



MESTRADO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**ANA ELISA DE FIGUEIREDO MIRANDA MUNDIM**

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DOS BIOMARCADORES DIRETOS DE FIBROSE  
HEPÁTICA ANTES E APÓS O TRATAMENTO DA HEPATITE C.**

**Goiânia-GO**

**2020**



MESTRADO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DOS BIOMARCADORES DIRETOS DE FIBROSE  
HEPÁTICA ANTES E APÓS O TRATAMENTO DA HEPATITE C.**

**ANA ELISA DE FIGUEIREDO MIRANDA MUNDIM**

**Orientadora: Prof. Profa. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer  
Co-Orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Teodoro Cordeiro Silva**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

**Goiânia-GO**

**2020**



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE  
DEFENDIDA EM 03 DE MARÇO DE 2020 E CONSIDERADA  
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

1) Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer  
Profa. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer / PUC Goiás (Presidente/Orientadora)

2) Cordeiro  
Prof. Dr. Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva / PUC Goiás (Co-Orientador)

3) Sebba  
Prof. Dr. Rodrigo Sebba Aires / UFG (Membro Externo)

4) Rodrigues  
Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho / PUC Goiás (Membro)

M965a Mundim, Ana Elisa de Figueiredo Miranda  
Avaliação do impacto dos biomarcadores diretos de  
fibrose hepática antes e após o tratamento da hepatite  
C / Ana Elisa de Figueiredo Miranda Mundim.-- 2020.  
60 f.: il.

Texto em português, com resumo em inglês  
Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade  
Católica de Goiás, Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas  
e Biomédicas, Goiânia, 2020

Inclui referências: f. 55-60

1. Hepacivirus. 2. Carcinoma hepatocelular. 3. Fígado  
- Cirrose. 4. Agentes antivirais. 5. Biomarcadores.  
I.Pfrimer, Irmtraut Araci Hoffmann. II.Silva, Antonio  
Márcio Teodoro Cordeiro. III.Pontifícia Universidade  
Católica de Goiás - Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Ambientais e Saúde - 2020. IV. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 616.36(043)

578.7(043)

## DEDICATÓRIA

*Ao Pedro, Rafael e Beatriz!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, aquele que me concedeu forças, não me deixando desistir. Aquele que providenciou tudo na hora certa, não na hora que eu queria. A Ele que me ensina a resiliência, a ter paciência, esperança e renovação a cada amanhecer!

À minha orientadora Araci, professora competente e exigente, mas sempre educada, sensível e generosa. Primeiro agradeço pelo convite para fazer Mestrado e mudar o meu destino. Enxergou meu potencial, me cobrou até que eu chegasse ao meu limite, não se esquecendo de que eu também era mãe, gestante e esposa. Conquistando assim o meu coração. Agradeço a você, Araci, por ter me aceitado no seu laboratório, por todos os ensinamentos, por cada mensagem monossilábica de incentivo (risos), pela paciência, por me repreender quando mereci, por cada abraço afetuoso e por enxergar em mim até o que eu mesma não enxergava. Confiou em mim e me fez chegar até aqui, sempre ao meu lado. Sorte a minha tê-la tido como orientadora e tê-la como guia. Serei eternamente grata. Impossível mensurar a minha admiração, respeito e carinho por você! De coração, muito obrigada por tudo!

Ao Professor Antonio Márcio, meu co-orientador, por todos os ensinamentos, pela paciência, pela presença e intervenções oportunas. Obrigada pelo empenho que teve em acompanhar e participar do desenvolvimento deste trabalho e no auxílio com a análise estatística.

À Pontifícia Universidade Católica de Goiás de modo geral, ao Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde (MCAS) e a todos os docentes do programa por abrirem as portas e terem sido peças-chaves para o meu crescimento.

À toda equipe do NEPY.

À CAPES, por ter me proporcionado a bolsa de estudos crucial para a conclusão do meu mestrado.

À FAPEG, por financiar todos os custos da pesquisa.

À Dra. Patrícia, por sempre me receber na Vigilância Epidemiológica com tanto carinho. Obrigada por todos os ensinamentos, acréscimos e correções, orientação e amizade, fundamentais para a construção deste trabalho. Agradeço também pela oportunidade de acompanhar o seu trabalho com cada paciente deste projeto e ver o seu zelo e respeito com a história de cada um deles. Foi um prazer enorme trabalhar com você!

Ao Dr. Rodrigo Sebba, que junto com a Dra. Patrícia contribuiu para a construção do tema do trabalho e sempre se disponibilizou a colaborar com tudo. O senhor é um profissional maravilhoso e um homem admirável. Obrigada por tudo!

À minha amiga Marina, pelas gargalhadas, por ter sido generosa e sempre me apoiar.

À Fernanda, minha companheira do NEPY, que tornou meus dias no laboratório muito mais especiais e minhas noites de testes muito mais alegres. Obrigada pela contribuição nas coletas e dosagens dos marcadores estudados. Agradeço por cada palavra de incentivo, cada conhecimento compartilhado e pelo companheirismo.

À Ana Paula, por todos os “socorros” durante a realização do projeto, por cada palavra de equilíbrio, pelo carisma e por todos os cafés. Sem você não teria dissertação, Ana. Obrigada pela sua colaboração técnica e, principalmente, pelos gestos de amizade.

À minha mãe, por ser o maior exemplo de resistência, trabalho e persistência. A quem sou grata pela educação que me trouxe até aqui. Por sempre ter se dedicado à criar os filhos, muitas vezes em detrimento de si mesma. Por ter me preparado e ensinado a ser forte. Minha conquista, é sua! Te amo muito viu mãe!

À minha irmã Lu, minha amiga, confidente e incentivadora. Aquela que me “sacode” com vontade, me corrige sem dó mas que me quer muito, mas muito bem!

Ao Bruno, irmão afetuoso e de humor ímpar!

À Mônica que sempre me incentivou a fazer um Mestrado mesmo muito antes de eu sequer cogitar a ideia. Sempre se fez presente, confiando na minha aptidão e nutrindo a minha auto estima.

Ao Marcos e à Rosa, que me permitem sonhar, que há dez anos me presentearam com o Pedro e me receberam com muito amor na família. Sempre me respeitando, cuidando e torcendo pelo meu sucesso. Despertaram em mim a curiosidade pelos livros e o amor pelo conhecimento e aprendizagem. Obrigada por sempre me incentivarem, me apoiarem e por me aceitarem como filha. Amo vocês!

A todos os meus familiares e amigas que sentiram a minha ausência, mas que compreenderam e torceram para que cada etapa fosse vencida. Em especial minha madrinha Cacata, meu padrinho Ilson e Tia Vânia pelo amor e cuidado essenciais na minha formação pessoal. À Isabella Mundim, Marina (“fia”), a todos os “Patifes” (“véis”), “Amigas Secretas”, Lucimeire, Ana, Mel, Lô, Rebeca, Lud, Cecília, Maria Paula e Lid.

Aos meus filhos Rafael e Beatriz pela paciência. Paciência com a minha ausência, com os beijos e abraços não dados e com os dias de reclusão. Vocês são o combustível da minha vida e a luz do meu caminho. Rafael, “cura”. Beatriz, “felicidade”. Os dois, cada um com sua essência, são os maiores responsáveis pela minha alegria. Com vocês há esperança e um amor imensurável compartilhado. Amo vocês, hoje e sempre.

Por fim, ao Pedro, o mais importante. Obrigada por ser esse homem maravilhoso, esposo e pai dedicado. Você foi o meu maior companheiro nesta jornada, o que mais renunciou nestes dois anos e que mesmo assim, com todas as dificuldades e sacrifícios, me animava quando me faltava coragem, me amava enquanto eu me culpava, era o meu equilíbrio nos dias difíceis e minha fonte de força! Você trouxe calma ao nosso lar, amor em dose dupla para os nossos filhos e ordem ao meu caos. Abdicou de você mesmo, por mim. Simplesmente por desejar a minha felicidade. Com você ao meu lado, o impossível não existe.

“De almas sinceras a união sincera;  
Nada há que impeça: amor não é amor  
Se quando encontra obstáculos se altera,  
Ou se vacila ao mínimo temor.  
Amor é um marco eterno, dominante,  
Que encara a tempestade com bravura;  
É astro que norteia a vela errante,  
Cujo valor se ignora, lá na altura.  
Amor não teme o tempo, muito embora  
Seu alfange não poupe a mocidade;  
Amor não se transforma de hora em hora,  
Antes se afirma para a eternidade.  
Se isso é falso, e que é falso alguém provou,  
Eu não sou poeta, e ninguém nunca amou.”  
William Shakespeare.

Amo você de alma e coração, Pedro!



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da Hepatite C	20
Figura 2 – Presença de fibrose ou cirrose hepática conforme valores do APRI e FIB4	25
Figura 3 – Representação do fígado normal	26
Figura 4 – Representação de um fígado anormal, com a ativação das células estreladas no fígado, envolvidas por um acúmulo de matriz fibrilar	27
Figura 5 – Ativação das células estreladas	29
Figura 6 – Fluxograma da metodologia do estudo	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos utilizados pelos 24 pacientes coletados após o tratamento	23
Tabela 2 – Perfil clínico dos pacientes	40
Tabela 3 – Classificação quanto ao grau de fibrose	41
Tabela 4 – Características do tratamento	42
Tabela 5 – Comparação dos marcadores indiretos e diretos, antes e após o tratamento	43
Tabela 6 – Comparação dos biomarcadores diretos com o APRI	44
Tabela 7 – Comparação dos biomarcadores diretos com o FIB4	44
Tabela 8 – Comparação dos biomarcadores diretos com os genótipos do vírus	45
Tabela 9 – Comparação dos biomarcadores diretos com os medicamentos administrados	46
Tabela 10 – Comparação dos biomarcadores diretos com o tempo indicado de tratamento	47
Tabela 11 – Comparação dos biomarcadores diretos com o tempo da RVS até a coleta	47

## LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
APRI	AST to platelet ratio index
AST	Aspartato aminotransferase
CHC	Carcinoma hepatocelular
DAAAs	Antivirais de Ação Direta
DAC	Daclatasvir
FIB 4	Fibrosis 4
HA	Ácido hialurônico
HBV	Hepatite B
HCs	Células de Kupffer
HCV	Hepatite C
HNANB	Hepatite não-A e não-B
HSCs	Células estreladas hepáticas
IFN- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frame
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Co-infecções
PEG-IFN $\alpha$	Interferon $\alpha$ peguilado
PIIINP	N-Terminal propeptídeo de colágeno tipo III
RBV	Ribavirina
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
SIM	Simeprevir
SOF	Sofosbuvir
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
ZC	Zona Cinza

## RESUMO

A infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) é uma das várias etiologias de lesão hepática. Estima-se que, mundialmente, 71 milhões de pessoas tenham infecção crônica pelo vírus. Um número significativo desses infectados crônicos desenvolverão cirrose e alguns desenvolverão carcinoma hepatocelular (CHC). Atualmente, para a avaliação do estadiamento da doença são utilizados: os índices APRI e FIB4; a elastografia hepática, recomendada antes do tratamento; e a biópsia, que apesar de apresentar algumas desvantagens e complicações para o paciente, que continua sendo o método padrão ouro. Por isso surgiram estudos em torno da capacidade que os marcadores diretos têm de auxiliarem na avaliação da fibrose hepática pós-tratamento, já que se tratam de componentes envolvidos diretamente no equilíbrio da matriz extracelular e associados à degradação e deposição de colágeno. Nesse contexto, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar oito marcadores sorológicos diretos em pacientes infectados com o HCV pré e pós-tratamento, comparando-os com o grau de fibrose classificado pelos métodos APRI e FIB4 e associando-os com os dados relacionados às características virais. Para isso, foram coletados os dados dos prontuários e amostra biológica de 24 pacientes, antes e após o tratamento com DAAs. Os resultados mostraram que houve diminuição dos valores APRI e FIB4, indicando melhora da fibrose após o tratamento, enquanto houve aumento significativo do COLIV, TIMP1 e 2 e diminuição significativa das MMP1 e 2, sugerindo piora no grau de fibrose após o tratamento. Concluímos, com isso, que após o tratamento com os DAAs os pacientes devem ser acompanhados para avaliar um possível impacto negativo do seu uso sobre o sistema imunológico e de um processo depressor temporário decorrente da eliminação abrupta do vírus do organismo. Mais estudos devem ser realizados, com um número maior de pacientes, inclusão de fatores de risco associados a agravos hepáticos e acompanhamento a longo prazo para verificação destes parâmetros após um período maior de RVS. De todo modo, os resultados deste estudo representaram um avanço por oferecerem diferentes dados pré e pós-tratamento relacionados com os biomarcadores diretos.

## ABSTRACT

Infection with the Hepatitis C virus (HCV) is one of several etiologies of liver damage. It is estimated that 71 million people worldwide have chronic infection with the virus. A significant number of these chronic infected people will develop cirrhosis and some will develop hepato-cellular carcinoma (HCC). Currently, for the assessment of hepatic fibrosis, the following are used: the APRI and FIB4 indices; liver elastography, recommended before treatment; and biopsy, which despite presenting some disadvantages and complications for the patient, remains the gold standard method. For this reason, studies have emerged on the ability of direct markers to assist in the assessment of post-treatment liver fibrosis, as these are components directly involved in the balance of the extracellular matrix and associated with collagen degradation and deposition. In this context, our objective was to evaluate eight direct serological markers in patients infected with HCV before and after treatment, comparing them with the degree of fibrosis classified by the APRI and FIB4 methods and associating them with the data related with viral characteristics. For this, data were collected from medical records and biological samples from 24 patients, before and after treatment with DAAs. The results showed that there was a decrease in the APRI and FIB4 values, indicating an improvement in fibrosis after treatment, while there was a significant increase in COLIV, TIMP1 and 2 and a significant decrease in MMP1 and 2, suggesting a worsening in the degree of fibrosis after treatment. We conclude, therefore, that after treatment with DAAs, patients should be monitored to assess a possible negative impact of their use on the immune system and a temporary depressive process resulting from the abrupt elimination of the virus from the body. Further studies should be carried out, with a larger number of patients, inclusion of risk factors associated with liver problems and long-term follow-up to verify these parameters after a longer period of SVR. Anyway, the results of this study represented an advance for offering different pre and post-treatment data related to direct biomarkers.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b>	
2.1.	A Hepatite C	18
2.2.	Classificação do vírus e estrutura molecular	18
2.3.	História e Prevalência	18
2.4.	Fases da doença	19
2.5.	Diagnóstico	20
2.6.	A evolução dos fármacos	21
2.7.	Estadiamento da doença	23
2.7.1.	Biópsia	23
2.7.2.	Elastografia	24
2.7.3.	APRI e FIB4	24
2.8.	O fígado	25
2.9.	Lesões hepáticas	26
2.10.	Matriz Extracelular e o Processo Inflamatório Hepático	27
2.11.	Biomarcadores sorológicos diretos	29
2.11.1.	Ácido Hialurônico	29
2.11.2.	Colágeno Tipo I e IV	30
2.11.3.	Propeptídeo aminoterminal do Procolágeno Tipo III	30
2.11.4.	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases	31
2.11.5.	Metaloproteinases	31
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
3.1.	Objetivo Geral	33
3.2.	Objetivos Específicos	33
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	
4.1.	Tipo, localização, período e população do estudo	34
4.2.	Coleta de Dados e Amostras	34
4.2.1.	Primeira Fase do Estudo	34
4.2.2.	Segunda Fase do Estudo	35
4.3.	Critérios de Inclusão	37

4.4.	Critérios de Exclusão	37
4.5.	Aspectos Éticos	37
4.6.	Variáveis analisadas	37
	4.6.1. Dados coletados	37
	4.6.2. Dados laboratoriais	38
4.7.	Análise estatística	39
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O fígado é maior órgão interno do nosso organismo e é responsável por diferentes funções essenciais para o corpo humano. Ele possui uma grande capacidade de regeneração, que é bastante afetada no caso de doenças crônicas. Por isso, compreender a histologia básica do órgão, a etiologia da lesão e o processo inflamatório causado após uma lesão é de suma importância para compreendermos a fibrose hepática e seu impacto no equilíbrio homeostático e funcionalidade do fígado (1,2).

A fibrose é um processo caracterizado por uma cicatrização tecidual em resposta ao dano hepático, e o principal mecanismo que dá início a este processo é a ativação das células estreladas hepáticas (HSCs), responsáveis por sintetizar uma grande quantidade de componentes da matriz extracelular (MEC), espaço onde se encontram os componentes estruturais do tecido hepático (3,4). Quando o fígado está saudável e a MEC em equilíbrio, a atividade hepática encontra-se normal. Contudo quando ocorre uma lesão, ocorre o estímulo de processos inflamatórios celulares, e na tentativa de recuperação fisiológica, a MEC é comprometida devido a uma alta produção dos seus componentes seguida de sua baixa degradação (5,6). Quando o processo de fibrose atinge o seu estágio mais avançado, ocorre a degeneração progressiva dos hepatócitos e a necrose, e o material fibrótico formado substitui o parênquima caracterizando a cirrose, que pode causar CHC (Carcinoma Hepatocelular).

Uma das várias etiologias de lesão hepática é a infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) (7). Estima-se que mundialmente, 71 milhões de pessoas tenham infecção crônica pelo vírus e um número significativo destes infectados cronicamente desenvolverão cirrose e alguns desenvolverão carcinoma hepatocelular (CHC). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que em 2016 quase 400 mil pessoas morreram de Hepatite C, principalmente por cirrose e CHC (8). E no Brasil, entre os anos de 2000 e 2017, foram identificados mais de 50 mil óbitos por causas básicas e associadas à Hepatite C (9).

O diagnóstico atualmente é realizado com o teste anti-HCV e a realização de teste molecular para a detecção do RNA viral e quantificação da carga viral. Desde 2018 a realização da elastografia não é mais obrigatória e todos os casos confirmados positivos são encaminhados para tratamento no sistema público de saúde (10,11). Mas acreditamos que a classificação do estadiamento hepático é de suma importância para orientação quanto à opção terapêutica a ser prescrita, acompanhamento do alcance de RVS (Resposta Viroológica Sustentada) e prognóstico após o tratamento.



Os métodos hoje utilizados e recomendados pelo Ministério da Saúde são classificados principalmente em marcadores invasivos e não invasivos. O marcador invasivo é a biópsia, e apesar de ser o “padrão ouro” recomendado para avaliar o estadiamento da doença, apresenta algumas desvantagens e limitações, como o fato de ser um método invasivo, com possíveis complicações para o paciente, variação interobservador e alto custo. Apesar de recentemente terem ocorrido avanços significativos na avaliação da fibrose, um método único e não invasivo capaz de substituir a biópsia ainda não existe (12,13). E os marcadores não invasivos que podem ser classificados como mecânico e indiretos. O marcador mecânico é a elastografia, considerado como indolor, de baixa variabilidade interobservador e verificação de uma área maior do fígado do que a biópsia (14), e os marcadores indiretos são o APRI e o FIB4, índices utilizados para refletir a condição hepática, considerados testes de simples execução laboratorial, disponíveis e de baixo custo (15).

Por fim, existem também os métodos não invasivos diretos, biomarcadores associados com o metabolismo da matriz extracelular hepática, que ainda não foram totalmente elucidados e validados quanto à sua especificidade e sensibilidade na avaliação da gravidade da doença hepática. Isto justifica a realização de mais estudos que avaliem o desempenho e aplicabilidade destes biomarcadores sorológicos diretos na avaliação da fibrose hepática em pacientes com Hepatite C.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. A Hepatite C

A Hepatite C, uma das causas de lesão hepática, é uma doença que tem apresentado dados preocupantes. Em 2015, 71 milhões de pessoas viviam com a Hepatite C crônica. Conforme o último dado da Organização Mundial da Saúde (OMS) (16), em 2017, a prevalência do HCV na região das Américas era de sete milhões de pessoas infectadas (17). Mas o problema é que o último Relatório Global de Hepatites indicou que a grande maioria dos infectados não tem acesso aos testes e tratamentos. Como resultado disso, milhões de pessoas têm o risco de uma lenta progressão da doença hepática crônica, com o desenvolvimento de fibrose, cirrose, CHC e morte (8,18,19). Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2019), a distribuição dos óbitos por causa básica e associada às hepatites virais foi em sua maioria, 76%, associados à Hepatite C. Esses dados justificam a preocupação em diagnosticar, tratar e acompanhar os pacientes após o tratamento para prever esses agravos e tratá-los adequadamente, antes dos infectados apresentarem complicações como o CHC (9).

### 2.2. Classificação do vírus e estrutura molecular.

O HCV é classificado como pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus* (20). O seu genoma é composto por RNA de cadeia simples e sentido positivo, com um único quadro de leitura aberto (ORF – Open Reading Frame) com 9.400 nucleotídeos de comprimento, flanqueado nas extremidades por 30 ou 50 regiões não traduzidas, conhecidas como 5’NTR (nontranslated region) e 3’NTR (21).

A tradução da região ORF do vírus produz um polipeptídeo de aproximadamente 3.000 aminoácidos que, após clivagem realizada por proteases virais e hospedeiras, produzem proteínas estruturais, uma proteína transmembrana e proteínas não estruturais. As proteínas estruturais são a CORE (glicoproteína do núcleo), E1 e E2 (glicoproteínas do envelope viral); a proteína transmembrana denominada p7; e as proteínas não estruturais produzidas são NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (22–26).

### 2.3. História e Prevalência

O HCV foi reconhecido pela primeira vez em 1975, quando pesquisadores concluíram que a maioria das hepatites pós-transfusionais não estavam associadas a infecções causadas pelo vírus da Hepatite A ou pelo vírus da Hepatite B (HBV), mas por outro agente infeccioso, ainda desconhecido. Assim, surgiu o conceito da Hepatite não-A e não-B (HNANB) que, na década de 80, continuou sendo um mistério para muitos pesquisadores (27).

Em 1989, CHOO *et al.* (28) decodificaram o DNA complementar do RNA do vírus HCV, utilizando amostras de chimpanzés infectados experimentalmente. Nos anos seguintes, observou-se uma evolução dos estudos realizados com o HCV, que permitiram o desenvolvimento de testes diagnósticos, a associação do vírus com doenças hepáticas, incluindo o CHC, e tratamentos efetivos para pacientes infectados.

Atualmente, a alta prevalência da infecção pelo HCV torna a doença um problema de saúde pública mundial. Diferenças na distribuição da doença entre os países no mundo ocorrem, principalmente, pelo fato do aumento da prevalência ser impulsionado pela baixa renda, procedimentos inseguros de cuidado da saúde e utilização de drogas injetáveis. Isso mostra a importância de diminuir a inequidade de acesso da população à saúde (18).

De acordo com o Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais do Ministério da Saúde, entre os anos de 1999 e 2017 foram notificados no Brasil 331.855 casos de Hepatite C com um dos marcadores, anti-HCV ou HCV-RNA, e 160.105 casos com os dois marcadores (29).

Existem muitas variações regionais no tipo de genótipos identificados. No Brasil, o genótipo predominante é o genótipo 1 (74,3%), seguido pelo genótipo 3 (14,2%) e pelo genótipo 2 (10,4%). Os 1,1% restantes são representados por uma mistura de outros genótipos, incluindo os genótipos 4, 5 e 6 (30). É muito importante conhecer essas variações porque elas são fatores que imputam variabilidade na cronicidade da doença e influenciam na resposta ao tratamento.

#### 2.4. Fases da doença

A infecção pelo HCV apresenta diferentes fases de desenvolvimento clínico. O estágio inicial da infecção pelo vírus é conhecido como fase aguda da doença. Pode durar até seis meses após a infecção. É assintomático, o que dificulta os estudos relacionados a esta fase da doença e favorece a transmissão do vírus pelo indivíduo que desconhece estar infectado. Já a fase crônica ocorre em até 80% dos pacientes infectados. É o período em que o vírus se repli-

ca continuamente, permitindo a detecção do RNA viral no soro e a descoberta da infecção (31,32). O fato de os principais relatos de insuficiência hepática, de cirrose e CHC ocorrerem na fase crônica (33) reforça a necessidade do diagnóstico e tratamento precoce da infecção (34).

## 2.5. Diagnóstico

O diagnóstico da Hepatite C recomendado atualmente pelo Ministério da Saúde, conforme Figura 1, é realizado a partir da realização do teste anti-HCV, que indica o contato prévio com o vírus e confirma a presença do anticorpo anti-HCV na amostra. Mas este teste não deve ser utilizado isoladamente para o diagnóstico porque pode se tratar de uma infecção prévia resolvida naturalmente pelo organismo do paciente. Sabe-se que 20% dos infectados talvez não se tornem portadores crônicos da infecção. Por isso, para confirmar a infecção ativa pelo vírus, deve-se realizar um teste molecular conhecido como HCV-RNA quantitativo, que detecta a presença do RNA viral na amostra, ou seja, a carga viral (11). Dessa forma, o diagnóstico da Hepatite C só pode ser confirmado após a realização e positividade desses dois testes (11,35).

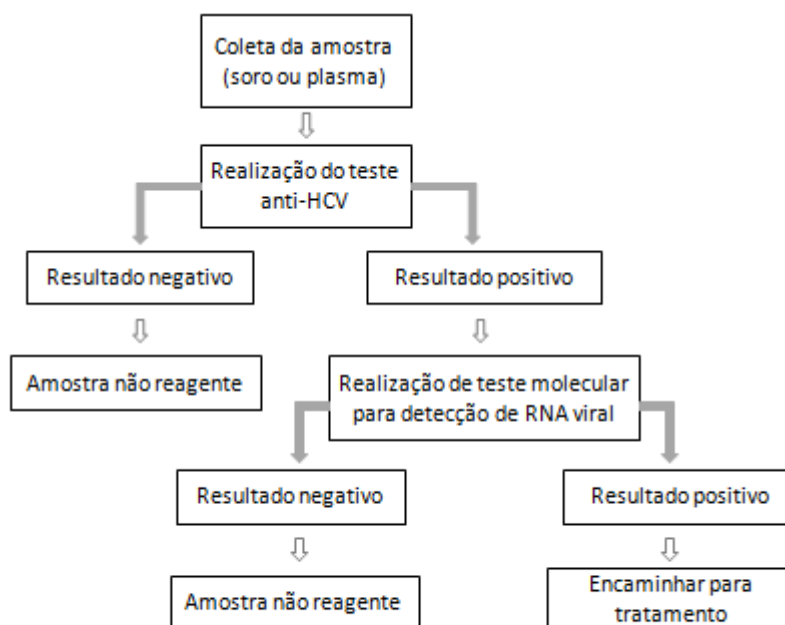


Figura 1: Esquema do diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da Hepatite C.

Fonte: a autora.

Após confirmação do diagnóstico, é realizado o teste de genotipagem para orientar o esquema terapêutico apropriado (11).

## 2.6. A evolução dos fármacos

A compreensão da estrutura genômica do HCV desempenha um papel fundamental no entendimento do ciclo de vida do vírus e a posterior identificação de fármacos eficazes no combate à doença. O tratamento da infecção pelo HCV tem como objetivo o alcance da RVS, que corresponde à persistência da viremia indetectável (RNA Viral) 12 ou 24 semanas após o final do tratamento (11).

Os principais alvos das drogas são as proteínas não estruturais, por estarem envolvidas no processamento da poliproteína e na replicação do RNA Viral (36). Espera-se, com o tratamento, diminuir a incidência de Hepatite C crônica e melhorar a qualidade de vida dos pacientes infectados.

Na década de 80, surgiu a primeira opção terapêutica para pacientes infectados com o HCV: a monoterapia com o interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) convencional, utilizada por um período de 6 a 12 semanas. Contudo, ela não se mostrou uma terapia muito eficaz, pois apresentava taxas de cura de 10 a 15% dos pacientes tratados (37,38).

Posteriormente, recomendou-se uma associação do Interferon- $\alpha$  peguilado (PEG-IFN $\alpha$ ) com a Ribavirina (RBV), em um período de 24 a 48 semanas. Essa opção terapêutica mostrou-se mais eficiente por ser uma terapia dupla. Ela fornecia uma taxa de cura de 45 a 60% em pacientes com os genótipos 1 e 4, e de 70 a 80% em pacientes com genótipos 2 e 3 (39). As limitações desta prescrição eram: o número grande de reações adversas aos medicamentos, como a diminuição nos glóbulos brancos, depressão e surgimento de doenças autoimunes, que causam maior intolerância; e o tempo prolongado de terapia, que contribuía para diminuir a adesão ao tratamento (33).

Por isso, foi importante o desenvolvimento de medicamentos antivirais mais eficazes, conhecidos como Antivirais de Ação Direta, os DAAs, que agem principalmente em algumas das proteínas não estruturais do vírus. A primeira geração de DAAs foi aprovada para uso clínico em 2011 e representou uma nova era terapêutica contra o HCV. Ela incluiu os medicamentos Boceprevir e Telaprevir. Quando ambos os medicamentos foram combinados ao

uso padrão PEG-IFN $\alpha$  + RBV, a taxa de cura para pacientes de genótipo 1 aumentou, ficando entre 65 a 75% (39).

Após dois anos, em 2013, a segunda geração de DAAs trouxe novos benefícios aos pacientes por serem menos tóxicos e mais efetivos, aumentando a RVS e elevando as taxas de cura para 90 a 100%. Apesar de apresentar vantagens, estas drogas ainda não tratavam todos os genótipos do HCV. O Sofosbuvir (SOF) combinado com o PEG-IFN $\alpha$ /RBV, aumentou a taxa de cura nos genótipos 1 e 4 para 92%, enquanto que a combinação do SOF com a RBV apresentou uma taxa de cura de 100% para o genótipo 2 e de 91% para o genótipo 3. O Simeprevir (SIM), quando associado ao SOF, apresentou taxa de cura de 92% em pacientes de genótipo 1 e, associado à PEG-IFN $\alpha$ /RBV, demonstrou efetividade em pacientes pós-transplantados portadores do HCV. Além do SOF e do SIM, também fazem parte da segunda geração de DAAs as combinações do SOF com o Ledipasvir, e a combinação do Ombitasvir, Dasabuvir, Veruprevir e Ritonavir, conhecida como 3D (39).

Em 2014, as terapias utilizadas se caracterizaram por serem livres de Interferon. O SOF + Ledipasvir e o SOF + SIM + RBV resultaram em taxas de cura entre 92 e 100% no genótipo 1. As combinações de Ombitasvir, Dasabuvir, Veruprevir e Ritonavir (3D), com ou sem RBV, resultaram em taxas de cura de até 100% (39).

Em 2016, a terceira geração incluía Asunaprevir, Daclatasvir (DAC), Beclabuvir, Grazoprevir, Elbasvir e Viekirax (composto do Ombitasvir com o Paritaprevir e Ritonavir) (39).

De acordo, com o PCDT de 2017, as opções terapêuticas disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) incluíam: DAC, SIM e SOF e a associação dos fármacos Ombitasvir, Dasabuvir, Veruprevir/Ritonavir, também conhecido com 3D (40,41).

O PCDT, publicado em abril de 2018, compreendeu um grande avanço na indicação do tratamento, por incluir todos os pacientes diagnosticados com o vírus HCV, independente do estágio de fibrose hepática. Além dos DAAs disponíveis em 2017, já citados acima, duas novas associações foram incluídas como opções terapêuticas: a associação do Ledipasvir e SOF e a associação do Elbasvir e Grazoprevir (10).

Por fim, o último PCDT publicado, em 2019, faz parte de várias ações do Ministério da Saúde incluídas no Plano de Eliminação das Hepatites Virais. Um plano que tem como objetivo eliminar, até 2030, as Hepatites Virais como problema de saúde pública. Entre as principais atualizações deste protocolo estão as inclusões de duas opções terapêuticas que são capazes de tratar todos os tipos de vírus da Hepatite C: Glecaprevir/Pibrentasvir e Velpatasvir/SOF. Estas duas novas prescrições terapêuticas se juntam a associação SOF/DAC. Além

dessas novas opções, o PCDT 2019 manteve a administração do Ledipasvir/SOF para o genótipo 1, Elbasvir/Grazoprevir e Glecaprevir/Pibrentasvir para os genótipos 1 e 4 e a PEG-IFN $\alpha$ /RBV para casos pediátricos (11).

Para maior compreensão, segue abaixo na Tabela 1 os medicamentos utilizados pelos pacientes deste estudo e seu mecanismo de ação.

Tabela 1. Fármacos utilizados pelos 24 pacientes coletados após o tratamento.

Medicamento	Ação
Ribavirina	Inibe o RNA mensageiro viral e a polimerase do RNA viral.
Sofosbuvir	Análogo de nucleotídeo que inibe a polimerase da NS5B.
Simeprevir	Inibidor de protease da NS3.
Daclatasvir	Inibidor do complexo enzimático da NS5A. Inibidor de NS5A.
3D	Inibidor não nucleosídico da polimerase da NS5B. Inibidor de protease NS3/4A; Potencializador farmacocinético.

## 2.7. Estadiamento da doença

O estadiamento da doença hepática trata-se de uma classificação que se refere à avaliação da gravidade da enfermidade. Desde 2018, o tratamento é indicado independente do estágio da fibrose hepática. Esta classificação é importante porque afeta a condição clínica do paciente e a opção terapêutica que o médico irá propor (11).

### 2.7.1. Biópsia

A biópsia hepática é um marcador invasivo de fibrose hepática, continua sendo o “padrão ouro” e tem como objetivo determinar e classificar a gravidade da lesão para auxiliar no diagnóstico e no tratamento a ser utilizado. Contudo, apresenta algumas limitações, como o fato de ser um método invasivo, de alto custo para o sistema público de saúde e a variação interobservador (12,13,42). Por isso, o desenvolvimento de novos métodos não invasivos, como técnicas de imagem e dosagens séricas de marcadores diretos e indiretos de fibrose, tornou-se essencial (43).

A escala Metavir é um “score” francês utilizado para informar o grau de fibrose, representado pela letra “F”, e atividade necroinflamatória, representada pela letra “A”. A classifi-

cação do grau de fibrose é simples por apresentar somente cinco estágios: F0 (representa um fígado saudável, que não sofreu nenhuma agressão); F1 (representa um fígado com fibrose mínima, fibrose portal sem septos); F2 (representa a presença de fibrose moderada, com alguns septos); F3 (representa uma fibrose já avançada, com numerosos septos); e F4 (representa a presença de cirrose). A avaliação da atividade necroinflamatória é segmentada em quatro categorias: A0 (sem atividade); A1 (com atividade suave); A2 (com atividade moderada); e A3 (com atividade severa) (44,45).

### 2.7.2. Elastografia

A elastografia é um marcador não invasivo mecânico (tecnologia de imagem), baseada em ultrassom, utilizada exclusivamente para o diagnóstico de fibrose hepática (7). As principais vantagens que ela apresenta são: método não invasivo, indolor, de baixa variabilidade interobservador, execução rápida e avaliação de uma área maior do fígado do que o fragmento analisado em uma biópsia (12,14,46).

A elastografia classifica a fibrose apresentando pontos de corte para o grau da fibrose. É importante lembrar, contudo, que a avaliação e classificação na escala Metavir depende do aparelho utilizado. No caso dos pacientes avaliados neste estudo foi utilizada a elastografia transitória (Fibroscan<sup>®</sup>), com os seguintes valores de corte: Fibrose  $\geq 2$  (7,1 KPa); Fibrose  $\geq 3$  (9,5 KPa) e Fibrose  $\geq 4$  (12,5 KPa) (11,47,48).

### 2.7.3. APRI e FIB4

O APRI e FIB4 são marcadores não invasivos indiretos, utilizados para estabelecer índices que representam os resultados da avaliação histopatológica, ou seja, são índices que refletem as alterações estruturais e funcionais hepáticas (43).

O APRI ou AST to platelet ratio index, descrito por WAI *et al* em 2003 (49), correlaciona o nível de aspartato-aminotransferase (AST) ao de plaquetas, através da fórmula:  $[(\text{Valor de AST} / \text{Limite superior normal de AST}) / \text{Contagem de plaquetas} - 10^9] \times 100$  (49–51). É um índice utilizado para diferenciar o grau de fibrose e cirrose, com boa correlação com a condição histológica do órgão, e também pode ser utilizado na monitoração terapêutica dos pacientes com HCV. Ele apresenta algumas vantagens como: teste de simples realização laboratorial, disponível e de baixo custo (15). O FIB 4 ou Fibrosis 4, descrito por STERLING *et al*



em 2006 (52), é outro índice simples de ser calculado pela fórmula:  $[(\text{Idade} \times \text{AST}) / (\text{Contagem de plaquetas} - 10^9 \times \text{raiz quadrada de ALT})]$ , para também avaliar o grau de fibrose e cirrose (11).

O resultado destes dois índices dá-se pela interpretação de valores numéricos, como apresentado na Figura 2, que representam baixa probabilidade de fibrose hepática, representada pela ausência de fibrose ou fibrose leve, alta probabilidade de fibrose hepática, representada por uma fibrose avançada, e um último, presente entre as outras duas classificações, o grau de fibrose possivelmente intermediário que não permite uma categorização, e é reconhecido como indeterminado (49). Devido à sua praticidade de execução, o APRI e o FIB 4 são preferencialmente indicados para a avaliação do estadiamento hepático (11,12).

<b>APRI (avaliação de fibrose hepática avançada)</b>			
<b>Resultado</b>	<b>&lt;0,5</b>	<b>0,5-1,49</b>	<b>≥1,5</b>
Interpretação	Baixa probabilidade de fibrose hepática F2, F3 ou F4	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade de fibrose hepática F3 ou F4
<b>APRI (avaliação de cirrose hepática)</b>			
<b>Resultado</b>	<b>&lt;1,0</b>	<b>1,0-1,49</b>	<b>≥2,0</b>
Interpretação	Baixa probabilidade de cirrose (F4)	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade de cirrose (F4)
<b>FIB-4 (avaliação de fibrose hepática avançada ou cirrose)</b>			
<b>Resultado</b>	<b>&lt;1,45</b>	<b>1,45-3,24</b>	<b>≥3,25</b>
Interpretação	Baixa probabilidade de F2, F3 ou F4	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade de F3 ou F4

Figura 2: Presença de fibrose ou cirrose hepática conforme valores do APRI e FIB4. Fonte: (11)

## 2.8. O fígado

O fígado é o segundo maior órgão do nosso organismo e é responsável por diferentes funções essenciais para o corpo humano. O seu elemento básico histológico é a célula hepática, conhecida como hepatócito, que se organiza em placas, formando várias unidades estruturais chamadas de lóbulos hepáticos. Entre os hepatócitos, existem vasos chamados sinusóides, revestidos de células epiteliais e macrófagos, que no fígado são denominados células de Kupffer (HCs). No lóbulo hepático, os hepatócitos são separados dos vasos sinusóides por um espaço subendotelial chamado de espaço de Disse (1,53).

O espaço de Disse permite o fluxo de moléculas entre os hepatócitos e os vasos sinusóides, o que permite uma estabilidade estrutural do parênquima hepático. Nele encontramos

as HSCs, produtoras de MEC, principais responsáveis então pela fibrinogênese (54). A MEC é constituída por matriz fibrilar: fibras do sistema colágeno e elástico, e matriz não fibrilar: glicosaminoglicanos livres (como o ácido hialurônico), proteoglicanos, glicoproteínas e substâncias solúveis (como água e nutrientes) (4).

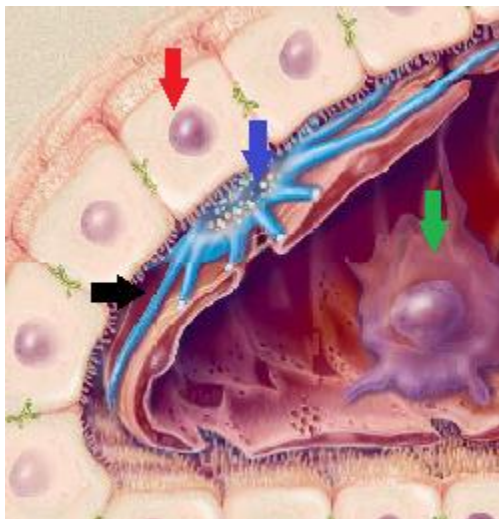


Figura 3: Representação do fígado normal. Hepatócito (indicado pela seta vermelha), célula de Kupffer (indicada pela seta verde) e a célula estrelada (indicada pela seta azul), que por sua vez encontra-se no espaço de Disse (indicado pela seta preta). Fonte: Adaptado de (55).

## 2.9. Lesões hepáticas

A partir da histologia básica hepática é possível compreender o impacto das lesões no órgão. Resumidamente, o que acontece no caso da fibrose é que quando ocorre uma lesão no fígado, a regeneração das células do parênquima hepático pode não ser suficiente ou falhar. Assim, os hepatócitos são substituídos por MEC, incluindo o colágeno fibrilar (6).

O processo de fibrose é caracterizado por uma cicatrização tecidual em resposta a um dano hepático que pode ser causado por diversos agentes. A ativação das HSCs é a via mais dominante que leva à fibrose hepática, porque são elas que sintetizam grande quantidade de componentes da MEC, conforme Figura 4 (3). Esse processo gera alterações na matriz reticular do espaço de Disse, por meio de uma maior produção de MEC e da sua menor degradação. Isso leva ao desenvolvimento de fibrose como resultado do espaçamento progressivo dos septos fibróticos e da ligação de colágeno. Essas mudanças na composição da MEC também estimulam a fibrogênese, caracterizada pela ruptura dessa matriz e da sua substituição por colágenos fibrilares tipo I e III, o que gera instabilidade no fluxo de moléculas e altera o funcionamento dos hepatócitos (6,56).

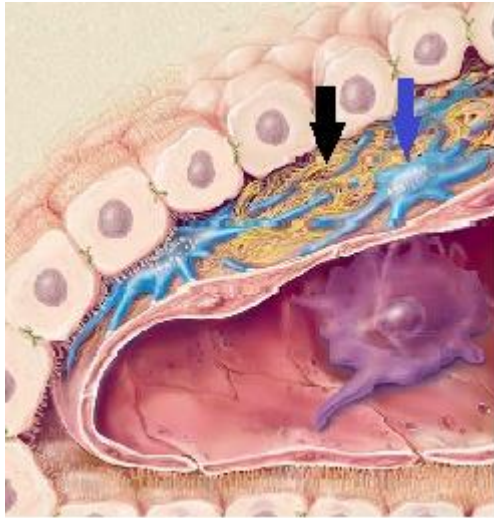


Figura 4: Representação de um fígado anormal, com a ativação das células estreladas no fígado, envolvidas por um acúmulo de matriz fibrilar. Célula estrelada ativada (indicada pela seta azul) e acúmulo de matriz fibrilar (indicada pela seta preta). Adaptado de Fonte: (55).

A cirrose ocorre quando o processo de fibrose atinge o seu estado mais avançado. Ela é resultado do aumento da resposta fibrótica, com um acúmulo excessivo de MEC, alteração do parênquima hepático e alterações no fluxo sanguíneo (5). A cirrose pode acarretar em perda da função dos hepatócitos e, conseqüentemente, na falência hepática, hipertensão portal, aumento da resistência intra-hepática e no desenvolvimento de CHC (7).

O progresso da fibrose varia dependendo da causa da lesão hepática, que pode decorrer do consumo excessivo de drogas e/ou álcool, doenças autoimunes e desordens metabólicas como, diabetes tipo 2, dislipidemia, obesidade e doenças virais, como hepatite B e C (57).

## 2.10. Matriz Extracelular e o Processo Inflamatório Hepático

O parênquima hepático é composto por hepatócitos, células endoteliais e outras células residentes, como as HSCs e as KCs, e os componentes estruturais do tecido hepático que se encontram na MEC (54).

A MEC é uma grande parte do microambiente de todos os tecidos formada por uma malha não celular composta, principalmente, por proteínas e proteoglicanos, mas também por glicoproteínas e polissacarídeos. Componentes que quando organizados e estruturados em diferentes proporções no tecido, oferecem as condições necessárias para o crescimento, funcionamento e sobrevivência celular (4,58–60).

Quando o fígado está saudável e a MEC em seu estado normal, a atividade hepática encontra-se estável e o órgão em equilíbrio fisiológico (6). Ao surgir uma lesão, ocorre o estímulo de processos inflamatórios celulares. Durante a tentativa de recuperação fisiológica, desenrola-se uma ruptura desta matriz, desencadeando um desequilíbrio funcional, pois a sua interação com cada célula do parênquima hepático fica comprometida (3,5,61).

O que ocorre é a interação entre as principais células hepáticas – os hepatócitos, as KCs e as HSCs – no desenvolvimento de fibrose em resposta a lesão hepática crônica causada pelo HCV. Por serem as células mais presentes no fígado, aproximadamente 80%, os hepatócitos são os mais afetados pela lesão, produzindo vários mediadores inflamatórios que ativam diretamente as HSCs. Estas também são ativadas indiretamente pelas KCs e pelas células endoteliais sinusoidais.

Como ilustrado na Figura 5, as HSCs inativas, armazenadoras de lipídeos e vitamina A, são ativadas para um fenótipo ativo miofibroblástico que se prolifera e desencadeia vários processos, tais como: a fibrinogênese, contração, quimiotaxia, liberação de citocinas inflamatórias e uma alteração do equilíbrio da MEC caracterizada por uma alta produção de matriz e sua baixa degradação (43). Isso causa o espessamento progressivo dos septos fibróticos, ruptura da matriz e sua consequente substituição por colágenos fibrilares. Esses achados reforçam a complexidade e importância que a ativação das HSCs tem na regulação e equilíbrio hepático, no desenvolvimento de novos diagnósticos e terapias para as doenças hepáticas (3,54,61,62).

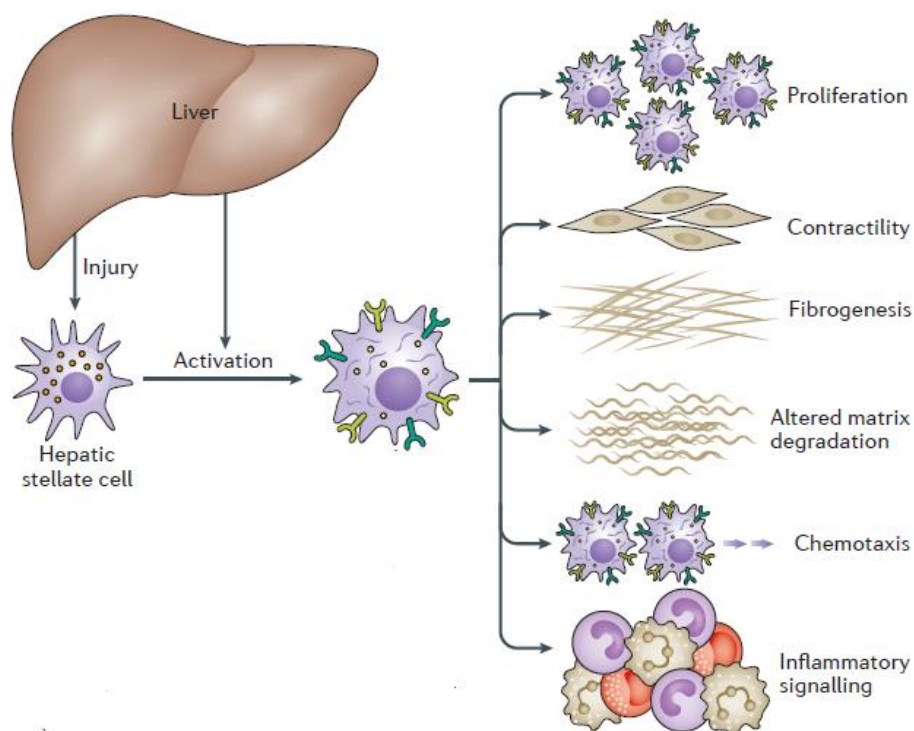


Figura 5: Ativação das células estreladas. Adaptado de Fonte: (56).

## 2.11. Biomarcadores sorológicos diretos.

A base de toda discussão em torno dos marcadores diretos é a MEC, por ser o seu desequilíbrio, entre degradação e acúmulo, o responsável pela desordem fisiológica hepática que causa a fibrose (54). Os marcadores diretos são as principais substâncias diretamente envolvidas com o metabolismo desta matriz, indicando alterações na histologia, fisiologia e funcionamento hepático. Eles são classificados como marcadores experimentais por ainda não serem validados e aceitos clinicamente (63).

### 2.11.1. Ácido Hialurônico (HA)

O HA é um glicosaminoglicano sintetizado pelas HSCs, degradado pelas células sinusoidais. É o principal componente estrutural de formação da MEC (64) encontrado na matriz intersticial (65). Ele é o mediador mais validado e seus altos níveis são relacionados diretamente com lesão hepática e hepatite viral crônica (66). Existem estudos que comprovam a sua eficácia na exclusão de fibrose avançada e/ou cirrose quando seus valores são  $< 60\text{mcg/L}$ .

Mas, em contrapartida, existem outros que relatam a baixa aplicabilidade deste marcador quando se tratam de pacientes em estágios menos avançados de lesão (66–70).

### 2.11.2. Colágeno Tipo I e IV (COLI e COLIV)

Dentre as principais proteínas fibrosas da MEC estão o colágeno, a elastina, a fibronectina e a laminina. Destes, o colágeno é o principal componente, representando 30% da massa total de proteínas de uma célula animal. É importante ressaltar que os colágenos podem ser divididos em dois grupos: colágeno da matriz da membrana basal e colágeno da matriz intersticial (60,71). Neste estudo, foram dosados o COLI e COLIV, cada um representando um grupo da matriz. Eles são sintetizados pelos fibroblastos e ambos são componentes importantes na fase de resposta a uma lesão, pela remodelação de reparo e pela sua proteólise ser essencial para a migração celular através da MEC (72,73). O aumento na síntese de colágeno caracteriza uma alteração proteica que, somada ao acúmulo de fibras no tecido e à mudança na estrutura hepática, causa o aumento da densidade da MEC, tornando-o um indicador fibrinogênico (56,63).

O COLI é o colágeno mais abundante na matriz intersticial hepática (55) e a maior parte do colágeno intersticial é secretado por fibroblastos que residem no tecido. Quando a MEC está saudável, a malha de colágeno e elastina sofre tensões celulares, mas mantém o funcionamento do tecido normal, remodelando-o (65). Quando ocorre uma lesão, a fibrinogênese é ativada e, com o intuito de cicatrizar a lesão, a MEC acaba sendo danificada porque a migração e a proliferação de fibroblastos fazem com que eles sintetizem e depositem na MEC grandes quantidades de COLI (72). Por isso, quando comparado à matriz normal, o tecido produzido na fibrose (55) e na cirrose (56) tem uma quantidade maior de COLI, embora ele não seja relacionado ao grau necroinflamatório (64).

O COLIV também é uma proteína da MEC, é encontrado na matriz da membrana basal e é essencial para a polaridade do tecido (72). Existem também relatos da correlação entre o COLIV e o estágio fibrótico (64), e do seu aumento em fígados cirróticos (56).

### 2.11.3. Propeptídeo aminoterminal do Procolágeno Tipo III (PIIINP)

Os colágenos fibrilares, como o colágeno III, são sintetizados no organismo como moléculas de procolágeno, flanqueada por dois domínios denominados propeptídeo N terminal e

propeptídeo C terminal. Quando este procolágeno é secretado da célula, os propeptídeos são clivados por proteases específicas, tornando o colágeno “maduro”. Como a síntese do colágeno tipo III antecede a sua deposição na MEC, o PIINP, seu propeptídeo precursor, pode ser utilizado como um indicador direto de síntese e deposição de colágeno (56,74).

O PIINP é um marcador encontrado em maior quantidade em pacientes com HCV crônica do que nos indivíduos saudáveis (66), e seu aumento é associado em muitos estudos com a presença de fibrose e cirrose (68,75–77). Mas um estudo recente relatou que o nível de PIINP não pode ser utilizado para diferenciar o estágio do dano hepático, e sim detectar a presença de doença hepática (74).

#### 2.11.4. Inibidores Teciduais de Metaloproteinases

Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são proteínas pequenas e multifuncionais envolvidas no controle da degradação da matriz por regularem o nível de ativação e a habilidade que as MMPs têm de hidrolisar um determinado substrato. Os TIMPs agem nas MMPs inativando-as e bloqueando sua atividade colagenolítica, contribuindo para um maior acúmulo de colágeno e, posteriormente, evolução da fibrose (78).

A principal fonte destes inibidores são as HSCs. No fígado humano, o grau de expressão dos TIMPs está diretamente associado ao grau de fibrose por promover, mesmo que indiretamente, a sobrevivência das células fibrogênicas (55).

#### 2.11.5. Metaloproteinases

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da MEC (79) e das membranas basais, incluindo colágeno, fibronectina e proteoglicanos. Elas são produzidas e secretadas em sua forma inativa e dependem da clivagem para entrarem em atividade no ambiente celular. Na presença de fatores de crescimento e citocinas, células como macrófagos e fibroblastos liberam as MMPs para o meio extracelular (78). Sua atividade é regulada por diferentes vias, e uma delas é pela expressão dos TIMPs, inibidores específicos das MMPs. Por isso, o equilíbrio entre a produção de TIMPs e MMPs é um ponto fundamental para manter a homeostase da MEC, pois quando ocorre uma lesão hepática as HSCs ativadas causam a superexpressão dos TIMPs que, conseqüentemente, suprimem a atividade das MMPs (56).

A MMP1 é conhecida como uma enzima colagenase 1 e a MMP2 é conhecida como gelatinase A (78). Ambas são classificadas como proMMP9 e, por isso, possuem substratos comuns específicos como: a fibronectina, a elastina, o colágeno tipo I e o colágeno tipo IV. Ao tentar manter a homeostase da matriz, a MMP1 degrada os colágenos fibrilares tipos I e III e a MMP2, junto com a MMP-9, degrada o colágeno tipo IV (55,72).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o desempenho e aplicabilidade da dosagem de marcadores sorológicos diretos na avaliação da fibrose hepática em pacientes infectados com o HCV, pré e pós-tratamento.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o perfil clínico dos pacientes infectados pelo HCV deste estudo.
- Comparar os marcadores indiretos e diretos entre o pré e pós-tratamento.
- Correlacionar os marcadores diretos, HA, PIINP, COLI, COLIV, TIMP1, TIMP2, MMP1 e MMP2, pré e pós-tratamento a partir do grau fibrose classificado pelos métodos APRI e FIB4.
- Associar os marcadores sorológicos diretos com as características virais (genótipo, medicamento utilizado, tempo de tratamento e tempo entre a coleta e a RVS).
- Identificar os marcadores sorológicos diretos capazes de auxiliar na avaliação do estadiamento hepático pré e pós-tratamento.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Tipo, localização, período e população do estudo.

Trata-se de um estudo analítico, prospectivo, não randomizado desenvolvido no período de fevereiro de 2018 a agosto de 2019, no Município de Aparecida de Goiânia, Goiás, localizada no Centro-Oeste do Brasil, cuja população estimada é de 578.179 habitantes (80). Os pacientes participantes da pesquisa são os pacientes portadores do HCV atendidos, diagnosticados e acompanhados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no Ambulatório de DST/AIDS e Hepatites Virais, localizado na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia, que preencheram os critérios de inclusão do estudo.

### 4.2. Coleta de Dados e Amostras

Este estudo foi dividido em duas fases. A primeira compreendeu a identificação dos pacientes infectados com o vírus HCV, do Ambulatório de DST/AIDS e Hepatites Virais na Vigilância Epidemiológica, do município de Aparecida de Goiânia, que atendiam aos critérios de inclusão da pesquisa. De um total de 67 pacientes acompanhados pelo Ambulatório, 51 atenderam aos critérios. Na segunda fase, foi realizada a avaliação de cada um dos 51 pacientes coletados na primeira fase do estudo, para verificação da RVS após o tratamento. Dos 51 pacientes participantes da primeira fase, 24 foram localizados, haviam terminado o tratamento e alcançado a cura virológica (Figura 6).

#### 4.2.1. Primeira Fase do Estudo

Fizeram parte do estudo 67 pacientes com o anticorpo positivo contra o HCV (ANTI-HCV +), atendidos pelo Ambulatório de DST/AIDS e Hepatites Virais na Vigilância Epidemiológica. Destes, foram excluídos aqueles que apresentaram o PCR quantitativo do HCV negativos (HCV-RNA -), aqueles que já haviam tratado do HCV ou que se encontravam em tratamento antiviral, restando o total de 51 pacientes virgens de tratamento, com indicação de tratamento da hepatite C, selecionados nesta primeira fase.

Os pacientes selecionados foram convidados a participarem do estudo e orientados quanto aos objetivos da pesquisa, os riscos e benefícios, com posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE). Em seguida, foi aplicado um questionário para confirmação e complementação dos dados para a análise do perfil epidemiológico e foi realizada a primeira coleta de amostra de sangue para a análise inicial do estudo. As amostras, coletadas por punção venosa, em um tubo EDTA e um de soro, foram então transportadas para o Laboratório de Estudos e Pesquisas Imunológicas - NEPY, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás), para processamento, aliquotagem do plasma e do soro, e armazenagem a -20C°. As informações relacionadas aos dados epidemiológicos, bioquímicos, características virológicas e de elastografia, foram obtidos dos prontuários e posteriormente tabulados e avaliados, conforme o item 4.6, concluindo a primeira fase do estudo.

Os pacientes então iniciaram o tratamento antiviral conforme o PCDT vigente na época da primeira coleta.

#### 4.2.2. Segunda Fase do Estudo

Na segunda fase do estudo, dos 51 pacientes inicialmente selecionados, 24 deles preencheram o último critério de inclusão, chamado de RVS, em que após o tratamento antiviral por 12 ou 24 semanas, repetiram o HCV-RNA no terceiro mês após o seu término e continuaram negativos, indicando cura virológica. Estes pacientes, portanto, foram incluídos nesta fase e continuaram participando do estudo.

A realização da coleta de amostra destes 24 pacientes após o tratamento possibilitou a avaliação:

- dos biomarcadores diretos antes e após o tratamento,
- a comparação pré e pós-tratamento das médias dos biomarcadores indiretos e diretos,
- a correlação dos valores dos marcadores diretos com o grau de fibrose determinado pelos métodos APRI e FIB4,
- a associação dos biomarcadores diretos com as características virais e
- a associação dos biomarcadores diretos com as características relacionadas ao tratamento.

A perda de 27 pacientes da primeira para a segunda fase do estudo deu-se por motivos não associados aos critérios de inclusão e exclusão do estudo: não início do tratamento, não finalização do tratamento, por não terem sido localizados e falecimento.

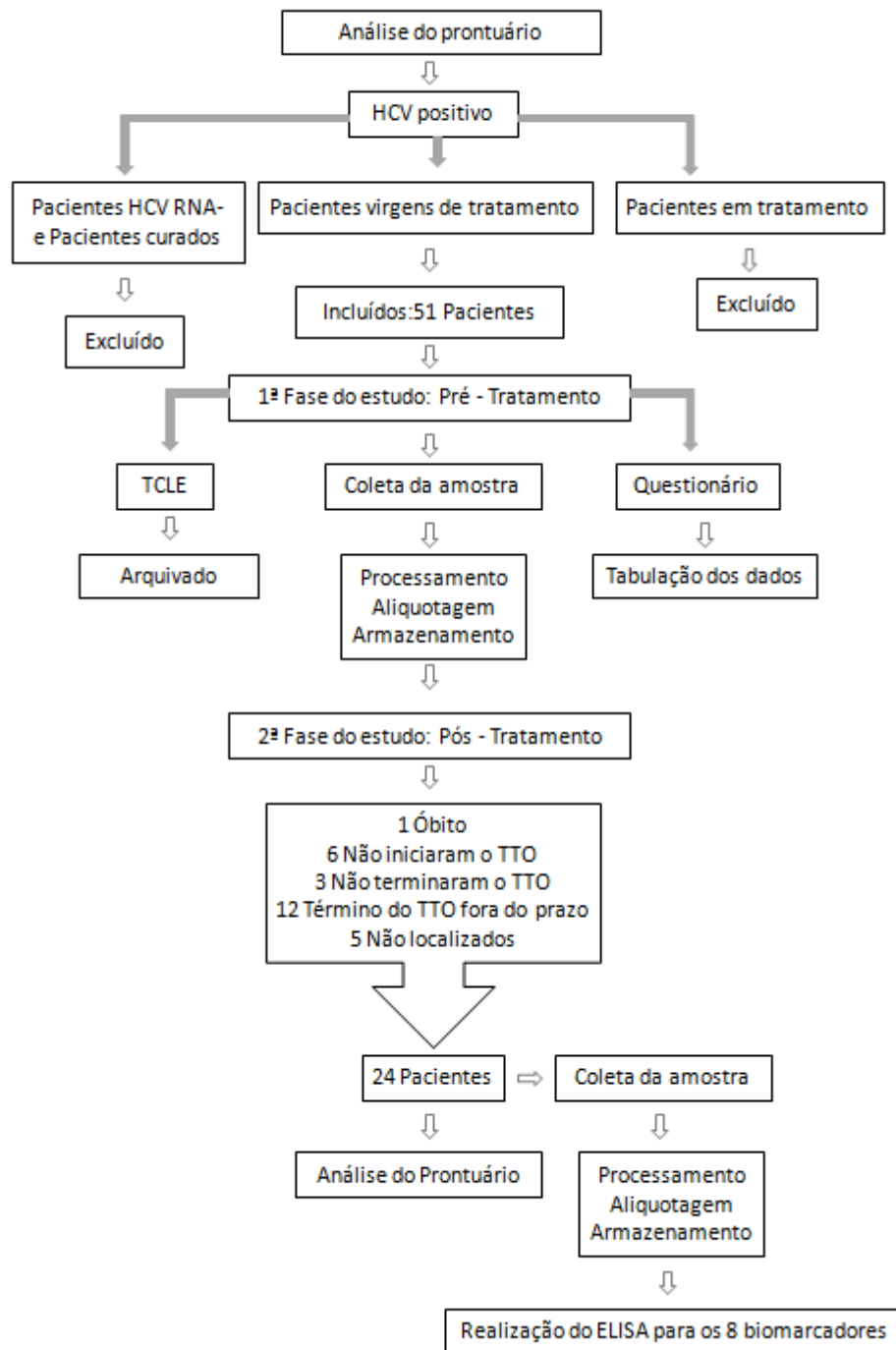


Figura 6: Fluxograma da metodologia do estudo.

Fonte: a autora.

#### 4.3. Critérios de Inclusão

- Pacientes de ambos os sexos, com idade maior ou igual a 18 anos, HCV-RNA positivos.
- Pacientes que ainda não haviam iniciado o tratamento para hepatite C.
- Pacientes que após o tratamento apresentaram RVS.

#### 4.4. Critérios de Exclusão

- Pacientes que apresentaram HCV-RNA negativo.
- Pacientes HCV-RNA positivos que já haviam iniciado o tratamento para Hepatite C.
- Pacientes HCV-RNA positivos que já haviam sido tratados e atingiram a RVS.

#### 4.5. Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, com o registro CAAE: 62925516.3.0000.0037 e aprovado também pela Secretaria de Saúde de Aparecida de Goiânia. A pesquisa foi conduzida em conformidade com as determinações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

#### 4.6. Variáveis analisadas

##### 4.6.1. Dados coletados

Os dados contidos nos prontuários dos pacientes e obtidos na primeira fase do estudo, por meio do questionário, foram transcritos para uma planilha em Excel. Estas informações foram divididas de acordo com o perfil do dado:

- Dados epidemiológicos e clínicos: idade, gênero, antecedente social (etilismo), comorbidade (Diabetes Mellitus – DM, diagnosticado por 2 glicemias de jejum acima de 126mg/dL ou Hemoglobina glicada > 6,5 mg/dL).

- Dados laboratoriais/bioquímicos para cálculo dos biomarcadores indiretos: índices APRI e FIB4, de acordo com os valores de AST, ALT e plaquetas.

- Dados relacionados às características virológicas e relacionadas ao tratamento antiviral: genótipo, tipo de medicamento utilizado, tempo de tratamento e o tempo entre a identificação da RVS até a coleta amostral na segunda fase.

- Dados relacionados aos marcadores mecânicos de avaliação de fibrose hepática: Elastografia hepática (Fibroscan®) com resultados de acordo com a classificação de Metavir (Fibrose leve = F0/F1 e Fibrose Significativa = F2/F3/F4).

#### 4.6.2. Dados laboratoriais

Além dos dados coletados, chamados biomarcadores indiretos, existem os indicadores criados a partir das dosagens laboratoriais de biomarcadores diretos de fibrose hepática, que são marcadores que poderiam indicar lesão hepatocelular, tipo necrose ou apoptose hepatocitária, que podem ser realizados em laboratórios especializados. Trata-se das concentrações séricas dos oito marcadores diretos discutidos anteriormente. São eles: Ácido Hialurônico (HA), Colágeno Tipo I (COLI), Colágeno Tipo IV (COLIV), Propeptídeo aminoterminal do Procolágeno Tipo III (PIIINP), Inibidor tecidual de metaloproteinase 1 (TIMP1), Inibidor tecidual de metaloproteinase 2 (TIMP2), Metaloproteinase 1 (MMP1) e Metaloproteinase 2 (MMP2).

A técnica utilizada foi a ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), da marca Cloud-Clone Corp. O processo em cada microplaca acontece da seguinte forma:

a) o branco, padrões, controles e amostras foram adicionadas aos poços da placa pré-revestidas com o Ac específico para cada biomarcador, incubado à 37°C e lavado;

b) o Ac específico conjugado com biotina foi adicionado a cada poço, incubado à 37°C e depois lavado;

c) a avidina conjugada à enzima peroxidase (HRP – *Horseradish Peroxidase*) é adicionada a cada poço, incubada à 37° e depois lavada;

d) o TMB, solução de substrato cromogênica, foi adicionado aos poços, incubado à 37°C, e foi possível observar que apenas os poços que continham o biomarcador, anticorpo conjugado à biotina e ao conjugado da avidina/HRP exibiram mudança de cor;

e) a reação enzima-substrato terminou quando a solução STOP (solução de ácido sulfúrico) foi adicionada e se observou imediatamente a mudança para a cor amarela; e

f) foi realizada a medição espectrofotometricamente a um comprimento de onda de  $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ .

Por fim, a concentração do biomarcador nas amostras foi determinada através da comparação do O.D. das amostras com a curva padrão.

#### 4.7. Análise estatística

Foram realizadas estatísticas descritivas e inferenciais. Na estatística descritiva, foram calculadas as frequências absolutas e relativas percentuais, para as variáveis categóricas, e médias, desvio padrão e amplitude, para as variáveis contínuas. Na estatística inferencial, foi aplicado o teste de normalidade *D'Agostino-Pearson*. Para a comparação das médias, nas distribuições paramétricas, foram utilizados o teste de *t de Student* (para duas estratificações) e ANOVA (para três ou mais estratificações). E para a comparação das distribuições não paramétricas, foram utilizados o teste *Mann-Whitney* (para duas estratificações) e *Kruskal-Wallis* (para três ou mais estratificações). Para todos os testes da estatística inferencial, foi utilizado o coeficiente de significância de 5% ( $p\text{-valor} < 0,05$ ). O *software* utilizado foi o *BioEstat* 5.3.

## 5. RESULTADOS

Conforme pode ser visto na **Tabela 2**, participaram deste estudo 51 pacientes portadores do HCV. Dentre eles, o percentual de mulheres foi maior do que o de homens, respectivamente 60,8% e 39,2%. A média de idade foi de 53,4 anos, com amplitude entre 34 e 78 anos. O percentual de pacientes com história de etilismo foi de 5,9% e de pacientes diabéticos 19,6%. A infecção pelos genótipos 1a (41,2%) e 1b (41,2%) foi a mais prevalente, representando 82,4% dos pacientes.

Tabela 2. Perfil clínico dos pacientes.

Variável (n=51)	N	f(%)
<b>Gênero</b>		
Feminino	31	60.8
Masculino	20	39.2
<b>Idade</b>		
Até 50 anos	22	43.1
Acima de 50 anos	29	56.9
Média (DP)	53.4	11.6
<b>Etilista</b>		
Sim	3	5.9
Não	48	94.1
<b>DM</b>		
Sim	10	19.6
Não	41	80.4
<b>Genótipo</b>		
Genótipo 1a	21	41.2
Genótipo 1b	21	41.2
Genótipo 2	2	3.9
Genótipo 3	7	13.7

Fonte: Prontuários dos pacientes arquivados na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia/GO.

Os pacientes foram classificados com relação ao grau de fibrose, segundo critérios propostos pelo PCDT. Dos 51 pacientes, 86,2% tinham a avaliação da fibrose pelo Fibroscan® antes do tratamento, sendo 43,1% classificados como Fibrose Leve (F0/F1) e 43,1% como Fibrose Significativa (F2/F3/F4). Verificou-se que 13,7% dos pacientes não realizaram elastografia hepática (Fibroscan®). Portanto, não obtiveram esta estimativa de fibrose hepática por este método, provavelmente porque o PCDT de 2018 autorizou o tratamento para todos



os pacientes infectados pelo HCV, dispensando a realização obrigatória deste exame. Como já havia sido autorizado anteriormente no PCDT 2017, somente os índices de APRI e FIB4, calculados a partir dos resultados coletados de AST, ALT e plaquetas, são utilizados para avaliar a fibrose hepática pré-tratamento.

Antes do tratamento, todos os 51 pacientes obtiveram dados para o cálculo dos índices APRI e FIB4. Como mostram os dados da **Tabela 3**, com base na classificação APRI, 47,1% foram classificados como de fibrose ausente/leve, 9,8% com fibrose avançada e 43,1% na “Zona Cinza”, permanecendo como fibrose indeterminada. Com base na classificação FIB4, 33,3% foram classificados com fibrose ausente/leve, 11,8% com fibrose avançada e 54,9% na Zona Cinza.

Após o tratamento, 42 pacientes apresentavam dados para o cálculo dos índices APRI e FIB4. Com base no APRI, 70,6% foram classificados com fibrose ausente/leve, 5,9% com fibrose avançada e 5,9% na Zona Cinza e em 17,6% não foi encontrada esta informação. Com base no FIB4, 39,2% foram classificados com fibrose ausente/leve, 5,9% com fibrose avançada e 37,3% na Zona Cinza e também em 17,6% não foi encontrada esta informação.

Tabela 3. Classificação quanto ao grau de fibrose.

Método	Variável (n=51)	N	f(%)	n	f(%)
	Classificação	Pré Tratamento		Pós Tratamento	
Fibroscan	Fibrose Leve (F0/F1)	22	43.1		
	Fibrose Significativa (F2/F3/F4)	22	43.1	Sem informação	
	Sem informação	7	13.7		
APRI	Fibrose leve/ausente	24	47.1	36	70.6
	Zona Cinza/Intermediário	22	43.1	3	5.9
	Fibrose Avançada	5	9.8	3	5.9
	Sem informação	0	0.0	9	17.6
FIB4	Fibrose leve/ausente	17	33.3	20	39.2
	Zona Cinza/Intermediário	28	54.9	19	37.3
	Fibrose Avançada	6	11.8	3	5.9
	Sem informação	0	0.0	9	17.6

Fonte: Prontuários dos pacientes arquivados na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia/GO.

A **Tabela 4** apresenta as características relacionadas ao tratamento. Em relação aos medicamentos utilizados, 9,8% dos pacientes receberam o SOF e SIM, 19,6% o SOF e DAC, 37,3% o SOF, DAC e RBV, 17,6% o medicamento 3D e 3,9% o 3D com RBV. Utilizou-se o tempo de tratamento de 12 semanas para 78,4% dos pacientes e de 24 semanas para 9,8%. É

importante ressaltar que no caso destas duas informações – fármaco prescrito e tempo de tratamento, em 6 pacientes (11,8%) não foi possível adquirir os dados, pois os mesmos não iniciaram o tratamento durante o período do estudo.

Por fim, em relação ao tempo entre a RVS até a data da segunda coleta (pós-tratamento), foram obtidas as informações de 24 pacientes. Este intervalo de tempo variou entre até seis meses (5,9% dos pacientes), de 7 a 12 meses (23,5%) e de 13 a 24 meses (17,7% dos pacientes).

Tabela 4. Características do tratamento.

<b>Variável (n=51)</b>	<b>N</b>	<b>f(%)</b>
<b>Medicamento</b>		
SOF + SIM	5	9.8
SOF + DAC	10	19.6
SOF + DAC + RIBA	19	37.3
3D	9	17.6
3D + RBV	2	3.9
Sem informação	6	11.8
<b>Tempo de TTO</b>		
12 Semanas	40	78.4
24 Semanas	5	9.8
Sem informação	6	11.8
<b>Tempo da RVS até a coleta</b>		
Até 6 meses	3	5,9
> 6 a 12 meses	12	23,5
> 12 a 24 meses	9	17,7
Sem informação	27	52,9

Fonte: Prontuários dos pacientes arquivados na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia/GO.

Na segunda etapa do estudo foi possível realizar a coleta de amostra (plasma e soro) de 24 pacientes, que alcançaram a RVS após o tratamento, o que permitiu comparar os dados pré e pós-tratamento desses pacientes. Essas informações são apresentadas nas Tabelas 5 a 11.

Como mostram os dados da **Tabela 5**, verificou-se uma diminuição dos valores de APRI e FIB4 do período pré para o pós-tratamento. Na comparação dos biomarcadores diretos, houve um aumento significativo no TIMP1 ( $p=0.0198$ ) e uma diminuição no MMP2 ( $p=0.0035$ ). Apesar dos outros quatro biomarcadores diretos (HA, COLIV, TIMP2 e MMP1)

apresentarem variações nas concentrações que podem sugerir piora após o tratamento, eles não foram estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ).

Tabela 5. Comparação dos marcadores indiretos e diretos, antes e após o tratamento.

<b>Marcador</b>	<b>Pré TTO</b>	<b>Pós TTO</b>	<b><i>p</i>-valor</b>
<b>Indireto</b>			
APRI	0.7665	0.4059	<b>&lt;0.0001</b>
FIB4	2.192	1.7786	<b>0.0309</b>
<b>Direto</b>			
HA	15.1	17.9	0.3083
PIINP	10.8	10.1	0.9097
COLI	39.1	37	0.7107
COLIV	58.8	76.2	0.2367
TIMP1	180	243.4	<b>0.0198</b>
TIMP2	43.9	46.2	0.4556
MMP1	10.6	9.2	0.3564
MMP2	121577.1	68317.3	<b>0.0035</b>

Fonte: Prontuários dos pacientes arquivados na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia/GO e resultados dos testes laboratoriais.

A partir da comparação das concentrações dos biomarcadores diretos pré e pós-tratamento, de acordo com o grau de fibrose classificado pelos métodos APRI e FIB4, foi possível encontramos: com base na classificação pelo APRI, os dados da **Tabela 6** mostram que o MMP1 apresentou diminuição significativa nos pacientes classificados com Fibrose ausente/leve, o MMP2 diminuiu significativamente nos pacientes considerados como “Zona Cinza” e o TIMP1 apresentou um aumento significativo nos pacientes com Fibrose Avançada.

Tabela 6. Comparação dos biomarcadores diretos com o APRI.

Biomarcador Direto	Fibrose Ausente/Leve			ZC			Fibrose Avançada		
	Pré-TTO	Pós-TTO	<i>p-valor</i>	Pré-TTO	Pós-TTO	<i>p-valor</i>	Pré-TTO	Pós-TTO	<i>p-valor</i>
HA	13.5	17.1	0.2809	18.0	27.0	0.4541	12.1	17.1	0.3522
PIINP	10.1	10.1	0.9915	9.6	11.5	0.1088	15.4	9.3	0.4865
COLI	40.5	35.6	0.5442	36.6	42.2	0.7263	41.6	42.3	0.9651
COLIV	66.4	81.7	0.4916	37.2	24.2	0.3472	94.0	76.0	0.6483
TIMP1	215.2	245.2	0.4121	161.9	219.2	0.4919	137.1	248.1	<b>0.0336</b>
TIMP2	43.9	46.3	0.6097	42.7	47.7	0.2871	47.4	44.2	0.6493
MMP1	11.5	8.5	<b>0.0459</b>	8.5	6.6	0.1992	13.3	15.5	0.7126
MMP2	98254.4	68329.2	0.3980	83208.5	13916.5	<b>0.0027</b>	275805.4	104509.2	0.3980

Fonte: Prontuários dos pacientes arquivados na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia/GO e resultados dos testes laboratoriais.

Com base na classificação pelo FIB4, como mostram os dados da **Tabela 7**, somente nos pacientes da Zona Cinza o biomarcador MMP2 apresentou uma diminuição significativa.

Tabela 7. Comparação dos biomarcadores diretos com o FIB4.

Biomarcador Direto	Fibrose Ausente/Leve			ZC			Fibrose Avançada		
	Pré-TTO	Pós-TTO	<i>p-valor</i>	Pré-TTO	Pós-TTO	<i>p-valor</i>	Pré-TTO	Pós-TTO	<i>p-valor</i>
HA	13.8	17.6	0.3087	16.5	18.5	0.6431	11.8	17.1	0.3270
PIINP	9.5	8.7	0.6334	9.8	11.7	0.1323	15.9	9.3	0.4416
COLI	38.9	39.0	0.9910	34.1	33.6	0.9295	57.7	42.3	0.3186
COLIV	53.3	91.1	0.1596	59.5	62.7	0.8889	63.3	76.0	0.6515
TIMP1	223.7	262.8	0.4423	170.9	224.4	0.1873	159.2	248.1	0.1145
TIMP2	49.3	44.0	0.4042	41.3	48.7	0.1206	47.0	44.2	0.6939
MMP1	10.2	7.6	0.2076	10.3	9.0	0.5420	12.0	15.5	0.4852
MMP2	104490.4	83266.7	0.7136	127745.0	44856.4	<b>0.0450</b>	119805.8	104509.2	0.8400

Fonte: Prontuários dos pacientes arquivados na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia/GO e resultados dos testes laboratoriais.

Após a identificação de alterações significativas nos valores de TIMP1, MMP1 e MMP2, foi realizada a comparação de todos os marcadores diretos dosados com a característica do genótipo viral e características do tratamento. Como mostram os dados da **Tabela 8**, quando comparados ao genótipo viral, houve diferença significativa de biomarcadores diretos em dois dos três genótipos do HCV deste estudo. No genótipo 1a foi observada alteração do TIMP1 e do MMP2, e no genótipo 1b houve alteração no TIMP2. Não houve mudanças significativas dos biomarcadores no genótipo 3.

Tabela 8. Comparação dos biomarcadores diretos com os genótipos do vírus.

Biomarcador Direto	Genótipo*								
	1a			1b			3		
	Pré TTO	Pós TTO	<i>p-valor</i>	Pré TTO	Pós TTO	<i>p-valor</i>	Pré TTO	Pós TTO	<i>p-valor</i>
HA	18.2	19.0	0.8787	11.7	14.2	0.1374	11.8	24.0	0.4641
PIINP	12.3	9.2	0.2786	9.6	11.1	0.2538	8.9	9.9	0.6686
COLI	41.9	40.2	0.8487	34.2	33.8	0.9631	50.0	36.4	0.1363
COLIV	46.0	79.3	0.2786	76.7	79.1	0.9271	31.5	42.7	0.7263
TIMP1	186.7	265.2	<b>0.0305</b>	189.3	233.8	0.3109	91.5	176.0	0.5055
TIMP2	48.0	48.4	0.9379	39.6	46.0	<b>0.0408</b>	45.3	35.0	0.2931
MMP1	9.3	9.1	0.9443	12.2	9.8	0.2986	8.6	6.4	0.4862
MMP2	118979.5	54089.9	<b>0.0357</b>	131830.0	92396.1	0.5664	79473.0	14134.5	0.4233

\*Análise não foi feita com o genótipo 2 porque o mesmo não estava presente em nenhum dos 24 pacientes.

Fonte: Prontuários dos pacientes arquivados na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia/GO e resultados dos testes laboratoriais.

Conforme pode ser visto na **Tabela 9**, houve diminuição significativa do MMP2 nos pacientes que foram tratados com SOF e SIM, diminuição do MMP1 nos pacientes tratados com SOF e DAC e aumento do TIMP2 nos pacientes tratados com 3D. Não houve mudanças significativas dos biomarcadores nos pacientes tratados com SOF, DAC e RBV.

Tabela 9. Comparação dos biomarcadores diretos com os medicamentos administrados.

Biomarcador Direto	Medicamento											
	SOF + SIM			SOF + DAC			SOF+DAC+RBV			3D		
	Pré TTO	Pós TTO	<i>p-valor</i>	Pré TTO	Pós TTO	<i>p-valor</i>	Pré TTO	Pós TTO	<i>p-valor</i>	Pré TTO	Pós TTO	<i>p-valor</i>
HA	11.0	16.3	0.4690	12.7	15.5	0.3346	20.7	21.5	0.8932	8.9	13.0	0.0453
PIINP	11.5	9.4	0.4421	9.4	10.7	0.9168	12.6	10.0	0.7573	9.3	10.9	0.3687
COLI	39.6	44.7	0.4240	58.7	42.1	0.3069	37.6	32.8	0.6277	24.7	35.2	0.2427
COLIV	45.5	65.1	0.6138	40.5	77.5	0.1302	40.2	63.0	0.8946	110.7	99.2	0.7791
TIMP1	207.6	301.2	0.2208	194.4	211.8	0.7882	165.7	235.7	0.1618	161.2	240.2	0.1532
TIMP2	44.9	46.7	0.9025	42.4	42.6	0.9613	48.6	45.4	0.5550	38.6	49.9	<b>0.0365</b>
MMP1	9.1	6.3	0.2468	16.2	10.8	<b>0.0472</b>	8.4	9.3	0.7367	10.7	9.6	0.7616
MMP2	95946.8	18236.2	<b>0.0289</b>	71445.0	64644.4	0.8518	110269.4	60563.8	0.1757	184657.5	114005.7	0.5711

*\*Análise com 23 dos 24 pacientes, pois somente 1 usou 3D+RBV.*

Fonte: Prontuários dos pacientes arquivados na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia/GO e resultados dos testes laboratoriais.

Os dados da **Tabela 10**, que mostram a comparação dos biomarcadores com o tempo de tratamento, sugerem que foi significativo o aumento do TIMP1 e a diminuição do MMP2 nos pacientes tratados por 12 semanas. Contudo, o mesmo não ocorreu nos pacientes tratados por 24 semanas, onde houve um aumento significativo do biomarcador COLIV.

Tabela 10. Comparação dos biomarcadores diretos com o tempo indicado de tratamento.

Biomarcador Direto	Tempo de Tratamento					
	12 semanas		<i>p</i> -valor	24 semanas		<i>p</i> -valor
	Pré TTO	Pós TTO		Pré TTO	Pós TTO	
HA	15.5	18.1	0.4248	13.3	17.2	0.3304
PIINP	9.9	10.4	0.6225	15.0	9.0	0.5637
COLI	36.0	35.9	0.9859	54.2	42.1	0.5406
COLIV	61.4	69.8	0.6087	45.9	108.0	<b>0.0352</b>
TIMP1	172.9	245.9	<b>0.0207</b>	215.2	231.0	0.7500
TIMP2	43.5	46.8	0.3262	46.1	42.8	0.6403
MMP1	10.6	8.3	0.1240	10.5	13.7	0.5396
MMP2	118169.5	53266.2	<b>0.0018</b>	138615.1	143572.8	0.9459

Fonte: Prontuários dos pacientes arquivados na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia/GO e resultados dos testes laboratoriais.

Por fim, a comparação dos biomarcadores com o tempo de RVS até a data da coleta após o tratamento, apresentada na **Tabela 11**, demonstrou que não houve alteração significativa nos pacientes curados em até seis meses. Nos pacientes curados entre sete e 12 meses, o TIMP1 aumentou e o MMP2 diminuiu, significativamente. Nos pacientes curados entre 13 e 24 meses, somente o MMP2 apresentou diminuição significativa.

Tabela 11. Comparação dos biomarcadores diretos com o tempo da RVS até a coleta.

Biomarcador Direto	Tempo da RVS até a coleta								
	Até 6 meses			> 6 a 12 meses			12 a 24 meses		
	Pré TTO	Pós TTO	<i>p</i> -valor	Pré TTO	Pós TTO	<i>p</i> -valor	Pré TTO	Pós TTO	<i>p</i> -valor
HA	17.1	19.5	0.5890	16.9	17.9	0.8379	12.1	17.5	0.2332
PIINP	9.2	10.1	0.7200	11.5	10.8	0.7290	10.4	9.3	0.3374
COLI	29.2	28.9	0.9898	35.8	34.3	0.8585	46.7	43.2	0.6625
COLIV	27.3	68.9	0.3977	74.4	81.4	0.7755	48.6	71.6	0.2036
TIMP1	285.8	262.9	0.7746	151.9	227.6	<b>0.0406</b>	182.1	257.9	0.1032
TIMP2	38.9	41.9	0.6519	47.5	45.5	0.6454	40.9	48.4	0.3099
MMP1	8.0	10.8	0.6704	10.6	9.4	0.6116	11.4	8.4	0.1102
MMP2	144763.0	169451.5	0.8014	135389.8	64282.1	<b>0.0496</b>	95431.6	39986.1	<b>0.0442</b>

Fonte: Prontuários dos pacientes arquivados na Vigilância Epidemiológica de Aparecida de Goiânia/GO e resultados dos testes laboratoriais.

## 6. DISCUSSÃO

Este estudo buscou avaliar marcadores sorológicos diretos descritos em estudos como métodos complementares aos já utilizados e abordados como métodos específicos e eficientes na avaliação da fibrose hepática. Por isso, podem ser utilizados para avaliarem o impacto que o uso dos DAAs tem sobre o fígado, o seguimento do paciente após a cura, além de poderem ser utilizados na prevenção de futuras complicações hepáticas. Dos marcadores já descritos, dosamos os HA, PIIINP, COLI, COLIV, TIMP1 e 2, e MMP1 e 2, e os comparamos com o grau de fibrose classificado pelo APRI e FIB4, com o genótipo do vírus e com informações sobre o tratamento.

A maioria dos pacientes deste estudo tinha idade acima de 50 anos, dado que refletiu a faixa etária com maior prevalência da Hepatite C na população brasileira (9). Isso também aconteceu com o genótipo dos pacientes, já que neste estudo o genótipo 1 foi o mais encontrado (82,4%), seguido pelos genótipos 3 (13,7%) e 2 (3,9%), refletindo assim a maior prevalência do genótipo 1 no mundo (81) e a maior prevalência dos genótipos 1, 3 e 2 respectivamente na América do Sul (30).

Os valores dos marcadores indiretos, quando comparados no pré e pós-tratamento, sugerem um prognóstico contrário aos apresentados pelos marcadores diretos. Enquanto houve diminuição dos valores de APRI e FIB4, refletindo uma melhora na fibrose hepática do paciente após o tratamento, os aumentos do COLIV, do TIMP1 e do TIMP2, e a diminuição do MMP1 e do MMP2, sugere piora.

Esse é um ponto que deve ser melhor discutido pelo fato dos marcadores indiretos serem calculados a partir de diferentes parâmetros laboratoriais, conhecidamente relacionados à atividade inflamatória (82), que não só aqueles envolvidos essencialmente com a atividade necrótica e apoptótica do fígado. As plaquetas, por exemplo, podem apresentar variações não associadas com injúria hepática e interferirem no cálculo e classificação do grau de fibrose. As transaminases são mais específicas para indicar lesão hepática, por se tratarem de enzimas presentes nos hepatócitos (83), mas nem sempre refletem o grau de fibrose. Antes do tratamento, as transaminases estarão altas por conta da atividade inflamatória, e isso pode superestimar a fibrose (82,84,85). Após o tratamento e alcance da RVS, as transaminases normalizam, causando diminuição do APRI e FIB4 (83,86,87), o que pode mascarar a existência de fibrose no paciente. Apesar de que o mais esperado é a regressão da fibrose naqueles pacientes que alcançaram a cura, após o tratamento com DAAs (88,89). O fato das transaminases



nem sempre refletirem a fibrose ressalta a importância de combinar o uso do APRI e FIB4 com outros métodos, como a elastografia transitória (90).

Isso explica o fato do APRI e FIB4 apresentarem melhor acurácia em pacientes com fibrose mais avançada. Um estudo com 107 pacientes relatou valores maiores de transaminases nos pacientes com mais fibrose, mas constatou maior exatidão dos métodos somente nos pacientes com mais fibrose (91). Outro estudo realizado com pacientes com hepatite C crônica, tratados com Interferon e RBV, descreveu nos pacientes com fibrose severa e cirrose uma diminuição significativa dos valores de APRI, tanto nos que atingiram RVS como também naqueles que não atingiram a RVS. O mesmo não aconteceu no grupo com fibrose leve e moderada (15).

Os biomarcadores diretos, na prática, se tornam mais específicos por serem produtos da MEC ou por serem produzidos pelas HSCs, estando assim diretamente associados com o equilíbrio da matriz e envolvidos com a degradação e deposição do colágeno (92). Petersen *et al* (2014) comparou o APRI e um score que combina as dosagens de três dos marcadores diretos dosados neste estudo (HA, TIMP1 e PIIINP), e relatou a importância da combinação dos métodos, já que cada um mede aspectos diferentes do processo fibrótico (93).

Diante dos resultados contraditórios dos marcadores indiretos e diretos, decidimos correlacionar os marcadores diretos com o grau de fibrose hepática determinado pelos métodos APRI e FIB4. Constatou-se que o TIMP1, o MMP1 e o MMP2 são métodos diretos específicos para cada grau de lesão. Quando utilizado o método APRI, o MMP1 apresentou diminuição significativa nos pacientes com Fibrose Ausente/Leve ( $p=0.0459$ ), o MMP2 diminuição para pacientes da ZC ( $p=0.0027$ ) e o TIMP1 aumento para aqueles com Fibrose Avançada ( $p=0.0336$ ). Com o método FIB4, somente o biomarcador MMP2 diminuiu significativamente nos pacientes da ZC ( $p=0.0450$ ). Isso pode ter ocorrido porque o método APRI mostrou-se melhor para a avaliação do estadiamento hepático do que o FIB4, pelo número de pacientes classificados na ZC. Tanto na avaliação no pré-tratamento, quanto na avaliação pós-tratamento, o FIB4 apresentou muito mais pacientes na ZC do que o APRI. Isso imputa muita variação na análise de melhora ou piora da lesão porque os pacientes da ZC são indeterminados e não classificados quanto ao grau de fibrose.

A variação significativa do biomarcador MMP2 nos pacientes da ZC deste estudo, e a ausência de estudos que demonstram diferença significativa deste biomarcador em pacientes com fibrose indeterminada, sugere uma limitação na avaliação realizada do estadiamento hepático pós-tratamento a partir dos valores do APRI e FIB4. Um estudo constatou que o APRI

e o FIB4 têm um valor prognóstico significativo menor em relação à biópsia (94), o que é de certa forma esperado, já que a biópsia é o padrão ouro para tal avaliação. E já foi relatado que estes métodos apresentam melhor desempenho no diagnóstico dos pacientes sem fibrose, e naqueles com cirrose, do que nos pacientes com fibrose intermediária, onde há uma perda significativa de acurácia diagnóstica (95).

Pressupomos, então, que essa limitação diagnóstica interfere na avaliação dos biomarcadores diretos a partir da classificação realizada pelos métodos indiretos, o que não exclui a aplicabilidade dos métodos APRI e FIB4. Um estudo mostrou que a diminuição do MMP2 está relacionada à lesão hepática comparando os seus valores entre pacientes com hepatite C crônica e pacientes saudáveis, demonstrando sua diminuição no grupo de pacientes saudáveis (66). O estudo, contudo, não correlacionou os biomarcadores aos graus de fibrose.

Acreditamos, baseando-se nos resultados deste estudo, que os marcadores TIMP1 e MMP1 podem ser utilizados em pacientes com fibrose definida, MMP1 em pacientes com fibrose ausente/leve e TIMP1 em pacientes com fibrose avançada. Os estudos a seguir descreveram a utilização destes marcadores, comparando pacientes controles com pacientes infectados com HCV e demonstraram que são marcadores com sensibilidade significativa. Nassef *et al* (96) compararam crianças infectadas com o HCV e um grupo controle de crianças saudáveis. Eles concluíram que houve um aumento significativo do TIMP1 nas crianças infectadas em relação às saudáveis e que este aumento também foi mais significativo nas crianças com fibrose significativa ( $F \geq 2$ ), quando comparadas às que não tinham fibrose significativa. Outro trabalho com 194 pacientes, o qual apresentou um resultado semelhante ao nosso, concluiu que os biomarcadores podem ser associados ao grau de lesão hepática comparando um grupo controle com pacientes com hepatite C crônica. O TIMP1 aumentou nos pacientes com lesão hepática, e a MMP1 diminuiu (66). Outro estudo recente abordou a identificação de marcadores genéticos (expressão de genes) capazes de definir o estágio da fibrose, por PCR Real-Time, que podem servir como marcadores de estadiamento, e apresentou aumento dos TIMPs significativamente maior nos casos de fibrose mais avançada em detrimento daqueles pacientes com fibrose mais recente (97). Esse achado é coerente com o aumento significativo de TIMP em pacientes com fibrose avançada neste estudo, o que confirma sua aplicabilidade neste perfil de pacientes.

Os biomarcadores, quando comparados com os genótipos dos pacientes, apresentaram correlação somente nos pacientes com o genótipo 1, com aumento do TIMP1 e a diminuição do MMP2 no genótipo 1a, e aumento do TIMP2 no genótipo 1b. Isso provavelmente ocorreu

devido ao maior número de pacientes do genótipo 1a e 1b (11 pacientes de cada genótipo, dentre os 24 pacientes estudados), e o número baixo de pacientes com o genótipo 3. Muitos dos trabalhos que abordaram o tema deste estudo, também tiveram pacientes do genótipo 1, em sua maioria (46,66,82,83,89). Mas nenhum deles correlacionou os marcadores com o tipo do genótipo.

Quando comparados com o tipo de medicamento utilizado, apresentaram uma diferença significativa: MMP2 com SOF e SIM, MMP1 com SOF e DAC e TIMP2 com 3D. Interessante notar que não houve nenhum marcador relacionado com o tratamento com SOF, DAC e RBV, sendo este o único tratamento realizado com DAAs associados à RBV, fármaco com um perfil de ação completamente diferente dos DAAs.

TIMP1 aumentou e MMP2 diminuiu significativamente quando o tempo de tratamento foi de 12 semanas. O COLIV, que ainda não havia apresentado aumento significativo em relação às variáveis deste estudo, nos pacientes tratados por 24 semanas foi maior, sugerindo piora destes pacientes após o término do tratamento. Pacientes que são tratados em 24 semanas têm um perfil diferente dos que tratam em 12 semanas, sendo normalmente pacientes cirróticos.

Compreender o COLIV no processo fibrótico é muito importante porque ele interage com muitas outras substâncias, como proteínas da matriz e MMPs. Por conta destas interações, ele desempenha papel fundamental na homeostase do tecido (56), podendo ser diretamente associado à fibrose. Confirmando esta associação, um estudo que dosou especificamente o domínio 7S do COLIV em pacientes com CHC, infectados com HBV, HCV ou não infectados, demonstrou que o grupo onde a concentração sérica do colágeno 7S era maior, apresentou piora na atividade hepática (98). Em contrapartida, e apesar de o COLIV ser um dos colágenos mais abundantes no fígado (56), ele não é específico. Por isso, deve ser mais estudado e elucidado, sem desconsiderar sua sensibilidade nos pacientes tratados por mais tempo.

Por fim, quando comparados com o tempo de cura (RVS), não houve alteração significativa de nenhum biomarcador naqueles pacientes com menor tempo de cura (até seis meses). Nos pacientes curados entre 7 e 12 meses, variações no TIMP1 e MMP2 mostraram-se significativas. Nos pacientes curados há mais tempo, entre 13 e 24 meses, somente o MMP2 foi significativo. Todas as variações sugerem piora dos pacientes após RVS.

Estudo realizado com 456 pacientes com hepatite C crônica, tratados com peginterferona  $\alpha$  2a e RBV, por 24 a 48 semanas, relatou diminuição do valor de TIMP1 após término da terapia, e RVS na 72ª semana (99). Este resultado indica a melhora do paciente pós-

tratamento, sugerindo um prognóstico contrário ao apresentado neste estudo. Contudo, deve-se ressaltar que essa comparação não pode ser feita, pois se tratam de terapias e tempo de tratamentos diferentes. Além disso, outras variáveis não foram avaliadas, por falta de dados nos prontuários dos pacientes, como: a presença de esteatose hepática, o aumento de peso e o desenvolvimento de CHC.

Uma revisão abordou a recorrência de CHC após o tratamento com os DAAs e apresentou trabalhos que discutiram, entre os anos de 2016 e 2018, o efeito que o tratamento antiviral tem no sistema imunológico (100). Em contrapartida, um estudo recente mostrou evidências de que o tratamento com os DAAs pode reduzir a incidência de CHC em pacientes com fibrose avançada (F3) e cirróticos (F4) (101). Não diminuimos a relevância do desenvolvimento dos DAAs e a sua efetividade em curar os pacientes, mas discutimos a importância de realização de mais pesquisas que avaliem os efeitos do tratamento antiviral.

Este estudo apresentou algumas limitações que certamente diminuíram a capacidade de avaliação do grau de fibrose a partir da dosagem dos biomarcadores diretos. Foram elas: número reduzido de pacientes do estudo; ausência de grupo controle; presença de outros fatores de risco associados a agravos hepáticos nos pacientes deste estudo; e alto número de pacientes classificados quanto ao grau de fibrose pelos métodos APRI e FIB4, como indeterminados.

## 7. CONCLUSÃO

A avaliação precisa do grau de fibrose hepática nos pacientes infectados pelo HCV e tratados é importante para estabelecer o prognóstico e a prevenção de doenças decorrentes da lesão hepática, como o CHC.

Os resultados encontrados demonstraram um prognóstico contrário ao sugerido pelos métodos indiretos, e indicaram piora no grau de fibrose após o tratamento dos pacientes deste estudo. Este resultado atinge a crença de que o alcance da RVS isenta automaticamente o paciente de ter problemas futuros decorrentes da lesão causada pela infecção, ressalta a importância de continuar acompanhando estes pacientes após a RVS e a necessidade de mais estudos de longo prazo em torno da capacidade que os DAAs têm de restaurar o sistema imunitário e a imunodepressão que pode ser causada pela eliminação abrupta do vírus no organismo do paciente.

De todo modo os resultados deste estudo representam um avanço por apresentarem dados pré e pós-tratamento e relacioná-los com outras informações que não só o grau de fibrose. Dos oito biomarcadores dosados neste estudo, cinco apresentaram diferença significativa. Foram eles: COLIV, TIMP1, TIMP2, MMP1 e MMP2. Quando avaliados de acordo com o grau de fibrose, MMP1 demonstrou diminuição significativa nos pacientes com fibrose ausente/leve, MMP2 demonstrou diminuição significativa nos pacientes indeterminados e TIMP1 demonstrou aumento significativo nos pacientes com fibrose avançada.

É importante considerarmos que os biomarcadores diretos não podem ser utilizados como único parâmetro de avaliação, porque nenhum deles é específico do fígado, podendo ser afetados por alterações extra-hepáticas. Mas todos têm papel importante na prática clínica por refletirem a fibrinogênese hepática com certa especificidade, quando comparada aos métodos indiretos, contribuindo assim para o diagnóstico, o tratamento e o prognóstico, além de poderem colaborar com o desenvolvimento de terapias antifibróticas, já que a taxa de cura com os DAAs hoje já atinge quase 100% dos pacientes tratados.

Um estudo demonstrou que há evidências de que o tratamento com os DAAs pode reduzir o risco de desenvolvimento de CHC em pacientes com fibrose avançada. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para avaliar o papel que eles têm no sistema imunológico após a eliminação abrupta do vírus, que abre um caminho imunossupressor temporal devido à reconstituição imune, sua função antifibrinogênica e outros fatores não relacionados com o vírus, como por exemplo: o consumo de álcool e a presença de diabetes.

Em conclusão, sugerimos que sejam realizadas pesquisas prospectivas, observacionais de longo prazo, com um número grande de pacientes, com grupo controle, acompanhamento dos hábitos após o tratamento e classificação do grau de fibrose por outro método, além do APRI e FIB4. Sabemos da interferência da atividade inflamatória nos valores das transaminases por termos encontrado um número representativo de pacientes indeterminados por estes índices no nosso trabalho. Mas acreditamos que os marcadores diretos podem auxiliar na elucidação destes fenômenos junto com métodos mais precisos, como a elastografia.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sasse D, Spornitz UM, Maly IP. Liver architecture. *Enzyme*. 1992;46(1–3):8–32.
2. Tsuchiya A, Yu W. Liver stem cells: Plasticity of the liver epithelium. *World J Gastroenterol*. 2019;25(9):1037–49.
3. Friedman SL. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev*. 2008;88(1): 125(1):125–72.
4. Bornstein P, Sage H. Matricellular proteins : extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14:608–16.
5. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, et al. Liver fibrosis: Insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology*. 2003;124(1):147–59.
6. Kang J, Lee M. Liver Cirrhosis - Update and Current Challenges. *Intech*. 2017;Cap. 2:13.
7. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008;371(9615):838–51.
8. WHO. World Health Organization [Internet]. 2019. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
9. Brasil M da S do. Boletim Epidemiológico Hepatites Virais 2019. *Bol Epidemiológico*. 2019;50:1–76.
10. Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções/PCDT. Ministério da Saúde. 2018;
11. Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções/PCDT. Ministério da Saúde. 2019;
12. Saludes V, González V, Planas R, Matas L, Ausina V, Martró E. Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging. *World J Gastroenterol*. 2014;20(13):3431–42.
13. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(10):2614–8.
14. Lupsor M, Stefanescu H, Feier D, Badea R. Non-Invasive evaluation of liver steatosis, fibrosis and cirrhosis in hepatitis C virus infected patients using unidimensional transient Elastography (Fibroscan®). In: *Intech*. 2012.
15. Amaral I, Moia L, Martins C, Soares M, Demachki S, Araújo M. Análise do teste APRI como marcador não-invasivo de fibrose hepática após tratamento de pacientes com hepatite c crônica. 2010;7–12.
16. WHO. World Health Organization [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int>
17. WHO. Global Hepatitis Report. World Health Organization; 2017.
18. WHO. Global hepatitis report, 2017. [Internet]. 2017. 62 p. Available from: <http://www.who.int/hepatitis>
19. Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, Hagan H, Jarlais D Des, Horyniak D, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs : results of systematic reviews. *Lancet [Internet]*. 2010;378(9791):571–83. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61097-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61097-0)
20. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2019.
21. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of the hepatitis C viruses. *J Gastroenterol*. 2007;42:411–23.
22. Ashfaq U, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J*. 2011;8.

23. Atoom A, Taylor N, Russel R. The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein. *Virology*. 2014;462–463:377–87.
24. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J Hepatol* [Internet]. 2016;65(1):S2–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.035>
25. Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds P. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol*. 1995;76 ( Pt 10(1995):2493–507.
26. Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, Rahal P, Ruiz-Tovar K, Yamasaki L, et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol*. 2014;20(43):15992–6013.
27. Feinstone S, Kapikian A, Purcell R, Alter H, Holland P. Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *N Engl J Med*. 1975;292:767–70.
28. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-a, non-b viral hepatitis genome. *Science* (80- ). 1989;244(4902):359–62.
29. Ministério da Saúde do Brasil. Boletim Epidemiológico Hepatites Virais. Ministério da Saúde [Internet]. 2018;49(31). Available from: [http://www.aids.gov.br/system/tdf/pub/2016/65812/boletim\\_hepatites\\_2018\\_sm\\_.pdf?file=1&type=node&id=65812&force=1](http://www.aids.gov.br/system/tdf/pub/2016/65812/boletim_hepatites_2018_sm_.pdf?file=1&type=node&id=65812&force=1)
30. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2016;22(34).
31. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology* [Internet]. 2008;47(1):321–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2277496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Ferreira CT, Silveira TR Da. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da preven. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2004;7(4):473–87. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-790X2004000400010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000400010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
33. Liu G, Cai Q, Li Z, Shao X, Luo Q, Zhang X, et al. Effect of drug resistance mutations on antiviral agents in HCV patients. *Antivir Ther*. 2016;21(5):369–75.
34. Lavanchy D. Chronic viral hepatitis as a public health issue in the world. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [Internet]. 2008;22(6):991–1008. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2008.11.002>
35. Brasil. Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais. Ministério da Saúde. 2018;
36. Suzuki Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y, Chayama K, et al. Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *J Hepatol*. 2013;58:655–662.
37. Carlos Eduardo Brandão Mello. Tratamento da hepatite crônica pelo vírus C Novas perspectivas. *J Bras Med*. 2014;102(n° 1):23–32.
38. Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol*. 2004;40:993–9.
39. Zhang X. Direct anti-HCV agents. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2016;6(1):26–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2015.09.008>



40. Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções/PCDT. Ministério da Saúde. 2017;
41. BRASIL C. Relatório de Recomendação: Veruprevir, ritonavir, ombitasvir e dasabuvir para o tratamento de hepatite C crônica causada por infecção pelo genótipo 1 do HCV. Ministério da saúde Secr ciência, Tecnol e insumos estratégicos. 2016;94.
42. Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling Variability of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(6):1449–57.
43. Karanjia RN, Crossey MME, Cox IJ, Fye HKS, Njie R, Goldin RD, et al. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. *World J Gastroenterol*. 2016;22(45):9880–97.
44. Mendes LC, Ferreira PA, Miotto N, Zanaga L, Gonçalves E, Lazarini MS, et al. Transient elastography and APRI score: Looking at false positives and false negatives. Diagnostic performance and association to fibrosis staging in chronic hepatitis C. *Brazilian J Med Biol Res*. 2016;49(9):1–9.
45. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* [Internet]. 1996;24(2):289–93. Available from: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/633077/national-travel-survey-2016.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/633077/national-travel-survey-2016.pdf)
46. Cross TJS, Calvaruso V, Maimone S, Carey I, Chang TP, Pleguezuelo M, et al. Prospective comparison of Fibroscan , King’s score and liver biopsy for the assessment of cirrhosis in chronic hepatitis C infection. *J Viral Hepat*. 2010;17:546–54.
47. Lai-Hung Wong G. Transient Elastography (Fibroscan®): A New Look of Liver Fibrosis and Beyond. *Euroasian J Hepato-Gastroenterology*. 2013;3(1):70–7.
48. Schiavon L de L, Narciso-Schiavon JL, de Carvalho-Filho RJ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2014;20(11):2854–66.
49. Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518–26.
50. Parsian H, Alizadeh M, Yahyapour Y. Clinical Application of Non-Invasive Markers of Liver Fibrosis. *Practical Management of Chronic Viral Hepatitis*. In: Intech. 2013. p. 13.
51. Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, Lanzoni V, Martins J, Nader H, et al. Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int*. 2006;26(9):1095–9.
52. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43(6):1317–25.
53. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 12th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
54. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- $\beta$  as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*. 2006;10(1):76–99.
55. Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003;38.
56. Nielsen MJ, Leeming DJ, Karsdal MA, Krag A. Biomarkers of Extracellular Matrix Remodeling in Liver Diseases. *Br J Nutr* [Internet]. 2015; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7742-2>
57. Luk JM, Wang X, Liu P, Wong KF, Chan KL, Tong Y, et al. Traditional Chinese herbal medicines for treatment of liver fibrosis and cancer: From laboratory discovery to clinical evaluation. *Liver Int*. 2007;27(7):879–90.

58. Potts JR, Campbell I. D. Structure and Function of Fibronectin Modules. 1996;15:313–20.
59. Pereira ALA, Veras SSL, Silveira ÉJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB, et al. The role of matrix extracellular proteins and metalloproteinases in head and neck carcinomas: an updated review. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2005;71(1):81–6.
60. Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):1–12.
61. Van de Bovenkamp M, Groothuis GMM, Meijer DKF, Olinga P. Liver fibrosis in vitro: Cell culture models and precision-cut liver slices. *Toxicol Vitro.* 2007;21(4):545–57.
62. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Publ Gr [Internet].* 2017;14(7):397–411. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
63. Lurie Y, Webb M, Cytter-kuint R, Shteingart S, Lederkremer GZ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2015;21(41):11567–83.
64. Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and Quantitation of Fibrosis. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1670–81.
65. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010;123(24):4195–200.
66. Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, et al. Circulating Matrix Metalloproteinases 1, 2, 9 and Their Inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as Serum Markers of Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C: Comparison with PIIINP and Hyaluronic Acid. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(2):271–9.
67. El-Bassiouni NE, Nosseir MMF, Madkour ME, Zoheiry MMK, Bekheit IW, Ibrahim RA, et al. Role of fibrogenic markers in chronic hepatitis C and associated hepatocellular carcinoma. 2012;6843–50.
68. Fontana RJ, Goodman ZD, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Naishadham D, Sterling RK, et al. Relationship of Serum Fibrosis Markers with Liver. *Hepatology.* 2008;47:789–98.
69. Arain SA, Meo SA JQ. Serum hyaluronic acid level does not reliably differentiate minimal and significant liver disease in chronic hepatitis C. *Saudi Med J.* 2011;32:1241–1245.
70. Mehta P, Ploutz-snyder R, Ph D, Nandi J, Ph D, Rawlins SR, et al. Diagnostic Accuracy of Serum Hyaluronic Acid , FIBRO Spect II , and YKL-40 for Discriminating Fibrosis Stages in Chronic Hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2008;
71. Exposito J, Valcourt U, Cluzel C, Lethias C, Biologie I De, Lyon-gerland IFRB, et al. The Fibrillar Collagen Family. *Int J Mol Sci.* 2010;11:407–26.
72. Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;22(5):697–706.
73. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528–42.
74. Gudowska M, Gruszewska E, Panasiuk A, Cylwik B, Swiderska M, Flisiak R, et al. High serum N-terminal propeptide of procollagen type III concentration is associated with liver diseases. *Prz Gastroenterol.* 2017;12(3):203–7.
75. Lee MH, Cheong JY, Um SH, Seo YS, Kim DJ, Hwang SG, et al. Comparison of surrogate serum markers and transient elastography (Fibroscan) for assessing cirrhosis in patients with chronic viral hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2010;55(12):3552–60.
76. Rosenberg WMC, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, et al. Serum Markers Detect the Presence of Liver Fibrosis : A Cohort Study. *Gastroenterology.*

- 2004;127:1704–13.
77. Sharma S, Khalili K, Nguyen GC. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(45):16820–30.
  78. Vignot S, Spano JP. Matrix metalloproteinases. *Target Ther Oncol*. 2007;(37):315–32.
  79. Burgio A. An updated review on the epidemiology , pathophysiology , etiology , and diagnosis of liver cirrhosis. *Curr Probl Diagn Radiol [Internet]*. 2019;44(March):449–61. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0363018815000419>
  80. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. 2019. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/go/aparecida-de-goiania/panorama>
  81. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015;61(1):77–87.
  82. Kostadinova L, Shive CL, Zebrowski E, Fuller B, Rife K, Hirsch A, et al. Soluble Markers of Immune Activation Differentially Normalize and Selectively Associate with Improvement in AST, ALT, Albumin, and Transient Elastography During IFN-Free HCV Therapy. *Pathog Immun*. 2018;3(1):149.
  83. Huynh T, Zhang J, Hu K-Q. Hepatitis C Virus Clearance by Direct-acting Antiviral Results in Rapid Resolution of Hepatocytic Injury as Indicated by Both Alanine Aminotransferase and Aspartate Aminotransferase Normalization. *J Clin Transl Hepatol*. 2018;6(3):1–6.
  84. Castera L, Yuen Chan HL, Arrese M, Afdhal N, Bedossa P, Friedrich-Rust M, et al. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol*. 2015;63(1):237–64.
  85. Yen YH, Kuo FY, Kee KM, Chang KC, Tsai MC, Hu TH, et al. APRI and FIB-4 in the evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients stratified by AST level. *PLoS One*. 2018;13(6):1–16.
  86. Mei Lu, Jia Li, Talan Zhang, Loralee B. Rupp, Sheri Trudeau, Scott D. Holmberg§, Anne C. Moorman, Philip R. Spradling, Eyasu H. Teshale, Fujie Xu, Joseph A. Boscarino, Mark A. Schmidt, Vinutha Vijayadeva and SCG. Serum Biomarkers Indicate Long-term Reduction in Liver Fibrosis in Patients With Sustained Virological Response to Treatment for HCV Infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;17(3):139–48.
  87. Khan ST, McGuinty M, Corsi DJ, Cooper CL. Liver enzyme normalization predicts success of Hepatitis C oral directacting antiviral treatment. *Clin Investig Med*. 2017;40(2):E73–80.
  88. Singh S, Facciorusso A, Loomba R, Falck-Ytter YT. Magnitude and Kinetics of Decrease in Liver Stiffness After Antiviral Therapy in Patients With Chronic Hepatitis C: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16(1).
  89. Facciorusso A, Del Prete V, Turco A, Buccino RV, Nacchiero MC, Muscatiello N. Long-term liver stiffness assessment in hepatitis C virus patients undergoing antiviral therapy: Results from a 5-year cohort study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018;33(4):942–9.
  90. Crisan D, Radu C, Lupsor M, Sparchez Z, Grigorescu MD, Grigorescu M. Two or More Synchronous Combination of Noninvasive Tests to Increase Accuracy of Liver Fibrosis Assesment in Chronic Hepatitis C; Results From a Cohort of 446 Patients. *Hepat Mon*. 2012;12(3):177–84.
  91. Ragazzo TG, Paranagua-Vezozzo D, Lima FR, de Campos Mazo DF, Pessoa MG, Oliveira CP, et al. Accuracy of transient elastography-fibroscan, acoustic radiation force impulse (ARFI) imaging, the enhanced liver fibrosis (ELF) test, APRI, and the

- FIB-4 index compared with liver biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clinics*. 2017;72(9):516–25.
92. Soresi M, Giannitrapani L, Cervello M, Licata A, Montalto G. Non invasive tools for the diagnosis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(48):18131–50.
  93. Petersen JR, Ph D, Stevenson HL, Ph D, Krishna SK, Naniwadekar A, et al. Evaluation of the APRI (AST platelet ratio index) and ELF (Enhanced Liver Fibrosis) tests to detect significant fibrosis due to chronic hepatitis c. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48(4):370–6.
  94. Poynard T, Ngo Y, Perazzo H, Munteanu M, Lebray P, Moussalli J, et al. Prognostic value of liver fibrosis biomarkers: A meta-analysis. *Gastroenterol Hepatol*. 2011;7(7):445–54.
  95. Gomes Ferraz ML, De Mello Perez R. Avaliação crítica dos métodos não invasivos na determinação da fibrose nas hepatites virais. *Rev Bras Med*. 1999;56(SPEC. ISS.):207–14.
  96. Nassef YE, Abu Shady MM, Galal EM, Hamed MA. Performance of diagnostic biomarkers in predicting liver fibrosis among hepatitis C virus-infected Egyptian children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(7):887–93.
  97. Dawood RM, el-Meguid MA, Ibrahim MK, Bader El Din NG, Barakat A, El-Wakeel K, et al. Dysregulation of fibrosis related genes in HCV induced liver disease. *Gene* [Internet]. 2018;664(March):58–69. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.032>
  98. Kawai S, Kubo S, Tsukamoto T, Tanaka H, Shuto T, Yamamoto T, et al. Serum concentration of type IV collagen 7S domain as a marker for increased risk of recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma. *Dig Surg*. 2003;20(3):201–8.
  99. Fontana RJ, Bonkovsky HL, Naishadham D, Dienstag JL, Sterling RK, Lok ASF, et al. Serum Fibrosis Marker Levels Decrease After Successful Antiviral Treatment in Chronic Hepatitis C Patients With Advanced Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2009;7(2):219–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2008.10.034>
  100. Sanduzzi-zamparelli M, Boix L, Leal C. Hepatocellular Carcinoma Recurrence in HCV Patients Treated with Direct Antiviral Agents. *Viruses*. 2019;11(406).
  101. Shiha G, Mousa N, Soliman R, Mikhail NNNH, Elbasiony MA, Khattab M. Incidence of HCC in chronic hepatitis C patients with advanced hepatic fibrosis who achieved SVR following DAAs: A prospective study. *J Viral Hepat*. 2020;