e alterações histológicas hepáticas

A análise univariada da associação entre mediadores inflamatórios solúveis e alterações à biópsia hepática mostrou que pacientes com atividade necro-inflamatória hepática moderada/intensa tinham níveis plasmáticos significativamente mais elevados de sTNFR2 ($p=0,019$), se comparados àqueles com atividade ausente ou leve (TAB. 3). O GRÁF. 1 mostra que mesmo pacientes sem atividade necro-inflamatória hepática apresentaram mediana dos níveis plasmáticos de sTNFR2 significativamente mais elevada do que o grupo-controle. Além disso, parece haver relação dose-resposta entre os níveis plasmáticos de sTNFR2 e atividade necro-inflamatória hepática, apesar da ausência de significância estatística, já que a amostra não tinha poder suficiente para demonstrar essa relação. Os níveis plasmáticos medianos dos demais marcadores inflamatórios analisados não diferiram de maneira significativa entre pacientes com atividade necro-inflamatória ausente ou leve e aqueles com atividade moderada/intensa (TAB. 3).

No que tange ao estadiamento hepático, pacientes com fibrose hepática moderada/intensa manifestaram níveis plasmáticos significativamente mais elevados de sTNFR1 ($p=0,012$), sTNFR2 ($p=0,009$) e CXCL9 ($p=0,014$), se comparados aos com fibrose ausente ou leve (TAB. 4). Os GRÁF. 2 e 3 mostram também um padrão do tipo dose-resposta entre os níveis plasmáticos de sTNFR1 e sTNFR2 e o estadiamento hepático, ressaltando-se, entretanto, que a diferença entre os diferentes graus de fibrose não alcançou

significância estatística. Em relação aos níveis plasmáticos de CXCL9, a associação com fibrose hepática não teve padrão linear, com a mediana dos níveis plasmáticos de CXCL9 aumentando desde o grupo de pacientes sem fibrose até aqueles com fibrose moderada, reduzindo-se no grupo com fibrose avançada e voltando a se elevar em pacientes com cirrose hepática (GRÁF. 4). As curvas *receiver operating characteristic* (ROC) mostram que a acurácia de predição de fibrose moderada/avançada utilizando os receptores solúveis de TNF ou CXCL9 foi baixa (GRÁF. 5 a 7), com valores inferiores a 70%, insuficiente para se propor a utilização desses marcadores isoladamente como preditores de estadiamento hepático na prática clínica.

TABELA 3

Comparação da mediana e amplitude interquartil (AIQ) dos mediadores inflamatórios solúveis (em pg/mL) entre pacientes com infecção crônica pelo HCV apresentando atividade necro-inflamatória ausente/leve (METAVIR A \leq 1) e aqueles apresentando atividade moderada/intensa (METAVIR A \geq 2) à biópsia hepática

Mediadores inflamatórios	Atividade necro-inflamatória ausente/leve (n=45) Mediana (AIQ)	Atividade necro-inflamatória moderada/intensa (n=26) Mediana (AIQ)	Valor de p
CCL2	96,1 (0-128,0)	103,2 (57,3-160,0)	0,498
CCL3	98,5 (35,0-126,9)	108,0 (89,1-141,1)	0,194
CCL11	200,4 (174,4-259,1)	216,6 (161,4-239,5)	0,834
CCL24	690,4 (389,9-1068,2)	752,7 (574,9-1068,2)	0,463
CXCL9	349,4 (0 – 884,0)	626,5 (285,7-1056,7)	0,085
CXCL10	139,0 (94,2-286,1)	178,4 (75,5-289,9)	0,784
sTNFR1	677,8 (443,8-920,9)	737,8 (584,7-1040,2)	0,178
sTNFR2	1992,8 (1705,4-2390,9)	2336,9 (1910,0-2723,2)	0,019

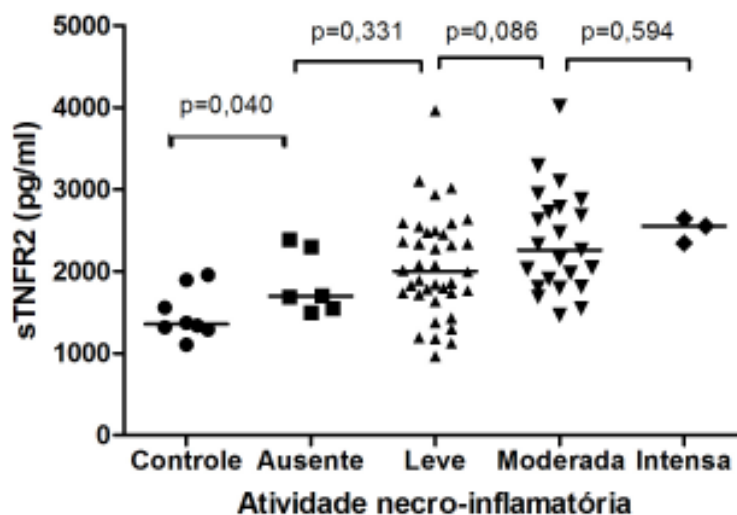


GRÁFICO 1 - Níveis plasmáticos de sTNFR2 no grupo-controle e em pacientes com infecção crônica pelo HCV estratificados por diferentes graus de atividade necro-inflamatória hepática.

TABELA 4

Comparação da mediana e amplitude interquartil (AIQ) dos mediadores inflamatórios solúveis (em pg/mL) entre pacientes com infecção crônica pelo HCV apresentado fibrose ausente/leve (METAVIR F \leq 1) e aqueles apresentando fibrose moderada/intensa (METAVIR F \geq 2) à biópsia hepática

Fator	Fibrose ausente/leve (n=36) Mediana (AIQ)	Fibrose moderada/intensa (n=35) Mediana (AIQ)	Valor de p
CCL2	97,9 (0 – 129,8)	96,1 (59,1-144,0)	0,583
CCL3	96,1 (22,5-122,1)	108,0 (89,1-157,7)	0,183
CCL11	200,4 (164,7-249,3)	219,9 (171,2-266,5)	0,379
CCL24	665,1 (372,4-1045,5)	761,7 (557,3-1090,3)	0,490
CXCL10	132,7 (86,7-267,0)	180,3 (114,7-293,3)	0,424
CXCL9	285,7 (0 – 733,6)	626,5 (211,6-1273,6)	0,014
sTNFR1	636,7 (413,7-782,8)	833,1 (622,1-1044,9)	0,012
sTNFR2	1951,7 (1697,8-2332,8)	2345,1 (1834,5-2703,3)	0,009

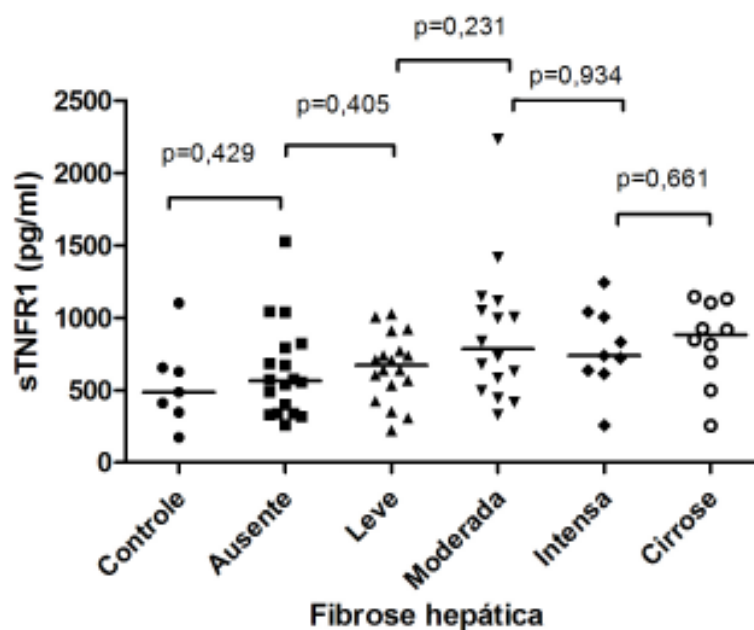


GRÁFICO 2 - Níveis plasmáticos de sTNFR1 no grupo-controle e em pacientes com infecção crônica pelo HCV estratificados por diferentes graus de fibrose hepática.

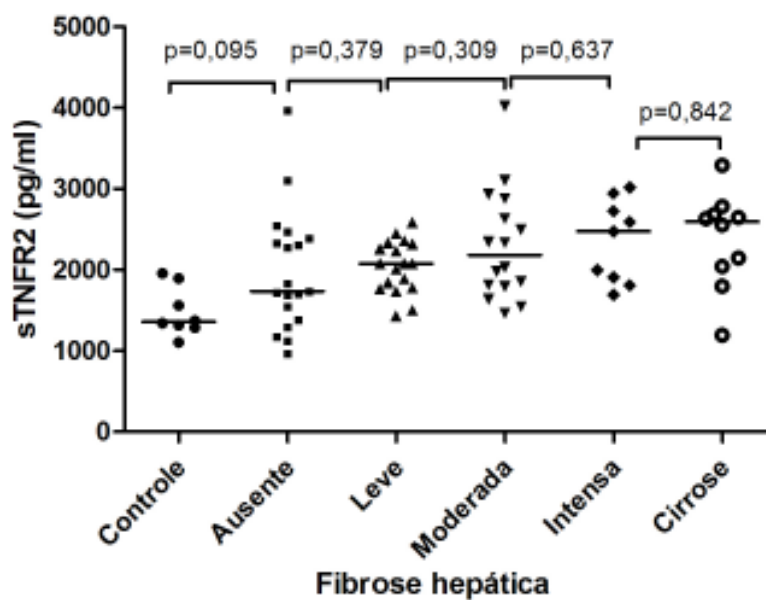


GRÁFICO 3 - Níveis plasmáticos de sTNFR2 no grupo-controle e em pacientes com infecção crônica pelo HCV estratificados por diferentes graus de fibrose hepática.

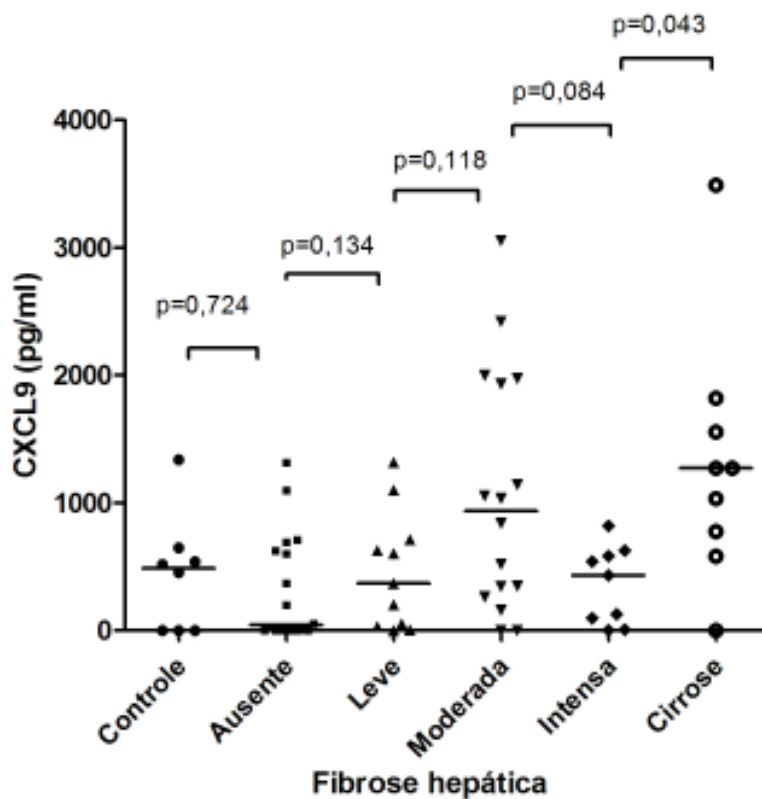
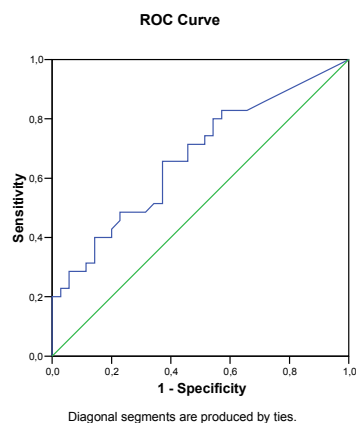
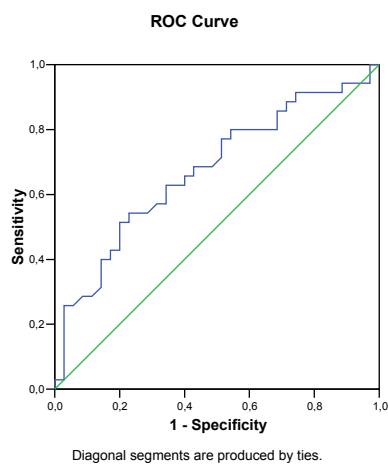


GRÁFICO 4 - Níveis plasmáticos de CXCL9 no grupo-controle e em pacientes com infecção crônica pelo HCV estratificados por diferentes graus de fibrose hepática.



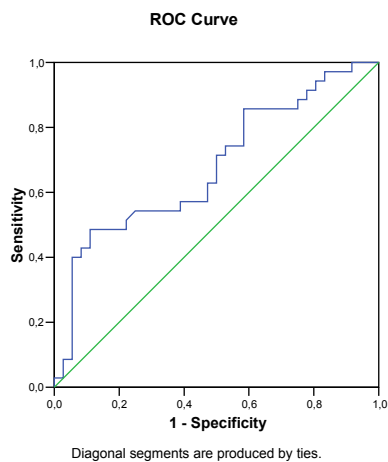
AUC 0,67 (IC95%: 0,54-0,80).

GRÁFICO 5 - Curva ROC dos níveis plasmáticos de CXCL9 como preditores de fibrose hepática moderada/avançada (METAVIR \geq F2).



AUC 0,67 (IC95%: 0,55-0,80).

GRÁFICO 6 - Curva ROC dos níveis plasmáticos de sTNFR1 como preditores de fibrose hepática moderada/avançada (METAVIR \geq F2).



AUC 0,68 (IC95%: 0,55-0,80)

GRÁFICO 7 - Curva ROC dos níveis plasmáticos de sTNFR2 como preditores de fibrose hepática moderada/avançada (METAVIR \geq F2).

5.3.2 Fatores clínico-virológicos e alterações histológicas hepáticas

Considerando os fatores clínico-virológicos analisados, pacientes com atividade necro-inflamatória moderada/intensa apresentaram idade mais avançada no momento da biópsia hepática ($48,7 \pm 11,6$ anos vs. $41,7 \pm 9,2$ anos; $p = 0,006$), maior proporção de elevação da ALT (OR 3,08; IC95% 1,11-8,55), de diabetes *mellitus* tipo 2 (OR 10,47; IC 95% 1,15-95,41) e de esteatose hepática (OR 3,54; IC 95% 1,30-9,74) se comparados a pacientes com atividade ausente/leve (TAB. 5 e 6).

Em relação ao estadiamento hepático, pacientes com fibrose hepática moderada/intensa tinham idade mais avançada no momento da biópsia ($47,7 \pm 11,4$ vs. $40,9 \pm 8,6$ anos; $p = 0,006$) e maior proporção de esteatose hepática (OR 3,47; IC95% 1,29-9,33), de carga viral elevada (> 600.000 UI por mL) - (OR 9,0; IC95% 1,57- 51,48) e de atividade necro-inflamatória moderada/intensa (OR 21,1; IC95% 5,3-83,2) se comparados a pacientes com fibrose hepática ausente/leve (TAB. 7 e 8).

Sexo, peso e história pregressa de tratamento para esquistossomose não se associaram à atividade necro-inflamatória nem à fibrose hepática. A média do número de tratos portais também não diferiu significativamente entre os grupos. O tempo médio entre o provável momento da infecção e a data da biópsia hepática, disponível em 29 pacientes, foi maior em pacientes com maior intensidade de atividade necro-inflamatória ($21,86 \pm 12,1$ anos vs. $17,1 \pm 9,8$ anos) e estadiamento hepático mais avançado ($21,7 \pm 11,4$ anos vs. $16,1 \pm 10,1$ anos), mas essa diferença não alcançou significância estatística ($p = 0,250$ e $p = 0,182$, respectivamente).

TABELA 5

Associação entre fatores sociodemográficos e histológicos contínuos, representados como média (\pm dp) e atividade necro-inflamatória hepática de acordo com a classificação de METAVIR em pacientes com infecção crônica pelo HCV

Fator	A \leq 1 (n=45)	A \geq 2 (n=26)	Valor de p
Idade em anos	41,7 (\pm 9,2)	48,7 (\pm 11,6)	0,006
Peso em kg	68,0 (\pm 15,4)	69,4 (\pm 10,4)	0,539
Número de tratos portais	11,6 (\pm 4,5)	12,3 (\pm 4,4)	0,552

TABELA 6

Associação entre fatores sociodemográficos, clínicos e virológicos categóricos e atividade necro-inflamatória hepática de acordo com a classificação de METAVIR, em pacientes com infecção crônica pelo HCV

Fator		Total N	A\geq2 N (%)	OR (95% IC)	Valor de p
Sexo	Masculino	36	14 (53,8)	1,22 (0,46-3,21)	0,806
	Feminino	35	12 (34,3)	1,0	
Diabetes mellitus tipo 2	Sim	6	5 (83,3)	10,47 (1,15-95,41)	0,022
	Não	65	21 (32,3)	1,0	
Passado de esquistossomose	Sim	13	5 (38,5)	1,18 (0,34-4,12)	1,00
	Não	58	20 (34,5)	1,0	
Ingestão etílica	≥ 40 g/d	33	12 (36,4)	0,98 (0,37-2,58)	1,00
	< 40 g/d ou ausente	38	14 (36,8)	1,0	
Ingestão etílica recente	≥ 40 g/d	17	6 (35,3)	0,93 (0,30-2,89)	0,901
	< 40 g/d ou ausente	54	20 (37%)	1,0	
Usa medicação hepatotóxica	Sim	8	5 (62,5)	3,33 (0,73-15,31)	0,132
	Não	63	21 (33,3)	1,0	
Níveis de ALT	$\geq 1,5x$ LSN	37	18 (48,6)	3,08 (1,11-8,55)	0,048
	< 1,5x LSN	34	8 (23,5)	1,0	
Genótipo	1	53	17 (32,1)	0,47 (0,16-1,40)	0,257
	2 ou 3	18	9 (50,0)	1,0	
Carga viral (UI/mL) (n=34)	≥ 600.000	14	9 (34,3)	4,20 (0,98-17,95)	0,080
	< 600.000	20	6 (30,0)	1,0	
Esteatose hepática	Presente	30	16 (53,3)	3,54 (1,30-9,74)	0,024
	Ausente	41	10 (24,4)	1,0	

OR = Odds ratio.

IC = Intervalo de confiança.

TABELA 7

Associação entre fatores sociodemográficos e histológicos contínuos, representados como média (\pm dp), e fibrose hepática de acordo com a classificação de METAVIR em pacientes com infecção crônica pelo HCV

Fator	F \leq 1 (n=36) Média (\pm dp)	F \geq 2 (n=35) Média (\pm dp)	Valor de p
Idade (anos)	40,9 (\pm 8,6)	47,7 (\pm 11,4)	0,006
Peso (kg)	68,6 (\pm 13,9)	68,8 (\pm 13,0)	0,920
Número de tratos portais	11,8 (\pm 5,1)	11,9 (\pm 3,7)	0,887

TABELA 8

Associação entre fatores clínico-virológicos e fibrose hepática de acordo com a classificação de METAVIR em pacientes com infecção crônica pelo HCV

Fator	Total N	F \geq 2 n (%)	OR (95% IC)	Valor de p	
Sexo	Masculino	36	19 (52,8)	1,33 (0,52-3,37)	0,638
	Feminino	35	16 (45,7)	1,0	
Diabetes	Sim	6	5 (83,3)	5,8 (0,65-52,74)	0,107
	Não	65	30 (46,2)	1,0	
Passado de esquistossomose					
	Sim	13	6 (46,2)	0,83 (0,25-2,78)	1,0
	Não	58	29 (50,0)	1,0	
Ingestão etílica	\geq 40 g/d	33	19 (57,6)	1,87 (0,73-4,80)	0,238
	< 40g/d ou ausente	38	16 (42,1)	1,0	
Ingestão etílica recente					
	\geq 40g/d	17	11 (64,7)	2,29 (0,74-7,10)	0,173
	< 40g/d ou ausente	54	24 (44,4)	1,0	
Usa medicação hepatotóxica					
	Sim	8	5 (62,5)	1,83 (0,40-8,33)	0,478
	Não	63	30 (47,6)	1,0	
Genótipo	1	53	23 (43,4)	0,38 (0,13-1,18)	0,107
	2 ou 3	18	12 (66,7)	1,0	

Continua TAB. 8

Fator	Total N	F ≥ 2	OR (95% IC)	Valor de p
Níveis de ALT	37	24 (64,9)	3,86 (1,44-10,35)	0,006
≥1,5x LSN				
< 1,5x LSN	34	11 (32,4)	1,0	
Carga viral (UI/mL)	14	12 (85,7)	9,0 (1,57- 51,48)	0,013
≥ 600.000				
< 600.000	20	8 (40,0)	1,0	
Esteatose hepática	30	20 (66,7)	3,47 (1,29-9,33)	0,017
Presente				
Ausente	41	15 (36,6)	1,0	
Atividade necro-inflamatória hepática				
Ausente/leve (A ≤ 1)	45	12 (26,7)	21,1 (5,3-83,2)	< 0,001
Moderada/intensa (A ≥ 2)	26	23 (88,5)	1,0	

5.3.3 Análise multivariada dos fatores associados com atividade necro-inflamatória hepática

Na análise multivariada dos fatores associados à atividade necro-inflamatória, além dos níveis plasmáticos de sTNFR2, foram incluídas no modelo inicial as variáveis esteatose hepática, diabetes *mellitus* tipo 2, idade no momento da biópsia, elevação de ALT $\geq 1,5x$ LSN, uso de medicação hepatotóxica e hábito de ingestão etílica moderada/intensa (>40 g/d) próximo à realização da biópsia. Estas duas últimas variáveis, apesar de não terem se associado de maneira significativa à atividade necro-inflamatória hepática na análise univariada, foram incluídas por sua relevância clínica.

A variável “carga viral elevada” não foi incluída por estar disponível apenas em alguns pacientes com genótipo 1, o que reduziria substancialmente o número de pacientes na análise, impossibilitando a realização de regressão logística. O modelo inicial e os diversos modelos intermediários da análise de regressão logística estão apresentados no APÊNDICE B. No modelo final, permaneceram associadas à atividade necro-inflamatória, de maneira significativa e independente, as variáveis níveis plasmáticos de sTNFR2, esteatose hepática e diabetes *mellitus* tipo 2 (TAB. 9).

TABELA 9

Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória (METAVIR A \geq 2) à biópsia hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV

Fator	OR (95% IC)	Valor de p
sTNFR2 (ng/mL)	2,85 (1,09-7,47)	0,033
Esteatose	3,22 (1,08-9,63)	0,036
Diabetes tipo 2	11,43 (1,08-121,60)	0,043

Hosmer-Lemeshow: 0,73; Nagelkerke R²: 0,28

5.3.4 Análise multivariada dos fatores associados à fibrose hepática

Na análise multivariada dos fatores associados à fibrose hepática, optou-se por construir um modelo para cada marcador inflamatório solúvel cujos níveis plasmáticos se associaram de maneira significativa, na análise univariada, à fibrose, ou seja, CXCL9, sTNFR1 e sTNFR2, devido à correlação existente entre eles (TAB. 10).

Além dos mediadores inflamatórios, foram incluídas nos modelos iniciais de regressão logística as variáveis idade no momento da biópsia, esteatose hepática, diabetes *mellitus* tipo 2, genótipo viral e ingestão etílica > 40 g/d recente. Devido à correlação entre os níveis séricos de ALT e atividade necro-inflamatória (Spearman rho 0,33; p=0,005), optou-se por incluir apenas uma delas no modelo, sendo a atividade necro-inflamatória a escolhida, por sua maior associação com fibrose hepática na análise univariada. Apesar de não terem apresentado significância estatística na análise univariada, as variáveis genótipo viral e ingestão etílica recente foram incluídas no modelo inicial pela relevância clínica e por terem apresentado valor de p < 0,20 na análise univariada. Em relação aos níveis de sTNFR2, optou-se por construir um segundo modelo inicial, não incluindo a variável atividade necro-inflamatória, pela correlação significativa entre essas variáveis (Spearman rho 0,29; p=0,017). Os modelos iniciais e os diversos modelos intermediários da análise de regressão logística estão apresentados no APÊNDICE B.

Nos modelo finais, a atividade necro-inflamatória permaneceu fortemente associada à fibrose hepática em todos os modelos nos quais esta variável foi incluída (TAB. 10 a 12). Os níveis plasmáticos de CXCL9 e de sTNFR1 permaneceram associados

à fibrose hepática no modelo final, demonstrando que a associação ocorre de maneira independente da atividade necro-inflamatória. Em relação aos níveis de sTNFR2, esta variável não se manteve associada de maneira significativa à fibrose hepática no modelo incluindo a variável atividade necro-inflamatória, sugerindo que a associação de sTNFR2 com fibrose seja mediada por sua correlação com a atividade necro-inflamatória. O mesmo ocorreu com a variável idade no momento da biópsia, que se associou de maneira independente à fibrose hepática apenas no modelo que não incluiu a variável atividade necro-inflamatória. A variável ingestão etílica moderada/intensa próximo da data da biópsia permaneceu associada de maneira independente à fibrose hepática no modelo contendo o marcador inflamatório sTNFR1 e no que incluiu o marcador sTNFR2 sem a inclusão da variável atividade necro-inflamatória (TAB. 10 e 11).

TABELA 10

Análise da correlação entre os níveis plasmáticos pré-tratamento de quimiocinas em pacientes com infecção crônica pelo HCV (N=71)

	Coeficiente de correlação (valor de p)		
	CXCL9	sTNFR1	sTNFR2
CXCL9	1,0	0,54 (<0,001)	0,37 (0,002)
sTNFR1	0,54 (<0,001)	1,0	0,79 (<0,001)
sTNFR2	0,37 (0,002)	0,79 (<0,001)	1,0

TABELA 11

Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática na infecção crônica pelo HCV, incluindo o marcador inflamatório sTNFR1

Fator	OR (95% IC)	Valor de p
sTNFR1 (ng/mL)	19,85 (1,57-251,22)	0,021
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	40,96 (7,09-236,56)	<0,001
Étilismo moderado/intenso recente	5,95 (1,24-28,61)	0,026

Hosmer-Lemeshow: 0,62; Nagelkerke R²: 0,59

TABELA 12

Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática na infecção crônica pelo HCV, incluindo o marcador inflamatório sTNFR2

Fator	OR (95% IC)	Valor de p
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	25,31 (6,03-103,14)	<0,001
Etilismo moderado/intenso recente	3,68 (0,93-14,54)	0,063

Hosmer-Lemeshow: 0,85 ; Nagelkerke R² : 0,47

TABELA 13

Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática na infecção crônica pelo HCV, incluindo o marcador inflamatório sTNFR2 e não incluindo a variável atividade necro-inflamatória

Fator	OR (95% IC)	Valor de p
sTNFR2 (ng/mL)	2,87 (1,05-7,83)	0,039
Idade (anos)	1,08 (1,02-1,14)	0,010
Etilismo moderado/intenso recente	5,19 (1,34-20,03)	0,017

Hosmer-Lemeshow: 0,24; Nagelkerke R² : 0,29

TABELA 14

Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática na infecção crônica pelo HCV, incluindo o marcador inflamatório CXCL9

Fator	OR (95% IC)	Valor de p
CXCL9 (ng/mL)	3,06 (1,16-8,11)	0,024
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	31,98 (6,21-164,82)	<0,001

Hosmer-Lemeshow: 0,78; Nagelkerke R² : 0,54

5.4 Fatores associados à resposta terapêutica

Dos 73 pacientes incluídos, 43 (58,9%) submeteram-se, no período estudado, a tratamento específico com interferon, na forma convencional ou peguilada, e ribavirina. Um deles utilizou, de maneira equivocada, apenas a metade da dose prescrita de ribavirina nos dois primeiros meses de tratamento e uma teve o tratamento suspenso antes da 12ª semana devido à anemia grave, sendo excluídos da análise. Entre os 41 pacientes elegíveis para esta análise, a média de idade foi de 44,4 (\pm 11,1) anos, 23 (56,1%) eram do sexo masculino, 29 (70,7%) estavam infectados pelo genótipo 1 do HCV, 29 (70,7%) apresentavam aumento de ALT superior a 1,5 vez o limite superior da normalidade, 28 (68,3%) tinham fibrose moderada/avançada à biópsia, sendo que 10 (24,4%) tinham diagnóstico histológico de cirrose hepática (TAB. 15). Os pacientes com genótipo 1 tiveram carga viral pré-tratamento analisada e 16 (57,1 %) apresentavam carga viral do HCV > 600.000 UI/mL.

TABELA 15

Perfil dos pacientes com hepatite C crônica submetidos a tratamento com interferon e ribavirina (N=41)

Característica	n	% ou média (dp)
Idade em anos (média \pm dp)	41	44,4 \pm 11,1
Peso em kg (média \pm dp)	41	68,5 \pm 13,1
Sexo masculino (%)	23	56,1%
Genótipo (%)		
1	29	70,7%
2	5	11,9%
3	7	19,0%
Carga viral elevada (>600.000 UI/mL) (n=28)	16	55,2%
Elevação de ALT (>1,5x LSN)		70,7%
Alterações à biópsia hepática		
- Atividade inflamatória (A\geq2)	20	48,8%
- Fibrose (F\geq2)	28	68,3%
- Cirrose	10	24,4%
- Esteatose \geq1	20	48,8%

Dos 29 pacientes com genótipo 1, oito utilizaram peg-interferon alfa 2a e 21 e fizeram uso de peg-interferon alfa 2b associados à ribavirina ajustada pelo peso do paciente. Os pacientes com genótipo 2 e 3 foram todos tratados com interferon convencional e ribavirina ajustada pelo peso.

Os pacientes com genótipo 1 realizaram a quantificação do RNA do HCV por PCR na 12^a semana de tratamento e a resposta virológica precoce (RVP) foi de 69%. Todos os que tinham RVP apresentaram o RNA do HCV indetectável pela técnica de PCR quantitativo na 12^a semana.

Dos 41 elegíveis para análise do tratamento, 40 haviam concluído o tratamento até o final do período de coleta de dados para este estudo. Destes, dois interromperam o tratamento entre a 12^a semana e o final, sendo excluídos da análise de fatores preditores de resposta. Um paciente suspendeu o tratamento por ordem médica devido a efeito adverso (anemia grave necessitando de hemotransusão) e o outro o abandonou após reiniciar consumo abusivo de bebida alcoólica. Desta forma, 38 indivíduos foram analisados em relação aos fatores preditores de resposta virológica ao final do tratamento e 24 semanas após o término do mesmo.

As taxas globais de RVF e RVS foram de 60,5 e 55,3%, respectivamente. As taxas de resposta virológica, tanto final quanto sustentada, foram mais altas para pacientes portadores do genótipo 2, seguidos do genótipo 3 e genótipo 1 (TAB. 16).

TABELA 16

Resposta virológica ao tratamento de pacientes com infecção crônica pelo HCV, global e estratificada por genótipo viral

	RVP (N=29)	RVF (N=38)	RVS (N=38)
Global	-	23/38 (60,5%)	21/38 (55,3%)
Genótipo 1	20/29 (69,0%)	13/26* (50%)	12/26* (46,2%)
Genótipo 2	-	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Genótipo 3	-	5/7 (71,4%)	4/7 (57,1%)

RVP: resposta virológica precoce; RVF: resposta virológica ao final do tratamento; RVS: resposta virológica sustentada.

*Observação: foram excluídos da análise de RVP e RVS um paciente que abandonou o tratamento, um que precisou interrompê-lo por efeitos colaterais entre a 12^a e a 48^a semana e um que não o havia concluído até o término do período de coleta de dados.

5.4.1 Análise da associação entre marcadores inflamatórios solúveis e resposta virológica ao tratamento

A análise da associação entre marcadores inflamatórios solúveis pré-tratamento e resposta ao tratamento da hepatite C crônica mostrou que níveis plasmáticos de CXCL10 mais elevados estiveram associados à ausência tanto de RVP ($p=0,011$) quanto de RVS ($p=0,045$) - (GRÁF. 8 e 13 e TAB. 17 e 19) A acurácia dos níveis plasmáticos de CXCL10 para predição de ausência de resposta precoce foi de 0,79 (IC95% 0,59-0,99), com sensibilidade de 78% e especificidade de 65% para ausência de RVP utilizando-se o valor de 220 pg/mL como ponto de corte (GRÁF. 10). A utilização dos valores inferiores a 150 e superiores a 450 pg/mL para predição de resposta terapêutica resultou em valores preditivos positivo e negativo para RVP de 85,7% e 71,4%, respectivamente (TAB. 20 e 21); entretanto, 15 (51,7%) dos 29 pacientes apresentaram valores plasmáticos de CXCL10 entre 150 e 450 pg/mL e não seriam passíveis de classificação utilizando estes pontos de corte.

Para predição de RVS, a acurácia dos níveis plasmáticos de CXCL10 foi menor (0,69 - IC95% 0,51-0,87) - (GRÁF. 11). Utilizando-se os mesmos valores empregados para predição de RVP, ou seja, abaixo de 150 pg/mL e acima 450 pg/mL, encontrou-se um valor preditivo positivo de 78,6% e valor preditivo negativo 66,7% em relação à RVS (TAB. 22 e 23); 15 (39,5%) dos 38 pacientes exibiram valores plasmáticos de CXCL10 entre 150 e 450 pg/mL e não seriam passíveis de classificação usando esses pontos de corte.

Adotando-se como ponto de corte níveis plasmáticos de CXCL10 de 600 pg/mL, verificou-se que apenas quatro pacientes apresentavam níveis superiores a este valor. Nesse pequeno grupo, a taxa de RVS foi de 25%, sendo que o único paciente respondedor era genótipo 2.

Os níveis plasmáticos de CXCL10 não se associaram à RVF ($p=0,121$). Os outros mediadores inflamatórios solúveis analisados não se associaram à resposta terapêutica (TAB. 17 a 19).

As amostras plasmáticas utilizadas nesta análise foram coletadas próximo à biópsia hepática e, por isso, o tempo entre a coleta e o início do tratamento foi muito variável. O tempo médio entre a coleta da amostra e o início do tratamento foi de 265 (± 173) dias. Uma subanálise de treze pacientes cujo tempo entre coleta da amostra e início de tratamento foi superior à média, ou seja, a 265, dias mostrou que mesmo nesse subgrupo

a mediana dos níveis pré-tratamento foi mais alta para o grupo dos três pacientes sem RVP se comparada àquela encontrada no grupo de respondedores (536,0 pg/mL vs. 174,6 pg/mL, respectivamente; $p=0,043$) (GRÁF. 12).

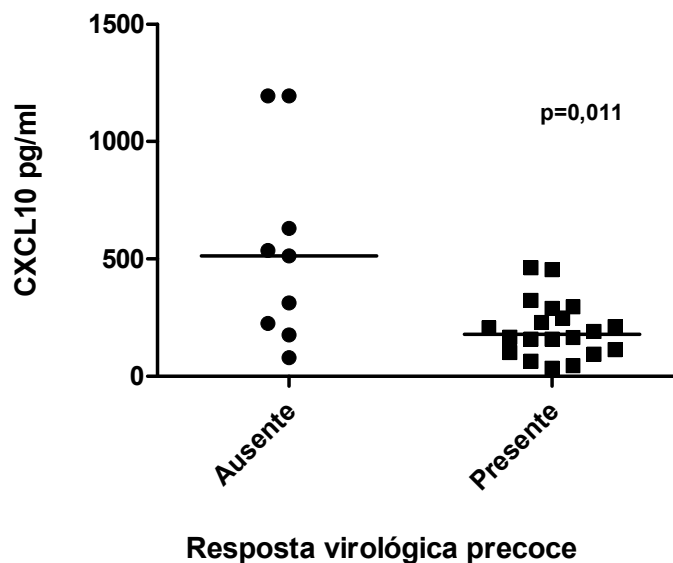


GRÁFICO 8 - Níveis plasmáticos pré-tratamento de CXCL10 em pacientes com hepatite C crônica estratificado por resposta virológica precoce.

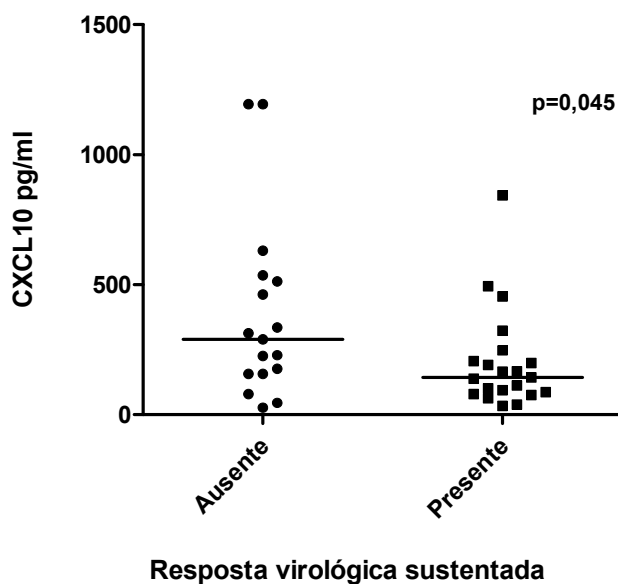


GRÁFICO 9 - Níveis plasmáticos de CXCL10 em pacientes com hepatite C crônica estratificados por resposta virológica sustentada.

TABELA 17

Associação dos níveis plasmáticos pré-tratamento de quimiocinas e receptores solúveis de TNF com resposta virológica precoce (RVP)

Fator	Sem RVP (n=9)	Com RVP (n=20)	Valor de p
CCL2	124,5 (85,5-177,8)	122,7 (36,2-133,3)	0,627
CCL3	141,1 (89,1-207,6)	100,9 (5,0-126,9)	0,340
CCL11	259,1 (239,4-304,9)	216,6 (168,0-273,0)	0,183
CCL24	690,4 (346,2-1050,1)	686,6 (429,5-1228,6)	0,945
CXCL9	434,4 (102,5-1711,0)	637,2 (2,5-1208,4)	0,729
CXCL10	512,9 (225,5-630,3)	179,1 (107,2-268,9)	0,011
sTNFR1	721,7 (636,7-996,7)	824,6 (537,3-1064,9)	0,982
sTNFR2	2078,0 (1992,8-2947,1)	2411,0 (1837,6-2657,8)	0,594

TABELA 18

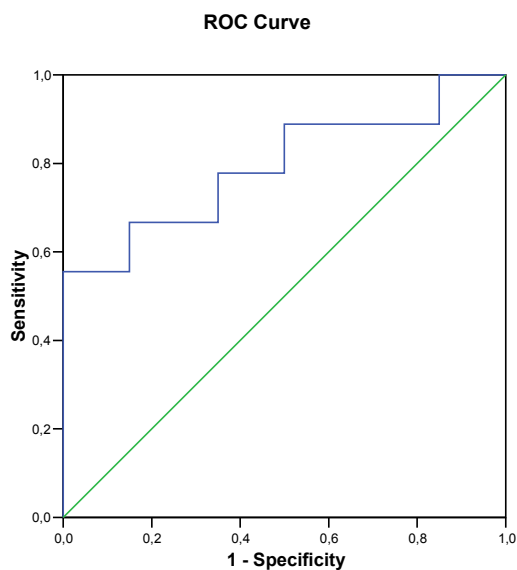
Associação dos níveis plasmáticos pré-tratamento de quimiocinas e receptores solúveis de TNF com resposta virológica ao final do tratamento (RVF)

Fator	Sem RVF (n=15)	Com RVF (n=23)	Valor de p
CCL2	103,2 (71,4-152,9)	128,0 (69,7-158,2)	0,701
CCL3	98,5 (86,8-183,8)	108,0 (44,6-195,7)	0,953
CCL11	239,4 (180,9-266,1)	220,1 (164,7-272,1)	0,616
CCL24	761,7 (513,4-1219,6)	719,3 (429,6-1100,1)	0,746
CXCL10	229,3 (157,7-524,4)	165,2 (90,5-268,9)	0,121
CXCL9	541,0 (53,8-1154,3)	583,7 (211,6-1089,1)	0,953
sTNFR1	721,7 (636,7-1001,2)	677,8 (515,8-1037,9)	0,658
sTNFR2	2078,0 (1850,4-2810,0)	2328,7 (1852,4-2632,0)	0,930

TABELA 19

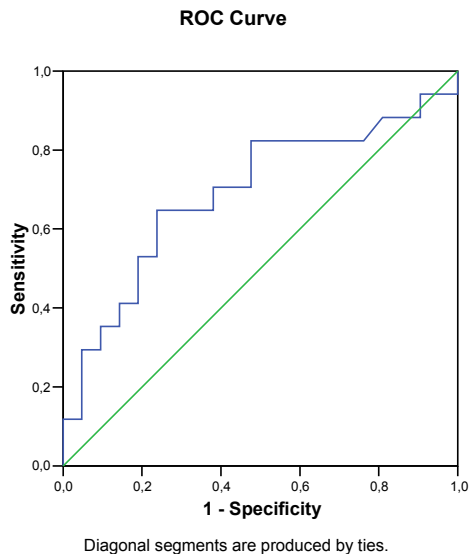
Associação dos níveis plasmáticos pré-tratamento de quimiocinas e receptores solúveis de TNF com resposta virológica sustentada

Fator	Sem RVS (n=17)	Com RVS (n=21)	Valor de p
CCL2	120,9 (85,5-177,8)	124,5 (53,8-135,1)	0,728
CCL3	103,3 (89,1-207,6)	108,0 (0-169,5)	0,561
CCL11	239,4 (174,4-273,1)	220,1 (167,9-265,6)	0,504
CCL24	806,5 (610,4-1050,1)	690,5 (390,0-1132,0)	0,581
CXCL9	626,5 (102,5-1273,6)	583,7 (158,7-884,0)	0,486
CXCL10	289,9 (157,7-512,9)	142,7 (86,7-206,6)	0,045
sTNFR1	721,7 (636,7-996,7)	613,4 (498,3-1049,6)	0,622
sTNFR2	2078,0 (1808,5-2683,4)	2328,7 (1910,0-2632,2)	1,0



AUC 0,79 (IC95%: 0,59-0,99)

GRÁFICO 10 - Curva ROC dos níveis plasmáticos de CXCL10 como preditor de ausência de resposta virológica precoce.



AUC 0,69 (IC95%: 0,51 - 0,87)

GRÁFICO 11 - Curva ROC dos níveis plasmáticos de CXCL10 como preditor de ausência de resposta virológica sustentada.

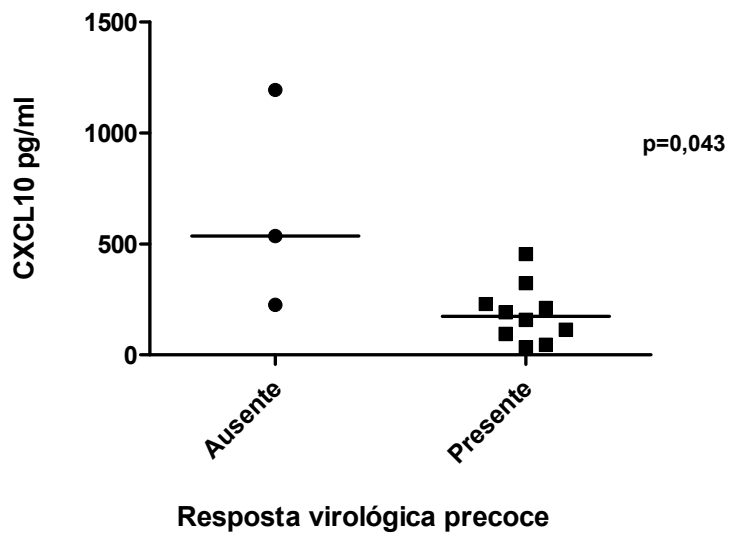


GRÁFICO 12 - Níveis plasmáticos de CXCL10 estratificado por resposta virológica precoce em pacientes com tempo entre coleta da amostra e início do tratamento superior a 265 dias.

TABELA 20

Associação entre níveis plasmáticos de CXCL10 e
resposta virológica precoce (RVP)

RVP	Níveis de CXCL10		Total
	≤ 150 pg/mL	> 150 pg/mL	
Ausente	1 (14,3%)	8 (36,4%)	9 (31,0%)
Presente	6 (85,7%)	14 (63,6%)	21 (69,0%)
Total	7 (100%)	22 (100%)	29 (100%)

TABELA 21

Associação entre níveis plasmáticos de CXCL10
e resposta virológica precoce (RVP)

RVP	Níveis de CXCL10		Total
	≤ 450 pg/mL	> 450 pg/mL	
Ausente	4 (18,2%)	5 (71,4%)	9 (31,0%)
Presente	18 (81,8%)	2 (28,6%)	21 (69,0%)
Total	22 (100%)	7 (100%)	29 (100%)

TABELA 22

Associação entre níveis plasmáticos de CXCL10 e
resposta virológica sustentada (RVS)

RVS	Níveis de CXCL10		Total
	≤ 150 pg/mL	> 150 pg/mL	
Ausente	3 (21,4%)	14 (58,3%)	17 (44,7%)
Presente	11 (78,6%)	10 (41,7%)	21 (55,3%)
Total	14 (100%)	24 (100%)	38 (100%)

TABELA 23
Associação entre níveis plasmáticos de CXCL10 e
resposta virológica sustentada (RVS)

RVS	Níveis de CXCL10		Total
	≤ 450 pg/mL	> 450 pg/mL	
Ausente	11 (37,9%)	6 (66,7%)	17 (44,7%)
Presente	18 (62,1%)	3 (33,3%)	21 (55,3%)
Total	29 (100%)	9 (100%)	38 (100%)

5.4.2 Associação entre fatores clínico-demográficos e resposta virológica ao tratamento

Nenhum dos fatores clínicos, demográficos ou virológicos analisados associou-se de maneira estatisticamente significativa às respostas virológica precoce, final ou sustentada (TAB. 24 a 26). Apesar da ausência de significância estatística, é interessante observar que nenhum dos três pacientes portadores de diabetes *mellitus* submetidos ao tratamento obteve resposta virológica sustentada.

TABELA 24

Associação entre fatores clínico-demográficos e resposta virológica precoce em pacientes com infecção crônica pelo HCV (apenas genótipo 1)

Fator	N	Com RVP n (%)	RR (95% CI)	Valor de p	
Sexo	Masculino	16	10 (62,5)	0,81 (0,50-1,32)	0,454
	Feminino	13	10 (76,9)		
Níveis de ALT	≥1,5x LSN	20	15 (75,0)	1,78 (0,62-5,10)	0,396
	< 1,5x LSN	9	5 (55,6)		
Carga viral (UI/mL)	≥ 600.000	12	8 (66,7)	0,75 (0,23-2,41)	0,691
	< 600.000	16	12 (75,0)		
Passado de esquistossomose	Sim	10	6 (60,0)	0,66 (0,23-1,92)	0,675
	Não	19	14 (73,7)		

Continua TAB. 24

Fator	N	Com RVP n (%)	RR (95% CI)	Valor de p	
Ingestão etílica	≥40g/d	14	8 (57,1)	0,47 (0,14-1,52)	0,245
	ausente ou < 40g/d	15	12 (80,0)	1,0	
Ingestão etílica recente	≥ 40g/d	3	2 (66,7)	1,04 (0,45-2,41)	1,0
	ausente ou < 40g/d	26	18 (69,2)	1,0	
Atividade necro-inflamatória hepática					
	moderada/intensa (A ≥ 2)	13	9 (69,2)	1,02 (0,34-3,03)	1,0
	ausente/leve (A ≤ 1)	16	11 (68,8)	1,0	
Fibrose hepática					
	moderada/intensa (F ≥ 2)	18	13 (72,2)	1,31 (0,45-3,85)	0,694
	ausente/leve (F ≤ 1)	11	7 (63,6)	1,0	
Cirrose	presente	7	6 (85,7)	2,54 (0,38-16,97)	0,382
	ausente	22	14 (63,6)		
Esteatose	presente	15	12 (80,0)	2,14 (0,66-6,95)	0,245
	ausente	14	8 (57,1)	1,0	

TABELA 25

Associação entre fatores clínico-demográficos e resposta virológica ao final do tratamento em pacientes com infecção crônica pelo HCV

Fator	N	Com RVF n (%)	RR (95% CI)	Valor de p
Sexo	22	13 (59,1)	0,92 (0,41-2,06)	1,0
Masculino	16	10 (62,5)		
Feminino				
Níveis de ALT				
≥1,5x LSN	27	17 (63,0)	1,23 (0,54-2,78)	0,722
< 1,5x LSN	11	6 (54,5)		
Carga viral (UI/mL)				
≥600.000	10	3 (33,3)	0,48 (0,21-1,08)	0,111
< 600.000	15	10 (66,7)		
Passado de esquistossomose				
Sim	11	5 (45,5)	0,61 (0,29-1,31)	0,285
Não	27	18 (66,7)		
Ingestão etílica				
≥ 40g/d	20	11 (55,0)	0,74 (0,33-1,67)	0,522
ausente ou < 40g/d	18	12 (66,7)		
Ingestão etílica recente				
≥ 40g/d	4	2 (50,0)		
ausente ou < 40g/d	34	21 (61,8)		
Atividade necro-inflamatória hepática				
moderada/intensa (A ≥ 2)	18	10 (55,6)	0,79 (0,36-1,73)	0,741
Ausente/leve (A ≤ 1)	20	13 (65,0)		
Fibrose hepática				
moderada/intensa (F ≥ 2)	25	15 (60,0)	0,96 (0,42-2,22)	1,0
Ausente/leve (F ≤ 1)	13	8 (61,5)		
Cirrose				
Presente	8	4 (50,0)	0,73 (0,32-1,69)	0,687
Ausente	30	19 (63,3)		
Esteatose				
Presente	18	12 (66,7)	1,35 (0,60-3,04)	0,522
Ausente	20	11 (55,5)		

TABELA 26

Associação entre fatores clínico-demográficos e resposta virológica sustentada

Fator	Total N	Com RVS	RR (95% CI)	Valor de p	
Sexo	Masculino	22	12 (54,5)	0,96 (0,47-1,98)	1,0
	Feminino	16	9 (56,3)	1,0	
Diabetes	Sim	3	0 (0)	0,82 (0,66-1,03)	0,081
	Não	35	21 (60)	1,0	
Passado de esquistossomose	Sim	11	5 (45,5)	0,75 (0,37-1,51)	0,491
	Não	27	16 (59,3)	1,0	
Ingestão etílica	≥ 40g/d	20	10 (50,0)	0,78 (0,38-1,61)	0,532
	ausente ou < 40g/d	18	11 (61,1)	1,0	
Ingestão etílica recente	≥ 40g/d	4	1 (25,0)	0,55 (0,27-1,10)	0,307
	ausente ou < 40g/d	34	20 (58,8)	1,0	
Genótipo	1	26	12 (46,2)	0,46 (0,16-1,32)	0,161
	2 ou 3	12	9 (75,0)	1,0	
Níveis de ALT	≥ 1,5x LSN	27	16 (59,3)	1,34 (0,66-2,71)	0,491
	< 1,5x LSN	11	5 (45,5)	1,0	
Carga viral (UI/mL)	≥ 600.000	10	3 (30,0)	0,57 (0,27-1,20)	0,226
	< 600.000	15	9 (60,0)	1,0	
Atividade necro-inflamatória hepática					
	moderada/intensa (A ≥ 2)	18	9 (50,0)	0,80 (0,39-1,62)	0,745
	Ausente/leve (A ≤ 1)	20	12 (60,0)	1,0	
Fibrose hepática					
	moderada/intensa (F ≥ 2)	25	13 (52,0)	0,80 (0,36-1,78)	0,734
	Ausente/leve (F ≤ 1)	13	8 (61,5)	1,0	
Cirrose	Presente	8	3 (37,5)	0,64 (0,32-1,28)	0,426
	Ausente	30	18 (60,0)	1,0	
Esteatose hepática	Presente	18	11 (55,0)	1,01 (0,50-2,06)	1,0
	Ausente	20	10 (55,6)	1,0	

5.4.3 Análise da cinética dos mediadores inflamatórios solúveis após início do tratamento

Na análise da cinética das citocinas, foram comparados os níveis desses marcadores inflamatórios antes, durante e ao final do tratamento. Dos 41 pacientes que iniciaram tratamento, 25 com genótipo 1 tinham amostra coletada na 12^a semana de tratamento disponível para análise e 13, com diferentes genótipos virais (quatro com genótipo viral 1, cinco com genótipo 2 e quatro com genótipo 3), tinham amostra coletada ao final do tratamento.

Observou-se que os níveis plasmáticos de CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL24, sTNFR1 reduziram-se, enquanto os níveis de sTNFR2 elevaram-se significativamente na 12^a semana de tratamento comparando-se com os níveis pré-tratamento (TAB. 27). No final do tratamento, os níveis de CXCL9, CCL3 e sTNFR1 reduziram-se enquanto os níveis de CCL11 elevaram-se de maneira significativa em relação aos níveis encontrados antes do tratamento (TAB. 28).

TABELA 27

Comparação dos níveis plasmáticos pré-tratamento dos marcadores inflamatórios pré-tratamento com interferon e ribavirina e na 12^a semana de tratamento (n=25).

Fator	Mediana (AIQ) pré-tratamento	Mediana (AIQ) 12^a semana de tratamento	Valor de p
CXCL9	434,4 (5,0-1143,3)	0 (0-40,6)	0,001
CXCL10	225,5 (157,7-322,8)	29,3 (0-264,9)	0,004
CCL2	124,5 (57,3-135,1)	0 (0-225,7)	0,601
CCL3	98,5 (78,5-160,1)	0 (0-5,0)	<0,001
CCL11	220,1 (174,4-273,1)	243,0 (215,2-273,1)	0,475
CCL24	690,5 (416,3-1389,1)	437,1 (247,6-624,4)	< 0,001
sTNFR1	737,8 (567,9-1005,8)	539,4 (408,8-638,3)	< 0,001
sTNFR2	2328,7 (1892,2-2723,2)	2751,7 (2262,1-3388,6)	0,001

TABELA 28

Comparação dos níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios pré-tratamento e ao final do tratamento com interferon e ribavirina em pacientes com hepatite C crônica (n=13)

Fator	Mediana (AIQ) pré-tratamento	Mediana (AIQ) final do tratamento	Valor de p
CXCL9	583,7 (158,7-841,0)	0 (0-140,6)	0,021
CXCL10	112,8 (75,5-166,7)	0 (0-271,5)	0,152
CCL2	92,6 (18,6-124,5)	24,1 (0 – 473,8)	0,203
CCL3	103,3 (0-108,0)	5,0 (0 – 5,0)	0,013
CCL11	200,4 (148,5-239,5)	253,8 (239,9-283,0)	0,039
CCL24	574,9 (318,7-1132,0)	436,3 (155,0-691,3)	0,311
sTNFR1	584,7 (443,8-923,1)	495,5 (388,4-577,5)	0,007
sTNFR2	2233,7 (1798,0 – 2336,9)	2133,9 (1760,4-2534,1)	0,311

Estratificando a análise da cinética dos marcadores inflamatórios pela resposta terapêutica, verificou-se que os níveis plasmáticos de CXCL10 na 12^a semana reduziram-se de maneira significativa apenas entre respondedores virológicos precoces (TAB. 29 e 30). Um padrão semelhante foi observado para os níveis de CXCL9 e CCL24.

Em relação à RVS, as reduções nos níveis de CXCL9, CCL3, CCL24 e sTNFR1 na 12^a semana de tratamento foram registradas tanto entre pacientes com resposta quanto naqueles sem RVS (TAB. 31 e 32).

TABELA 29

Comparação dos níveis pré-tratamento e na 12^a semana de tratamento entre pacientes com hepatite C crônica sem resposta precoce a interferon e ribavirina (n=8)

Fator	Mediana (AIQ) pré-tratamento	Mediana (AIQ) 12^a semana de tratamento	Valor de p
CXCL9	391,9 (53,8-1126,0)	13,9 (0-186,6)	0,071
CXCL10	412,8 (201,0-583,1)	132,1 (0-492,9)	0,216
CCL2	113,8 (42,8-152,9)	0 (0-340,7)	0,921
CCL3	117,4 (83,8-183,8)	2,5 (0 – 68,2)	0,040
CCL11	252,5 (219,9-289,0)	243,9 (183,8-279,6)	0,618
CCL24	553,3 (241,8-1303,6)	479,7 (139,6-741,1)	0,091
sTNFR1	680,1 (602,3-867,2)	492,8 (394,8-657,5)	0,041
sTNFR2	2076,1 (1942,5-2941,8)	2647,1 (2331,1-3111,3)	0,068

TABELA 30

Comparação dos níveis dos marcadores inflamatórios plasmáticos pré-tratamento e na 12^a semana de tratamento entre pacientes com hepatite C crônica apresentando resposta precoce ao tratamento com interferon e ribavirina (n=17)

Fator	Mediana (AIQ) pré-tratamento	Mediana (AIQ) 12^a semana de tratamento	Valor de p
CXCL9	690,7 (5,0-1143,3)	0 (0 – 0)	0,006
CXCL10	206,6 (101,6-289,9)	29,3 (0 – 240,5)	0,003
CCL2	128,0 (57,3-135,1)	7,4 (0-225,7)	0,467
CCL3	98,5 (10,0-131,6)	0 (0 – 5,0)	0,001
CCL11	213,4 (168,1-267,3)	230,4 (216,5 – 272,2)	0,101
CCL24	743,8 (610,4-1389,1)	437,1 (260,1 – 579,6)	0,001
sTNFR1	833,1 (541,3-1026,3)	539,4 (432,1-622,3)	0,004
sTNFR2	2493,4 (1765,1-2683,4)	2751,7 (2262,1-3470,6)	0,006

TABELA 31

Comparação dos níveis dos marcadores inflamatórios plasmáticos pré-tratamento e na 12^a semana de tratamento entre pacientes com hepatite C crônica sem resposta sustentada (n=13)

Fator	Mediana (AIQ) pré- tratamento	Mediana (AIQ) 12^a semana de tratamento	Valor de p
CXCL9	434,4 (5,0-1273,6)	0 (0-27,9)	0,011
CXCL10	289,9 (157,7-512,9)	0 (0-288,6)	0,061
CCL2	103,2 (57,3-128,0)	0 (0 – 225,7)	0,897
CCL3	98,5 (84,4-141,1)	0 (0 – 5,0)	0,005
CCL11	200,4 (168,1 – 259,1)	243,0 (209,8-273,1)	0,648
CCL24	690,4 (416,3-1050,1)	375,8 (260,1-577,9)	0,009
sTNFR1	721,7 (636,7-996,7)	464,4 (408,8-676,7)	0,007
sTNFR2	2146,3 (1992,8-2683,4)	2692,7 (2337,3-2849,5)	0,021

TABELA 32

Comparação dos níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios pré-tratamento e na 12^a semana de tratamento entre pacientes com hepatite C crônica apresentando resposta sustentada (n=9)

Fator	Mediana (AIQ) pré- tratamento	Mediana (AIQ) 12^a semana de tratamento	Valor de p
CXCL9	690,7 (264,5-884,0)	0 (0 – 40,6)	0,021
CXCL10	191,5 (94,2-247,9)	80,1 (3,5 – 240,5)	0,092
CCL2	131,6 (128,0-152,9)	141,4 (0-489,1)	0,407
CCL3	122,2 (98,5 – 236,2)	0 (0 – 5,0)	0,021
CCL11	257,8 (213,4-291,8)	221,0 (216,5 – 274,9)	0,950
CCL24	1068,2 (690,5-2010,3)	520,5 (247,6 – 772,9)	0,021
sTNFR1	837,1 (541,3 – 1103,6)	539,4 (457,4 – 622,3)	0,050
sTNFR2	2493,4 (1765,1-2784,3)	2751,7 (2262,1- 3741,7)	0,111

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que os níveis plasmáticos de CXCL9 e de receptores solúveis de TNF associaram-se de maneira independente às alterações histológicas hepáticas em pacientes com hepatite C crônica.

Em relação aos receptores solúveis de TNF, os níveis de sTNFR1 e sTNFR2 associaram-se de maneira significativa ao estadiamento hepático, sendo que os níveis de sTNFR2 associaram-se também à atividade necro-inflamatória. Esses receptores solúveis resultam da clivagem de receptores TNF de membrana de células inflamatórias, como monócitos, neutrófilos e linfócitos T ativados (PORTEU; HIEBLOT, 1994) e contribuem para a homeostasia do sistema TNF, competindo com os receptores de membrana por sua ligação.

Em estudos experimentais de endotoxemia em humanos, a elevação dos níveis séricos de TNF após administração de endotoxina correlacionaram-se com a elevação dos níveis de sTNFR (SPINAS; KELLER; BROCKHAUS, 1992; VAN ZEE *et al.*, 1992), sugerindo a possibilidade de utilização desses receptores solúveis como marcadores correlatos da ativação do sistema TNF (DIEZ-RUIZ *et al.*, 1995). Em pacientes com hepatite C crônica, a correlação entre níveis séricos de TNF e seus receptores solúveis, sTNFR1 e R2, foi demonstrada por Nelson *et al.* (1997). Zylberberg *et al.* (1999), entretanto, não conseguiram comprovar a associação entre níveis séricos de sTNFR e TNF, sugerindo a possibilidade de envolvimento de outros mediadores inflamatórios além do TNF na liberação do sTNFRs.

A maior ativação do sistema TNF poderia ser uma das explicações para o achado da associação entre níveis plasmáticos mais elevados de sTNFR2 e maior atividade necro-inflamatória. Como o TNF- α é um indutor de apoptose em hepatócitos infectados (KOUNTOURAS; ZAVOS; CHATZOPOULOS, 2003) e está também envolvido no dano causado pelos LTCs aos hepatócitos circunvizinhos não-infectados (KAPLANSKI *et al.*, 1997), maior ativação do sistema TNF resultaria em maior agressão ao parênquima hepático. Zylberberg *et al.* (1999), em estudo realizado com pacientes com hepatite C crônica, verificaram que níveis séricos de TNF dos pacientes com atividade necro-inflamatória intensa estiveram significativamente mais elevados do que aqueles encontrados em pacientes com atividade leve ou moderada.

Pesquisas anteriores haviam estabelecido a associação dos níveis séricos de sTNFR1 e sTNFR2 com os níveis de aminotransferases e diferentes intensidades de atividade necro-inflamatória hepática e de fibrose hepática (ITOH *et al.*, 1999; KAKUMU *et al.*, 1997; KALLINOWSKI *et al.*, 1998; ZYLBERBERG *et al.*, 1999). Kallinowski *et al.* (1998), assim como Itoh *et al.* (1999), encontraram, em análise univariada, a associação dos níveis séricos de sTNFR1 e sTNFR2 com atividade necro-inflamatória. Zylberberg *et al.* (1999) mostraram que níveis séricos de sTNFR2, além de associarem-se aos níveis de aminotransferases e atividade necro-inflamatória hepática, estiveram significativamente mais elevados entre pacientes com estadiamento mais avançado de fibrose hepática. Kakumu *et al.* (1997) constataram que os níveis séricos de sTNFR2 aumentaram gradativamente de acordo a progressão da doença em pacientes infectados pelo HCV, comparando os seguintes grupos de pacientes: portadores do HCV sem aumento de aminotransferases, presença de hepatite C crônica, cirrose e hepatocarcinoma.

A ausência de associação dos níveis plasmáticos de sTNFR1 com atividade necro-inflamatória encontrada neste estudo foi também registrada por Zylberberg *et al.* (1999). Em pessoas saudáveis, os níveis séricos de sTNFR2 são mais abundantes e demonstram mais afinidade com o TNF, se comparado ao sTNFR1 (DIEZ-RUIZ *et al.*, 1995). Em pacientes com hepatite C crônica, a expressão intra-hepática do TNFR2 é muito mais intensa do que a de TNFR1 (KALLINOWSKI *et al.*, 1998) e o sTNFR2 é liberado em concentrações bem maiores em resposta a citocinas inflamatórias (ZYLBERBERG *et al.*, 1999).

Em relação às quimiocinas estudadas, apenas os níveis plasmáticos de CXCL9 associaram-se de maneira significativa às alterações histológicas hepáticas. Os resultados deste trabalho mostraram que pacientes com estadiamento mais avançado de fibrose hepática apresentavam níveis plasmáticos mais elevados de CXCL9.

A CXCL9 é produzida por diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais sinusoidais, principalmente sob estímulo do IFN- γ (LUSTER, 1998; SHIELDS *et al.*, 1999). Por meio de sua ligação ao receptor CXCR3, encontrado principalmente em linfócitos T ativados com fenótipo Th1, a CXCL9 promove a quimiotaxia dessas células para o fígado, exercendo importante papel na inflamação hepática (BONECCHI *et al.*, 1998; CLARK-LEWIS *et al.*, 2003; LIAO *et al.*, 1995; LOETSCHER *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 2002; QIN *et al.*, 1998). Shields *et al.* (1999) e Zeremski *et al.* (2008) demonstraram, por imuno-histoquímica, que linfócitos infiltrando o espaço porta e o lóbulo hepático expressam CXCR3 e que ligantes deste receptor, como a CXCL9, estão presentes em

maior quantidade no endotélio sinusoidal e hepatócitos de pacientes com hepatite C crônica do que em pacientes utilizados como controle.

Embora não se possa afirmar que os níveis plasmáticos de CXCL9 analisados neste trabalho representem produção intra-hepática dessa quimiocina, três estudos atestaram que a expressão intra-hepática da CXCL9 está aumentada em pacientes com hepatite C crônica (APOLINARIO *et al.*, 2002; SHIELDS *et al.*, 1999; ZEREMSKI *et al.*, 2008). A análise imuno-histoquímica realizada por Apolinário *et al.* (2002), mostrou uma maior expressão de CXCL9 e uma presença mais marcante de linfócitos expressando CXCR3 e CCR5 nos ácinos hepáticos com maior infiltração leucocitária.

Apesar de Apolinário *et al.* (2002) não terem investigado a associação entre a CXCL9 e fibrose hepática, que foi demonstrada no presente trabalho, sabe-se que a intensidade da atividade necro-inflamatória hepática é fator preditor da evolução de fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica (BOCCATO *et al.*, 2006; FONTAINE *et al.*, 2001; POYNARD *et al.*, 2001). A associação significativa entre atividade necro-inflamatória e fibrose hepática foi também encontrada nesta pesquisa tanto na análise univariada (OR 21,1; IC95% 5,3-83,2) quanto nos diversos modelos de análise multivariada. Entretanto, os níveis plasmáticos de CXCL9 na amostra estudada, embora mais elevados entre os pacientes com maior atividade necro-inflamatória, não diferiram de maneira estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,09$). Outra explicação para a associação entre CXCL9 e fibrose hepática seria o seu papel como ligante do CXCR3 nas células estelares hepáticas. Essas células, que desempenham papel fundamental na fibrogênese hepática (FRIEDMAN, 2003; IREDALE, 2003), expressam CXCR3 em sua membrana e a ligação do CXCL9 a esses receptores estimula a proliferação e migração dessas células (BONACCHI *et al.*, 2001), etapa crítica na cicatrização do tecido hepático.

Os níveis periféricos da CXCL9 em pacientes com hepatite C crônica foram analisados em outros dois estudos, nos quais se demonstrou elevação dos níveis séricos dessa quimiocina nos pacientes portadores de hepatite C crônica em relação a controles sadios (APOLINARIO *et al.*, 2004; BUTERA *et al.*, 2005). Apolinário *et al.* (2004) analisaram 63 pacientes com hepatite C crônica e ressaltaram níveis séricos aumentados de CXCL9 em relação ao grupo-controle e correlação entre os níveis dessa quimiocina e a carga viral plasmática do HCV. Butera *et al.* (2005) avaliaram os níveis plasmáticos de CXCL9 em 82 pacientes e realçaram também elevação dos níveis entre pacientes com hepatite C crônica, se comparados a um grupo-controle. No entanto, nenhum desses dois estudos analisou a associação dos níveis de CXCL9 com alterações histológicas hepáticas.

No presente trabalho, evidenciou-se, pela primeira vez, a associação entre os níveis periféricos de CXCL9 e alterações histológicas hepáticas.

A CXCL10, um marcador inflamatório solúvel que vem sendo bastante estudado nos últimos anos, liga-se ao mesmo receptor da CXCL9 e exerce funções semelhantes. Dois estudos encontraram que os níveis de CXCL10 periféricos (tanto séricos quanto plasmáticos) estiveram associados, de forma dose-resposta, a inflamação e fibrose hepáticas (APOLINARIO *et al.*, 2004; HARVEY *et al.*, 2003). Na presente pesquisa, entretanto, os níveis plasmáticos de CXCL10 não se associaram de maneira significativa às alterações histológicas hepáticas nem apresentaram elevação significativa comparando-se os portadores de hepatite C crônica com o grupo-controle.

Considerando as quimiocinas da subfamília CC aqui analisadas (CCL2, CCL3, CCL11 e CCL24), não houve associação entre os níveis plasmáticos de nenhuma delas com alterações histológicas hepáticas; e também não houve diferença dos níveis plasmáticos entre pacientes portadores crônicos do HCV e o grupo-controle. Avaliações entre a associação dos níveis periféricos dessas quimiocinas com alterações histológicas hepáticas não foram encontradas na literatura.

Entre os fatores clínico-demográficos analisados, esteatose hepática, diabetes *mellitus* tipo 2, carga viral do HCV, elevação dos níveis de ALT e idade associaram-se à maior atividade necro-inflamatória na análise univariada. No modelo final, os níveis plasmáticos de sTNFR2, esteatose hepática e diabetes *mellitus* tipo 2 permaneceram associados, de maneira significativa e independente, à atividade necro-inflamatória.

Diversos autores têm destacado associação entre esteatose hepática e progressão da doença hepática (ADINOLFI *et al.*, 2001; CASTERA *et al.*, 2003; HOURIGAN *et al.*, 1999; PATTON *et al.*, 2004; RUBBIA-BRANDT *et al.*, 2004). Em uma metanálise que incluiu 3.068 pacientes de 10 centros na Europa e Estados Unidos, Leandro *et al.* (2006) salientaram que a esteatose hepática esteve associada tanto à fibrose quanto à atividade necro-inflamatória hepática em pacientes com hepatite C crônica. Esses autores sugerem que a esteatose hepática potencializaria o dano hepático pelo estímulo à produção de mediadores inflamatórios e pró-fibróticos como TNF- α , ácidos graxos livres e interleucina-6 (LEANDRO *et al.*, 2006).

A associação entre diabetes *mellitus* e alterações histológicas hepáticas se manteve mesmo após ajuste para idade e para uso de medicamentos potencialmente hepatotóxicos. A associação entre diabetes *mellitus* tipo 2 e fibrose hepática já foi demonstrada por diversos autores (MONTA *et al.*, 2002; ONG *et al.*, 2001; PETIT *et al.*,

2001) e a resistência à insulina parece associar-se, de maneira independente, à intensidade e à progressão da fibrose hepática (HUI *et al.*, 2003). Hui *et al.* (2003) acreditam que a hiperinsulinemia estimula a produção de citocinas fibrogênicas e a secreção de matriz extracelular.

Idade no momento da biópsia, esteatose hepática, diabetes *mellitus* tipo 2, atividade necro-inflamatória, elevação dos níveis de ALT e carga viral do HCV associaram-se com fibrose hepática no modelo univariado. Nos modelos de análise multivariada, atividade necro-inflamatória hepática e o hábito de ingestão etílica acima de 40 g/dia próximo da data da biópsia permaneceram associados à fibrose hepática.

O hábito de ingestão etílica acima de 40 g/dia nos seis meses anteriores à biópsia hepática também se associou de maneira significativa e independente à fibrose hepática. A dificuldade em abandonar o hábito etílico mesmo após o diagnóstico da hepatite C crônica pode refletir mais alto grau de dependência ao álcool e, desta forma, mais exposição ao álcool ao longo da vida. A ingestão etílica é um fator importante de progressão da doença hepática em pacientes com hepatite C crônica e já se estabeleceu associação entre o consumo de álcool ao longo da vida e a existência de cirrose hepática pelo vírus da hepatite C (OSTAPOWICZ *et al.*, 1998). O cálculo em g/dia é atualmente o mais utilizado, mas o limite de tolerância para ingestão etílica ainda não está muito bem definido. Os valores de ingestão acima dos quais o etanol exerceria efeito deletério ao fígado variam entre os diferentes autores, indo de 20 g/dia a 60 g/dia de etanol (HEZODE *et al.*, 2003; PESSIONE *et al.*, 1998; POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997; POYNARD *et al.*, 2001; WILEY *et al.*, 1998).

A associação entre carga viral e fibrose hepática encontrada no presente estudo não foi demonstrada em diversos estudos desenhados para avaliar fatores de progressão na hepatite C crônica (POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997; POYNARD *et al.*, 2001). Entretanto, a associação entre carga viral elevada e aumento da resistência à insulina foi recentemente demonstrada (HSU *et al.*, 2008; MOUCARI *et al.*, 2008). Como este aumento de resistência à insulina relaciona-se à progressão da fibrose hepática (HUI *et al.*, 2003), este poderia ser um possível mecanismo para explicar a associação entre carga viral elevada e níveis mais avançados de fibrose hepática aqui demonstrada.

Idade permaneceu associada à fibrose hepática apenas no modelo no qual a variável atividade necro-inflamatória não foi incluída. A associação diretamente proporcional entre idade e intensidade de fibrose hepática possivelmente reflete o maior tempo de infecção entre pacientes mais idosos, fator este sabidamente associado à

progressão da doença (POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997; POYNARD *et al.*, 2001). A associação entre fibrose hepática e tempo de infecção não foi encontrada neste estudo, possivelmente devido à dificuldade de obter essa informação de forma confiável. Na presente investigação, a provável forma de aquisição do HCV não foi identificada em mais de um terço dos pacientes e, mesmo naqueles em que ela foi constatada, a exposição ao fator se dava ao longo de vários anos, dificultando a definição do momento em que foram infectados. Independentemente do tempo de infecção, já foi evidenciado que pacientes com idade mais avançada apresentam progressão mais rápida da fibrose hepática (POYNARD *et al.*, 2001).

Esta pesquisa analisou também a associação entre os marcadores inflamatórios solúveis e resposta ao tratamento. Dos analisados, apenas os níveis plasmáticos pré-tratamento de CXCL10 associaram-se à resposta terapêutica, com níveis mais elevados dessa quimiocina associados a piores taxas de resposta virológica tanto precoce quanto sustentada. Alguns estudos prévios já demonstraram essa associação inversa entre níveis periféricos pré-tratamento da CXCL10 e resposta terapêutica (APOLINARIO *et al.*, 2004; BUTERA *et al.*, 2005; DIAGO *et al.*, 2006; LAGGING *et al.*, 2006; NARUMI *et al.*, 1997; ROMERO *et al.*, 2006).

Apolinário *et al.* (2004) foram os primeiros a destacar a associação entre os níveis séricos de CXCL10 e resposta terapêutica. Eles analisaram 63 pacientes com hepatite C crônica, provenientes majoritariamente de ensaios clínicos controlados, tratados com doses variáveis de ribavirina em combinação com interferon peguilado α -2a ou α -2b. A acurácia dos níveis de CXCL10 para predição de ausência de resposta virológica sustentada foi de 0,74, um pouco superior à encontrada no presente estudo (0,69; IC95%: 0,51 - 0,87). Utilizando ponto de corte de 299 pg/mL, Apolinário *et al.* referiram sensibilidade de 80% e especificidade de 63% para predição de ausência de resposta virológica sustentada, muito semelhante à encontrada no presente estudo (78% e 65%, respectivamente).

Níveis plasmáticos de CXCL10 foram avaliados por Butera *et al.* (2005) em amostras coletadas uma semana antes do início do tratamento de 29 pacientes. Eles publicaram níveis significativamente mais altos entre os não-respondedores do que em respondedores. Além disso, perceberam que os níveis pós-tratamento de pacientes com hepatite C crônica que apresentavam RVS eram comparáveis aos do grupo-controle. Entre os não-respondedores ao tratamento, níveis plasmáticos de CXCL10 permaneceram elevados na quarta semana de tratamento e após a suspensão do tratamento.

Lagging *et al.* (2006) dividiram 173 pacientes com hepatite C crônica, provenientes de uma ensaio clínico, em três categorias de acordo com os níveis plasmáticos de CXCL10 pré-tratamento (0-150 pg/mL; 150-600 pg/mL; >600 pg/mL). Esses autores encontraram associação entre níveis plasmáticos aumentados de CXCL10 e menos resposta virológica tanto rápida quanto sustentada. A associação dos níveis plasmáticos aumentados de CXCL10 e ausência de RVS se manteve mesmo após ajuste para outros fatores como índice de massa corpórea (IMC), sexo e carga viral pré-tratamento. Níveis acima de 600 pg/mL apresentaram valor preditivo negativo de RVS de 79%. Em subanálise incluindo apenas pacientes considerados de difícil tratamento, ou seja, com IMC elevado e carga viral alta, nenhum dos sete indivíduos com esse perfil e que apresentavam níveis acima de 600 pg/mL atingiram RVS. Lagging *et al.* acrescentaram que os níveis plasmáticos de CXCL10 reduziram-se na maioria dos pacientes seis semanas após terapia, mas retornaram àqueles encontrados antes do tratamento nos pacientes que não alcançaram resposta virológica sustentada.

Por fim, Romero *et al.* (2006) analisaram 270 pacientes provenientes do mesmo estudo de Lagging *et al.* (2006), incluindo também a análise histológica hepática dos pacientes. Esses autores preconizaram que os níveis plasmáticos de CXCL10 obtidos na semana anterior ao início do tratamento estiveram associados à resposta virológica rápida mesmo após ajuste em análise multivariada para outras variáveis como alterações histológicas hepáticas, carga viral pré-tratamento e genótipo. Utilizando pontos de corte de 150 e 600 pg/mL para predição de resposta virológica sustentada em pacientes com hepatite C crônica de genótipo 1, a especificidade dos níveis plasmáticos de CXCL10 foi de 81% (VPP de 68%) e a sensibilidade foi de 95% (VPN de 79%).

Os resultados deste estudo reforçam a associação entre os níveis plasmáticos de CXCL10 e resposta terapêutica, apresentando resultados semelhantes em relação à capacidade desse marcador inflamatório como preditor de ausência de resposta. Além disso, aponta para o fato de que os níveis plasmáticos pré-tratamento podem ser úteis como preditores de ausência tanto de RVP quanto de RVS em pacientes submetidos a tratamento fora do ambiente de ensaios clínicos randomizados. Sugere também que os níveis plasmáticos de CXCL10 estão associados à resposta virológica mesmo se a coleta da amostra for realizada em período bem anterior ao início do tratamento.

A CXCL9, que se liga ao mesmo receptor da CXCL10, não demonstrou associação significativa com resposta terapêutica em nosso estudo. Uma pesquisa anterior

também não havia encontrado associação entre níveis plasmáticos pré-tratamento CXCL9 e resposta terapêutica (BUTERA *et al.*, 2005).

Entre os vários fatores clínicos e virológicos analisados, nenhum se associou à resposta terapêutica de maneira estatisticamente significativa. Devido às baixas taxas de resposta do genótipo 3, principalmente à custa de elevada taxa de recidiva após o término do tratamento, nem a variável genótipo do HCV associou-se de maneira estatisticamente significativa à resposta virológica sustentada. Outros fatores potencialmente associados a taxas de resposta, como carga viral e fibrose hepática (FRIED *et al.*, 2002; MANNNS *et al.*, 2001; MIHM *et al.*, 2006), também não se associaram à resposta terapêutica na presente investigação, talvez por falta de força estatística.

Finalmente, de forma exploratória, realizou-se a análise da cinética dos níveis dos marcadores inflamatórios solúveis após início do tratamento. A maioria dos marcadores inflamatórios analisados (CCL3, CCL24, CXCL9, CXCL10, sTNFR1) teve seus níveis reduzidos de forma significativa após 12 semanas do início do tratamento específico. Comparando-se os níveis plasmáticos pré-tratamento com aqueles ao final do tratamento, verificou-se redução significativa dos níveis de CCL3, CXCL9 e sTNFR1, e uma elevação dos níveis de CCL11.

A estratificação da análise pela presença ou ausência de RVP sugeriu diferença na cinética dos níveis plasmáticos pré-tratamento de CXCL10 e CCL24 entre esses dois grupos de pacientes, com redução dos níveis plasmáticos dessas quimiocinas ocorrendo de maneira significativa na 12^a semana apenas entre aqueles com resposta precoce. A cinética dos marcadores inflamatórios plasmáticos não diferiu entre aqueles com e sem RVS.

Outros estudos já analisaram a cinética desses marcadores inflamatórios durante o tratamento da hepatite C crônica. Narumi *et al.* (1997) ressaltaram que a redução dos níveis séricos de CXCL10 em pacientes com hepatite C crônica precedeu a resposta terapêutica e que aqueles com RVS normalizaram completamente os níveis dessa quimiocina. Por outro lado, pacientes que não eliminaram o HCV após o tratamento mantiveram níveis elevados de CXCL10 se comparados aos respondedores virológicos (ITOH *et al.*, 2001). Em relação à CXCL9, Butera *et al.* (2005) afirmaram que os níveis dessa quimiocina reduziram-se de maneira significativa em pacientes que alcançaram RVS. Em relação ao sTNFR, os níveis séricos desse marcador parecem aumentar logo após a aplicação de interferon e, a partir do terceiro dia, parecem ser mais baixos nos pacientes que apresentam resposta terapêutica (FABRIS *et al.*, 1999).

7 LIMITAÇÕES

Em relação à seleção dos pacientes, o fato de o estudo ter sido realizado em um serviço de referência poderia ter introduzido um viés de seleção de pacientes mais graves ou mais complexos. Entretanto, o ambulatório de referência no qual os pacientes foram selecionados recebe tanto pacientes com doença mais avançada, encaminhados de outras unidades de saúde, quanto assintomáticos, com sorologia positiva, triados em hemocentros. As características histológicas dos pacientes incluídos evidenciam que a amostra teve representação adequada das diferentes fases de atividade e de estadiamento da doença.

Em relação ao desenho do estudo, a análise transversal da associação entre os marcadores inflamatórios solúveis e alterações histológicas hepáticas limita a interpretação dos resultados em termos de causalidade, ou seja, não se pode afirmar que os níveis elevados de sTNFR1, sTNFR2 e CXCL9 sejam diretamente responsáveis pela fibrose hepática. Estudos longitudinais seriam necessários para determinar se o aumento dos níveis plasmáticos desses marcadores inflamatórios precederia o aparecimento das alterações histológicas.

Do ponto de vista metodológico, a dosagem das quimiocinas pré-tratamento em apenas um momento poderia limitar a interpretação dos achados. Para sustentar a discussão realizada na presente pesquisa, é necessário supor que os níveis plasmáticos tanto das quimiocinas quanto dos receptores de TNF apresentem certa estabilidade ao longo do tempo. Alguns estudos da cinética dos níveis periféricos desses marcadores inflamatórios em pacientes com hepatite C crônica submetidos a tratamento mostram que, entre pacientes não-respondedores, os níveis de quimiocinas tendem a retornar aos níveis pré-tratamento após o término da medicação (BUTERA *et al.*, 2005; ITOH *et al.*, 1999; NARUMI *et al.*, 1997). Isso aponta para a existência de um ponto de equilíbrio dos níveis séricos desses marcadores, mas estudos de valores seriados de quimiocinas seriam necessários para demonstrar essa suposição.

No tocante à análise da associação entre os marcadores inflamatórios e a resposta ao tratamento, o fato de alguns pacientes terem usado interferon peguilado e outros interferon convencional pode ter interferido na interpretação e generalização dos resultados em relação à resposta virológica sustentada. No entanto, o estudo foi feito

dentro da realidade do nosso serviço e teve que seguir o preconizado pela Portaria n° 863, de 04 de novembro de 2002, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), quanto ao uso de interferon convencional para genótipos 2 e 3. A necessidade de adequação a essa Portaria impossibilitou também a avaliação da carga viral pré-tratamento e na 12^a semana de tratamento para genótipos 2 e 3. Desta forma, não se pode generalizar a capacidade dos níveis plasmáticos de CXCL10 de predição de resposta virológica precoce para pacientes com genótipo 2 e 3.

Em relação ao tamanho amostral, apesar de o cálculo ter indicado que um grupo-controle de três pacientes seria suficiente para se encontrar diferença significativa em relação ao CXCL10, a maior dispersão dos valores no grupo-controle impediu que a diferença alcançasse significância estatística.

Por fim, o questionário de avaliação da quantidade/frequência de ingestão etílica utilizado, apesar de ter permitido a diferenciação entre etilistas recentes, etilistas progressos e não-etilistas não permitiu uma estimativa precisa da quantidade acumulada de etanol ingerido ao longo da vida entre os etilistas, tanto os recentes quanto os progressos.

8 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que os níveis plasmáticos de sTNFR1 e sTNFR2 estiveram aumentados em pacientes com hepatite C crônica se comparados aos valores encontrados para o grupo-controle.

Conclui-se também que os níveis plasmáticos de CXCL9, sTNFR1 e sTNFR2 estiveram associados às alterações histológicas hepáticas, com valores mais elevados associando-se à maior intensidade de fibrose hepática. Na análise multivariada, além dos marcadores inflamatórios, a atividade necro-inflamatória hepática e o hábito de ingestão etílica ≥ 40 g/dia nos seis meses que precederam a data da biópsia hepática também se associaram de maneira significativa à fibrose hepática.

Os níveis plasmáticos mais elevados de sTNFR2 associaram-se também a uma maior intensidade de atividade necro-inflamatória hepática. Na análise multivariada, além dos níveis de sTNFR2, a presença de esteatose hepática e de diabetes *mellitus* tipo 2 também aumentaram, de maneira independente, a chance de se encontrar atividade necro-inflamatória hepática mais intensa.

Os níveis plasmáticos de CCL2, CCL3, CCL11, CCL24 e CXCL10 não se associaram a alterações histológicas hepáticas.

Em relação à resposta terapêutica, níveis plasmáticos de CXCL10 pré-tratamento mais elevados associaram-se à ausência de resposta virológica tanto precoce quanto sustentada. Nenhum dos fatores demográficos, clínicos, virológicos e histológicos analisados associaram-se a resposta virológica ao tratamento com interferon e ribavirina.

Os níveis plasmáticos de CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL24 e sTNFR1 reduziram-se significativamente após 12 semanas de tratamento, mas, ao final do tratamento, apenas os níveis CXCL9, CCL3 e sTNFR1 estiveram significativamente mais baixo do que os encontrados antes do tratamento. Os níveis de sTNFR2 estiveram significativamente mais elevados na 12^a semana de tratamento, mas não houve diferença entre os níveis pré-tratamento e os níveis encontrados ao final do tratamento. A cinética dos níveis de CXCL10 e CCL24 na 12^a semana diferiu entre pacientes com ou sem RVP, mas não entre aqueles com ou sem RVS.

9 PROPOSIÇÕES

Embora a origem e mecanismos de ação dos marcadores inflamatórios solúveis não sejam perfeitamente compreendidos, eles podem ser úteis preditores tanto de dano hepatocelular quanto de resposta terapêutica em pacientes com hepatite C crônica. Seu uso na prática clínica vai depender da padronização de métodos usados para mensuração das citocinas bem como da disponibilidade de *kits* comerciais confiáveis. Estudos adicionais correlacionando ou agregando esses marcadores inflamatórios periféricos com outros métodos não-invasivos de estadiamento hepático como APRI, Fibrotest ou Fibroscan podem ser importantes. Em relação ao tratamento, são necessárias pesquisas sobre a acurácia da CXCL10 na predição de resposta virológica em pacientes não respondedores e recidivantes submetidos a retratamento com IFN peguilado e doses de ribavirina ajustadas pelo peso.

REFERÊNCIAS

- ABU-KHABAR, K.S.; ARMSTRONG, J.A.; HO, M. Type I interferons (IFN-alpha and -beta) suppress cytotoxin (tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin) production by mitogen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell. **J Leukoc Biol**, v.52, p.165-172, 1992.
- ADERKA, D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.7, p.231-240, 1996.
- ADINOLFI, L.E. *et al.* Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. **Hepatology**, v.33, p.1358-1364, 2001.
- AHLENSTIEL, G. *et al.* Effects of the CCR5-Delta32 mutation on antiviral treatment in chronic hepatitis C. **J Hepatol**, v.39, p.245-252, 2003.
- ALTER, H.J.; SEEFF, L.B. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. **Semin Liver Dis**, v.20, p.17-35, 2000.
- ANDO, K. *et al.* Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. **J Immunol**, v.158, p.5283-5291, 1997.
- APOLINARIO, A. *et al.* Gene expression profile of T-cell-specific chemokines in human hepatocyte-derived cells: evidence for a synergistic inducer effect of cytokines and hepatitis C virus proteins. **J Viral Hepat**, v.12, p.27-37, 2005.
- APOLINARIO, A. *et al.* Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy. **Aliment Pharmacol Ther**, v.19, p.551-562, 2004.
- APOLINARIO, A. *et al.* Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. **Am J Gastroenterol**, v.97, p.2861-2870, 2002.
- APOLINARIO, A.; GARCIA-MONZON, C. Role of chemokines in the pathogenesis of liver diseases. **Rev Esp Enferm Dig**, v.95, p.614-620, 607-613, 2003.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annu Rev Immunol**, v.15, p.675-705, 1997.
- BANNER, B.F. *et al.* Inflammatory markers in chronic hepatitis C. **Virchows Arch**, v.431, p.181-187, 1997.
- 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.

- BENHAMOU, Y. *et al.* Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. **Hepatology**, v.30, p.1054-1058, 1999.
- BENVEGNI, L. *et al.* Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study. **Cancer**, v.74, p.2442-2448, 1994.
- BLOBE, G.C.; SCHIEMANN, W. P.; LODISH, H.F. Role of transforming growth factor beta in human disease. **N Engl J Med**, v.342, p.1350-1358, 2000.
- BOCCATO, S. *et al.* Fibrosis progression in initially mild chronic hepatitis C. **J Viral Hepat**, v.13, p.297-302, 2006.
- BONACCHI, A. *et al.* Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. **J Biol Chem**, v.276, p.9945-9954, 2001.
- BONACCHI, A. *et al.* The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v.125, p.1060-1076, 2003.
- BONECCHI, R. *et al.* Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. **J Exp Med**, v.187, p.129-134, 1998.
- BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v.214, p.149-160, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 863, de 04 de novembro de 2002. Estabelece Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o tratamento da Hepatite Viral Crônica C. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 de novembro de 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº34 de 28 de setembro de 2007. Dispõe sobre Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 de setembro de 2007.
- BRAVO, A.A.; SHETH, S. G.; CHOPRA, S. Liver biopsy. **N Engl J Med**, v.344, p.495-500, 2001.
- BRUNT, E.M. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. **Semin Liver Dis**, v.21, p.3-16, 2001.
- BRUNT, E.M. Nonalcoholic steatohepatitis. **Semin Liver Dis**, v.24, p.3-20, 2004.
- BUTERA, D. *et al.* Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. **Blood**, v.106, p.1175-1182, 2005.
- CAMPIOTTO, S. *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v.38, p.41-49, 2005.

- CARMO, R.A. *et al.* Hepatitis C virus infection among Brazilian hemophiliacs: a virological, clinical and epidemiological study. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.589-598, 2002.
- CASTERA, L. *et al.* Worsening of steatosis is an independent factor of fibrosis progression in untreated patients with chronic hepatitis C and paired liver biopsies. **Gut**, v.52, p.288-292, 2003.
- CERNY, A.; CHISARI, F.V. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. **Hepatology**, v.30, p.595-601, 1999.
- CHANG, K.M.; REHERMANN, B.; CHISARI, F. V. Immunopathology of hepatitis C. **Springer Semin Immunopathol**, v.19, p.57-68, 1997.
- CHARO, I.F.; RANSOHOFF, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med**, v.354, p.610-621, 2006.
- CHOO, Q.L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v.244, p.359-362, 1989.
- CLARK-LEWIS, I. *et al.* Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. **J Biol Chem**, v.278, p.289-295, 2003.
- CRAMP, M.E. *et al.* Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v.118, p.346-355, 2000.
- DAY, C.L. *et al.* Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. **J Virol**, v.76, p.12584-12595, 2002.
- DE ARAUJO, E. S. *et al.* Consensus of the Brazilian Society of Infectious Diseases on the management and treatment of hepatitis C. **Braz J Infect Dis**, v.11, p.446-450, 2007.
- DIAGO, M. *et al.* Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. **Gut**, v.55, p.374-379, 2006.
- DIEZ-RUIZ, A. *et al.* Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. **Eur J Haematol**, v.54, p.1-8, 1995.
- DURANTE-MANGONI, E. *et al.* Hepatic steatosis and insulin resistance are associated with serum imbalance of adiponectin/tumour necrosis factor-alpha in chronic hepatitis C patients. **Aliment Pharmacol Ther**, v.24, p.1349-1357, 2006.
- ENGELMANN, H.; NOVICK, D.; WALLACH, D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. **J Biol Chem**, v.265, p.1531-1536, 1990.
- FABRIS, C. *et al.* Kinetics of serum soluble tumour necrosis factor receptor (TNF-R) type-I and type-II after a single interferon-alpha (IFN-alpha) injection in chronic hepatitis C. **Clin Exp Immunol**, v.117, p.556-560, 1999.

FAN, X.G. *et al.* Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection. **Mediators Inflamm**, v.7, p.295-297, 1998.

FELD, J.J.; HOOFNAGLE, J.H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature**, v.436, p.967-972, 2005.

FOCACCIA, R. *et al.* Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of Sao Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. **Braz J Infect Dis**, v.2, p.269-284, 1998.

FONTAINE, H. *et al.* Hepatitis activity index is a key factor in determining the natural history of chronic hepatitis C. **Hum Pathol**, v.32, p.904-909, 2001.

FRANÇA, J.L. *et al.* **Manual para normalização de publicações técnico-científicas**. Belo Horizonte: UFMG, 8.ed, 2007.

FRESE, M. *et al.* Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor- α . **J Gen Virol**, v.84, p.1253-1259, 2003.

FRIED, M.W. *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v.347, p.975-982, 2002.

FRIEDMAN, S.L. Cytokines and fibrogenesis. **Semin Liver Dis**, v.19, p.129-140, 1999.

FRIEDMAN, S.L. Liver fibrosis: from bench to bedside. **J Hepatol**, v.38 Suppl 1, p.S38-53, 2003.

GEHR, G. *et al.* Both tumor necrosis factor receptor types mediate proliferative signals in human mononuclear cell activation. **J Immunol**, v.149, p.911-917, 1992.

GERARD, C.; ROLLINS, B.J. Chemokines and disease. **Nat Immunol**, v.2, p.108-115, 2001.

GHANY, M.G. *et al.* Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v.124, p.97-104, 2003.

GLAS, J. *et al.* The Delta 32 mutation of the chemokine-receptor 5 gene neither is correlated with chronic hepatitis C nor does it predict response to therapy with interferon- α and ribavirin. **Clin Immunol**, v.108, p.46-50, 2003.

GOULDING, C. *et al.* The CCR5-delta32 mutation: impact on disease outcome in individuals with hepatitis C infection from a single source. **Gut**, v.54, p.1157-1161, 2005.

GUIDOTTI, L. G.; CHISARI, F.V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. **Annu Rev Immunol**, v.19, p.65-91, 2001.

GUTIERREZ-RUIZ, M.C.; GOMEZ-QUIROZ, L.E. Liver fibrosis: searching for cell model answers. **Liver Int**, v.27, p.434-439, 2007.

HARVEY, C.E. *et al.* Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. **J Leukoc Biol**, v.74, p.360-369, 2003.

HASSAN, M.I. *et al.* Antiproliferative effect of hepatitis C virus on mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells: potential role in viral persistence in Egyptian patients. **Clin Biochem**, v.40, p.1173-1179, 2007.

HECHTMAN, D.H. *et al.* Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. **J Immunol**, v.147, p.883-892, 1991.

HELLIER, S. *et al.* Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. **Hepatology**, v.38, p.1468-1476, 2003.

HEZODE, C. *et al.* Impact of moderate alcohol consumption on histological activity and fibrosis in patients with chronic hepatitis C, and specific influence of steatosis: a prospective study. **Aliment Pharmacol Ther**, v.17, p.1031-1037, 2003.

HIRAMATSU, N. *et al.* Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome. **Hepatology**, v.16, p.306-311, 1992.

HIROISHI, K. *et al.* Cytotoxic T lymphocyte response and viral load in hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v.25, p.705-712, 1997.

HOURIGAN, L.F. *et al.* Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. **Hepatology**, v.29, p.1215-1219, 1999.

HSU, C.S. *et al.* High hepatitis C viral load is associated with insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. **Liver Int**, v.28, p.271-277, 2008.

HUI, J.M. *et al.* Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. **Gastroenterology**, v.125, p.1695-1704, 2003.

IREDALE, J.P. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. **BMJ**, v.327, p.143-147, 2003.

ITOH, Y. *et al.* Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Am J Gastroenterol**, v.94, p.1332-1340, 1999.

ITOH, Y. *et al.* Clinical significance of elevated serum interferon-inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum transaminase levels. **J Viral Hepat**, v.8, p.341-348, 2001.

JACOBSON BROWN, P. M.; NEUMAN, M. G. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. **Clin Biochem**, v.34, p.167-171, 2001.

JOYCE, D.A. *et al.* Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. **Eur J Immunol**, v.24, p.2699-2705, 1994.

KAKUMU, S. *et al.* Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. **Clin Exp Immunol**, v.109, p.458-463, 1997.

KALLINOWSKI, B. *et al.* Induction of tumour necrosis factor (TNF) receptor type p55 and p75 in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. **Clin Exp Immunol**, v.111, p.269-277, 1998.

KAMAL, S. M. *et al.* Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v.123, p.1070-1083, 2002.

KAMAL, S.M. *et al.* Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetics. **Hepatology**, v.39, p.1721-1731, 2004.

KANTO, T.; HAYASHI, N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. **Intern Med**, v.45, p.183-191, 2006.

KAPLANSKI, G. *et al.* Increased levels of soluble adhesion molecules in the serum of patients with hepatitis C. Correlation with cytokine concentrations and liver inflammation and fibrosis. **Dig Dis Sci**, v.42, p.2277-2284, 1997.

KHABAR, K.S. *et al.* The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha. **J Exp Med**, v.186, p.1077-1085, 1997.

KOUNTOURAS, J.; ZAVOS, C.; CHATZOPOULOS, D. Apoptosis in hepatitis C. **J Viral Hepat**, v.10, p.335-342, 2003.

KOZIEL, M.J. Cytokines in viral hepatitis. **Semin Liver Dis**, v.19, p.157-169, 1999.

KUNKEL, S.L. Through the looking glass: the diverse in vivo activities of chemokines. **J Clin Invest**, v.104, p.1333-1334, 1999.

KUSANO, F. *et al.* Expression of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patients with chronic hepatitis C. **Lab Invest**, v.80, p.415-422, 2000.

LAGGING, M. *et al.* IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. **Hepatology**, v.44, p.1617-1625, 2006.

LANTZ, M. *et al.* Infusion of tumor necrosis factor (TNF) causes an increase in circulating TNF-binding protein in humans. **Cytokine**, v.2, p.402-406, 1990.

LARREA, E. *et al.* Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.23, p.210-217, 1996.

- LARRUBIA, J.R. *et al.* The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. **J Hepatol**, v.47, p.632-641, 2007.
- LAUER, G.M.; WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v.345, p.41-52, 2001.
- LEANDRO, G. *et al.* Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. **Gastroenterology**, v.130, p.1636-1642, 2006.
- LECHNER, F. *et al.* CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. **Eur J Immunol**, v.30, p.2479-2487, 2000.
- LEE, S.S. *et al.* Prognostic factors and early predictability of sustained viral response with peginterferon alfa-2a (40KD). **J Hepatol**, v.37, p.500-506, 2002.
- LEROY, V. *et al.* Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.38, p.829-841, 2003.
- LIAO, F. *et al.* Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. **J Exp Med**, v.182, p.1301-1314, 1995.
- LIEN, E. *et al.* Polymorphonuclear granulocytes enhance lipopolysaccharide-induced soluble p75 tumor necrosis factor receptor release from mononuclear cells. **Eur J Immunol**, v.25, p.2714-2717, 1995.
- LIU, Z.G.; HAN, J. Cellular responses to tumor necrosis factor. **Curr Issues Mol Biol**, v.3, p.79-90, 2001.
- LOETSCHER, M. *et al.* Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. **J Exp Med**, v.184, p.963-969, 1996.
- LUSTER, A.D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**, v.338, p.436-445, 1998.
- MACKAY, C.R. Chemokines: what chemokine is that? **Curr Biol**, v.7, p.R384-386, 1997.
- MAHER, J.J. Cytokines: overview. **Semin Liver Dis**, v.19, p.109-115, 1999.
- MANNS, M.P. *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet**, v.358, p.958-965, 2001.
- MARINOS, G. *et al.* Tumor necrosis factor receptors in patients with chronic hepatitis B virus infection. **Gastroenterology**, v.108, p.1453-1463, 1995.
- MIHM, U. *et al.* Association of serum interleukin-8 with virologic response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. **J Hepatol**, v.40, p.845-852, 2004.

MIHM, U. *et al.* Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. **Aliment Pharmacol Ther**, v.23, p.1043-1054, 2006.

MONTES-CANO, M.A. *et al.* CCL2-2518 A/G and CCR2 190 A/G do not influence the outcome of hepatitis C virus infection in the Spanish population. **World J Gastroenterol**, v.13, p.2187-2192, 2007.

MONTO, A. *et al.* Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes *mellitus*, and alcohol. **Hepatology**, v.36, p.729-736, 2002.

MOUCARI, R. *et al.* Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 134, p.416-423, 2008.

NAPOLI, J. *et al.* Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. **Hepatology**, v.24, p.759-765, 1996.

NARUMI, S. *et al.* Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. **J Immunol**, v.158, p.5536-5544, 1997.

NARUMI, S. *et al.* TNF-alpha is a potent inducer for IFN-inducible protein-10 in hepatocytes and unaffected by GM-CSF *in vivo*, in contrast to IL-1beta and IFN-gamma. **Cytokine**, v.12, p.1007-1016, 2000.

NATTERMANN, J. *et al.* Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5. **J Viral Hepat**, v.11, p.519-526, 2004.

NELSON, D.R. *et al.* Activation of tumor necrosis factor-alpha system in chronic hepatitis C virus infection. **Dig Dis Sci**, v.42, p.2487-2494, 1997.

NELSON, D.R. *et al.* Intrahepatic hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity and response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.28, p.225-230, 1998.

NEUMAN, M.G. *et al.* Cytokines as predictors for sustained response and as markers for immunomodulation in patients with chronic hepatitis C. **Clin Biochem**, v.34, p.173-182, 2001.

NEUMAN, M.G. *et al.* Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. **Clin Biochem**, v.32, p.537-545, 1999.

NEUMAN, M. G., *et al.* Role of cytokines in the assessment of the severity of chronic hepatitis C and the prediction of response to therapy. **Rom J Gastroenterol**, v.11, p.97-103, 2002a

NEUMAN, M. G., *et al.* Serum tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta levels in chronic hepatitis C patients are immunomodulated by therapy. **Cytokine**, v.17, p.108-117, 2002b.

NEUMAN, M. G., *et al.* Kinetics of serum cytokines reflect changes in the severity of chronic hepatitis C presenting minimal fibrosis. **J Viral Hepat**, v.9, p.134-140, 2002c.

NEUMAN, M. G., *et al.* Cytokine--chemokine and apoptotic signatures in patients with hepatitis C. **Transl Res**, v.149, p.126-136, 2007.

NISCHALKE, H.D. *et al.* Semiquantitative analysis of intrahepatic CC-chemokine mRNAs in chronic hepatitis C. **Mediators Inflamm**, v.13, p.357-359, 2004.

NOPHAR, Y. *et al.* Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. **Embo J**, v.9, p.3269-3278, 1990.

NOURI-ARIA, K.T. *et al.* Intrahepatic expression of hepatitis C virus antigens in chronic liver disease. **J Pathol**, v.175, p.77-83, 1995.

OLSSON, I. *et al.* Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine. **Eur J Haematol**, v.42, p.270-275, 1989.

ONG, J.P. *et al.* Chronic hepatitis C and superimposed nonalcoholic fatty liver disease. **Liver**, v.21, p.266-271, 2001.

ONO, S.J. *et al.* Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. **J Allergy Clin Immunol**, v.111, p.1185-1199; quiz 1200, 2003.

OSTAPOWICZ, G. *et al.* Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v.27, p.1730-1735, 1998.

PANASIUK, A.; PROKOPOWICZ, D.; PANASIUK, B. Monocyte chemotactic protein-1 and soluble adhesion molecules as possible prognostic markers of the efficacy of antiviral treatment in chronic hepatitis C. **World J Gastroenterol**, v.10, p.3639-3642, 2004.

PARK, M. K. *et al.* The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamma (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen in vivo. **J Immunol**, v.169, p.1433-1443, 2002.

PATTON, H.M. *et al.* The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. **J Hepatol**, v.40, p.484-490, 2004.

PERONE, C. *et al.* High prevalence of genotype 1 in individuals with hepatitis C in Belo Horizonte, MG. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.41, p.238-242, 2008.

PERZ, J.F. *et al.* The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **J Hepatol**, v.45, p.529-538, 2006.

PESSIONE, F. *et al.* Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.27, p.1717-1722, 1998.

PETIT, J.M. *et al.* Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. **J Hepatol**, v.35, p.279-283, 2001.

POLYAK, S.J. *et al.* Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. **J Virol**, v.75, p.6095-6106, 2001a.

POLYAK, S.J. *et al.* Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. **J Virol**, v.75, p.6209-6211, 2001b.

PORTEU, F. *et al.* Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Comparison with the proteolytic activity responsible for shedding of TNF receptors from stimulated neutrophils. **J Biol Chem**, v.266, p.18846-18853, 1991.

PORTEU, F.; HIEBLOT, C. Tumor necrosis factor induces a selective shedding of its p75 receptor from human neutrophils. **J Biol Chem**, v.269, p.2834-2840, 1994.

PORTEU, F.; NATHAN, C. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. **J Exp Med**, v.172, p.599-607, 1990.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. **Lancet**, v.349, p.825-832, 1997.

POYNARD, T. *et al.* Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. **J Hepatol**, v.34, p.730-739, 2001.

POYNARD, T. *et al.* Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v.122, p.1303-1313, 2002.

QIN, S. *et al.* The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. **J Clin Invest**, v.101, p.746-754, 1998.

RADKOWSKI, M. *et al.* Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro: induction of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 8. **J Gen Virol**, v.85, p.47-59, 2004.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nat Rev Immunol**, v.5, p.215-229, 2005.

REHM, J. Measuring quantity, frequency, and volume of drinking. **Alcohol Clin Exp Res**, v.22, p.4S-14S, 1998.

ROLLINS, B.J. Chemokines. **Blood**, v.90, p.909-928, 1997.

ROMERO, A.I. *et al.* Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **J Infect Dis**, v.194, p.895-903, 2006.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U.H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. **Annu Rev Immunol**, v.22, p.891-928, 2004.

RUBBIA-BRANDT, L. *et al.* Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. **Gut**, v.53, p.406-412, 2004.

SECKINGER, P.; ISAAZ, S.; DAYER, J. M. Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor. **J Biol Chem**, v.264, p.11966-11973, 1989.
SEEFF, L.B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.36, p.S35-46, 2002.

SHAHEEN, A.A.; WAN, A. F.; MYERS, R. P. FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy. **Am J Gastroenterol**, v.102, p.2589-2600, 2007.

SHEPARD, C.W.; FINELLI, L.; ALTER, M.J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis**, v.5, p.558-567, 2005.

SHIELDS, P.L. *et al.* Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. **J Immunol**, v.163, p.6236-6243, 1999.

SHIMIZU, Y.K. *et al.* Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. **J Virol**, v.68, p.1494-1500, 1994.

SILVA, L. *et al.* Prevalence of hepatitis C virus in urban and rural populations of northeast Brazil-pilot study. **Arq Gastroenterol**, v.32, p.168-171, 1995.

SOBUE, S. *et al.* Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J Gastroenterol**, v.36, p.544-551, 2001.

SOUSA-PEREIRA, S.R. *et al.* Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2 cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy. **Parasite Immunol**, v.28, p.473-478, 2006.

SPINAS, G.A.; KELLER, U.; BROCKHAUS, M. Release of soluble receptors for tumor necrosis factor (TNF) in relation to circulating TNF during experimental endotoxemia. **J Clin Invest**, v.90, p.533-536, 1992.

STRADER, D.B. *et al.* Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. **Hepatology**, v.39, p.1147-1171, 2004.

STRASSBURG, C.P.; MANN, M.P. Approaches to liver biopsy techniques revisited. **Semin Liver Dis**, v.26, p.318-327, 2006.

SYRBE, U.; SIVEKE, J.; HAMANN, A. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? **Springer Semin Immunopathol**, v.21, p.263-285, 1999.

TACHIBANA, Y. *et al.* Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of chronic hepatitis C. **Cancer Lett**, v.251, p.36-42, 2007.

TAM, R.C. *et al.* Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. **J Hepatol**, v.30, p.376-382, 1999.

THIMME, R. *et al.* Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. **J Exp Med**, v.194, p.1395-1406, 2001.

TILG, H. New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. **Gastroenterology**, v.112, p.1017-1021, 1997.

TILG, H.; VOGEL, W.; DINARELLO, C. A. Interferon-alpha induces circulating tumor necrosis factor receptor p55 in humans. **Blood**, v.85, p.433-435, 1995.

TSAI, S.L. *et al.* Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. **Hepatology**, v.25, p.449-458, 1997.

VAN ZEE, K.J. *et al.* Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, p.4845-4849, 1992.

VON ANDRIAN, U.H.; MACKAY, C.R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. **N Engl J Med**, v.343, p.1020-1034, 2000.

WAI, C.T. *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.38, p.518-526, 2003.

WANG, J. *et al.* Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signaling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool. **J Biol Chem**, v.278, p.21751-21760, 2003.

WARE, C.F. *et al.* Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. **J Immunol**, v.147, p.4229-4238, 1991.

WEJSTAL, R. Immune-mediated liver damage in chronic hepatitis C. **Scand J Gastroenterol**, v.30, p.609-613, 1995.

WERTHEIMER, A.M. *et al.* Engulfment of apoptotic cells expressing HCV proteins leads to differential chemokine expression and STAT signaling in human dendritic cells. **Hepatology**, v.45, p.1422-1432, 2007.

WILEY, T.E. *et al.* Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. **Hepatology**, v.28, p.805-809, 1998.

WOITAS, R.P. *et al.* CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. **J Immunol**, v.159, p.1012-1018, 1997.

WONG, T.; LEE, S. S. Hepatitis C: a review for primary care physicians. **CMAJ**, v.174, p.649-659, 2006.

YAMAUCHI, K. *et al.* Increased serum levels of macrophage inflammatory protein-3alpha in chronic viral hepatitis: prognostic importance of macrophage inflammatory protein-3alpha during interferon therapy in chronic hepatitis C. **J Viral Hepat**, v.9, p.213-220, 2002.

YANG, Y.F. *et al.* IFN-alpha acts on T-cell receptor-triggered human peripheral leukocytes to up-regulate CCR5 expression on CD4+ and CD8+ T cells. **J Clin Immunol**, v.21, p.402-409, 2001.

YOSHIOKA, K. *et al.* Tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic liver disease. **Hepatology**, v.10, p.769-773, 1989.

ZARIFE, M.A. *et al.* Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.100, p.663-668, 2006.

ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clin Microbiol Rev**, v.13, p.223-235, 2000.

ZEIN, N.N, *et al.* Etanercept as an adjuvant to interferon and ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus infection: a phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Hepatol**, v.42, p.315-322, 2005.

ZEREMSKI, M. *et al.* Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.48, p.1440-1450, 2008.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v.12, p.121-127, 2000.

ZYLBERBERG, H. *et al.* Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. **J Hepatol**, v.30, p.185-191, 1999.

APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido do estudo “Marcadores inflamatórios como preditores de alterações histológicas hepáticas e resposta terapêutica em pacientes com infecção crônica pelo HCV”, Belo Horizonte, 2002-2008.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome do voluntário: _____ Nº Prontuário: _____

O(a) Sr.(a) está sendo solicitado(a) a participar, como voluntário(a), de um estudo científico com o objetivo de avaliar se existe alguma relação entre a concentração de algumas substâncias, denominadas quimiocinas, no seu sangue e as possíveis alterações presentes na sua biópsia do fígado e na sua resposta ao tratamento. As quimiocinas são importantes para atrair as células de defesa até o local onde se encontram os microrganismos e provocar a inflamação. Esse processo é importante no combate ao vírus da hepatite, mas pode também resultar em doença.

Os pesquisadores manterão em sigilo a identidade dos participantes, inclusive em qualquer publicação resultante do estudo, garantindo-se total anonimato e confidencialidade.

O(a) Sr. (a) poderá recusar-se a participar da pesquisa, ou mesmo afastar-se dela a qualquer momento, sem que isto venha a lhe causar constrangimento ou penalidade. Seu médico se dispõe a continuar tratando-o(a), mesmo que o(a) Sr(a) não aceite participar desta pesquisa.

Antes de assinar este termo, o (a) Sr.(a) deve informar-se plenamente a respeito do projeto, não tendo medo ou vergonha de fazer perguntas sobre qualquer assunto que queira esclarecer.

É importante ter conhecimento das seguintes informações sobre o estudo:

Objetivo do estudo: analisar se existe alguma relação entre os níveis de quimiocinas no sangue e alterações na biópsia do fígado e na resposta ao tratamento com interferon associado à ribavirina em pacientes com hepatite C crônica.

Procedimentos a serem realizados: serão colhidas amostras de sangue do(a) paciente em quatro momentos: antes do tratamento, 12 semanas após o início do tratamento, logo após o término do tratamento e 24 semanas após o término do tratamento. Poderá ser utilizada

também parte do sangue coletado para realização do exame PCR qualitativo para hepatite C (exame que confirmou a presença da infecção) que se encontra armazenado no laboratório NUPAD. Os pacientes sem hepatite C, que farão parte de um grupo-controle, terão o sangue colhido apenas uma vez.

Benefícios: não serão garantidos benefícios individuais para os participantes do estudo. O conhecimento obtido poderá esclarecer aspectos importantes de como o vírus produz a doença no fígado e como o organismo se comporta durante o tratamento.

Riscos potenciais: o estudo acrescenta riscos mínimos quanto à coleta de sangue, podendo ocorrer dorimento leve e/ou pequeno hematoma no local onde foi realizada a coleta. A realização deste estudo não interfere na indicação da biópsia hepática, do tratamento com interferon e ribavirina, bem como não interfere na eventual necessidade de interrupção do tratamento na presença de respostas indesejáveis ou efeitos colaterais.

Declaro estar ciente do inteiro teor deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, decidindo participar desta pesquisa, depois de ter feito as perguntas que julguei necessárias e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas. Declaro dar meu consentimento para participar desta pesquisa, recebendo uma cópia deste termo, estando ciente de que outra cópia permanecerá arquivada com os responsáveis pela pesquisa.

Caso tenha alguma dúvida ou necessidade de qualquer esclarecimento adicional sobre o estudo, você poderá entrar em contato com o Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha ou Dr. Alexandre Moura no CTR-Orestes Diniz, pelo telefone 3248-9547 ou pessoalmente neste mesmo ambulatório na 3^a feira pela manhã ou na 6^a feira pela manhã e à tarde. Esclarecimentos adicionais poderão ser obtidos também no Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG, pelo telefone 3248-9364.

Nome do paciente: _____ RG: _____

Assinatura do paciente: _____

Nome do pesquisador que prestou as informações: _____

Assinatura e CRM do pesquisador que prestou as informações: _____

Data: ____/____/____

Apêndice B - Detalhamento das etapas da análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória hepática e de fibrose hepática.

Análise dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória hepática

TABELA 33

Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória hepática

Variáveis	Coefficiente de regressão (valor de p)							
sTNFR2 (ng/mL)	2,85 (0,05)	-	3,09 (0,03)	2,76 (0,05)	2,36 (0,09)	2,74 (0,06)	2,60 (0,06)	2,89 (0,05)
Idade (anos)	1,03 (0,45)	1,04 (0,21)	-	1,04 (0,28)	1,05 (0,15)	1,03 (0,34)	1,02 (0,51)	1,03 (0,45)
Presença de esteatose	2,42 (0,14)	2,38 (0,13)	2,65 (0,09)	-	2,33 (0,15)	2,38 (0,14)	2,57 (0,11)	2,80 (0,08)
Presença de diabetes tipo 2	6,89 (0,15)	3,93 (0,28)	10,18 (0,07)	6,22 (0,16)	-	7,13 (0,14)	6,15 (0,18)	7,46 (0,12)
Uso de medicação hepatotóxica	2,41 (0,33)	2,12 (0,40)	2,72 (0,26)	2,38 (0,34)	2,49 (0,30)	-	2,30 (0,35)	2,42 (0,33)
Etilismo moderado/intenso recente	1,66 (0,46)	1,23 (0,75)	1,54 (0,53)	1,91 (0,34)	1,43 (0,60)	1,58 (0,49)	-	1,66 (0,46)
Aumento de ALT ≥ 1,5x LSN	1,93 (0,27)	2,01 (0,22)	1,93 (0,27)	2,34 (0,14)	2,11 (0,20)	1,94 (0,26)	1,93 (0,27)	-
- 2log verossimilhança	73,6	77,8	74,2	75,8	76,1	74,6	74,1	74,9

TABELA 34

Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória hepática depois da retirada das variáveis “idade”, “uso de medicamento hepatotóxico”, “hábito recente de ingestão etílica moderada/intensa”.

Variáveis	Coefficiente de regressão (valor de p)				
sTNFR2 (ng/mL)	2,81 (0,04)	-	2,73 (0,03)	2,53 (0,05)	2,85 (0,03)
Presença de esteatose	2,76 (0,08)	2,73 (0,07)	-	2,84 (0,06)	3,22 (0,04)
Presença de diabetes tipo 2	10,36 (0,06)	7,91 (0,08)	9,95 (0,05)	-	11,43 (0,04)
Aumento de ALT ≥ 1,5x LSN	1,93 (0,26)	2,05 (0,20)	2,45 (0,11)	2,23 (0,16)	-
- 2log verossimilhança	75,8	80,5	80,0	80,4	77,1

TABELA 35

Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória hepática depois da retirada das variáveis “idade”, “uso de medicamento hepatotóxico”, “etilismo moderado/intenso recente” e “aumento de ALT \geq 1,5x LSN”

Variáveis	Coefficiente de regressão (valor de p)			
sTNFR2 (ng/mL)	2,85 (0,03)	-	2,82 (0,03)	2,59 (0,04)
Presença de esteatose	3,22 (0,04)	3,26 (0,03)	-	3,46 (0,02)
Presença de diabetes tipo 2	11,43 (0,04)	8,99 (0,06)	11,95 (0,03)	-
- 2log verossimilhança	77,1	82,2	81,6	82,5

TABELA 36

Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de atividade necro-inflamatória hepática

Fator	OR (95% IC)	Valor de p
sTNFR2 (ng/mL)	2,85 (1,09-7,47)	0,033
Presença de esteatose	3,22 (1,08-9,63)	0,036
Presença de diabetes tipo 2	11,43 (1,07-121,60)	0,043

Hosmer e Lemeshow: 0,73; Nagelkerke R²: 0,28.

Análise dos fatores preditores de fibrose hepática

TABELA 37

Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR1

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)							
sTNFR1 (ng/mL)	16,89 (0,04)	-	22,49 (0,02)	16,8 (0,04)	16,8 (0,04)	18,37 (0,04)	10,68 (0,03)	7,3 (0,09)
Idade (anos)	1,06 (0,18)	1,06 (0,12)	-	1,06 (0,16)	1,06 (0,14)	1,05 (0,19)	1,06 (0,07)	1,05 (0,22)
Presença de esteatose	1,11 (0,89)	1,51 (0,54)	1,40 (0,64)	-	1,11 (0,89)	1,17 (0,83)	2,10 (0,21)	1,54 (0,52)
Presença de diabetes	1,01 (0,99)	0,97 (0,98)	2,78 (0,53)	0,99 (0,99)	-	0,98 (0,99)	2,76 (0,44)	0,64 (0,79)
Infecção pelo genótipo 1	0,52 (0,43)	0,44 (0,28)	0,56 (0,48)	0,51 (0,42)	0,52 (0,43)	-	0,36 (0,12)	0,44 (0,28)
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	29,3 (<0,01)	17,16 (<0,01)	30,6 (<0,01)	30,18 (<0,01)	29,3 (<0,01)	30,5 (<0,01)	-	24,66 (<0,01)
Etilismo moderado/intenso recente	6,52 (0,03)	3,83 (0,08)	5,81 (0,04)	6,68 (0,03)	6,51 (0,03)	6,95 (0,02)	4,95 (0,03)	-
-2log verossimilhança	53,4	62,4	55,3	53,4	53,4	54,0	72,8	58,6

TABELA 38

Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR1, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática” e “genótipo viral 1”

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)				
sTNFR1 (ng/mL)	18,42 (0,03)	-	19,85 (0,02)	10,90 (0,02)	7,49 (0,08)
Idade (anos)	1,06 (0,13)	1,06 (0,08)	-	1,08 (<0,01)	1,04 (0,23)
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	31,59 (<0,01)	19,74 (<0,01)	40,96 (<0,01)	-	27,57 (<0,01)
Etilismo moderado/intenso recente	7,24 (0,02)	4,49 (0,04)	5,95 (0,03)	5,84 (0,01)	-
-2log verossimilhança	54,07	64,0	56,4	77,41	60,4

TABELA 39

Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR1, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática”, “genótipo viral 1” e “idade”

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)			
sTNFR1 (ng/mL)	19,85 (0,02)	-	12,97 (<0,01)	8,88 (0,05)
Atividade necro-inflamatória hepática (A\geq2)	40,96 (<0,01)	25,31 (<0,01)	-	32,48 (<0,01)
Etilismo moderado/intenso recente	5,95 (0,03)	3,68 (0,06)	3,71 (0,04)	-
-2 log verossimilhança	56,4	67,2	86,1	61,9

TABELA 40

Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR1

Fator	OR (95% IC)	Valor de p
sTNFR1 (ng/mL)	19,85 (1,57-251,22)	0,021
Atividade necro-inflamatória hepática (A\geq2)	40,96 (7,09-236,56)	<0,001
Etilismo moderado/intenso recente	5,95 (1,24-28,61)	0,026

Hosmer e Lemeshow: 0,62; Nagelkerke R²: 0,59.

TABELA 41

Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)							
sTNFR2 (ng/mL)	2,37 (0,17)	-	2,85 (0,08)	2,30 (0,17)	2,24 (0,18)	2,23 (0,19)	3,40 (0,03)	1,86 (0,28)
Idade (anos)	1,05 (0,25)	1,06 (0,12)	-	1,05 (0,19)	1,05 (0,15)	1,04 (0,26)	1,05 (0,15)	1,04 (0,31)
Presença de esteatose	1,57 (0,51)	1,51 (0,54)	1,87 (0,34)	-	1,55 (0,52)	1,62 (0,48)	2,39 (0,14)	2,02 (0,27)
Presença de diabetes	1,75 (0,73)	0,97 (0,98)	3,97 (0,37)	1,61 (0,76)	-	1,61 (0,76)	4,23 (0,27)	1,18 (0,92)
Infecção pelo genótipo 1	0,41 (0,24)	0,44 (0,28)	0,42 (0,25)	0,40 (0,23)	0,42 (0,24)	-	0,31 (0,08)	0,38 (0,18)
Atividade necro-inflamatória hepática (A\geq2)	13,18 (<0,01)	17,16 (<0,01)	13,38 (<0,01)	14,7 (<0,01)	14,07 (<0,01)	14,6 (<0,01)	-	12,76 (<0,01)
Etilismo moderado/intenso recente	4,62 (0,05)	3,83 (0,08)	4,18 (0,06)	5,11 (0,03)	4,50 (0,05)	4,79 (0,04)	4,49 (0,04)	-
- 2log verossimilhança	60,3	62,4	61,7	60,8	60,5	61,7	74,24	64,5

TABELA 42

Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2” e “esteatose hepática”

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)					
sTNFR2 (ng/mL)	2,20 (0,18)	-	2,50 (0,11)	2,09 (0,21)	3,04 (0,03)	1,79 (0,29)
Idade (anos)	1,06 (0,11)	1,06 (0,07)	-	1,05 (0,12)	1,08 (0,01)	1,05 (0,18)
Infecção pelo genótipo 1	0,41 (0,24)	0,43 (0,27)	0,44 (0,26)	-	0,34 (0,09)	0,38 (0,18)
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	15,5 (<0,01)	18,8 (<0,01)	19,75 (<0,01)	16,66 (<0,01)	-	14,74 (<0,01)
Etilismo moderado/intenso recente	5,01 (0,04)	4,28 (0,05)	4,17 (0,05)	5,25 (0,03)	4,88 (0,03)	-
- 2log verossimilhança	60,9	62,8	63,5	62,3	77,9	65,7

TABELA 43

Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática” e “genótipo viral 1”

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)				
sTNFR2 (ng/mL)	2,09 (0,21)	-	2,32 (0,13)	2,87 (0,04)	1,68 (0,33)
Idade (anos)	1,05 (0,12)	1,06 (0,08)	-	1,08 (0,01)	1,04 (0,21)
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	16,66 (<0,01)	19,74 (<0,01)	21,12 (<0,01)	-	15,9 (<0,01)
Etilismo moderado/intenso recente	5,25 (0,03)	4,49 (0,04)	4,34 (0,04)	5,19 (0,02)	-
- 2log verossimilhança	62,3	64,0	64,8	81,0	67,6

TABELA 44

Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática”, “genótipo viral 1” e “níveis de sTNFR2”

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)			
Idade (anos)	1,06 (0,08)	-	1,09 (<0,01)	1,05 (0,14)
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	19,74 (<0,01)	25,31 (<0,01)	-	17,62 (<0,01)
Etilismo moderado/intenso recente	4,49 (0,04)	3,68 (0,06)	3,92 (0,04)	-
- 2log verossimilhança	64,0	67,2	85,9	68,5

TABELA 45

Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2

Fator	OR (95% IC)	Valor de p
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	25,31 (6,03-103,14)	<0,001
Etilismo moderado/intenso recente	3,68 (0,93-14,54)	0,063

Hosmer e Lemeshow: 0,85 ; Nagelkerke R² : 0,47.

TABELA 46

Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, e não incluindo a variável “atividade necro-inflamatória”

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)						
sTNFR2 (ng/mL)	3,40 (0,03)	-	4,05 (0,01)	3,63 (0,02)	2,97 (0,04)	3,12 (0,04)	2,59 (0,06)
Idade (anos)	1,05 (0,15)	1,07 (0,04)	-	1,06 (0,07)	1,07 (0,03)	1,05 (0,12)	1,04 (0,23)
Presença de esteatose	2,39 (0,14)	2,41 (0,12)	2,92 (0,06)	-	2,39 (0,13)	2,28 (0,15)	2,81 (0,07)
Presença de diabetes	4,23 (0,27)	2,38 (0,48)	9,45 (0,07)	4,24 (0,26)	-	3,98 (0,29)	3,12 (0,98)
Infecção pelo genótipo 1	0,31 (0,08)	0,35 (0,11)	0,30 (0,06)	0,32 (0,08)	0,32 (0,08)	-	0,30 (0,06)
Etilismo moderado/intenso recente	4,49 (0,04)	3,11 (0,09)	3,77 (0,05)	5,18 (0,02)	4,15 (0,05)	4,62 (0,03)	-
- 2log verossimilhança	74,24	80,0	76,5	76,4	75,7	77,6	79,0

TABELA 47

Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, e não incluindo a variável “atividade necro-inflamatória”, depois da retirada da variável “diabetes tipo 2”

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)					
sTNFR2 (ng/mL)	2,97 (0,04)	-	3,50 (0,02)	3,04 (0,03)	2,79 (0,05)	2,39 (0,07)
Idade (anos)	1,07 (0,03)	1,08 (0,01)	-	1,08 (0,01)	1,07 (0,03)	1,05 (0,07)
Presença de esteatose	2,39 (0,13)	2,48 (0,10)	3,31 (0,03)	-	2,25 (0,15)	2,84 (0,06)
Infecção pelo genótipo 1	0,32 (0,08)	0,35 (0,10)	0,32 (0,07)	0,34 (0,09)	-	0,30 (0,06)
Etilismo moderado/intenso recente	4,15 (0,05)	3,04 (0,10)	2,80 (0,12)	4,88 (0,03)	4,34 (0,04)	-
- 2log verossimilhança	75,7	80,5	80,8	77,9	78,9	79,9

TABELA 48

Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, e não incluindo a variável “atividade necro-inflamatória”, depois da retirada da variável “diabetes tipo 2” e “genótipo viral 1”

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)			
sTNFR2 (ng/mL)	2,87 (0,04)	-	3,23 (0,06)	2,26 (0,08)
Idade (anos)	1,08 (0,01)	1,09 (<0,01)	-	1,06 (0,03)
Etilismo moderado/intenso recente	5,19 (0,02)	3,92 (0,04)	3,30 (0,01)	-
- 2log verossimilhança	80,9	85,9	88,9	87,4

TABELA 49

Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório sTNFR2, e não incluindo a variável “atividade necro-inflamatória”

Fator	OR (95% IC)	Valor de p
sTNFR2 (ng/mL)	2,87 (1,05-7,83)	0,039
Idade (anos)	1,08 (1,02-1,14)	0,010
Etilismo moderado/intenso recente	5,19 (1,34-20,03)	0,017

Hosmer e Lemeshow: 0,24; Nagelkerke R²: 0,29.

TABELA 50

Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório CXCL9

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)							
	CXCL9(ng/mL)	2,84 (0,05)	-	3,20 (0,03)	2,85 (0,05)	2,83 (0,05)	2,96 (0,05)	2,91 (0,03)
Idade (anos)	1,06 (0,20)	1,03 (0,12)	-	1,06 (0,19)	1,06 (0,14)	1,05 (0,21)	1,06 (0,12)	1,05 (0,28)
Presença de esteatose	1,09 (0,91)	1,51 (0,54)	1,25 (0,75)	-	1,09 (0,91)	1,09 (0,90)	2,02 (0,23)	1,42 (0,62)
Presença de diabetes	1,06 (0,98)	0,97 (0,98)	3,16 (0,47)	1,05 (0,98)	-	1,01 (0,99)	3,70 (0,32)	0,84 (0,92)
Infecção pelo genótipo 1	0,59 (0,51)	0,44 (0,28)	0,64 (0,57)	0,85 (0,51)	0,59 (0,51)	-	0,37 (0,14)	0,54 (0,43)
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	28,04 (<0,01)	17,16 (<0,01)	26,6 (<0,01)	28,7 (<0,01)	28,2 (<0,01)	29,9 (<0,01)	-	24,1 (<0,01)
Etilismo moderado/intenso recente	4,33 (0,07)	3,83 (0,08)	3,78 (0,10)	4,42 (0,06)	4,32 (0,07)	4,46 (0,07)	3,29 (0,08)	-
- 2log verossimilhança	54,5	62,4	56,2	54,5	54,5	54,9	73,5	58,0

TABELA 51

Modelo inicial de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório CXCL9, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática” e “genótipo viral 1”

Variáveis	Coeficiente de regressão (valor de p)				
	CXCL9(ng/mL)	2,97 (0,04)	-	3,19 (0,03)	2,88 (0,03)
Idade (anos)	1,05 (0,14)	1,06 (0,08)	-	1,08 (0,01)	1,04 (0,22)
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	30,6 (<0,01)	19,74 (<0,01)	36,71 (<0,01)	-	27,76 (<0,01)
Etilismo moderado/intenso recente	4,56 (0,05)	4,49 (0,04)	3,88 (0,08)	3,90 (0,04)	-
- 2log verossimilhança	54,9	64,0	57,2	78,5	58,9

TABELA 52

Modelo de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório CXCL9, depois da retirada das variáveis “diabetes tipo 2”, “esteatose hepática”, “genótipo viral 1” e “idade”

Variáveis	Coefficiente de regressão (valor de p)			
CXCL9 (ng/mL)	3,19 (0,03)	-	3,16 (0,01)	3,07 (0,02)
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	36,71 (<0,01)	25,31 (<0,01)	-	31,98 (<0,01)
Etilismo moderado/intenso recente	3,88 (0,08)	3,68	2,61 (0,12)	-
- 2log verossimilhança	57,2	67,2	86,0	60,4

TABELA 53

Modelo final de regressão logística para análise multivariada dos fatores preditores de fibrose hepática, contendo o marcador inflamatório CXCL9

Fator	OR (95% IC)	Valor de p
CXCL9 (ng/mL)	3,06 (1,16-8,11)	0,024
Atividade necro-inflamatória hepática (A≥2)	31,98 (6,21-164,8)	<0,001

Hosmer-Lemeshow: 0,78; Nagelkerke R²: 0,54

Anexo A - Lista de medicamentos potencialmente hepatotóxicos¹ utilizada como referência no estudo “Marcadores inflamatórios como preditores de alterações histológicas hepáticas e resposta terapêutica em pacientes com infecção crônica pelo HCV”, Belo Horizonte, 2002-2008.

- | | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. Ácido acetilsalicílico | 40. Risperidona |
| 2. Ácido valpróico | 41. Sertralina |
| 3. Alopurinol | 42. Sulfonamida |
| 4. Amiodarona | 43. Tamoxifeno |
| 5. Amitriptilina | 44. Tapazol |
| 6. Bupropiona | 45. Terbinafina |
| 7. Carbamazepina | 46. Trazodona |
| 8. Cetoconazol | 47. Tropicamato |
| 9. Clorpromazina | 48. Venlafaxina |
| 10. Corticoesteróides | |
| 11. Dapsona | |
| 12. Diazepam | |
| 13. Diclofenaco | |
| 14. Eritromicina | |
| 15. Estatinas | |
| 16. Etionamida | |
| 17. Fenitoína | |
| 18. Fenobarbital | |
| 19. Fluconazol | |
| 20. Fluoxetina | |
| 21. Glibenclamida | |
| 22. Haloperidol | |
| 23. Ibuprofeno | |
| 24. Imipramina | |
| 25. Indometacina | |
| 26. Isoniazida | |
| 27. Itraconazol | |
| 28. Metildopa | |
| 29. Metronidazol | |
| 30. Metrotexate | |
| 31. Naproxeno | |
| 32. Nitrofurantoína | |
| 33. Nortriptilina | |
| 34. Oxacilina | |
| 35. Paracetamol | |
| 36. Paroxetina | |
| 37. Pirazinamida | |
| 38. Piroxicam | |
| 39. Rifampicina | |

¹ BROWN, S. J.; DESMOND, P. V. Hepatotoxicity of antimicrobial agents. **Semin Liver Dis**, v.22, p.157-167, 2002. CHITURI, S.; GEORGE, J. Hepatotoxicity of commonly used drugs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihypertensive, antidiabetic agents, anticonvulsivants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs. **Semin Liver Dis**, v.22, p.169-183, 2002.

Anexo B - Formulários para coleta de dados utilizados no estudo “Marcadores inflamatórios como preditores de alterações histológicas hepáticas e resposta terapêutica em pacientes com infecção crônica pelo HCV”, Belo Horizonte, 2002-2008.

Formulário 1 – Avaliação de pacientes a serem incluídos no estudo

Formulário 1: Avaliação de pacientes a serem incluídos no estudo

Nº de registro:	Nº identificação (se for incluído)	Data de preenchimento:	Nome do pesquisador:	Código do pesquisador:
IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE				
NOME:			ESCOLARIDADE:	SEXO:
			<input type="checkbox"/> analfabeto	<input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> Ign
DATA DE NASCIMENTO:	Ocupação:	Estado Civil:		Raça:
		1-casado(a) 2-solteiro 3-viúvo 4-outro 9-ignorado		<input type="checkbox"/> 1- Branco 2- Negro 3- Pardo(a) 4-Outra 9-ignorado
TELEFONE DE CONTATO:	MUNICÍPIO DE RESIDÊNCIA:			
ASPECTOS CLÍNICOS				
Data de 1º Anti-HCV positivo:	ALT <input type="checkbox"/>		(1-normal 2- < 1,5x normal 3- < 1,5x persistente 4- > 1,5x flutuante 5- > 1,5x persistente 9-ignorado)	
Data PCR qualitativo positivo:	GENOTIPO: <input type="checkbox"/>			
Data biópsia:	METAVIR: A <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>			
CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO				
Intervalo entre biópsia e PCR < 12 meses? <input type="checkbox"/> (1- Sim 2- Não 9- Ignorado)				
Exames complementares (1-Positivo 2- Negativo 3- Não realizado 4- Ignorado)				
FAN <input type="checkbox"/>	Anti-musculo liso <input type="checkbox"/>	Anti-mitocôndria <input type="checkbox"/>		
HbsAg <input type="checkbox"/>	Anti-HBc total <input type="checkbox"/>	Anti-HIV <input type="checkbox"/>		
EPF (1ª amostra) <input type="checkbox"/>	EPF (2ª amostra) <input type="checkbox"/>	EPF (3ª amostra) <input type="checkbox"/>		
História clínica (1- Sim, atual 2- Sim, pregressa 3- Não 9- Ignorado)				
Etilismo (> 50g/dia) <input type="checkbox"/> Em caso afirmativo, descrever consumo: _____				
Uso de medicação hepatotóxica <input type="checkbox"/> Qual? _____				
Uso de INF antes do PCR <input type="checkbox"/>				
Presença de IRC <input type="checkbox"/>				
Esquistossomose <input type="checkbox"/>				
Preenche critérios de inclusão? <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não				
Médico assistente: _____				

Formulário 2 – Formulário de complementação de informações utilizado em todos os pacientes elegíveis para o estudo.

Nº de registro:	Nº identificação:	Data do preenchimento:	Nome do pesquisador:	Código do pesquisador
IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE				
NOME:			ESCOLARIDADE:	SEXO:
DATA DE NASCIMENTO:			anos de estudo	1-M 2-F 9-Ign
Ocupação:	Estado Civil:		Raça:	
	1-casado/amasiado 2-solteiro 3-viúvo 4-outro 9-ignorado		1- Branco 2- Negro 3- Falodermia 4-Outro 9-ignorado	
ENDEREÇO RESIDENCIAL (rua, avenida, número, apto.):			CEP:	TELEFONE P/ CONTATO:
BAIRRO OU DISTRITO:		MUNICÍPIO:		
DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS				
Provável meio de aquisição da hepatite C: (marque com "X" na casela)				
<input type="checkbox"/> 1- Hemotransfusão 2- uso de droga injetável 3- uso de droga inalatória 4- Sexual 5- Tatuagem 6- Ocupacional 8- Outro: _____ <input type="checkbox"/> 9- Ignorado				
Provável data de aquisição da hepatite C: ____/____/____				
Genotipagem			PCR quantitativo (para genotipo 1)	
<input type="checkbox"/> 1- Genotipo 1a 2- Genotipo 1b 3- Genotipo 2 <input type="checkbox"/> 4- Genotipo 3 5- Outro			<input type="checkbox"/> cópias/ml	
Biópsia hepática				
Data de realização: ____/____/____				
Número de tratos portais: _____				
Metavir: A <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>				
Descrição da Biópsia:				
Ultrassonografia: Data de realização: ____/____/____ Tamanho do fígado: Lobo esquerdo: ____cm Lobo direito: ____cm Não realizada <input type="checkbox"/> Textura hepática: <input type="checkbox"/> (1- homogênea 2- aumento da ecogenicidade 3- heterogênea 9- ignorado) Evidência de hipertensão portal: <input type="checkbox"/> (1- sim 2- não 9- ignorado) Evidência de ascite: <input type="checkbox"/> (1- sim 2- não 9- ignorado)				
Dosagem de ALT pré-tratamento:				
ALT1: _____	Data: ____/____/____	ALT4: _____	Data: ____/____/____	
ALT2: _____	Data: ____/____/____	ALT5: _____	Data: ____/____/____	
ALT3: _____	Data: ____/____/____	ALT6: _____	Data: ____/____/____	
Comportamento da ALT: <input type="checkbox"/> (1- persistentemente normal 2- aumento < 1,5X flutuante 3- aumento < 1,5X persistente 4- aumento > 1,5X flutuante 5- aumento > 1,5X persistente 9- ignorado)				
Dosagem de outros exames bioquímicos séricos pré-tratamento:				
Fosfatase alcalina: _____	GGT: _____	Ferritina: _____		
Bilirubina total: _____	BD: _____	Glicemia: _____		
Proteína total: _____	Alb.: _____	Creatinina: _____		
Dosagem de quimiocinas pré-tratamento (Data: ____/____/____)				
CCL-2: _____	CXCL-8: _____			
CCL-3: _____	CXCL-9: _____			
CCL-5: _____	CXCL-10: _____			

Formulário 3 – Formulário de complementação de informações utilizado para avaliação complementar dos pacientes submetidos a tratamento durante o período do estudo.

Formulário 3: Inclusão de pacientes na Fase I do estudo

ESTUDO FASE II			
Indicação de tratamento: <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não			
Data início do tratamento: ___/___/___			
Tipo de tratamento:			
Interferon	<input type="checkbox"/> 1- Interferon convencional	<input type="checkbox"/> 2- Peg-Interferon alfa 2a	<input type="checkbox"/> 3- Peg-Interferon alfa 2b
Ribavirina	<input type="checkbox"/> 1- Ribavirina 1.250 mg	<input type="checkbox"/> 2- Ribavirina 1.000 mg	<input type="checkbox"/> 3- Ribavirina 750 mg 4- sem ribavirina
PCR quantitativo (3 meses) <input type="checkbox"/> 1-Positivo 2- Negativo 3- Não realizado 4- Ignorado			
PCR qualitativo (final do tratamento) <input type="checkbox"/> 1-Positivo 2- Negativo 3- Não realizado 4- Ignorado			
PCR qualitativo (6 meses após tratamento) <input type="checkbox"/> 1-Positivo 2- Negativo 3- Não realizado 4- Ignorado			
Intercorrências			
Houve necessidade de <u>suspensão</u> do tratamento? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- Ignorado			
Se sim, por qual motivo: <input type="checkbox"/> 1- Anemia 2- Neutropenia 3- Plaquetopenia 4 – Outro 9- Ignorado			
Se outro motivo, especificar: _____			
Se sim, data da interrupção: ___/___/___			
Houve necessidade de <u>redução de dose</u> durante o tratamento? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- Ignorado			
Se sim, por qual motivo: <input type="checkbox"/> 1- Anemia 2- Neutropenia 3- Plaquetopenia 4 – Outro 9- Ignorado			
Se outro motivo, especificar: _____			
Se sim, data da modificação: ___/___/___ Qual modificação realizada? _____			
Comentários sobre intercorrências durante o tratamento:			
Evolução das transaminases pós início do tratamento			
Data	___/___/___ (15 dias)	___/___/___ (30 dias)	___/___/___ (12 semanas)
ALT			
Data	___/___/___ (24 semanas)	___/___/___ (48 semanas)	___/___/___ (72 semanas)
ALT			
Evolução das quimiocinas após início do tratamento			
CCL-2			
Data	___/___/___ (12 sem.)	___/___/___ (24 sem.)	___/___/___ (48 sem.)
Dosagem			
CCL-3			
Data	___/___/___ (12 sem.)	___/___/___ (24 sem.)	___/___/___ (48 sem.)
Dosagem			
CCL-5			
Data	___/___/___ (12 sem.)	___/___/___ (24sem.)	___/___/___ (48 sem.)
Dosagem			
CXCL-8			
Data	___/___/___ (12 sem.)	___/___/___ (24sem.)	___/___/___ (48 sem.)
Dosagem			
CXCL-9			
Data	___/___/___ (12 sem.)	___/___/___ (24 sem.)	___/___/___ (48 sem.)
Dosagem			
CXCL-10			
Data	___/___/___ (12 sem.)	___/___/___ (24 sem.)	___/___/___ (48 sem.)
Dosagem			

Formulário de avaliação do hábito de ingestão etílica

- a) Faz uso de bebida alcólica atualmente (sim/não)? _____
- b) Se não faz uso atual, já fez uso de bebida alcoólica (sim/não)? _____
- c) Caso use ou já tenha feito uso, idade em que bebeu pela primeira vez: ____ anos
- d) Se já parou, quando parou (mês/ano): ____/____
- e) Em geral, com que frequência bebe ou costumava beber pelo menos uma dose de bebida alcoólica (anotar por extenso)? _____
- f) Em geral, quantas doses em cada ocasião (vide figura abaixo)? _____
- g) Em geral, qual bebida alcoólica? _____



Anexo C - Parecer do comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº. ETIC 128/05

Interessado: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 15 de junho de 2005, o projeto de pesquisa intitulado « **Avaliação dos Níveis Séricos de Quimiocinas como Preditores de Alterações Histopatológicas Hepáticas e de Resposta Viroológica Sustentada em Pacientes com Hepatite C Crônica Tratados com Interferom Alfa e Ribavirina** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG