

**LEILA MARIA SOARES TOJAL DE BARROS LIMA**

**VALOR PREDITIVO DE MARCADORES SÉRICOS  
DE FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES  
PORTADORES DE HEPATITE CRÔNICA VIRAL C**

**São Paulo  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LEILA MARIA SOARES TOJAL DE BARROS LIMA**

**VALOR PREDITIVO DE MARCADORES SÉRICOS  
DE FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES  
PORTADORES DE HEPATITE CRÔNICA VIRAL C**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo - Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do Título de Mestre  
em Ciências

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida da Silva Pinhal

Co-Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Celina Maria Costa Lacet

**São Paulo  
2007**

Lima, Leila Maria Soares Tojal de Barros

Valor preditivo de marcadores séricos de fibrose hepática em pacientes portadores de hepatite crônica viral C. / São Paulo, 2007.

107p.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Título em inglês: Predictive value of serum hepatic fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C

1. Marcadores séricos de fibrose hepática 2. Ácido hialurônico 3. Fibrose hepática 4. Hepatite Crônica C.

*A Deus, pelo dom da vida e por tantas bênçãos recebidas.*

*À minha mãe e eterna professora Aidé Soares Tojal, ao meu lado em todos os momentos; fez-me crescer superando as adversidades.*

*Sua força e seu amor foram o alicerce para a construção dos meus sonhos.*

*Ao meu pai e mestre Luiz Plácido Tojal (in memoriam), grande incentivador do meu crescimento pessoal e científico. Saudades.*

*Ao Jorge, meu marido e companheiro, que sempre me estimulou na busca das minhas conquistas pessoais e profissionais; às minhas gêmeas Ana Beatriz e Maria Luiza, razão da luta diária e luz da minha vida.*

*Às minhas irmãs e amigas Margarida e Ana, aos meus cunhados Pedro e Ricardo e aos meus sobrinhos-filhos Lucas, Cíntia, André e Laís, pelo apoio incondicional em todos os momentos.*

*Ao meu irmão Alvinho (in memoriam), jornalista de corpo e alma, dono de uma inteligência rara e o mais doce dos irmãos. Sua luz me ajudou a concluir esse projeto. Quanta saudade!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, de todo coração, à grande amiga e orientadora, Prof<sup>a</sup> Celina Maria Costa Lacet. Sua competência e experiência foram fundamentais na elaboração dessa tese. Foram muitos dias e noites de esforço compartilhado até que esse trabalho “nascesse”. Obrigada por acreditar nesse projeto e me ajudar a realizar este grande sonho!

À Prof<sup>a</sup>. Maria Aparecida Pinhal e Prof. João Roberto Maciel Martins, meus orientadores na Escola Paulista de Medicina, pelos ensinamentos, apoio, dedicação e paciência durante estes dois anos de trabalho juntos, incluindo dosagens e discussão dos resultados. Muito obrigada!

À Dra. Helena Nader e novamente Prof. João Roberto Maciel Martins, por colocarem à disposição o Laboratório de Biologia Molecular da EPM e permitirem que seus estagiários Bruno e a doce Daniela me ajudassem a desenvolver a técnica de dosagem do ácido hialurônico.

Ao Dr. Adávio de Oliveira e Silva, meu eterno professor, que plantou e fez germinar em mim a curiosidade científica.

Às minhas grandes amigas Andréa Agra e Eleusa Farias, por me incentivarem na busca dos meus ideais e especialmente nesse trabalho, pelo encaminhamento dos seus pacientes para inclusão na tese.

Ao amigo Mário Jucá, pelo estímulo para conclusão dessa tese e por me ajudar a superar momentos de sofrimento; agradeço ainda pela competência no cuidado dos meus pacientes.

Ao querido Carlos Augusto Cavalcanti, por realizar biópsias hepáticas sempre de excelente qualidade e encaminhar seus pacientes para inclusão nessa tese.

À Dra. Maria do Carmo Vasconcelos Balwani, que com sua reconhecida capacidade avaliou todas as biópsias hepáticas.

Aos queridos Fernando Barreiros, Rozangela Wyszomirska e James Marinho por permitirem que seus pacientes fossem por mim avaliados.

Ao Laboratório HEMOPAC e todo seu maravilhoso quadro de funcionários, que carinhosamente receberam meus pacientes procedentes do Hospital Universitário para coleta sanguínea. Agradeço de modo especial à Dra. Izaura Pinto pelo apoio irrestrito em todos os momentos; à querida farmacêutica Soraya Cristina Costa Pereira, que se dispôs a armazenar, cadastrar e enviar de forma adequada o soro de todos os pacientes para o Laboratório de Biologia Molecular da UNIFESP para dosagem do ácido hialurônico; à Ira, querida amiga sempre tão solícita e ao enfermeiro Luiz, por levar conforto aos pacientes tão sofridos.

À querida amiga Prof<sup>a</sup> Lígia Dalva Ataíde Lima Silva, pela precisa revisão ortográfica dessa dissertação.

À doce Anginha, pela sua grande colaboração na construção do abstract.

À Dra. Gleice Conceição, que foi de fundamental importância na avaliação estatística dos resultados obtidos.

À competente Laís Tojal, por esclarecer as minhas muitas dúvidas na digitação da tese; ao querido Lucas Tojal, sempre disposto reformatar o meu computador e à doce Cintinha, pela ajuda com as regras da nossa língua.

À amiga Bernadete Costa, agradeço o estímulo e as poderosas preces.

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas, particularmente ao Setor de Infectologia, por permitir que desenvolvêssemos esse trabalho em suas dependências, com os pacientes referenciados ao Ambulatório de Hepatite Virais dessa instituição.

À UNCISAL, minha querida Escola de Ciências Médicas, onde realizei a graduação e que me deu a oportunidade de realizar a tão sonhada pós-graduação. Aos funcionários dessa instituição, especialmente Luciene e Eduardo, que em todos os momentos nos cercaram de cuidados e atenção. À Prof<sup>a</sup> Maria do Carmo B. Teixeira, que aliada à Dra. Celina Lacet, assumiu a Pós-Graduação na UNCISAL com competência impar. Muito obrigada!

Por fim, agradeço imensamente aos meus pacientes, que concordaram em participar desse trabalho e literalmente deram seu sangue para que pudéssemos melhor avaliar sua doença hepática.



## SUMÁRIO

Dedicatória	
Agradecimentos	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de abreviaturas e siglas	
Resumo	
1. Introdução .....	2
1.1. O vírus da hepatite C .....	4
1.2. Fibrose hepática.....	12
1.3. Biópsia hepática.....	14
1.4. Marcadores indiretos de fibrose hepática .....	16
1.5. Reversibilidade da fibrose hepática .....	23
1.6. Terapia antiviral: alterações na fibrogênese .....	25
2. Objetivos .....	29
3. Casuística e métodos.....	31
3.1. Desenho do estudo .....	31
3.2. Casuística .....	31
3.3 Métodos .....	32
4. Resultados .....	43
4.1. Análise Descritiva.....	43
4.2. Análise Comparativa .....	49
4.3. Análise pós-tratamento antiviral com Interferon e Ribavirina .....	56
5. Discussão .....	64
6. Conclusões .....	81
7. Referências bibliográficas .....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de METAVIR para Hepatite Crônica C .....	37
Tabela 2. Características demográficas da amostra (N=72) .....	43
Tabela 3. Provável fonte de contágio do vírus da Hepatite C (N=72) .....	44
Tabela 4. Tratamento antiviral (N=72) .....	44
Tabela 5. Parâmetros bioquímicos, INR e contagem de plaquetas da amostra pré- terapia antiviral (N=72) .....	45
Tabela 6. Carga viral por PCR pré-tratamento antiviral (N=67) .....	45
Tabela 7. Distribuição dos genótipos (N=63) .....	45
Tabela 8. Valores séricos do ácido hialurônico pré-terapêutica antiviral (N=72) .....	46
Tabela 9. Distribuição por grau de atividade histológica (N=72) .....	46
Tabela 10. Distribuição por grau de fibrose (N=72) .....	46
Tabela 11. Média dos marcadores séricos relacionados à fibrose tecidual .....	49
Tabela 12. Coeficiente de correlação de Spearman entre grau de fibrose e as demais variáveis em estudo .....	55
Tabela 13. Áreas sob as curvas ROC construídas para os marcadores séricos de fibrose hepática .....	56
Tabela 14. Índice AST/ALT pré e pós-tratamento x resposta virológica (N=33) .....	57
Tabela 15. Dosagem sérica de GGT pré e pós-tratamento x resposta virológica (N=33) .....	58
Tabela 16. Contagem de plaquetas pré e pós-tratamento x resposta virológica (N=33) .....	59
Tabela 17. Índice APRI pré e pós-tratamento x resposta virológica (N=33) .....	60
Tabela 18. Dosagem sérica do ácido hialurônico pré e pós-tratamento x resposta viroológica (N=33) .....	61
Tabela 19. Níveis descritivos dos testes das hipóteses de interesse para as variáveis estudadas .....	
.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura genômica do HCV .....	5
Figura 2. Fibrose portal sem septos - F1 da classificação de METAVIR.....	47
Figura 3. Fibrose portal com raros septos - F2 da Classificação de METAVIR.....	47
Figura 4. Fibrose com numerosos septos - F3 da Classificação de METAVIR .....	48
Figura 5. Cirrose hepática - F4 da Classificação de METAVIR.....	48
Figura 6. Curva ROC desenvolvida para o parâmetro GGT .....	50
Figura 7. Curva ROC desenvolvida para o parâmetro plaquetas.....	51
Figura 8. Curva ROC desenvolvida para o parâmetro índice APRI .....	52
Figura 9. Média e intervalo de confiança para o ácido hialurônico segundo o grau de fibrose. ....	53
Figura 10. Diagrama de dispersão do ácido hialurônico em função do grau de fibrose. ....	54
Figura 11. Curva ROC desenvolvida para o parâmetro ácido hialurônico.....	54
Figura 12. Variação do índice AST/ALT entre os períodos pré e pós-tratamento ....	57
Figura 13. Variação dos níveis séricos de GGT entre os períodos pré e pós- tratamento.....	58
Figura 14. Variação da contagem de plaquetas entre os períodos pré e pós- tratamento.....	59
Figura 15. Variação do índice APRI entre os períodos pré e pós-tratamento .....	60
Figura 16. Variação do ácido hialurônico entre os períodos pré e pós-tratamento...	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Atividade histológica (Classificação de METAVIR)
AH	Ácido hialurônico
ALT	Alanina-aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno core da hepatite
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
APRI	AST to platelet radio index
AST	Aspartato-aminotransferase
DP	Desvio padrão
EIE	Enzime-linked immunosorbent assay
EPM	Escola Paulista de Medicina
F	Fibrose hepática (Classificação de METAVIR)
GGT	Gama-glutamilttransferase
HAV	Vírus da hepatite A
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HCV-RNA	Ácido Ribonucléico do Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN	Interferon
INR	Relação internacional normatizada
LSN	Limite superior da normalidade
mcg/L	Micrograma por litro
mg/ml	Miligrama por mililitro
ml	Mililitro
M U	Milhões de unidades
N	Número de amostras
ng/ml	Nanograma por mililitro
nL	Nanolitro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG-IFN	Interferon peguilado
RIBA	Recombinant immunoblot assay
RNA	Ácido Ribonucléico
ROC	Receiver operator characteristic

RVS	Resposta virológica sustentada
TMA	Transcrição mediada por amplificação
U/L	Unidade por litro
UNCISAL	Fundação Universitária de Ciências da Saúde de Alagoas Governador Lamenha Filho
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
X LSN	Veze o limite superior da normalidade
WHO	World Healthy Organization

## RESUMO

**Introdução:** A Hepatite Crônica Viral C tem curso altamente variável, sendo habitualmente assintomática. Os testes laboratoriais empregados não refletem com fidedignidade o estadiamento hepático. A biópsia hepática implica custos, riscos e dificuldade de repetição durante a evolução de hepatopatia crônica. Alguns marcadores séricos têm sido estudados como método alternativo para diagnóstico da fibrose hepática. **Objetivos:** Este estudo se propõe correlacionar o índice aspartato aminotransferase (AST)/alanino aminotransferase (ALT), os níveis séricos de gama-glutamilttransferase (GGT), a contagem de plaquetas, o índice APRI (quociente AST/plaquetas) e o ácido hialurônico (AH) ao estadiamento histológico (padrão-ouro) nos pacientes portadores de hepatite crônica viral C e avaliar a variação dos marcadores indiretos de fibrose pós-terapia antiviral. **Casuística e métodos:** Os 72 pacientes estudados foram divididos em dois grupos de acordo com o grau de fibrose (F) conforme os critérios de METAVIR (GI: F= 0, 1 e 2; n=48 e GII: F = 3 e 4; n=24). Foram dosadas no sangue periférico as concentrações de AH (por método imunofluorimétrico), de AST, ALT, GGT e plaquetas e a, partir desses valores foram calculados os índices AST/ALT e APRI. Os valores foram expressos com média  $\pm$  desvio padrão, e na análise estatística foram utilizados os testes t de Student e correlação de Spearman. Nos casos em que as médias foram diferentes, foram construídas curvas ROC e estimadas a sensibilidade, a especificidade, VPP e VPN desses marcadores. Receberam tratamento com Interferon associado à Ribavirina 65 pacientes. Os indivíduos que completaram o tratamento foram submetidos à nova dosagem dos marcadores séricos 6 meses após o término da terapia antiviral, tendo sido utilizadas técnicas de análise de variância (ANOVA) para avaliação das medidas repetidas. **Resultados:** As dosagens séricas do AH foram significativamente mais elevadas no grupo com fibrose hepática avançada (GII  $68,9 \pm 41,2$  ng/ml x GI  $27,3 \pm 12,5$  ng/ml) e se correlacionaram ao estadiamento hepático ( $p < 0,01$ ), com sensibilidade de 79,2% e especificidade de 85,4%. Os demais marcadores testados - GGT, plaquetas e índice APRI - também apresentaram diferença significativa entre os grupos com fibrose inicial e avançada, exceto o índice AST/ALT. A análise das áreas sob as curvas ROC (AUC) evidenciou que os marcadores que melhor se correlacionaram com o estágio de fibrose hepática foram o índice APRI e a dosagem sérica do ácido hialurônico - AUC (APRI) = 0,85 e AUC (AH) = 0,86. Até a avaliação final deste estudo, concluíram o tratamento 33 pacientes, sendo 19 com RVS e 14 NR. Na avaliação pós-tratamento a concentração sérica de GGT e o índice APRI apresentaram redução em ambos os grupos (respondedores e não respondedores), porém o AH apresentou redução com grau de significância estatística apenas nos pacientes com resposta virológica sustentada ( $p < 0,05$ ). **Conclusões:** Dos marcadores séricos avaliados, o índice APRI e o ácido hialurônico apresentaram maior valor preditivo no estadiamento dos pacientes portadores de hepatite crônica C, podendo representar uma alternativa à biópsia hepática. A concentração sérica do ácido hialurônico apresentou associação com a resposta virológica.

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1. Introdução

A infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) representa uma pandemia viral, afetando cerca de 170 milhões de pessoas, aproximadamente 3% da população mundial (Lauer & Walker, 2001). É responsável por cerca de 15% das hepatites agudas e 60 a 70% das hepatites crônicas (NDDIC, 2006). Uma das principais características da hepatite C que a diferencia das demais infecções por vírus hepatotrópicos é sua marcante tendência a cronificação da doença. Estima-se que 54 a 86% dos pacientes infectados evoluem para a forma crônica, predispondo a complicações em 20% dos casos, como a cirrose, falência hepática e o hepatocarcinoma (Seef, 2002). Anualmente ocorrem cerca de 500.000 novos casos de hepatocarcinoma, sendo o HCV responsável por 24% destes e a insuficiência hepática causada pelo vírus da hepatite C apresenta-se como a principal indicação de transplante hepático (Shaw-Stiffel, 2004).

A Hepatite C é transmitida predominantemente por via parenteral. Ocorre em indivíduos de todas as idades e etnias, com elevada prevalência entre aqueles com repetida exposição ao sangue infectado. Anteriormente a 1990, as pessoas que receberam derivados do sangue e órgãos representavam o maior grupo de risco. Desde então, após a introdução da sorologia - anti-HCV, o uso de drogas é o maior fator de risco para aquisição do HCV (Armstrong, 2006). Embora outras vias como a sexual, perinatal e contato domiciliar não sejam tão importantes, não podem ser desprezadas (Dienstag, 1997). Existe uma parcela importante onde a via de transmissão não se faz conhecida. (Alter & Margolis, 1998).

A maioria dos pacientes portadores de Hepatite Crônica C não apresenta sintomas de doença hepática. Quando presentes, os sintomas são usualmente brandos, não específicos e intermitentes, podendo incluir fadiga, desconforto em quadrante superior direito, náusea, inapetência e dores musculares e articulares. Similarmente, o exame físico é igualmente normal ou mostra apenas discreta hepatomegalia (Liang *et al*, 2000).



A medida dos níveis séricos das aminotransferases é importante, porém não específica nos pacientes com hepatite crônica pelo HCV (Romagnoulo *et al*, 2001). O diagnóstico da infecção pelo vírus da Hepatite C envolve testes de anticorpos e a confirmação da replicação viral é feita através da detecção dos genomas virais por testes moleculares (Asselah *et al*, 2007). No entanto, nenhum dos parâmetros bioquímicos ou virológicos comumente usados se correlacionam com o grau ou estágio histopatológico.

A biópsia hepática é considerada o “gold standard” para o diagnóstico da fibrose hepática na Hepatite Crônica Viral C (Olga O & Nikolai D, 2003). O estudo morfológico do fragmento hepático determina o grau de atividade e o estágio de fibrose, elimina diagnósticos alternativos e contribui na detecção de patologias adicionais, sendo essencial na definição terapêutica. No entanto, a biópsia é uma técnica invasiva com possíveis complicações, que, em casos raros, podem ser letais, sendo contra-indicada em pacientes com distúrbios de coagulação (Zaman *et al*, 2007). Devemos considerar ainda os erros amostrais, a variabilidade interobservadores e falhas na interpretação dos resultados (Sherman *et al*, 2007).

As limitações relacionadas à biópsia hepática associadas ao seu elevado custo levaram à necessidade do desenvolvimento de testes simples, menos dispendiosos e não-invasivos para avaliação da severidade da doença em pacientes com hepatite crônica C, usando amostras do sangue periférico (Romagnoulo *et al*, 2001; Zaman *et al*, 2007).

Recentemente, uma alternativa para avaliação da fibrose hepática tem merecido atenção da comunidade científica. Corresponde à avaliação dos níveis séricos dos produtos da matriz extracelular, sendo os mais aplicáveis o ácido hialurônico (AH), o colágeno tipo IV, o procolágeno tipo III, as metaloproteinases, os inibidores de metaloproteinases e o fator de transformação de crescimento beta (Fraser *et al*, 1988; Oberti *et al*, 1997; Murawaki *et al*, 2001; Xie *et al*, 2003). O AH, um glicosaminoglicano de alto peso molecular, é um componente essencial da matriz extracelular. É principalmente sintetizado pelas células hepáticas estreladas e degradado pelas células endoteliais sinusoidais; tem sido considerado um excelente marcador de fibrose hepática nos pacientes portadores de hepatite crônica viral

C (Yamada *et al*, 1998; Murawaki *et al*, 2001; Ueno *et al*, 2001; Halfon *et al*, 2005; Parise *et al*, 2006) e ainda na doença hepática gordurosa (Santos, 2002) e alcoólica (Pares *et al*, 1996; Stickel *et al*, 2003). Os níveis séricos de AH são diretamente relacionados ao grau de fibrose hepática.

Há poucos anos, a fibrose hepática era considerada um processo não reversível. No entanto, a regressão da extensa fibrose após a exposição tóxica ao tetracloreto de carbono e a da fibrose induzida pela colestase após a descompressão biliar em modelos murinos levaram os pesquisadores a avaliarem a reversibilidade da fibrose hepática (Friedman, 1993; Alcolado *et al*, 1997). A regressão da fibrose hepática também foi observada em estudos humanos em portadores de hemocromatose, doença de Wilson e hepatite autoimune (Powell & Kerr, 1970; Falkner, Samuelson & Sjölin, 1970; Dufour, DeLellis & Kaplan, 1997) e avaliada há poucos anos em pacientes portadores de hepatite crônica viral C após tratamento com interferon alfa ou associado à ribavirina (Shiratori *et al*, 2000; Poynard *et al*, 2002).

Considerando o caráter invasivo da biópsia hepática, alguns pesquisadores têm demonstrado que é possível evidenciar a regressão da fibrose na hepatopatia crônica viral C pós-tratamento antiviral através da monitorização dos marcadores séricos de fibrose hepática, especialmente o AH, com resultados animadores. (Yamada *et al*, 1998; Patel *et al*, 2003; Asselah *et al*, 2007; G. Esmat *et al*, 2007).

## 1.1. O vírus da hepatite C

As manifestações clínicas das hepatites virais são reconhecidas há séculos, entretanto o vírus da hepatite C foi identificado como agente etiológico recentemente. A existência do HCV foi reconhecida inicialmente em 1974 pelos grupos de Feinstone e Prince que demonstraram que casos residuais de hepatite pós-transfusional em pacientes HBsAg negativos não eram devido à Hepatite A ou B - que resultou o termo Hepatite não-A não-B (Prince *et al*, 1974; Feinstone *et al*, 1975). Nesse estágio, o diagnóstico de Hepatite não-A não-B era de exclusão, baseado nas sorologias negativas para HAV e HBV,

associadas às alterações clínicas. Em 1989, Choo e colaboradores (Choo *et al*, 1989; Kuo *et al*, 1989) clonaram e seqüenciaram o genoma do HCV e, a partir de então, os testes diagnósticos foram desenvolvidos.

O vírus da Hepatite C pertence à família flavivírus. O seu genoma é composto por uma fita única de RNA, cuja polaridade é positiva e contém cerca de 9.600 nucleotídeos. As partículas virais medem cerca de 30 a 60 nm de diâmetro (Okamoto *et al*, 1991). Apresenta duas extremidades - 3' e 5' - não-codificantes e uma única região aberta de leitura, que codifica uma poliproteína de 3.010 a 3.033 aminoácidos, a qual, após clivagem, origina proteínas estruturais (do core e do envelope), formadoras da partícula viral e não-estruturais (proteases, helicase, RNA polimerase), ligadas à replicação viral (Penin, 2003).

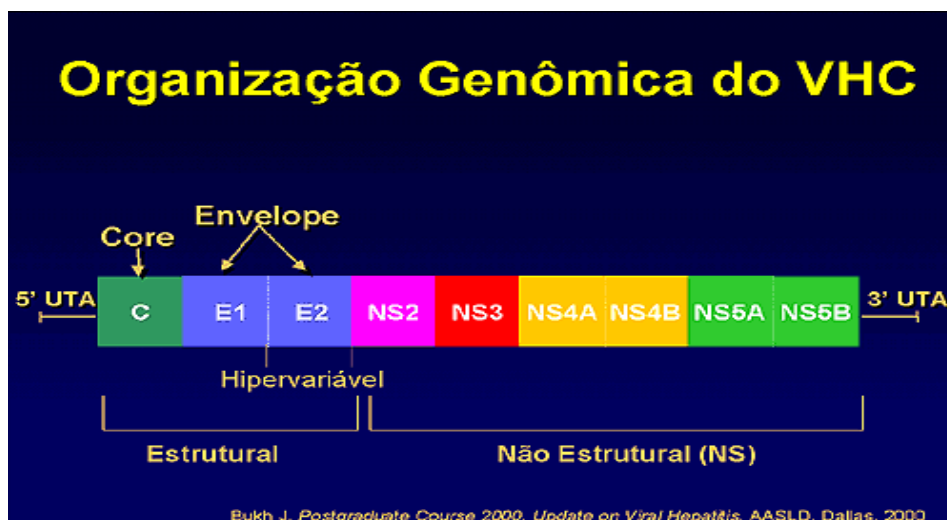


Figura 1. Estrutura genômica do HCV

O HCV é um vírus de alta heterogeneidade genética, que resulta na classificação do vírus em 6 grupos maiores - genótipos (1 - 6) e mais de 50 subtipos (expressos em letras de a - e). Os genótipos refletem diferenças em torno de 30 a 35% do genoma viral; as variações entre os subtipos são em torno de 15 a 23% das seqüências genômicas (Davison *et al*, 1995). Na replicação do HCV surgem ainda as quasispécies que apresentam uma homologia do genoma viral de até 95%, diferindo umas das outras por poucas bases de ácido nucléico. Essa diversidade genética dificulta a resposta

terapêutica e o desenvolvimento de vacinas, promovendo uma perpetuação do HCV no organismo.

O reconhecimento dos genótipos virais é um importante fator preditor da resposta virológica sustentada e na determinação da duração da terapia antiviral. As recomendações são que os pacientes com genótipo 1 deverão ser tratados por 48 semanas e os com genótipo 2 e 3 apenas por 24 semanas. Tem implicações ainda no desenvolvimento de vacina contra o HCV, já que a diversidade genética do vírus é fator limitante na imunização de indivíduos suscetíveis (Fried *et al*, 2002; Ferraz & Oliveira, 2007).

## **Epidemiologia**

A Organização Mundial da Saúde (WHO) estima que aproximadamente 170 milhões de pessoas, cerca de 3% da população mundial, estão infectados com o VHC e cerca de 3 a 4 milhões são infectados a cada ano. (WHO, 1999; Centers for Disease Control and Prevention, 2000; Alter, 2007). Aproximadamente 85% progredem para a fase crônica, com complicações como a cirrose, falência hepática e hepatocarcinoma. Não há vacina desenvolvida até o momento e o tratamento é de custo elevado para a população e o governo. Atualmente, a hepatite C é a infecção crônica mais comum transmitida por sangue e a principal indicação de transplantes hepáticos (Wasley A & Alter, 2000; Armstrong *et al*, 2006; Alter, 2007).

A incidência é maior em comunidades de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, chegando a aproximadamente 4 a 6% em alguns grupos populacionais de regiões da África e do Oriente Médio (WHO, 2000). Nos Estados Unidos da América, 1,8% da população - que corresponde à cerca de 3,9 milhões de americanos - tem o anticorpo para HCV (anti-HCV), que indica infecção atual ou prévia pelo vírus, sendo a hepatite C responsável por estimadas 10.000 mortes anualmente (Armstrong *et al*, 2006). Na Europa, a prevalência varia de 0,5 a 5% (WHO, 2000; Clarke & Kulasegaram, 2006).

Na maioria dos estudos nacionais, a prevalência geral da infecção pelo HCV é determinada pela presença de anticorpos anti-HCV em grupos

populacionais, como os pré-doadores de sangue. No Brasil, os inquéritos realizados pela Sociedade Brasileira de Hepatologia, em 1999, mostraram uma prevalência média em torno de 1,23% em pré-doadores de sangue com variações amplas entre as regiões - Sul 0,65% e Norte 2,12%.

Os nossos estudos abertos são raros (Gayotto, 1984; Focaccia, 1998) e necessitam de amostras representativas de um universo populacional mais extenso. Foi conduzido em 1996 um estudo de soroepidemiologia no município de São Paulo (Focaccia, 1998), abrangendo 1.059 indivíduos, visando determinar a prevalência das hepatites virais nessa população - a prevalência estimada para Hepatite C foi de 1,42% (0,7 a 2,12%). Essa estimativa coloca a cidade de São Paulo numa faixa intermediária de endemicidade, similar à média norte-americana (Armstrong *et al*, 2006).

O Inquérito Soroepidemiológico de Prevalência das Hepatites Virais A, B e C, primeiro estudo de base populacional das hepatites nas capitais brasileiras, veiculado pelo Ministério da Saúde, apresentou em Maceió a prevalência de 1,4% da população estudada com anti-HCV positivo (Figueiredo, 2007).

O HCV é transmitido predominantemente por via parenteral. O vírus tem sido detectado também na saliva, na urina, no sêmen, no líquido ascítico, na bile e na mucosa intestinal, porém com baixo potencial de risco de transmissão. A hepatite C ocorre em indivíduos de todas as idades e etnias, com elevada prevalência entre aqueles que receberam transfusões múltiplas de sangue e hemoderivados, principalmente prévias a 1990, quando não se dispunha de testes diagnósticos em bancos de sangue (Alter MJ, 1993).

Atualmente a injeção de drogas ilícitas é o maior fator de risco para a infecção pelo HCV, alcançando até 40 a 60% dos novos casos em comunidades urbanas de países mais desenvolvidos (Armstrong *et al*, 2006; Alter, 2007). O risco é proporcional ao tempo de uso, co-infecção com HIV e/ou hepatite B e frequência do uso de drogas. A infecção pelo HCV é transmitida de forma muito eficiente entre os usuários de drogas injetáveis. Em estudo americano foi verificado que, após cinco anos de aplicações de drogas, cerca de 76,9% dos indivíduos tinham anti-HCV positivo (Garfein *et al*, 1996). Dados recentes (Burt *et al*, 2007) apresentados pela Academia de Medicina de Nova

York mostram um declínio da prevalência do anti-HBc e anti-HCV entre os usuários de drogas americanos devido a medidas de proteção como uso de agulhas individuais, preservativos e vacinação para hepatite B.

Constituem também situações de risco com potenciais variados de contágio: hemodiálise; exposição a sangue pelos profissionais da área de saúde (agulhas, acidentes percutâneos); receptores de órgãos e tecidos transplantados; recém-nascidos de mães HCV positivas; contatos sexuais promíscuos ou com parceiro sabidamente HCV positivo; exposição a sangue por material cortante ou perfurante de uso coletivo não devidamente esterilizado em procedimentos médicos (endoscopia, plasmaferese, diálises, flebotomia, acunputura, hemodinâmica); procedimentos odontológicos; procedimentos cosméticos (tatuagem, piercing, manicure/pedicure, barbeiros, cabeleireiros); circuncisão; escoriações resultantes de rituais religiosos; contato social ou familiar com material de uso pessoal (barbeadores, escovas dentais, depiladores, lâminas) ou contato com ferimentos, epistaxes, menstruação; medicina folclórica (Conry-Cantilena *et al*, 1996; Centers for Disease Control and Prevention, 1998; Feitelson, 2002; Focaccia, Galante & Oliveira, 2007).

O desconhecimento da fonte de infecção do HCV se deve basicamente à ausência de sintomas na fase aguda da doença - os sintomas ocorrem em apenas 30% dos casos, tendem a ser inespecíficos e aparecem cerca de 12 semanas após a exposição viral (Feitelson, 2002). Além disso, os pacientes crônicos permanecem assintomáticos e, por essa razão, a infecção pelo VHC é conhecida como “epidemia silenciosa” (Lee, 1993). Dessa forma, a detecção da infecção pelo HCV tende a ser fortuita através de revisões médicas de rotina ou doação sanguínea.

As hepatites virais se constituem em um relevante problema de saúde pública, entretanto no Brasil a determinação da prevalência dos diversos vírus causadores de hepatite passa por múltiplos obstáculos. A identificação clínica se torna difícil, pois a maioria das infecções é assintomática. Existem ainda as dificuldades econômicas na rotina assistencial desses pacientes para determinação etiológica dessas infecções. Observamos também um elevado índice de subnotificação dos casos clínicos. Na maioria das vezes, os estudos disponíveis se limitam a grupos específicos (doadores de sangue, profissionais

de saúde, profissionais do sexo, prisioneiros, pacientes de clínicas de doenças sexualmente transmissíveis, usuários de drogas intravenosas, dialisados, esquistossomóticos, gestantes ou populações de alguns municípios) que não refletem a população geral do país (Romão, 1984; Carrilho *et al*, 1984; Passos *et al*, 1993; Ferreira & Silveira, 2004; Braga *et al*, 2004; Zarife *et al*, 2006).

### **Diagnóstico sorológico do VHC**

O diagnóstico da infecção pelo vírus da Hepatite C envolve testes para anticorpos e a confirmação da replicação viral através de testes utilizando os genomas virais.

O ensaio imunoenzimático para determinação do anticorpo anti-HCV é o teste mais apropriado para o screening inicial dos pacientes com infecção pelo HCV. Utilizam proteínas do vírus e são importantes para a seleção de doadores e para o diagnóstico da hepatite C. O primeiro teste utilizado - ELISA I, de primeira geração, reagia apenas com o antígeno c100-3, com 20% de resultados falso-positivos. O ELISA - II, de segunda geração, emprega três antígenos: o c-200, que incorpora o c33c, o c100-3 e o c-22, aumentando a sensibilidade para 93,9 a 100% e a especificidade para 97,9 a 100% (Lyra, Braga & Lyra, 2004). O teste de terceira geração - ELISA III incorpora antígenos das regiões do nucleocapsídeo, NS3, NS4 e NS5, com sensibilidade e especificidade de 99% (Fried, 1999).

O RIBA - Ensaio Immunoblot Recombinante usa antígenos derivados de várias regiões do genoma do VHC e é usado para confirmar a reatividade do anti-HCV. Identifica anticorpos contra antígenos individuais do VHC e, dessa forma, tem maior especificidade que o ELISA. Apesar de ser regularmente utilizado em bancos de sangue, não é largamente utilizado na prática clínica devido à excelente sensibilidade e especificidade dos testes imunoenzimáticos de terceira geração. No entanto, o RIBA pode ser utilizado para confirmar o anti-HCV ELISA positivo em pacientes com RNA-HCV indetectável, apesar de os testes direcionados à viremia do VHC serem mais apropriados. O RIBA I emprega dois antígenos, o c 100-3 e 5-1-1; o RIBA III

emprega quatro antígenos - c33c,c22, c100-3 e 5-1-1; o RIBA III (terceira geração) incorpora os antígenos c100-3, c22, c33c e 5'NS5 (Pawlotsky *et al*, 1998).

A amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), idealizada em 1983 por Kary Mullis (Mullis *et al*, 1986), pode detectar baixos níveis de RNA-HCV no soro, sendo considerado o gold-standard para o diagnóstico da infecção e avaliação da resposta terapêutica.

O RNA do HCV pode ser detectado por PCR a partir da primeira semana de infecção, sendo extremamente útil para o diagnóstico precoce da fase aguda, como também na confirmação dos casos de pacientes com anti-HCV positivos, sem evidência clínica ou laboratorial de infecção ativa (Regev & Schiff, 2000). Outra utilidade desse método consiste no acompanhamento de pacientes tratados com interferon ou outros agentes antivirais, pois a simples detecção dos anticorpos anti-HCV não fornece indicações fidedignas, já que tendem a continuar presentes, mesmo após a eliminação do vírus, por tempo indeterminado (Cheinquer, 2001). O teste qualitativo detecta a presença ou ausência do RNA HCV, podendo ser usado em pacientes imunodeprimidos, naqueles que receberam recentemente transplante de órgãos e nos pacientes com falência renal crônica - detecta 50 a 100 UI/ml (limite inferior) (Ferenci *et al*, 2005).

Os testes quantitativos confirmam os títulos virais e têm como principal utilidade a determinação da carga viral pré-tratamento para avaliar a chance de resposta ao interferon. Além disso, são usados para identificação precoce dos indivíduos resistentes (Ferenci *et al*, 2005, Cheinquer, 2001). Os principais métodos de quantificação do VHC baseiam-se na técnica de RT-PCR (Cobas Amplicor Monitor, Roche Diagnostics Systems e SuperQuant, National Genetics Institute) e na técnica de bDNA (quantiplex HCV RNA, Bayer Diagnostics) (Gretch, 2000; Martinot-Peignoux *et al*, 2000). O limite mínimo de detecção varia entre  $10^2$  e  $10^3$  cópias/ml.

O teste de maior sensibilidade é o TMA - transcrição mediada por amplificação, capaz de detectar 10 UI/ml; porém apresenta elevado custo, sendo pouco utilizado na prática clínica (Sarrazin *et al*, 2000).



Recentemente vem sendo desenvolvido um novo teste para diagnóstico e monitorização da infecção pelo HCV. Trata-se da determinação do antígeno core do HCV no sangue periférico utilizando a tecnologia de ensaio imunoenzimático. Dados preliminares sugerem que esse teste poderá ser usado como preditor de resposta virológica, com a vantagem de ter menor custo que os testes utilizando o RNA (Bouvier-Alias *et al*, 2002). No entanto, não é ainda suficiente para detectar erradicação viral em pacientes com baixa viremia. Outros estudos têm sido desenvolvidos para otimizar a sensibilidade desse método (Muerhoff *et al*, 2002) e seus benefícios clínicos ainda necessitam de avaliações futuras.

O reconhecimento do genótipo viral é um importante fator tanto na predição da resposta virológica sustentada como na determinação da duração da terapia antiviral (Bowden & Berzsenyi, 2006). O genótipo 1 foi associado a taxas mais baixas de resposta virológica sustentada, quando comparado com os genótipos 2 ou 3 (Fried *et al*, 2002; Manns *et al*, 2001; Hadziyannis *et al*, 2004).

A genotipagem depende de amostras que apresentem partículas virais para análise. Utilizam-se as técnicas de seqüenciamento, primers tipo específicos, hibridizações com probes tipo específicas, PCR em tempo real (TaqMan) e digestão enzimática de produtos da PCR (Yun *et al*, 1996; Tallo *et al*, 2000; Cavalheiro, 2007).

O método mais direto e considerado padrão-ouro é o seqüenciamento - neste método são seqüenciadas regiões específicas do genoma viral, como a região 5' não-codificante ou NS5B, permitindo a identificação de subtipos mais complexos e a presença de infecção por mais de um subtipo do HCV, no entanto esse método é pouco prático devido a sua complexidade (Stuyver *et al*, 1996). A técnica mais amplamente utilizada tem sido o line probe assay (LIPA), que se baseia na imobilização, em membranas, de probes capazes de detectar seqüências variáveis em produtos de PCR biotinizados. Cada padrão de linhas de reatividade define um determinado genótipo (Ferraz & Oliveira, 2007).

Nos Estados Unidos, mais de 70% dos indivíduos infectados pelo VHC apresentam genótipo 1 (Rustgi, 2007). No Brasil, temos dois estudos com

base populacional de soroprevalência de genótipos (Focaccia *et al*, 1998; Zarife *et al*, 2006), que mostram prevalência no Sudeste do genótipo 1 seguido pelo tipo 3, enquanto na região Nordeste (estudo com pequena casuística) o genótipo 3 se sobrepõe ao tipo 1, com menor porcentagem do genótipo 2 em ambos os trabalhos.

## 1.2. Fibrose hepática

A fibrose hepática é o ponto final comum para quase todas as doenças hepáticas, incluindo hepatites B e C, doenças auto-imunes e metabólicas (Oh & Afdhal, 2001). O resultado final da injúria crônica é o acúmulo de matriz extracelular e reposição de depósito de colágeno tipo IV de baixa densidade com colágeno de alta densidade tipo I dentro do espaço subendotelial de Disse. Com o prolongamento da injúria, pode haver desenvolvimento de cirrose hepática, levando à distorção da arquitetura normal e formação de nódulos regenerativos em torno dos hepatócitos. Complicações da doença hepática ocorrem quase exclusivamente em pacientes com cirrose, relacionadas ao aumento da deposição de matriz cicatricial dentro do espaço subendotelial de Disse, com interrupção da junção intercelular, levando ao desequilíbrio da homeostase e culminando na disfunção hepatocelular. Essa disfunção se manifesta clinicamente por complicações da hipertensão portal (ascite, hemorragia digestiva por varizes e encefalopatia hepática) (Albanis & Friedman, 2006).

A fibrose requer anos ou até décadas de injúria para seu desenvolvimento na maioria dos pacientes, mas, em pelo menos três situações, esta progride de forma rápida: pacientes com fibrose hepática congênita, recorrência pós-transplante e co-infecção HIV-HCV (Friedman, 2004).

A fisiopatologia da fibrose hepática está intrinsecamente relacionada à ativação das células hepáticas estelares, que se situam no espaço de Disse entre os hepatócitos e o endotélio sinusoidal. No fígado normal, as células estelares são relativamente quiescentes e desempenham um importante papel

no acúmulo de vitamina A. Após a injúria hepática, as células estelares são ativadas, transformam-se em células transicionais e, posteriormente, em fibroblastos ou miofibroblastos e se tornam as principais células produtoras de colágeno do fígado. A ativação das células estelares é mediada primariamente pela ativação do TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor), considerada a principal citocina envolvida na fibrogênese. As citocinas são substâncias solúveis liberadas pelas células inflamatórias, responsáveis por desencadear o processo fibrótico (Oh & Afdhal, 2001; Parise, 2001; Olga & Nikolai, 2003).

No fígado normal, o nível de produção da MEC se iguala ao da degradação. As enzimas responsáveis primariamente pelo sistema de degradação colagênico são as collagenases - metaloproteinases. No estado pró-fibrogênico é encontrada uma atividade reduzida das metaloproteinases (Oh & Afdhal, 2001).

A fibrose é percebida como mecanismo fisiológico, inicialmente benéfico, para limitar a extensão do processo inflamatório, mas, com a persistência da agressão, passa a ser patológico. O processo inflamatório hepático caracteriza-se por flutuação, com períodos de agravamento e melhora. No entanto, a fibrose é resultante de uma injúria crônica e persistente, de caráter progressivo, que leva a distorção da arquitetura hepática e à cirrose. Dessa forma, a progressão da fibrose determina o prognóstico dos pacientes com doença hepática crônica (Zaman *et al*, 2007).

O conhecimento do estágio de fibrose hepática é essencial para o prognóstico e definição da terapêutica antiviral (Bedossa *et al*, 1994; Zheng *et al*, 2003). Os pacientes que não apresentam fibrose ou com grau mínimo parecem progredir lentamente, e o tratamento possivelmente poderia ser adiado ou desnecessário. Por outro lado, pacientes com grau de fibrose significativa (septal ou em ponte) progridem quase invariavelmente para cirrose, e nesses casos o tratamento antiviral deve ser fortemente considerado (Poynard *et al*, 2003; Ryder *et al*, 2004).

### 1.3. Biópsia hepática

Os primeiros relatos de biópsia hepática (BH) com finalidade diagnóstica datam de 1883, quando Paul Erlich se propôs a estudar o conteúdo de glicogênio do fígado diabético (Van Leeuwen, Wilson & Crowe, 1995). O uso desse procedimento propedêutico foi consagrado definitivamente durante a Segunda Guerra Mundial para estudo das hepatites virais que acometeram os soldados dos exércitos envolvidos no conflito.

Menghini, em 1958, difundiu o uso da BH através da modificação do método, reduzindo a fase intra-hepática de 6 a 15 minutos no método desenvolvido no século XIX para cerca de 1 segundo (Menghini, 1958). Ao longo dos anos tem havido uma evolução nas técnicas e métodos, objetivando otimizar a qualidade da biópsia hepática (Sherman *et al*, 2007).

As vias de coleta são: 1) biópsia percutânea - realizada na maioria dos casos, utilizando as vias intercostal transpleural e subcostal (em fígados aumentados de tamanho); 2) via laparoscópica, que permite inspeção da cavidade abdominal, uma visão macroscópica do fígado, sua superfície externa e a vasculatura abdominal, possibilitando a escolha da área a ser biopsiada e a documentação fotográfica de todos esses aspectos, no entanto causa também desconforto ao paciente devido ao pneumoperitônio provocado pelo operador; 3) via transjugular, realizada em pacientes com coagulopatia e colhida por transfixação da parede do ramo da veia hepática; além de onerosa e exigir longo tempo para execução, os fragmentos obtidos são inadequados ao estudo histológico em 14 a 20% dos casos; 4) biópsia cirúrgica em cunha ou a realizada com pinça geram amostras subcapsulares e devem ser desencorajadas, pois os espaços-porta nessa localização são geralmente volumosos, não representando adequadamente o grau de fibrose hepática. Por isso, mesmo durante o ato operatório a BH deve ser efetuada por agulha e no início da cirurgia para evitar as alterações histológicas secundárias à manipulação (Gayotto, 2000; Bravo, Sheth & Chopra, 2001; Silva *et al*, 2001).

Atualmente, a maioria das biópsias é obtida utilizando a técnica percutânea, que é obtida usando uma agulha tipo sucção - que pode ser Menghini, Jamshidi ou Klatskin ou uma agulha de corte - Tru-Cut ou Vim

Silverman. Mais recentemente, surgiram variantes de agulhas de corte que apresentam um mecanismo de resistência elástica que progride a agulha e protege a biópsia. As biópsias por agulha variam na medida e no comprimento da amostra a ser obtida. Por muitos anos, a biópsia percutânea foi realizada por um clínico experiente baseado na percussão e palpação abdominais. Nos últimos anos, os métodos de imagem, incluindo ultrassonografia e tomografia computadorizada (TC), têm sido usados como auxiliares para a realização da biópsia (Caturelli *et al*, 1996; Sherman *et al*, 2007). Quando a colheita do fragmento hepático é guiada por US ou visão laparoscópica, dados macroscópicos valiosos somam-se aos achados histológicos, melhorando o desempenho diagnóstico do patologista.

É amplamente utilizada em nosso meio a agulha de tru-cut, que tem diâmetro de 2,05 mm e se baseia no mecanismo de guilhotina para colher o fragmento hepático. Apresenta como vantagem redução da fragmentação do espécime e a coleta de porções intactas de septos fibrosos em hepatites crônicas e cirrose, os quais são mal representados nas biópsias colhidas com agulha de Menghini, que diseca os septos fibrosos (Gayotto LCC & Alves VAF; 2004; Sherman *et al*, 2007).

Para que a biópsia hepática seja eficiente, representando o restante do parênquima hepático, é aceito que o tamanho ideal do cilindro obtido tenha de 1,5 a 4 cm de comprimento e 1,2 a 2 mm de largura. Considera-se conveniente a representação de 10 tratos portais, no mínimo quatro, dependendo da suspeita diagnóstica e dos demais dados histológicos, especialmente a integridade da arquitetura lobular (Gayotto LCC & Alves VAF, 2004; Poynard *et al*, 2007; ).

Em estudo recente, Sherman *et al* (2007), avaliando um total de 923 biópsias de pacientes portadores de Hepatite Crônica C, concluíram que, em pacientes infectados pelo VHC com grau avançado de fibrose hepática e cirróticos, as biópsias utilizando agulhas de corte automatizadas são mais seguras e oferecem melhor qualidade para avaliação histológica do que as biópsias obtidas por aspiração.

A relação risco-benefício deve ser considerada na indicação da biópsia hepática. São contra-indicações absolutas o cisto hidático, devido ao

risco de extravasamento de equinococos para o peritônio, e o hemangioma cavernoso do fígado, que pode dar origem à hemorragia incoercível. A ascite oferece dificuldade à biópsia às cegas, uma vez que o fígado “flutua” no líquido ascítico, o que impede a abordagem firme pela agulha de biópsia. Esse problema pode ser minorado com paracenteses repetidas. Outra contra-indicação para a biópsia hepática são os transtornos graves de coagulação. É exigida em nosso meio, como limite de segurança, atividade de protrombina de 50% (Silva *et al*, 2001).

Complicações, como o aparecimento de dor no local da punção ou ombro direito e de hematomas de parede pós-punção, ocorrem em torno de 0,9%. São freqüentes as hipotensões transitórias, sem repercussões importantes, e mais graves quando prolongadas. Considerados como significativos são pneumotórax, hemotórax, hemoperitônio, hemobilia, hematoma intra-hepático, arritmia cardíaca, perfuração da vesícula biliar e punção inadvertida de fígado e pâncreas. A morbidade referente à biópsia hepática situa-se entre 0,13% a 5,9% e a mortalidade entre 0,004% a 0,33% (Caturelli *et al*, 1996; Silva *et al*, 2001).

#### **1.4. Marcadores indiretos de fibrose hepática**

A biópsia hepática é o gold standard na avaliação da histologia hepática. Apesar de ser um procedimento em geral seguro, por ser invasivo está associado a um pequeno índice de complicações, apresenta elevado custo e existem 10 a 20% de discrepâncias entre observadores na avaliação da fibrose hepática. Portanto, existe a necessidade de desenvolvimento de métodos não-invasivos, reprodutíveis e de elevada acurácia na avaliação da severidade da fibrose hepática (Wai *et al*, 2003).

Os parâmetros não-invasivos incluem sinais e sintomas clínicos, testes laboratoriais rotineiros, marcadores séricos de fibrose e inflamação, ensaios quantitativos da função hepática e métodos de imagem radiológicos. Entre os métodos de imagem está a Elastografia transitória ou Fibroscan, que mede a elasticidade hepática por meio da velocidade de transmissão de uma

onda através do fígado, utilizando-se um transdutor ultrassônico acoplado a vibrador. Esse método é considerado atualmente como um exame não invasivo, indolor, rápido, objetivo e de elevada acurácia na identificação da cirrose hepática (Sandrin *et al*, 2003; Castera *et al*, 2005; Castera *et al*, 2006; Nguyen-Khac & Capron, 2006; Foucher *et al*, 2006; Coco *et al*, 2007; Ogawa *et al*, 2007; Kettaneh *et al*, 2007).

Em estudo preliminar publicado recentemente, foi avaliado um outro método não-invasivo chamado DWMRI (Diffusion-weighted magnetic resonance imaging) que mede o aparente coeficiente de difusão da água para diagnóstico da fibrose hepática em pacientes com hepatite crônica C e apresentou resultados favoráveis na detecção da fibrose hepática significativa (Lewin *et al*, 2007).

### **Marcadores séricos de fibrose hepática**

A fibrose é um processo caracterizado pela excessiva deposição de colágeno e outros componentes da matriz extracelular, levando ao distúrbio estrutural e funcional dos órgãos envolvidos. O fígado normal contém baixas concentrações dos componentes da biomatriz, enquanto na cirrose o conteúdo total de colágeno está aumentado de quatro a sete vezes. Durante a fibrogênese hepática, uma fração dos componentes recém-formados da biomatriz escapa para a circulação sistêmica e torna-se mensurável no soro. Alguns desses parâmetros como o procolágeno tipo I e tipo III estão relacionados ao conteúdo de colágeno no parênquima hepático, enquanto outros como a laminina derivam de glicoproteínas associadas à membrana basal e são depositadas no espaço de Disse durante a capilarização sinusoidal. O ácido hialurônico é um polissacarídeo de alto peso molecular amplamente distribuído nos tecidos conjuntivos e produzido principalmente pelas células mesenquimais; entra no sangue via linfa, sendo rapidamente retirado pelo fígado. Os níveis séricos de ácido hialurônico provavelmente refletem o aumento da síntese pelos fibroblastos hepáticos e/ou lipócitos e a

redução do catabolismo causada pela falência hepática (Murawaki *et al*, 2006; Oh S & Afdhal, 2001).

Alguns estudos têm observado que a combinação de marcadores séricos propiciam melhores resultados do que a aplicação isolada de um marcador em termos do seu valor preditivo dos graus de fibrose hepática. Índices baseados em cinco ou seis marcadores bioquímicos e outros algoritmos com elevado valor preditivo para a fibrose hepática moderada a severa têm sido propostos e podem reduzir a necessidade de biópsia hepática em um substancial número de pacientes portadores de Hepatite crônica viral C (Patel *et al*, 2004; Adams *et al*, 2005; Attallah *et al*, 2006; Sene *et al*, 2006).

Uma boa acurácia para distinguir a fibrose moderada da cirrose foi encontrada através de algoritmos usando múltiplos marcadores:

- Índice de fibrose do grupo MULTIVIRC: onde cinco marcadores são avaliados: alfa2 macroglobulina, haptoglobina, gama glutamiltranspeptidase (GGT), bilirrubina total e apolipoproteína A1 (Imbert-Bismut *et al*, 2001);
- Índice FORNS: *score* que combina idade, GGT, contagem de plaquetas, tempo de protrombina e nível de colesterol (Forns *et al*, 2002);
- Índice APRI (*AST to platelet ratio index*): estabelecido através dos níveis de AST (/limite superior da normalidade)/contagem de plaquetas ( $10^3$  /L) x100 (Wai *et al*, 2003);
- FIBROspect II®: painel que consiste de ácido hialurônico, inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP-1) e alfa-2-macroglobulina (Zaman *et al*, 2007);
- FibroIndex: derivado da contagem de plaquetas, AST e medida da gamaglobulina (Koda, 2007).

Dentre esses algoritmos, destacamos o índice APRI que tem sido aplicado por vários autores por ser de fácil execução, não invasivo e de elevada acurácia como preditor da fibrose hepática nos pacientes portadores de infecção crônica pelo VHC (Lackner *et al*, 2005; Yu *et al*, 2006; Parise *et al*, 2006; Schiavon *et al*, 2007). Schiavon *et al* (2007) avaliaram a aplicação do índice APRI em 203 pacientes renais crônicos em hemodiálise portadores do VHC, concluindo que 52% das biópsias hepáticas nesses pacientes poderiam



ser evitadas, considerando o alto risco de um procedimento invasivo e o elevado grau de correlação entre o estudo histopatológico e o índice APRI.

Parise *et al* (2006) compararam, em 206 pacientes portadores de Hepatite C, o índice APRI com os níveis séricos de AH quanto à capacidade de diferenciar graus de fibrose hepática iniciais dos avançados, determinados por histologia. Observaram sensibilidade e especificidade semelhantes entre os testes, com a vantagem de o primeiro depender de exames laboratoriais de rotina e de baixo custo.

Alguns marcadores séricos de fibrose se destacam dos demais por apresentarem correlação com a histologia hepática (padrão-ouro) e pela facilidade do seu uso clínico. Dentre esses destacamos o índice AST/ALT, a gama-GT, a contagem sérica de plaquetas e o ácido hialurônico.

O índice AST/ALT tem sido amplamente utilizado em estudos com pacientes portadores de hepatopatias de diferentes etiologias (Williams & Hoofnagle, 1988; Sheth *et al*, 1998; Giannini *et al*, 1999). Sheth *et al* (1998) demonstraram em 139 pacientes que o índice AST/ALT > 1 tem valor preditivo positivo de 100% para o diagnóstico de cirrose nos pacientes hepatopatas crônicos infectados pelo vírus da Hepatite C. A avaliação desse índice foi realizada por outros autores, com resultados semelhantes (Giannini *et al*, 1999) ou divergentes (Imperiale *et al*, 2000; Reedy, Loo & Levine, 1998; Romagnuolo *et al*, 2001). Apesar de os mecanismos da modificação do índice AST/ALT na doença hepática avançada não serem claros, esse parâmetro de baixo custo e fácil aplicação tem se mostrado útil na diferenciação de graus leves e moderados dos severos na hepatite C, sendo indicada sua avaliação em conjunto com outros marcadores (Wai *et al*, 2003; Luo *et al*, 2002; Khokhar, 2003; Fabris *et al*, 2006).

A gama-glutamyltransferase (GGT) está presente em maior concentração nas frações microsossomiais e na membrana celular do hepatócito, e em outros tecidos como as vias biliares, pâncreas, rins, cérebro, coração, baço e vesículas seminais. O aumento da atividade da GGT descrito em alcoolistas crônicos parece ser particularmente devido à indução enzimática microsossomal (Goldberg, 1980). A elevação dos níveis séricos de GGT é freqüentemente observada em pacientes com hepatite crônica viral C. Apesar

de a significância desse achado não estar muito clara, essa enzima parece ser útil como um marcador indireto de doença hepática avançada e, junto a outros marcadores séricos, é freqüentemente utilizada na avaliação do grau de fibrose hepática dos pacientes com infecção crônica pelo VHC (Silva *et al*, 2004).

A contagem de plaquetas tem correlação significativa com o estágio da fibrose hepática (Pohl *et al*, 2001; Murawaki Y *et al*, 2001). As causas da trombocitopenia, comum em portadores de doença hepática crônica, não estão claramente definidas. Os mecanismos propostos são hipertensão portal, esplenomegalia (Adnolfi *et al*, 2001), redução da produção de trombopoietina (Nagamine *et al* 1996) e elevação da IgG associada a plaquetas (Koruk *et al*, 2002).

Esses achados sugerem que esses marcadores séricos poderiam ser utilizados na avaliação da fibrose e na monitorização terapêutica das doenças hepáticas (Bourliere *et al*, 2006).

## **Ácido hialurônico**

O ácido hialurônico (AH) pertence à classe dos glicosaminoglicanos. Trata-se de um polissacarídeo com um alto peso molecular - maior que  $2 \times 10^6$  Da, composto por unidades repetidas de ácido glicurônico e N-acetil glucosamina, que está presente na maioria dos tecidos como um componente da matriz extracelular (Murawaki *et al*, 1998; Fujii *et al*, 2002). É sintetizado na membrana plasmática dos fibroblastos e outras células; interage com outras moléculas da matriz, produzindo estabilidade e elasticidade da MEC (Murawaki *et al*, 1996). Altas concentrações de AH são encontradas no líquido sinovial, no corpo vítreo, na pele e na musculatura esquelética (Ichida *et al*, 1996). O ácido hialurônico (AH) liberado pelos tecidos é carregado pela linfa para os linfonodos, que apresentam alta capacidade de degradação (Fraser *et al*, 1988); o AH residual entra na circulação geral; no sangue é clareado predominantemente pelas células endoteliais dos sinusóides hepáticos através de seus receptores CD44 (Murawaki *et al*, 1998). No fígado, o ácido hialurônico é produzido principalmente pelas células de Ito e liberado para o sangue em

aproximadamente 30 minutos, sendo levado através dos receptores para dentro das células endoteliais, onde é rapidamente degradado. A meia vida do AH hepático é de apenas alguns minutos (Ichida *et al*, 1996).

No fígado normal, a concentração de AH é baixa, porém no fígado fibrótico há aumento relativo e absoluto de AH (Wong *et al*, 1998). Essa elevação pode indicar anormalidades morfológicas e disfunção das células endoteliais sinusoidais, devido à capilarização dos sinusóides hepáticos associada à cirrose (Ichida *et al*, 1996), levando à redução da degradação ou indicar aumento da produção do AH hepático ou ambos (Wong *et al*, 1998).

A Hepatite Viral C evolui para cronicidade em 60 a 80% dos pacientes, com desenvolvimento de fibrose e cirrose hepáticas em cerca de 20%. O curso natural da doença hepática é habitualmente subclínico. Os testes bioquímicos habituais e a ultra-sonografia hepática não são capazes de avaliar e monitorar a progressão da fibrose hepática com fidedignidade (Wong *et al*, 1998).

A biópsia hepática é considerada o padrão ouro na avaliação da atividade inflamatória e da fibrose hepática (Yamada *et al*, 1998; Gebo *et al*, 2002; Olga & Nikolai, 2003), porquanto, além de eliminar alternativas diagnósticas e detectar patologias adicionais, avalia a eficiência da terapêutica antiviral. No entanto, a biópsia hepática é uma técnica invasiva com possibilidade de complicações.

Há alguns anos vem sendo demonstrada importante correlação entre os níveis séricos de Ácido Hialurônico (AH) e o estadiamento da fibrose hepática nos portadores de Hepatite Crônica Viral C (Wong *et al*, 1998). O AH foi definido por alguns pesquisadores como o mais sensível e específico marcador do estágio de fibrose hepática (Ichida *et al*, 1996; Wong *et al*, 1998). Foi observado que a dosagem sérica do AH foi eficaz em predizer não apenas o estágio da fibrose hepática, mas também o grau de necroinflamação na Hepatite Crônica C (Idobe *et al*, 1998; Murawaki *et al*, 2001).

O aumento das concentrações de AH em paciente com Hepatite Crônica C pode refletir: 1) estímulo da produção de AH devido à inflamação e remodelação tecidual pela ativação dos lipócitos; 2) diminuição do clareamento e degradação do AH, especialmente nas células endoteliais sinusoidais; 3)

progressão da fibrose com marcado aumento do tecido conjuntivo no trato portal dos portadores de hepatite crônica e cirrose hepática (Ichida *et al*, 1996).

McHutchison *et al* (2000) observaram em seus estudos que os pacientes com cirrose hepática tinham significativo aumento das concentrações do AH sérico comparados com os não-cirróticos, podendo ser usado clinicamente para excluir a presença de cirrose hepática. Esses achados foram também comprovados por Mendes (2002) e Oliveira (2003).

Guéchet *et al* (2000) postularam que os níveis séricos de AH são preditivos da ocorrência de complicações severas em portadores assintomáticos de cirrose hepática viral C, pois altos níveis de AH podem refletir capilarização sinusoidal. O AH também foi empregado na avaliação prognóstica dos pacientes com hepatite aguda e fulminante (Suzuki *et al*, 1996), sendo observada redução dos níveis de AH nos pacientes que sobreviveram e elevação progressiva naqueles que evoluíram para o óbito.

Alguns autores observaram que uma combinação de marcadores bioquímicos - alfa 2 macroglobulina, haptoglobina, gamaglobulina, apolipoproteína, GGT e bilirrubinas - tem acurácia na predição da fibrose relacionada à Hepatite Viral C, podendo ser usada como marcador do efeito anti-fibrogênico do Interferon em pacientes com hepatite crônica C, com maior valor que o AH (Imbert-Bismut *et al*, 2001; Poynard *et al*, 2002; Myers *et al*, 2002; Myers *et al*, 2003).

Foram avaliados ainda, comparativamente, outros marcadores bioquímicos de fibrose. Guéchet *et al* (1996) demonstraram que os níveis de AH apresentaram maior acurácia que o procolágeno tipo III na avaliação da fibrose nos portadores de hepatite crônica C, usando um valor de cut-off de 110 ng/l, com sensibilidade de 79,2% e especificidade de 89,4%. Murawaki *et al* (1996) mostrou que o AH é um teste mais sensível no diagnóstico da cirrose em comparação ao colágeno tipo IV. Pares *et al* (1996) observaram que o AH refletia o grau de fibrose e inflamação nos pacientes com doença hepática alcoólica, sendo considerado um bom marcador para discriminação entre pacientes com e sem fibrose. No estudo de Plevris *et al* (2000), os achados demonstram que há uma correlação entre os níveis de AH e fibrose hepática, porém uma vez estabelecida a cirrose, essa correlação torna-se menos

significante. Zheng *et al* (2003) concluíram em seus estudos que o AH, a laminina, o procolágeno tipo III e o colágeno tipo IV são índices de fibrose úteis na avaliação do estágio de fibrose hepática, atividade da inflamação e do grau de hepatite, porém não há correlação direta com as alterações histológicas.

Oh e Afdhal (2001) acreditam que há necessidade clínica da medição da fibrose hepática através de um método não invasivo para diagnóstico e monitorização da fibrose hepática, a fim de serem evitadas biópsias hepáticas repetidas. Mostram num trabalho revisional que o uso de múltiplos marcadores - proteínas da matriz extracelular como o colágeno III, AH, laminina, metaloproteinases - apresentam sensibilidade de 90% no diagnóstico da cirrose, porém especificidade em torno de 60%.

As dificuldades encontradas na pesquisa de um marcador de fibrose ideal são a falta de especificidade para o tecido hepático, visto que também podem se elevar nos processos inflamatórios e malignos; refletem a renovação da matriz extracelular e não a quantidade depositada em um determinado período e são dependentes do sistema de clareamento; dessa forma, doenças renais ou disfunções hepáticas podem alterar seus níveis (Olga O & Nikolai D, 2003).

Os níveis séricos de ácido hialurônico foram também avaliados nos pacientes submetidos à terapia antiviral com Interferon e foi observada em vários estudos redução da concentração de AH nos pacientes com resposta sustentada, podendo ser utilizado na monitorização na resposta histológica ao tratamento na Hepatite Crônica C (Serfaty *et al*, 1994; Guéchet *et al*, 1995; Ishibashi *et al*, 1996; Leroy *et al*, 2001; Patel *et al*, 2003).

Apesar dos obstáculos, o futuro parece promissor. Vários ensaios clínicos têm sido desenvolvidos em todo o mundo usando as moléculas da matriz extracelular como marcadores de fibrose hepática.

## **1.5. Reversibilidade da fibrose hepática**

A reversibilidade da fibrose hepática tem sido avaliada por vários autores (Friedman, 1993; Shiratori *et al*, 2000; Poynard *et al*, 2002; Pol *et al*,

2004). Serpaggi *et al* (2006) relataram a regressão da cirrose em 12,6% dos 113 pacientes com cirrose hepática de diferentes etiologias após o tratamento específico do agente causal. Foram realizadas biópsias com 1 cm ou mais com grande número de espaços-porta e avaliados por dois patologistas experientes. Os autores observaram também regressão dos sinais de hipertensão portal e de insuficiência hepática e redução dos níveis séricos de ácido hialurônico.

A regressão da fibrose nos portadores de Hepatite C tem sido alvo de várias publicações (Moreno & Muriel, 1995; Bueno, Danerei & Armendariz-Borunda, 2000; Powell *et al*, 2000; Pol *et al*, 2004; Kisseleva & Brenner, 2006;). Os pacientes tratados com Interferon alfa (mesmo na ausência de resposta virológica completa) apresentaram regressão do grau histológico de fibrose (Shiratori *et al*, 2000; Poynard *et al*, 2002; Pol *et al*, 2004). Shiratori *et al* (2000) registraram um índice de regressão da fibrose de 29% nos pacientes com RVS e de 7% dos pacientes que não apresentaram negatificação viral em contraste com nenhum dos pacientes não tratados. O interferon alfa pode ter propriedades antifibrogênicas na limitação da ativação das células estrelares e através do aumento da produção de colagenases e metaloproteinases (Brenner & Alcorn, 1990; Mallat *et al*, 1995; Moreno & Muriel, 1995). Fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar a reversibilidade da fibrose hepática (Richardson *et al*, 2005), como o polimorfismo no fator de transformação de crescimento beta 1 e nos genes do sistema renina-angiotensina I (Powell *et al*, 2000; De Minicis & Brenner, 2007; Osterreicher CH, Stickel F, Brenner DA, 2007), que influenciam a progressão da fibrose na Hepatite Crônica C, bem como os cofatores como o consumo crônico do álcool, coinfeções virais, esteatose ou esteato-hepatite não alcoólica (Powell, Jonsson & Clouston, 2005; Leandro *et al*, 2006; Clouston AD, Jonsson JR, Powell EE, 2007).

Em vários estudos, os valores do AH têm sido avaliados pré e pós-tratamento antiviral, e os autores têm observado uma significativa redução nos níveis séricos após tratamento com IFN (Ishibashi *et al*, 1996; Ueno *et al*, 2001; Serpaggi *et al*, 2006). Os autores sugerem que a redução do AH possa refletir a melhora da fibrose ou o turn over do colágeno (Patel *et al*, 2003).

## 1.6. Terapia antiviral: alterações na fibrogênese

A hepatite crônica viral C é a principal causa de cirrose, carcinoma hepatocelular, hemorragia digestiva alta por hipertensão portal e insuficiência hepática. Várias falhas têm sido observadas nos últimos anos no seu diagnóstico e tratamento, levando ao aumento da mortalidade devido à hepatite C (Poynard *et al*, 2003).

A estratégia atual para prevenir as complicações severas da hepatite C é a diminuição da progressão da fibrose. Vários regimes de tratamento têm sido avaliados em amplos trials: o primeiro (interferon 3 M U três vezes por semana em monoterapia) foi aprovado em 1990 e o último (uma combinação entre o Interferon peguilado e a Ribavirina) em 2002 (Poynard, 2004).

O IFN alfa por via subcutânea tem uma elevada depuração plasmática, que condiciona uma meia vida muito curta. Esse perfil farmacocinético justifica a existência de oscilações rápidas das concentrações plasmáticas de IFN alfa, o que reduz o tempo de eficácia antiviral durante o segundo dia após a administração, de forma que a replicação viral aumenta nesses períodos.

Houve melhora substancial nos índices de resposta virológica nos últimos anos após a introdução do Interferon peguilado no tratamento da Hepatite Crônica C (Parise *et al*, 2003). O processo de união de uma proteína com o polietilenoglicol (PEG) recebe o nome de peguilação, e o produto resultante denomina-se peguilado. A peguilação das proteínas é um método bem estabelecido para retardar a depuração e reduzir a imunogenicidade das proteínas. Tem como consequência primordial o aumento do tempo de permanência no organismo, conduzindo a um incremento de sua atividade farmacológica e redução do número de aplicações.

Existem atualmente dois PEG-IFNs disponíveis que utilizam cadeias de PEG de complexidade diferente. No PEG-IFN alfa 2 a, o IFN está unido a uma cadeia ramificada que tem peso molecular de 40 kDa; é absorvido mais lentamente (cerca de 50 horas), apresenta taxa de clearance acentuadamente reduzida e é metabolizado tanto pelo fígado quanto pelo rim; é administrado em dose fixa de 180 mcg/semana. O PEG-IFN alfa 2 b consiste em um IFN ligado

a uma cadeia linear de PEG com peso molecular de 12 kDa; é rapidamente absorvido, é distribuído amplamente em fluidos e tecido, devendo ter sua dose ajustada ao peso corpóreo (1 micrograma/ kg/ semana). (MuHutchison & Dienstag, 2006).

Segundo o Consenso Brasileiro sobre Conduitas nas Hepatites Virais (2005), a princípio, devem ser tratados todos os pacientes que apresentem na histologia atividade necro-inflamatória moderada ou severa e expansão fibrosa portal, bem como aqueles que apresentem estadiamento igual ou superior a F2 (pelas classificações de METAVIR e das Sociedades Brasileiras de Hepatologia e de Patologia).

Nos pacientes com genótipo 1, o tratamento idealmente estabelecido é aquele realizado com PEG-IFN e ribavirina, por um período de 48 semanas (Heathcote, 2004). Nos pacientes com genótipo 2 e 3, o tratamento pode também ser realizado com IFN convencional e ribavirina, por 24 semanas. O tratamento da hepatite C com monoterapia com IFN convencional, IFN convencional e ribavirina e PEG-IFN e ribavirina foi associado à resposta virológica sustentada em, respectivamente, 10% a 30%, 30% a 40% e em 50% a 70% dos casos. Entende-se como resposta virológica sustentada aquela em que os pacientes mantêm carga viral negativa seis meses após o término do tratamento antiviral.

O Interferon alfa é efetivo na redução dos níveis séricos de aminotransferases e na supressão da replicação do RNA do vírus da hepatite C. Os achados histológicos mostram também que a terapia antiviral com Interferon é efetiva na melhora da inflamação lobular e portal (Ishibashi *et al*, 1996). Vários estudos têm sugerido que o tratamento com Interferon alfa é efetivo na melhora da fibrose hepática e que esta é reversível. Para o tratamento da fibrose hepática, a erradicação viral é o ideal. A redução prolongada da inflamação através da terapia com Interferon alfa pode eventualmente não prevenir a progressão da hepatite crônica, mas é capaz de inibir a evolução para cirrose hepática e hepatocarcinoma (Ueno *et al*, 2001; Poynard, 2004).

Poynard *et al* (2002) reuniram dados de 3.010 pacientes naive (virgens de tratamento) com biópsias pré e pós-tratamento de 4 estudos



randomizados, aplicando dez regimes terapêuticos diferentes, combinando Interferon padrão, Interferon peguilado e Ribavirina. Em todos os regimes, a progressão da fibrose reduziu significativamente quando comparada aos índices pré-tratamento. A reversão da cirrose foi observada em 75/153 pacientes (49%).

Na monitorização da fibrose hepática pré e pós-terapia antiviral para Hepatite C, têm sido usados recentemente as proteínas e os metabólitos do tecido conjuntivo hepático, como o procolágeno tipo III e o colágeno tipo IV, que parecem refletir a síntese acelerada ou a degradação do colágeno no fígado (Ueno *et al*, 2001).

Alguns autores postulam que o AH reflete o grau de fibrose hepática com mais acurácia que o procolágeno tipo III e poderia ser usado como monitor de resposta ao tratamento antiviral (Serfaty *et al*, 1994, Ishibashi *et al*, 1996; Patel *et al*, 2003; Testa *et al*, 2006). Yamada *et al* (1996) observaram uma significativa redução dos níveis do AH em respondedores completos (pacientes com RVS) e não encontraram alterações nos pacientes com negativação transitória do RNA-HCV e naqueles não respondedores. O mesmo foi observado por Kojima *et al* (2001) que avaliaram alterações a longo prazo (após 3,8 anos do término da terapia antiviral com Interferon), tendo os pacientes com RVS apresentado significativa redução dos níveis séricos do AH e do colágeno IV; os níveis desses marcadores aumentaram nos pacientes com progressão da fibrose hepática. Essas observações foram reconhecidas por outros autores (Serfaty *et al*, 1994; Ishibashi *et al*, 1996; Ninomiya *et al*, 1998).

Apesar do grande número de publicações enfocando o papel dos marcadores séricos de fibrose nos pacientes portadores de Hepatite Crônica C, a aplicação desses ainda é limitada a ensaios clínicos. Em nosso estudo, objetivamos avaliar o valor preditivo de marcadores séricos no estadiamento hepático portadores de Hepatite Crônica C.

## **OBJETIVOS**

---

## 2. Objetivos

Avaliar o valor preditivo de marcadores séricos de fibrose hepática em portadores crônicos de hepatite crônica viral C, através da:

1. determinação do índice AST/ALT, dos níveis séricos de gamaGT e plaquetas, do índice APRI e das concentrações séricas de ácido hialurônico;
2. associação desses parâmetros não-invasivos com o estadiamento histológico da fibrose hepática;
3. comparação dos marcadores séricos de fibrose hepática analisados após a terapia antiviral.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

---

---

### **3. Casuística e métodos**

#### **3.1. Desenho do estudo**

Realizou-se estudo tipo longitudinal observacional em uma amostra de pacientes portadores de infecção crônica pelo vírus da Hepatite C, no qual o grau histológico de fibrose hepática foi relacionado ao índice AST/ALT, aos níveis séricos de GGT, à contagem de plaquetas, ao índice APRI e à concentração sérica do ácido hialurônico. Esses pacientes foram submetidos à terapêutica antiviral para Hepatite C com Interferon e Ribavirina. Realizou-se após seis meses da conclusão do tratamento nova determinação dos marcadores séricos de fibrose, que foram relacionados aos valores iniciais.

#### **3.2. Casuística**

Após aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa da UFAL e UNCISAL, foram elegíveis para participar deste estudo pacientes portadores de Hepatite Crônica Viral C, atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas e procedentes de serviços médicos particulares encaminhados para esse ambulatório no período de junho a dezembro de 2005.

Os pacientes foram entrevistados, avaliados através de exame físico e selecionados dentro dos critérios abaixo:

##### **a) Critérios de inclusão**

- Ambos os gêneros
- Idade entre 18 e 75 anos
- Anti-HCV reagente
- HCV-RNA sérico detectável através de PCR qualitativo no soro
- Consentimento informado e concordância assinada para a avaliação clínica e laboratorial e para a realização da biópsia hepática
- Biópsia hepática guiada por ultrassonografia ou videolaparoscopia, com fragmento adequado à análise histopatológica.

**b) Critérios de exclusão**

- Uso de drogas imunossupressoras
- Consumo de etanol superior a 40 g etanol/dia
- Doença pulmonar em atividade
- Insuficiência renal crônica
- Doença reumática em atividade
- Co-infecção com HBV e/ou HIV
- Tratamento atual ou progresso para Hepatite C

**3.3 Métodos****Caracterização da infecção pelo vírus da Hepatite C**

Todos os pacientes foram submetidos à avaliação realizada pelo médico assistente, que incluiu anamnese e exame físico. Foram esclarecidos quanto às características do trabalho e solicitados a dar consentimento por escrito antes da inclusão no estudo.

O diagnóstico da infecção pelo vírus C foi realizado através de detecção sorológica do anticorpo anti-HCV e confirmado por meio de biologia molecular, a partir da positividade do HCV-RNA.

A determinação no soro do anti-HCV foi realizada através da técnica imunoenzimática, empregando micropartículas de terceira geração (ABBOTT LABORATORIES, IMX).

A pesquisa do HCV-RNA foi realizada por técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando-se kits comerciais - método RT-PCR quantitativo Amplicor HCV Monitor da Roche Diagnostic Systems, cujo limite inferior de detecção segundo o fabricante é de 600 UI/ml e por PCR-HCV qualitativo no seguimento dos pacientes tratados, cujo limite de detecção é 50 UI/ml.

A genotipagem do HCV foi realizada por método de Reação em Cadeia da Polimerase e Enzima de restrição (PCR e RFLP), sendo necessária carga viral superior a 1000 UI/ml para que esse exame seja realizado.

Para os exames de PCR e genotipagem do HCV, foi colhido sangue venoso em tubo vacutainer ou seringa estéril com EDTA; deixado coagular em temperatura ambiente durante 20 minutos e centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos. Foi alicotado 1 ml de soro (para PCR) e 2 ml (para genotipagem) assepticamente em frasco estéril, congelado imediatamente e enviado em gelo seco pelo HEMOPAC - Hematologia e Patologia Clínica de Maceió para o Instituto Hermes Pardini em Belo Horizonte - Minas Gerais.

### Variáveis laboratoriais

Após inclusão, os pacientes foram submetidos à coleta de amostra de sangue (cerca de 20 ml) por venopunção periférica a vácuo, após jejum de 12 horas com intervalo de até 72 horas antes da realização da biópsia hepática.

As amostras obtidas foram colhidas em tubos com e sem anticoagulante. A separação do soro após a centrifugação ocorreu em no máximo 3 (três) horas após a coleta, e parte do soro foi congelada e armazenada a - 20° C.

Todos os exames foram realizados no Laboratório HEMOPAC - Hematologia e Patologia Clínica de Maceió, exceto a dosagem do Ácido Hialurônico que foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da UNIFESP-EPM.

A avaliação laboratorial incluiu as seguintes determinações séricas:

- **Aspartato-aminotransferase (AST):** analisada por método cinético automatizado, em analisador A25 e reagente BioSystems. Limites superiores de normalidade (LSN) a 37°C: até 40 U/L para ambos os gêneros.
- **Alanina-aminotransferase (ALT):** analisada por método cinético automatizado, em analisador A25 e reagente BioSystems. Limites

superiores de normalidade (LSN) a 37°C: até 41 U/L para ambos os gêneros.

- **Gama-glutamiltransferase (GGT):** analisada por método cinético automatizado, em analisador A25 e reagente BioSystems. Limites superiores de normalidade (LSN) a 37°C: até 60 U/L para o gênero masculino; até 40 U/L para o gênero feminino.
- **Contagem de plaquetas:** realizada por método automatizado em equipamento Cell-Dyn - 3700. Limite inferior da normalidade: 140.000/mm<sup>3</sup>.
- **Albumina:** medida por método colorimétrico em analisador A25 e reagente BioSystems - verde de Bromocresol. Os valores normais variaram de 3,5 a 5,0 g/dl para ambos os gêneros.
- **Atividade de protrombina:** determinada por método automatizado em equipamento COAGULATION. Os valores normais da atividade de protrombina variaram de 70 a 100% para ambos os gêneros; **INR (Relação Internacional normatizada)** foi calculada por tabela padrão a partir da atividade de protrombina; os valores normais para o INR variaram de 1 a 1,22.
- **Índice APRI:** desenvolvido por Wai *et al* (2003) que criaram um algoritmo simples, facilmente reprodutível, de baixo custo e elevada acurácia para identificar graus avançados de fibrose hepática na doença crônica pelo VHC. Esse índice é obtido através da seguinte fórmula: valores séricos de AST (/ limite superior da normalidade) x100/ contagem de plaquetas (10<sup>3</sup>/L). Índices acima de 0,70 são indicativos de fibrose significativa ( $F \geq 2$ ) e maiores de 1,5 são relacionados à cirrose hepática.
- **Ácido hialurônico:** para determinação do ácido hialurônico, o soro foi congelado e armazenado a - 20° C. As amostras foram enviadas em gelo seco para o Laboratório de Biologia Molecular da Escola Paulista de Medicina.

O ensaio desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da UNIFESP baseia-se na afinidade do ácido hialurônico por proteínas específicas da cartilagem. As proteínas de ligação do ácido hialurônico foram obtidas de cartilagem bovina através do método descrito por Hardingham & Muir (1972).



Após a obtenção das proteínas de ligação, estas foram utilizadas em fase sólida, em placas de EIE ou como sondas biotiniladas (180 a; 181 a; 182 a).

*Coating* da placa de ELISA - 100 nL de solução de proteína de ligação (1,0 ng/ml) diluída em tampão Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,06 M, pH 9,6 foram adicionados em cada orifício da placa de ELISA e mantidos *overnight* (por 12 a 18 horas) a 4°C. A solução foi removida e a placa foi lavada 6 vezes com Tris-HCl 0,05 M pH 7,75 (tampão de lavagem). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 200 nL/orifício de solução de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,75 + soro albumina bovina (BSA) 1° por 1 hora a 37°C e mantidos a 4°C nessa solução até o momento das dosagens.

Ensaio tipo sanduíche de AH - a cada orifício coberto com proteína de ligação foram adicionados 100 nL de solução de ácido hialurônico-padrão em várias concentrações (0 a 500 ng/ml) diluídas no tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,75 + BSA 1% (tampão de ensaio) e soro dos pacientes, em triplicatas. Seguiu-se incubação a 4°C, *overnight*, sendo a placa lavada, em seguida, 6 vezes com o tampão de lavagem.

Posteriormente, adicionaram-se 100 nL da "sonda" do ácido hialurônico (proteína de ligação biotinilada - 1 mg/ml) diluída 1:5.000 no tampão de ensaio. A placa foi agitada por 2 horas e em seguida lavada 6 vezes com o tampão de lavagem. Após a lavagem foram adicionados à placa 100 nL/orifício da estreptavidina marcada com Európio diluída 1:10.000 no tampão de ensaio. Agitou-se por meia hora, lavando-se a seguir por 6 horas com o tampão de lavagem. Por fim, adicionou-se a solução de Enhancement (200 nL/orifício) e agitou-se por 5 minutos, sendo a placa lida em fluorômetro (Tengblad, 1980; Laurent & Tengblad, 1980; Martins *et al*, 2003).

Análises do AH sérico em 545 voluntários saudáveis (provenientes do Banco de Sangue do Hospital São Paulo) e 40 pacientes cirróticos (Child B e C provenientes da Disciplina de Gastroenterologia da UNIFESP/EPM) mostraram valores de 14,5 e 542 mcg/L, respectivamente (Martins *et al*, 2003).

## Variáveis histológicas

O diagnóstico histológico foi realizado por meio de biópsia hepática percutânea guiada por ultrassonografia ou por videolaparoscopia, com agulha de Tru-cut número 14Ga (Baxter USA). Os critérios para indicação da biópsia hepática foram os adotados no Ambulatório de Hepatites do Hospital Universitário da UFAL, isto é, indivíduos com testes anti-HCV e HCV-RNA reagentes, independentemente do valor de ALT. As contra-indicações para a realização do procedimento foram atividade de protrombina inferior a 50%, dosagem de plaquetas inferior a 50.000/mm<sup>3</sup>, hemoglobina inferior a 8g/dl e presença de ascite.

Os espécimes de biópsia foram fixados em formol a 10%, e posteriormente submetidos à desidratação com álcool etílico e à diafanização em banhos de xilol; em seguida se procedeu à inclusão do material em blocos de parafina. Os cortes histológicos de 4 a 5 micrômetros de espessura foram corados por: hematoxilina-eosina; tricrômio de Masson, azul da Prússia (método de Perls) e impregnação das fibras reticulares pela prata (método de Gomory).

A análise das lâminas das biópsias hepáticas foi realizada por uma única médica patologista do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas, que não recebeu qualquer informação prévia sobre o estadiamento laboratorial dos pacientes.

A análise histológica foi baseada nos critérios da classificação das Hepatites Crônicas proposta pelo Grupo Francês de Estudos de METAVIR (Bedossa, 1993; Bedossa & Poynard, 1996). A proposta desse sistema, criado por experientes patologistas franceses, é a vantagem da simplicidade, reprodutibilidade e aplicação para um grande número de biópsias.

**Tabela 1. Classificação de METAVIR para Hepatite Crônica C**

<b>Fibrose</b>	<b>Atividade histológica</b>
F0 - sem fibrose	A0 - sem atividade
F1 - fibrose portal sem septos	A1 - leve atividade
F2 - fibrose portal com raros septos	A2 - moderada atividade
F3 - numerosos septos sem cirrose	A3 - severa atividade
F4 - cirrose	

### **Definição dos grupos**

#### **Considerando o estadiamento histológico**

Para análise estatística, os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com o estadiamento hepático, fundamentado na extensão do comprometimento e desarranjo da arquitetura lobular, da seguinte forma:

- **Grupo I** - pacientes com graus de fibrose 0, 1 e 2, que foram considerados como tendo uma forma “leve” da doença ou estadiamento “inicial” da doença hepática (n= 48 indivíduos).
- **Grupo II** - pacientes com graus 3 e 4 de fibrose, sendo considerados como tendo forma “avançada” da doença ou estadiamento “avançado” da hepatopatia (n= 24 indivíduos).

### **Terapia antiviral**

O tratamento antiviral foi indicado para os pacientes do estudo de acordo com o Consenso sobre Condutas nas Hepatites Virais da Sociedade Brasileira de Hepatologia (2005).

Foram tratados todos os pacientes que apresentaram na histologia atividade necro-inflamatória moderada ou severa e expansão fibrosa portal, bem como aqueles que apresentaram estadiamento igual ou superior a F2 (METAVIR), independentemente do grau de atividade.

Nos pacientes para os quais não foi recomendado o tratamento, o seguimento foi realizado através de avaliações clínicas no mínimo três vezes ao ano, sendo indicada biópsia hepática a cada 3-5 anos, para avaliar a progressão da doença.

Os pacientes com genótipo 1 realizaram tratamento com PEG-IFN alfa 2 a 180 mcg 1 ampola SC por semana e ribavirina 250 mg 04 comprimidos VO diários, por um período de 48 semanas.

Nos pacientes com genótipo 2 e 3, o tratamento foi realizado com IFN alfa 3 M U 1 ampola SC três vezes por semana associado à ribavirina 250 mg 04 comprimidos VO diários por 24 semanas.

Todos os pacientes realizaram avaliação clínica mensal através de consulta médica e exames laboratoriais - hemograma, plaquetas, creatinina, glicemia de jejum, AST e ALT e trimestralmente realizaram dosagem de TSH. O PCR-HCV qualitativo foi realizado na 12<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semanas do tratamento e seis meses após o término.

A decisão de interromper o tratamento decorreu de duas circunstâncias: 1) persistência do RNA do VHC na 24<sup>a</sup> semana; 2) surgimento de efeitos colaterais graves.

Os efeitos adversos graves que freqüentemente obrigam a redução ou suspensão das doses dos antivirais são: leucopenia acentuada (contagem de neutrófilos < 750 células/mm<sup>3</sup>); anemia, com hemoglobina abaixo de 10 g/dl, plaquetopenia (menor que 50.000/mm<sup>3</sup>) e depressão grave.

### **Resposta ao tratamento antiviral**

Os pacientes submetidos ao tratamento antiviral com Interferon e ribavirina foram classificados de acordo com a resposta virológica.

- Resposta virológica sustentada (RVS): quando o RNA-HCV estabelecido por PCR qualitativo permaneceu negativo após seis meses do término do tratamento antiviral.

- Não respondedores (NR): os pacientes com RNA-HCV positivo seis meses após o tratamento antiviral, incluindo os que apresentaram negatificação durante o tratamento, seguida de recidiva após o término da terapia.

### **Avaliação laboratorial pós-terapia antiviral com Interferon e Ribavirina**

Os pacientes que concluíram o tratamento antiviral até a análise deste estudo (33/65) foram submetidos à nova coleta de sangue (cerca de 20 ml) por venopunção periférica, após jejum de 12 horas, seis meses após término do tratamento.

Foram realizadas novas dosagens de AST, ALT, GGT, plaquetas, ácido hialurônico e PCR-HCV qualitativo, e recalculados os índices AST/ALT e APRI para que fossem comparados aos valores pré-tratamento antiviral, utilizando os mesmos métodos descritos.

### **Análise Estatística**

A análise descritiva das variáveis em estudo envolveu o cálculo de médias e desvios padrões (para as variáveis quantitativas), distribuições de frequência simples e conjunta (para as variáveis qualitativas) e a construção de gráficos.

Para avaliar a existência de associação entre o grau de fibrose tecidual e os marcadores séricos (o índice AST/ALT, os níveis séricos de gamaGT e plaquetas, o índice APRI e as concentrações séricas de ácido hialurônico), foram calculados coeficientes de correlação de Spearman (já que o grau de fibrose é uma variável qualitativa).

Para avaliar a existência de associação dos marcadores séricos de fibrose hepática entre si, foram calculados coeficientes de correlação Pearson (uma vez que esses cálculos envolvem apenas variáveis quantitativas).

Para avaliar se as médias dos marcadores séricos estudados antes do tratamento eram iguais nos dois grupos de fibrose (**0-2** e **3-4**), utilizou-se o teste t-Student.

Nos casos em que as médias dos marcadores séricos foram diferentes nos dois grupos de fibrose (GGT, plaquetas, índice APRI e AH), procurou-se avaliar se esses marcadores poderiam ser utilizados para ajudar a estabelecer o diagnóstico do grau de fibrose. Para tanto, foram construídas curvas ROC e estimadas a sensibilidade e a especificidade desses marcadores para diversos pontos de corte.

Para cada ponto de corte, foram calculados ainda os valores preditivo positivo (VPP) e preditivo negativo (VPN) do teste segundo as seguintes fórmulas:

$$\text{VPP} = ps / \{ ps + (1-p)(1-e) \}$$

$$\text{VPN} = (1-p)e / \{ p(1-s) + (1-p)e \}$$

onde:

$p$  é a prevalência de alto grau de fibrose na população de interesse;

$s$  é a sensibilidade do teste utilizado;

$e$  é a especificidade do teste utilizado.

Os pacientes que completaram o tratamento foram divididos em dois grupos: “negativo”, contendo os pacientes que responderam ao tratamento, ou seja, apresentaram PCR-HCV negativo seis meses após o término da terapia antiviral e “positivo”, contendo os pacientes que não responderam ao tratamento, permanecendo com PCR-HCV positivo.

Foram utilizadas técnicas de análise de variância (ANOVA) com 2 fatores (instante e grupo) e medidas repetidas em um fator (instante), para testar as seguintes hipóteses, com relação às variáveis de interesse (concentração de ácido hialurônico, índice APRI, quociente AST/ALT, concentração de GGT e número de plaquetas):

- (i) não existe interação entre o instante de observação e o grupo, ou seja, os perfis médios de resposta correspondente aos dois grupos

são paralelos, ou ainda, a diferença entre as médias pré e pós tratamento não depende do grupo.

- (ii) não existe efeito de instante, isto é, as resposta médias nos instantes pré-tratamento e pós-tratamento são iguais.
- (iii) não existe efeito do grupo, isto é, as respostas médias dos indivíduos respondedores e não respondedores são iguais.

Adotou-se o nível de significância igual a 0,05 em todas as análises.

Foi utilizado o pacote estatístico SPSS 13.0 for Windows.

## **RESULTADOS**

---

---



## 4. Resultados

Foram selecionados 72 pacientes, que preencheram os critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo. As exclusões foram devido a tratamento prévio para Hepatite C e patologias associadas como doença renal crônica em diálise e coagulopatia com contra-indicação à realização de biópsia hepática.

### 4.1. Análise Descritiva

#### Características Gerais da Amostra

Dos pacientes selecionados, 46 (63,9%) eram do gênero masculino e 26 (36,1%) do gênero feminino. A idade variou entre 20 e 70 anos, com média de 52,8 anos (tabela 2).

**Tabela 2. Características demográficas da amostra (N=72)**

Características	Número (N)	%
Idade (média ± DP)	52,8 ± 9,37	
Gênero masculino	46	63,9
Gênero feminino	26	36,1

A maioria dos pacientes n = 55 (76,4%) referia queixas de astenia leve ou dores abdominais inespecíficas. Relataram transfusão sanguínea ou de hemoderivados 20,83% (15/72); 55,5% (40/72) referiram uso de agulhas não-descartáveis entre as décadas de 70 e 80 para aplicação de energéticos ou punção venosa em exames laboratoriais; os demais (23,7%) não souberam informar sobre a provável fonte de contágio (tabela 3).

**Tabela 3. Provável fonte de contágio do vírus da Hepatite C (N=72)**

Fonte de contágio	Número (N)	%
Uso de agulhas não descartáveis	40	55,5
Transfusão sangue/hemoderivados	15	20,8
Desconhecida	17	23,7

O tratamento antiviral foi realizado com Interferon associado à Ribavirina em 65 pacientes (90,28%), sendo que 61 destes receberam interferon peguilado alfa 2 a 40 K D e 4 receberam o interferon alfa 3 M U de unidades. Dos pacientes tratados, 45,8% (33/72) concluíram o tratamento até a avaliação final deste estudo. Em quatro pacientes, o tratamento foi interrompido devido à anemia severa (2), plaquetopenia (1) e ausência de negativação viral (1) na 24<sup>a</sup> semana de tratamento. Sete pacientes (9,7%) não foram tratados por não preencherem os critérios de indicação para terapia antiviral (tabela 4).

**Tabela 4. Tratamento antiviral (N=72)**

Conduta terapêutica	Número (N)	%
Tratados	65	90,3
Não tratados	07	9,7
Total	72	100

### **Análise laboratorial prévia ao tratamento antiviral**

Na avaliação bioquímica prévia à terapia antiviral, os 72 pacientes incluídos apresentaram os valores médios de  $77 \pm 57,46$  UI/L para AST,  $91 \pm 68,32$  UI/L para ALT e  $95 \pm 74,85$  UI/L para GGT. A contagem de plaquetas apresentou média de  $199 \pm 73 \times 10^3/\text{mm}^3$ . A síntese hepática desses pacientes foi analisada através de dois parâmetros: albumina e INR. Os níveis séricos de albumina encontrados foram de  $3,93 \pm 0,52$  g/dl; o valor médio do INR foi de  $1,06 \pm 0,23$ .

Os valores mínimos, máximos, média e desvio padrão dessas variáveis estão demonstrados na tabela 5.

**Tabela 5. Parâmetros bioquímicos, INR e contagem de plaquetas da amostra pré-terapia antiviral (N=72)**

Parâmetro (variação)	Média + DP
AST (19-285 UI/L)	77± 57,46
ALT (13-302 UI/L)	91±68,32
GGT (11-330 UI/L)	95±74,85
Plaquetas (51-402 x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	199±73
Albumina (3-5 g/dl)	3,93±0,52
INR (1-2)	1,06±0,23

AST - Aspartato-aminotransferase; ALT - Alanina-aminotransferase;  
GGT - Gama-glutamilttransferase; INR - Relação Internacional Normalizada

A carga viral foi estabelecida em 67 pacientes através do PCR-HCV quantitativo. Os demais pacientes (5/72) realizaram determinação da carga viral através do PCR-HCV qualitativo. A carga viral máxima, mínima, média e desvio padrão estão representados na tabela 6.

**Tabela 6. Carga viral por PCR pré-tratamento antiviral (N=67)**

Carga Viral	Mínima	Máxima	Média	Desvio Padrão
PCR-HCV (UI/ml)	974	32.026.670	1.239.614	±4.099.183

A genotipagem foi estabelecida em 63 pacientes (87,5%). O genótipo 1 foi o mais prevalente (58,3%), seguido do genótipo 3 observado em 27,8% dos pacientes. O genótipo 2 apenas foi observado em 1 paciente (tabela 5).

**Tabela 7. Distribuição dos genótipos (N=63)**

Genótipo	Frequência	%
1	42	58,3
2	01	1,4
3	20	27,8
Total	63	100

A avaliação prévia à terapêutica antiviral do marcador de fibrogênese ácido hialurônico obteve variação de 6 a 168 ng/ml - média de  $41,19 \pm 32,32$  (tabela 6).

**Tabela 8. Valores séricos do ácido hialurônico pré-terapêutica antiviral (N=72)**

Parâmetro	Média±DP
Ácido Hialurônico (6-168 ng/ml)	41,19±32,32

### Análise histológica

O estudo histopatológico da biópsias hepáticas dos 72 pacientes foi baseado nos critérios da Classificação de METAVIR (anexo I). Avaliamos em separado a atividade necro-inflamatória (atividade) e o desarranjo estrutural (fibrose). A distribuição dos pacientes por graduação de atividade histológica e fibrose está exposta nas tabelas 9 e 10.

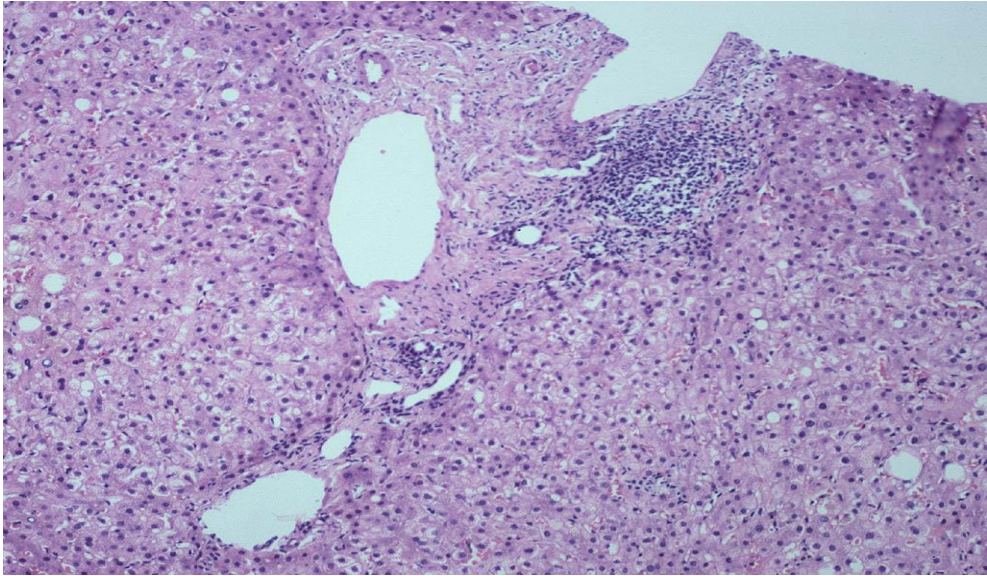
**Tabela 9. Distribuição por grau de atividade histológica (N=72)**

Grau de atividade	N (%)
0	09
1	14
2	43
3	06

**Tabela 10. Distribuição por grau de fibrose (N=72)**

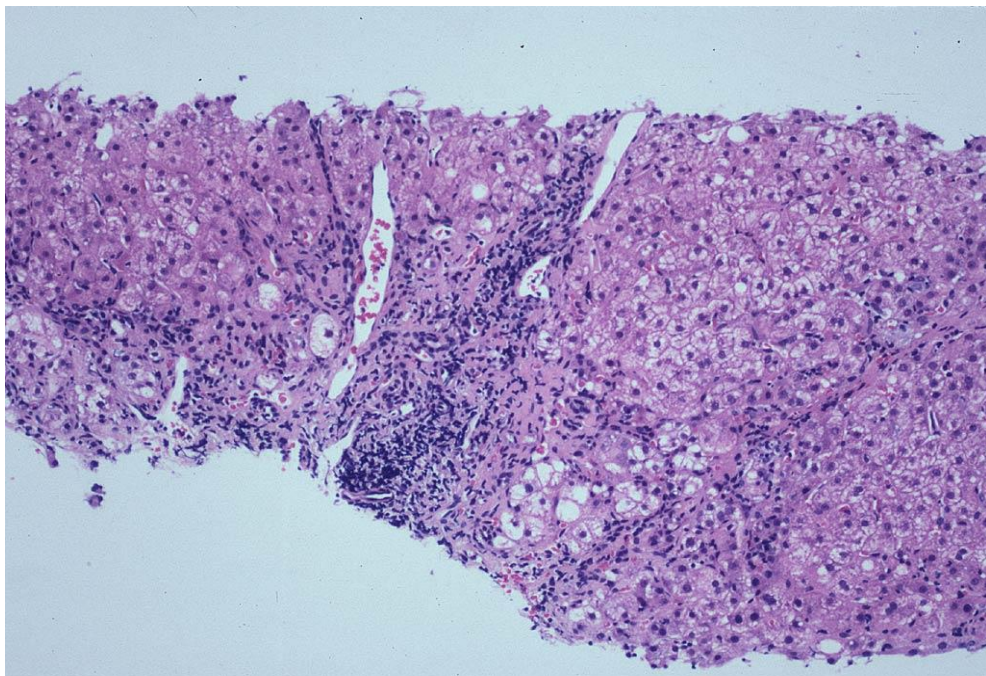
Grau de fibrose	N (%)
0	01 (1,4)
1	18 (25)
2	29 (40,3)
3	19 (26,4)
4	05 (6,9)

As alterações arquiteturais encontradas no estudo anatomopatológico dos pacientes portadores de hepatite crônica viral C estão ilustradas nas figuras que se seguem (Figuras 2 a 5).



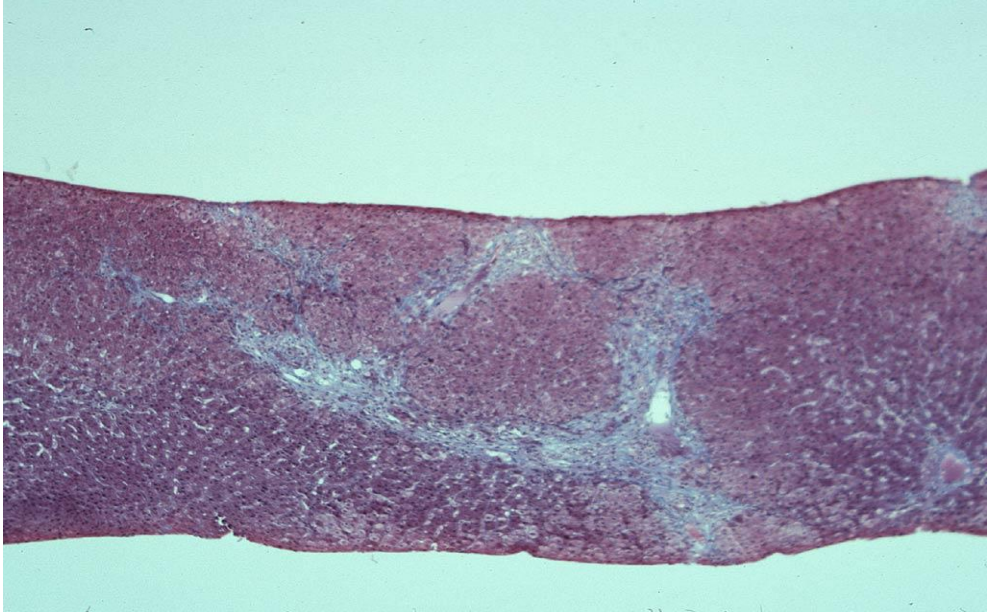
Coloração HE

Figura 2. Fibrose portal sem septos - F1 da classificação de METAVIR



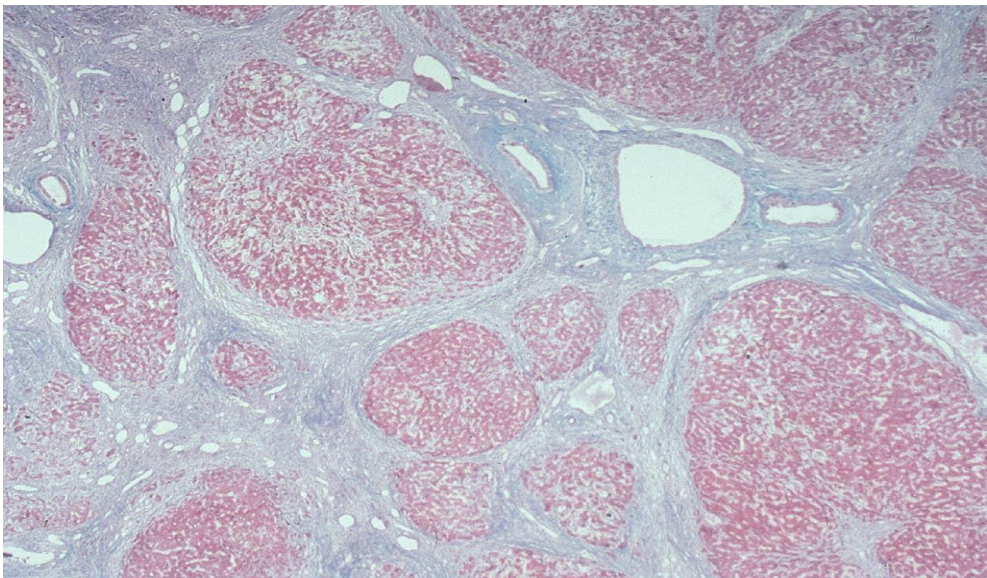
Coloração HE

Figura 3. Fibrose portal com raros septos - F2 da Classificação de METAVIR



Coloração HE

Figura 4. Fibrose com numerosos septos - F3 da Classificação de METAVIR



Coloração HE

Figura 5. Cirrose hepática - F4 da Classificação de METAVIR

## 4.2. Análise Comparativa

Foi realizada análise comparativa entre os marcadores séricos de fibrose (índice AST/ALT, GGT, plaquetas, índice APRI e ácido hialurônico) e os graus histológicos de fibrose hepática.

Para avaliar se as médias dos marcadores séricos eram iguais nos dois graus de fibrose tecidual (0-2 e 3-4), utilizou-se o teste t-Student.

Nos casos em que as médias foram diferentes (GGT, plaquetas, índice APRI e ácido hialurônico), procurou-se avaliar se seus níveis séricos poderiam ser utilizados para ajudar a estabelecer o diagnóstico de fibrose. Para tanto, foram construídas curvas ROC e estimadas a sensibilidade e a especificidade desses marcadores para diversos pontos de corte, bem como os valores preditivos positivo e negativo).

### Análise comparativa: marcadores séricos x fibrose tecidual

Os valores da média e desvio padrão dos marcadores séricos avaliados neste estudo: índice AST/ALT, GGT, plaquetas, índice APRI e ácido hialurônico foram relacionados aos grupos de pacientes divididos conforme os graus de fibrose hepática tecidual (tabela 11).

**Tabela 11. Média dos marcadores séricos relacionados à fibrose tecidual**

	Grau de Fibrose		p-valor
	Grupo I (média ± DP)	Grupo II (média ± DP)	
AST/ALT	0,97±0,64	0,96±0,30	0,39
GGT (U/L) *	74,7±61,9	135,2±83,2	<0,01
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )*	218±64	163±76	<0,01
APRI*	0.76±0.76	2.34±2.20	<0,01
AH (ng/ml)*	27,3±12,5	68,9±41,2	<0,01

AST/ALT - Relação Aspartato-aminotransferase/Alanina-aminotransferase;

GGT - Gama-glutamilttransferase; APRI - índice AST/plaquetas; AH - ácido hialurônico

\*p<0,05

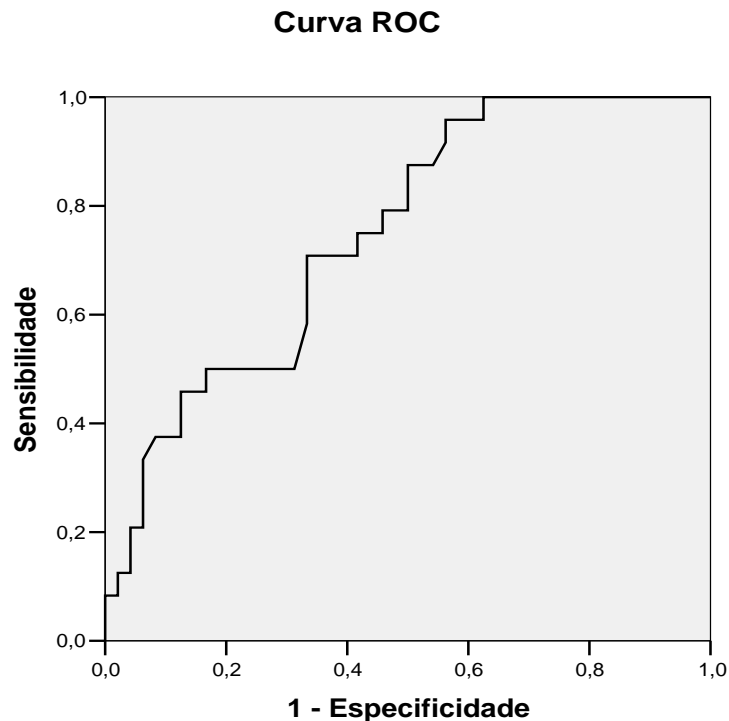
### Análise comparativa: índice AST/ALT x fibrose tecidual

A análise das medidas descritivas do quociente obtido a partir dos valores de AST pelos valores de ALT relacionadas à fibrose tecidual não mostrou diferença significativa entre os grupos de pacientes com fibrose inicial ou avançada (tabela 11). Neste estudo não foi observada associação estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os valores do índice AST/ALT e os graus de estadiamento histológico hepático.

### Análise comparativa: GGT x fibrose tecidual

O nível sérico médio de GGT foi maior nos pacientes com grau de fibrose 3 ou 4 do que naqueles com grau de 0 a 2 ( $p < 0,01$ ) (tabela 11).

Para o cálculo do ponto de corte considerado ideal, foi elaborada uma curva ROC (figura 7). O ponto de corte determinado como ideal para o parâmetro GGT foi 69 U/L.



\* Área sob a curva: ROC 0,75

Figura 6. Curva ROC desenvolvida para o parâmetro GGT

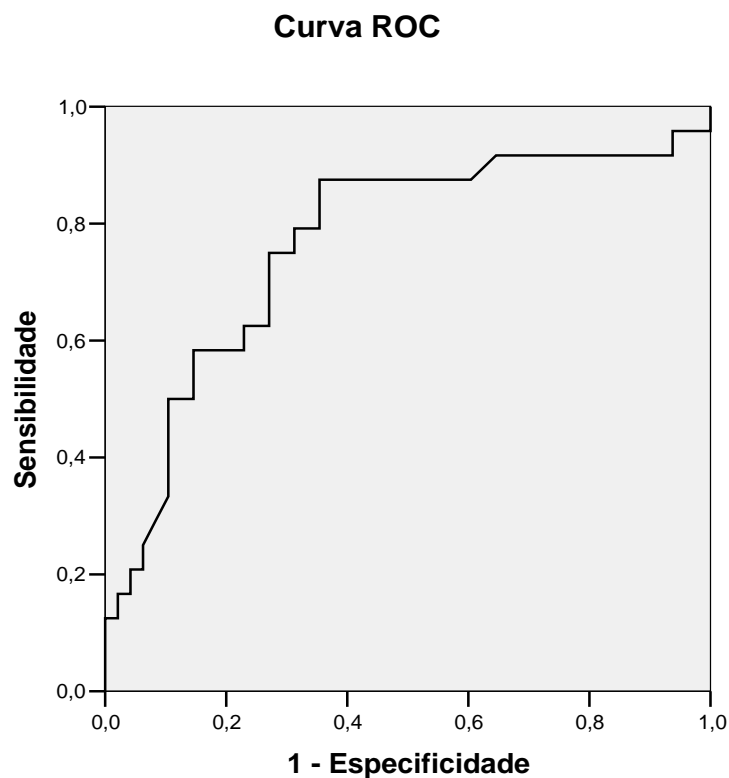


A sensibilidade dessa enzima na determinação de graus mais avançados de fibrose foi de 75%, a especificidade de 58,3%, o valor preditivo positivo de 47% e o valor preditivo negativo de 82%.

### **Análise comparativa: Plaquetas x fibrose tecidual**

O nível sérico médio de plaquetas foi menor nos pacientes com estadiamento histológico mais avançado (grau de fibrose 3 ou 4) do que naqueles em estágio inicial (grau de fibrose 0 a 2)  $p < 0,01$  (tabela 11).

A análise da curva ROC para a contagem de plaquetas na determinação dos graus de estadiamento histológico levou a escolha do ponto de corte ideal para a realização de grupamentos cujo valor foi de 168.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> (Figura 7).



\*Área sob a curva: ROC 0,77

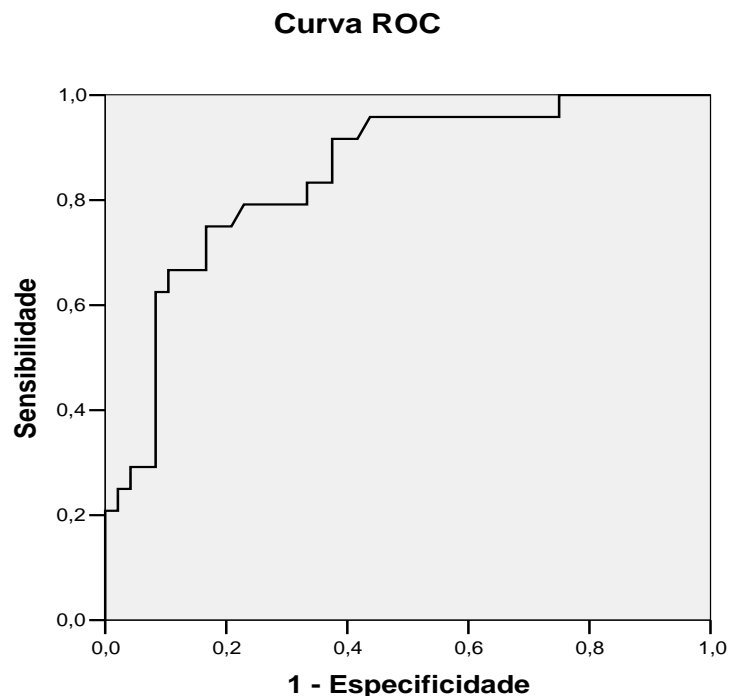
Figura 7. Curva ROC desenvolvida para o parâmetro plaquetas

A sensibilidade da contagem de plaquetas na determinação de graus mais avançados de fibrose foi de 75%, a especificidade foi de 72,9%, o valor preditivo positivo foi de 58% e o valor preditivo negativo foi de 85%.

### Análise comparativa: índice APRI x fibrose tecidual

Estabelecemos previamente ao tratamento antiviral o índice APRI, obtido a partir dos valores séricos de AST (/ limite superior da normalidade) x100/ contagem de plaquetas ( $10^3/L$ ). O índice APRI foi maior nos pacientes com grau de fibrose 3 ou 4 do que naqueles com grau de 0 a 2 -  $p < 0,01$  (tabela 11).

A análise da curva ROC definiu como ponto de corte ideal para o índice APRI na detecção de graus mais avançados de fibrose hepática o valor 0,84.



\*Área sob a curva ROC: 0,85

Figura 8. Curva ROC desenvolvida para o parâmetro índice APRI

A sensibilidade desse índice para determinação de estadiamento histológico avançado foi de 79,2%, a especificidade igual a 79,2%, o valor preditivo positivo de 63% e o valor preditivo negativo de 88%. Para o ponto de corte de 1,5 a especificidade aumenta para 91%, porém a sensibilidade reduz para 62,5%, o valor preditivo positivo foi de 79% e o valor preditivo negativo foi de 83%.

### Análise comparativa: ácido hialurônico x fibrose tecidual

O nível sérico médio de ácido hialurônico foi maior nos pacientes com estadiamento histológico avançado (grupo II) do que naqueles com estadiamento inicial (grupo I)  $p < 0,01$  (figura 9).

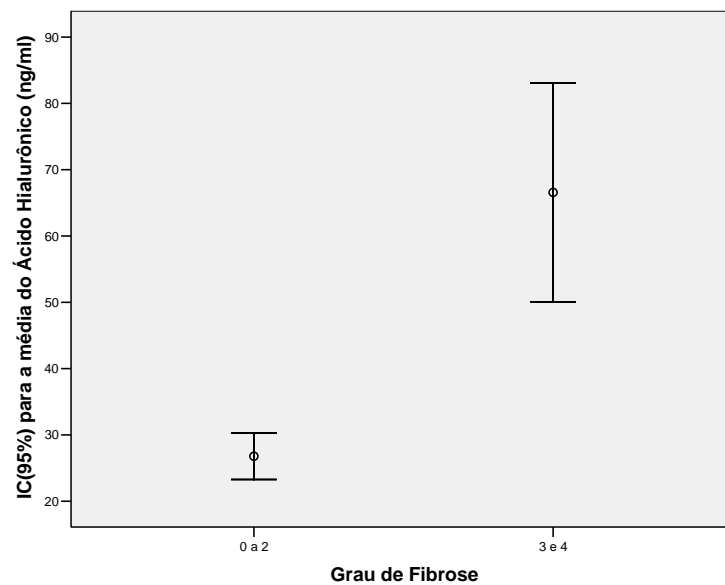


Figura 9. Média e intervalo de confiança para o ácido hialurônico segundo o grau de fibrose.

A correlação dos estágios de fibrose individualizados com os níveis séricos de ácido hialurônico está apresentada no diagrama abaixo. A análise discriminada dos graus de fibrose tecidual confirma que os maiores valores de ácido hialurônico são encontrados nos pacientes com estágios mais avançados - graus 3 e 4 (figura 10).

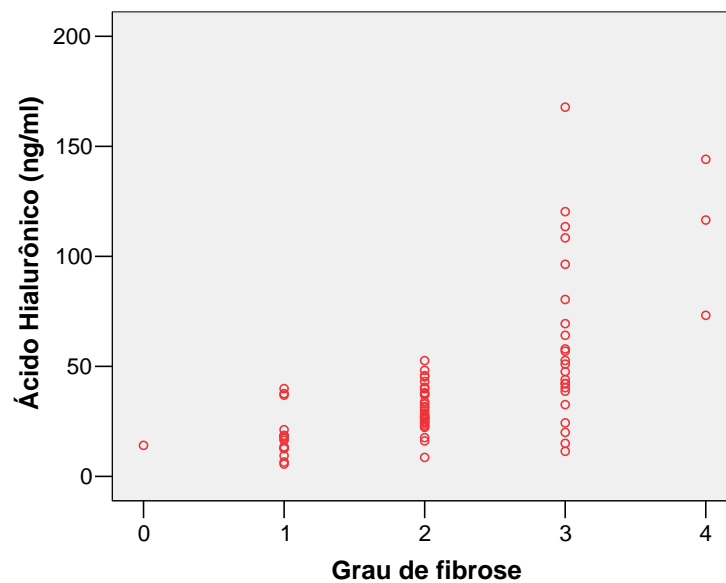
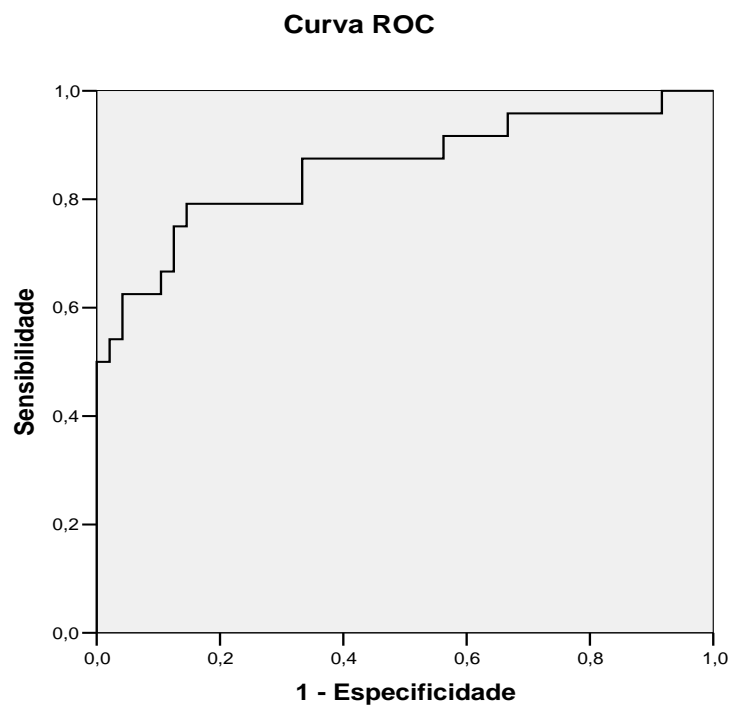


Figura 10. Diagrama de dispersão do ácido hialurônico em função do grau de fibrose.

Para avaliar se o nível sérico de ácido hialurônico poderia ser utilizado para estabelecer o diagnóstico de fibrose, foi construída uma curva ROC (Figura 11). Foi escolhido 40,1 ng/ml como ponto de corte ideal para a realização dos grupamentos.



\*Área sob a curva: ROC 0,86

Figura 11. Curva ROC desenvolvida para o parâmetro ácido hialurônico.

A sensibilidade dos níveis séricos de ácido hialurônico na determinação de graus avançados de estadiamento foi de 79,2%, especificidade foi de 85,4%, valor preditivo positivo de 73% e valor preditivo negativo de 89%.

### **Correlação da fibrose hepática com as variáveis do estudo**

O grau de significância estatística dos parâmetros avaliados neste estudo correlacionados ao estadiamento histológico - grau de fibrose hepática (padrão ouro) está apresentado na tabela 12.

**Tabela 12. Coeficiente de correlação de Spearman entre grau de fibrose e as demais variáveis em estudo.**

	Fibrose
AST/ALT	0,22
Plaquetas	-0,43**
GGT	0,38**
APRI	0,58**
AH	0,67**

AST/ALT - Relação Aspartato-aminotransferase/Alanina-aminotransferase;  
GGT - Gama-glutamiltransferase; APRI - Índice AST/plaquetas; AH - Ácido hialurônico  
\*\* p<0.01

Observamos que existe uma correlação estatisticamente significativa entre a fibrose hepática histológica e as variáveis: plaquetas, GGT, ácido hialurônico (AH) e o índice APRI. A correlação do índice AST/ALT com a fibrose não apresentou significância.

## Áreas sob as curvas ROC

As áreas sob as curvas ROC (AUC - area under the ROC curve) para analisar o valor diagnóstico dos marcadores séricos no estadiamento de graus avançados de fibrose tecidual estão apresentadas em conjunto na tabela abaixo (tabela 13).

**Tabela 13. Áreas sob as curvas ROC construídas para os marcadores séricos de fibrose hepática**

Marcador	GGT	plaquetas	APRI	AH
AUC	0,75	0,77	0,85	0,86
p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

GGT - Gama-glutamiltransferase; APRI - Índice AST/plaquetas; AH - Ácido hialurônico; AUC (*area under the ROC curve*) - área sob a CURVA ROC.

Observamos, nesta tabela, que as maiores áreas foram do índice APRI e da dosagem sérica de ácido hialurônico. Verificamos que esses marcadores apresentaram maior capacidade de discriminar os pacientes com grau avançado de fibrose em relação aos demais parâmetros avaliados.

### 4.3. Análise pós-tratamento antiviral com Interferon e Ribavirina

Realizaram terapia antiviral com Interferon associado à Ribavirina 65 pacientes (65/72). Dos pacientes tratados 45,8% (33/72) concluíram o tratamento até a avaliação final deste estudo. Apresentaram resposta virológica sustentada (RVS) 19 pacientes e 14 pacientes não responderam à terapia antiviral.

Nos pacientes que concluíram o tratamento, utilizamos técnicas de análise de variância (ANOVA) com 2 fatores (instante de observação e grau de fibrose) e medidas repetidas em um fator (instante de observação), para avaliar os marcadores AST/ALT, GGT, plaquetas, APRI e AH, sua relação com a resposta virológica sustentada e a variação desses marcadores pré e pós-terapia antiviral.

### Efeitos do tratamento sobre o índice AST/ALT

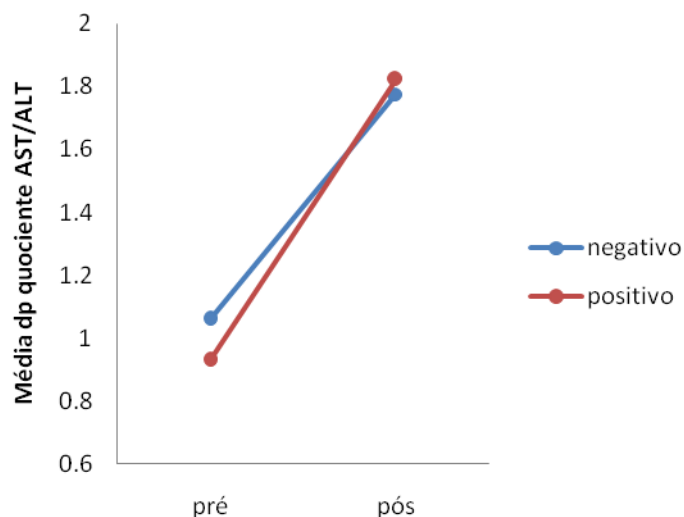


Figura 12. Variação do índice AST/ALT entre os períodos pré e pós-tratamento

Tabela 14. Índice AST/ALT pré e pós-tratamento x resposta virológica (N=33)

Variável	PCR-HCV	Instante de observação			
		Média pré	DP	Média pós	DP
AST/ALT	negativo (N=19)	1.1	(0.7)	1.8	(1.5)
	positivo (N=14)	0.9	(0.3)	1.8	(1.0)
	Total (N=33)	1.0	(0.6)	1.8	(1.3)

AST/ALT - Relação Aspartato-aminotransferase/Alanina-aminotransferase

Para a o quociente AST/ALT, detectou-se um efeito de instante, ou seja, os níveis médios dessa variável são menores antes do tratamento do que depois do tratamento, independente do grupo ( $p=0.003$ ). Não foi detectada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos ( $p=0.874$ ). (figura 12/tabela 14).

### Efeitos do tratamento sobre a dosagem sérica de GGT

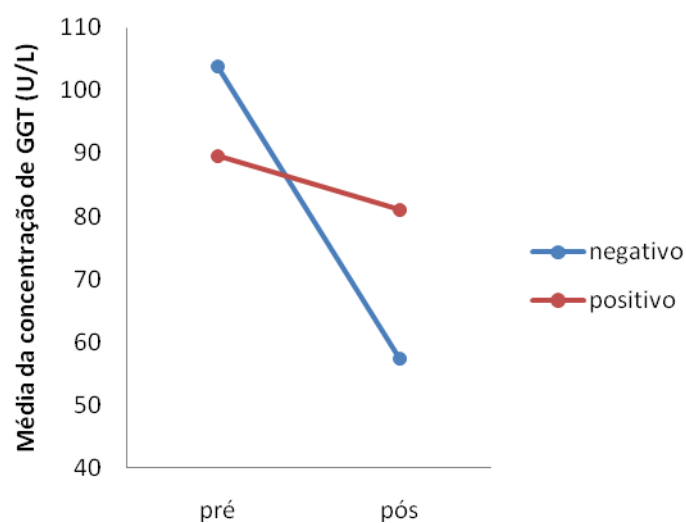


Figura 13. Variação dos níveis séricos de GGT entre os períodos pré e pós-tratamento.

**Tabela 15. Dosagem sérica de GGT pré e pós-tratamento x resposta virológica (N=33)**

Variável	PCR-HCV	Instante de observação			
		Média pré	DP	Média pós	DP
GGT	negativo (N=19)	103.8	(83.2)	57.4	(51.9)
	positivo (N=14)	89.6	(86.2)	81.0	(76.4)
	Total (N=33)	97.8	(83.4)	67.4	(63.5)

GGT - Gama-glutamilttransferase

Para a variável GGT, detectou-se um efeito de instante: os níveis médios dessa variável são menores depois do tratamento, independente do grupo ( $p=0.009$ ). Não foi detectada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos ( $p=0.849$ ). (figura 13/ tabela 15).



### Efeitos do tratamento sobre a contagem de plaquetas

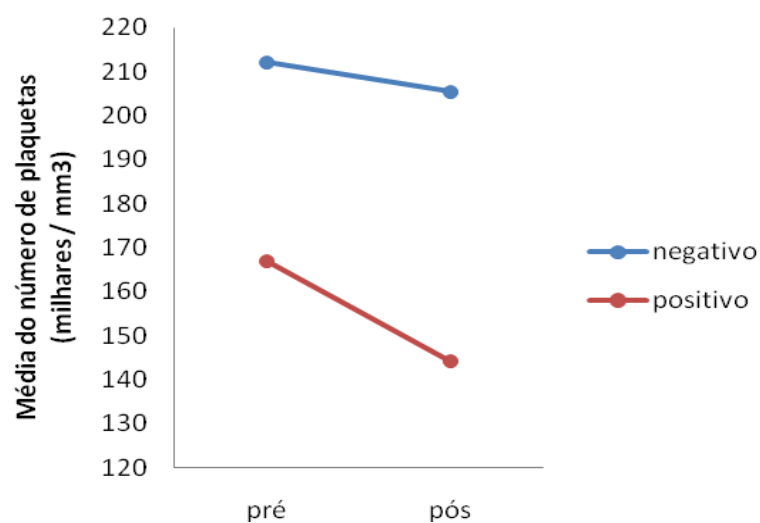


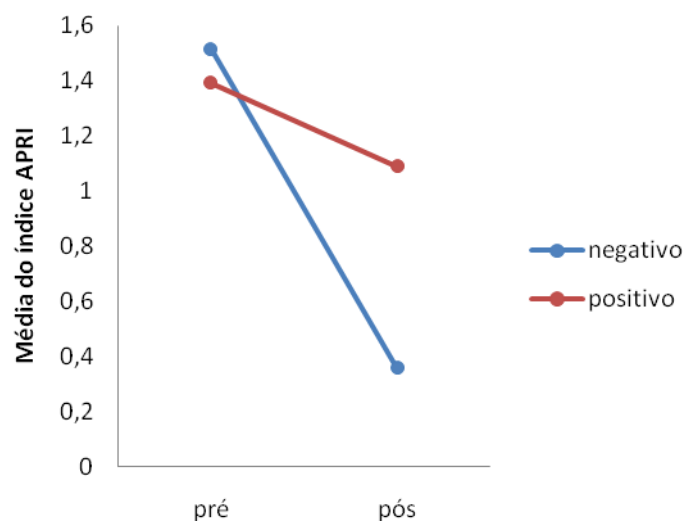
Figura 14. Variação da contagem de plaquetas entre os períodos pré e pós-tratamento

**Tabela 16. Contagem de plaquetas pré e pós-tratamento x resposta virológica (N=33)**

Variável	PCR-HCV	Instante de observação			
		Média pré	DP	Média pós	DP
Plaquetas	negativo (N=19)	212105.3	(90257.0)	205410.5	(69414.9)
	positivo (N=14)	166977.1	(49853.3)	144214.3	(52755.1)
	Total (N=33)	192960	(78134)	179448	(69168.9)

Para a quantidade de plaquetas, detectou-se um efeito de grupo: os níveis médios de plaquetas foram maiores no grupo de respondedores do que no grupo de não respondedores, independente do instante de observação ( $p=0.022$ ). Não foi detectada nenhuma diferença significativa nos níveis médios dessa variável antes e depois do tratamento ( $p=0.188$ ). (figura 14/ tabela 16).

### Efeitos do tratamento sobre o índice APRI



**Figura 15. Variação do índice APRI entre os períodos pré e pós-tratamento**

**Tabela 17. Índice APRI pré e pós-tratamento x resposta virológica (N=33)**

Variável	PCR-HCV	Instante de observação			
		Média pré	DP	Média pós	DP
APRI	negativo (N=19)	1.5	(2.4)	0.4	(0.3)
	positivo (N=14)	1.4	(1.2)	1.1	(1.4)
	Total (N=33)	1.5	(2.0)	0.7	(1.0)

APRI - Índice AST/plaquetas

Para o índice APRI, detectou-se um efeito de instante: os níveis médios de APRI são menores depois do tratamento do que antes do tratamento, para os dois grupos de pacientes (respondedores e não respondedores) ( $p=0.041$ ). Não houve efeito de grupo, ou seja os níveis médios de APRI foram iguais nos dois grupos, independentemente do instante (0.480). (figura 15/tabela 17).

### Efeitos do tratamento sobre o ácido hialurônico

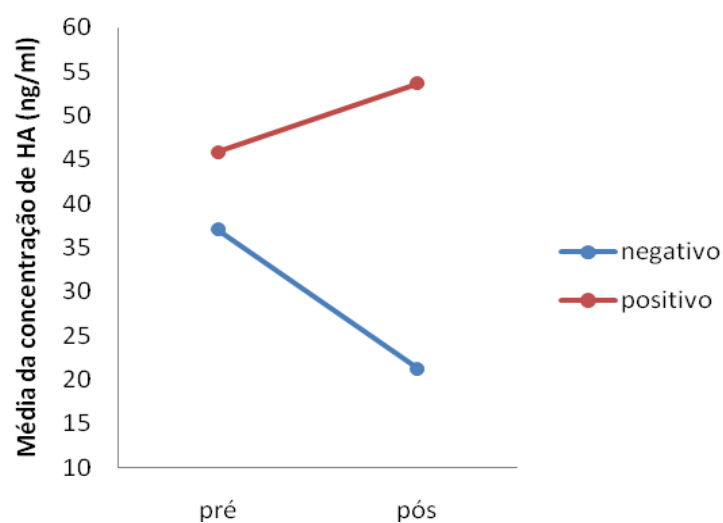


Figura 16. Variação do ácido hialurônico entre os períodos pré e pós-tratamento.

Tabela 18. Dosagem sérica do ácido hialurônico pré e pós-tratamento x resposta virológica (N=33)

Variável	PCR-HCV	Instante de observação			
		Média pré	DP	Média pós	DP
AH	negativo (N=19)	37.0	(30.8)	21.3	(21.0)
	positivo (N=14)	45.9	(35.1)	53.7	(37.3)
	Total (N=33)	40.8	(32.5)	35.0	(32.8)

AH - Ácido hialurônico

Tabela 19. Níveis descritivos dos testes das hipóteses de interesse para cada variável estudada.

Variáveis	Interação	Instante	Grupo
AH	0.012	0.373	0.046
APRI	0.220	0.041	0.480
AST / ALT	0.724	0.003	0.874
GGT	0.064	0.009	0.849
Plaquetas	0.468	0.188	0.022

Para a variável ácido hialurônico foi detectado um efeito de interação entre instante e grupo. Isto significa que a diferença média entre os valores de ácido hialurônico pré-tratamento e pós-tratamento depende do grupo, e vice-versa. Através do ajuste de contrastes, concluiu-se que houve uma diminuição da concentração de AH de antes para depois do tratamento para os pacientes que negativaram ( $p=0.010$ ). Para os pacientes que permaneceram positivos após o tratamento, a concentração de AH não se alterou de antes para depois do tratamento ( $p=0.258$ ). No instante pré-tratamento, não houve diferença nos níveis médios de AH entre respondedores e não respondedores ( $p=0.447$ ). No instante pós-tratamento, os níveis médios de AH foram maiores entre não respondedores do que entre os respondedores ( $p=0.003$ ). (figura 16 / tabelas 18 e 19).

Não foi detectado efeito de interação entre instante de observação e grupo para as demais variáveis: índice APRI ( $p=0.220$ ), quociente AST/ALT ( $p=0.724$ ), concentração de GGT ( $p=0.064$ ) e número de plaquetas ( $p=0.468$ ). Nesses casos, pode-se afirmar que a diferença média entre os valores pré-tratamento e pós-tratamento foi a mesma nos dois grupos. Analogamente, a diferença média entre respondedores foi a mesma nos dois instantes de observação (pré e pós tratamento). (tabela 19)



## 5. Discussão

A hepatite viral C representa um dos principais problemas mundiais de saúde pública da atualidade. Somam-se aproximadamente 170 milhões de pessoas infectadas pelo vírus C em todo o mundo, constituindo, portanto, uma epidemia mundial (MMWR, 1998; WHO, 1999; Lauer & Walker, 2001). A maioria dos pacientes com hepatite crônica viral C mostra inflamação hepatocelular sustentada, com desenvolvimento de necrose e cirrose em aproximadamente 20% nos pacientes seguidos por 5 a 10 anos (Ishibashi *et al*, 1996).

O estágio histológico da doença hepática é determinado pelo grau de fibrose, que geralmente é classificada como leve, moderada, severa ou cirrose. A biópsia hepática permanece como gold standard na avaliação da fibrose e atividade histológica na Hepatite C (Patel *et al*, 2003). Devido à sua acurácia, exclui outros diagnósticos e serem usados na monitorização da progressão da hepatopatia. No entanto é um procedimento de custo elevado, acarretando risco de complicações ocasionais pós-procedimento como dor, hemorragia e morte em raros casos (Silva *et al*, 2001).

Os resultados de estudos em diferentes populações de pacientes confirmam que a aplicação de marcadores bioquímicos pode ter elevado valor preditivo no diagnóstico da fibrose significativa (Oh & Afdhal, 2001; Halfon *et al*, 2005; Parise *et al*, 2006).

Em nosso estudo foram avaliados portadores de infecção crônica pelo HCV visando estabelecer a sensibilidade, especificidade e os valores preditivos positivo e negativo do índice AST/ALT, GGT, plaquetas, índice APRI e ácido hialurônico na determinação de graus avançados de fibrose hepática. Os pacientes foram submetidos à terapia antiviral com interferon alfa convencional e peguilado associado à ribavirina, seguindo os critérios adotados no Consenso de Condutas nas Hepatites Virais da SBH (2005) e, seis meses após o término do tratamento, esses marcadores séricos foram novamente dosados e seus valores relacionados aos níveis pré-tratamento e à resposta terapêutica.

A amostra analisada foi constituída por 72 pacientes, com predomínio do gênero masculino (63,9%), dado este semelhante ao de outros autores, que mostraram em séries com maior número de pacientes que há um predomínio do sexo masculino nos portadores de hepatite crônica viral C, com percentuais variando entre 52 a 74% (Halfon *et al*, Patel *et al*, 2003, Imbert-Bismut *et al.*, 2001; Poynard *et al*, 2002). Estudos desenvolvidos anteriormente na UNIFESP/EPM e publicados recentemente por Parise *et al* (2006) mostraram predomínio do sexo masculino 55,8% (115/206) em portadores de Hepatite Crônica Viral C.

O predomínio de pacientes masculinos observado neste estudo foi atribuído à maior exposição parenteral a sangue através do uso de instrumentos e agulhas contaminados e inadequadamente esterilizados, em especial para aplicação de energéticos (ex.: Gluconergan®) antes de partidas de futebol, prática muito comum em nossa região nos anos 70, esta prática foi relatada por 30% dos nossos pacientes masculinos (14/46), enquanto 6 pacientes *referiram* contatos sexuais com vários parceiros sem uso de preservativos.

Em nosso estudo, a média de idade foi de  $53 \pm 9,3$  anos, pouco acima da obtida em outras séries, que apresentaram variação entre 41 a  $47 \pm 9$  anos (McHutchison *et al*, 2000; Patel *et al*, 2004; Parise *et al* 2006). Esmat *et al* (2007) observaram, em estudo controle desenvolvido por centro médico israelita situado em Boston, que a média de idade nos pacientes avaliados procedentes do Egito foi em torno de  $39,3 \pm 8,7$  anos, inferior à média dos pacientes americanos de  $50,4 \pm 7,4$  anos,

Essa variação de faixa etária foi avaliada por Wasley & Alter (2000) que identificaram três padrões globais distintos de transmissão. Em países com o primeiro padrão (como os Estados Unidos e a Austrália), a maioria das infecções foi encontrada entre pessoas de 30 a 49 anos, indicando que o risco de infecção pelo VHC foi maior em um passado relativamente recente (10 a 30 anos atrás) e primariamente afetando adultos jovens. Em países com o segundo padrão (como o Japão e a Itália), a hepatite C predominou entre pessoas idosas, consistente com infecção adquirida em um passado distante (30 a 50 anos atrás). O terceiro padrão, encontrado em países como o Egito,

altos índices de infecção são observados em todas as faixas etárias, indicando um elevado risco atual para adquirir a infecção. Em países com o primeiro padrão, o uso de drogas injetáveis tem sido o principal fator de risco para a hepatite C. Nos países com segundo e terceiro padrões de transmissão, as injeções e os equipamentos contaminados usados em procedimentos médicos, bem como transfusões sanguíneas e de hemoderivados parecem ter papel predominante na transmissão (Wasley & Alter 2000)

Em nosso estudo a forma de contágio predominante foi a via parenteral, descrita como via principal de transmissão em todo o mundo (Clarke & Kulasegaram, 2006). Entre os pacientes incluídos no estudo, 40 (55%) relataram uso de agulhas não descartáveis para aplicações de energéticos e coleta de exames laboratoriais e um paciente referiu uso de drogas injetáveis com seringa compartilhada. A transfusão sanguínea e de hemoderivados foi relatada em 15 (20,8%) dos pacientes nas décadas de 70 e 80, quando não havia determinação de marcadores séricos para hepatite tipo C. Em dezessete pacientes (23,7%) não identificamos a provável fonte de contágio. Contato sexual com vários parceiros foi referido por 6 pacientes do sexo masculino (8%) nos últimos dez anos.

Em estudo prévio desenvolvido na UNIFESP, Mendes (2002) identificou percentuais diferentes dos nossos - transfusões sanguíneas em 38%, uso de drogas injetáveis em 15% e esporádica em 47%, onde a via de transmissão não foi identificada. Patel *et al* (2003) relataram como fatores de risco em 76 pacientes portadores de hepatite crônica C uso de drogas intravenosas em 34%, transfusão sanguínea em 32%, uso de agulhas não-descartáveis em 7%, contato sexual em 5%, tatuagem em 2% e esporádica em 20% dos casos.

Os pacientes incluídos neste estudo realizaram detecção do RNA-HCV por PCR. Em 67 (93%), determinamos a carga viral que mostrou uma média de 1.239.614 UI/ml ( $DP \pm 4.099.183$ ). Poynard (2004) avaliou dados de 3.010 portadores crônicos de hepatite C procedentes de 4 trials randomizados e observou que a carga viral inferior a 3.500.000 cópias/ml estava associada à ausência de fibrose significativa. Em nosso estudo, onde houve prevalência de graus de fibrose pouco avançados, encontramos apenas 10 pacientes com



carga viral superior à média de 1.240.000 cópias e destes apenas 3 apresentaram carga viral superior a 3.500.000 cópias/ml. Em estudo semelhante (PATEL *et al*, 2003) que incluiu 76 pacientes com hepatite crônica, sendo 48 destes no estágio 1 de fibrose pela classificação de METAVIR, a média de HCV-RNA foi de  $1,5 \times 10^6$  cópias/ml ( $DP \pm 2,2 \times 10^6$  cópias/ml).

A genotipagem foi realizada em 63 pacientes (87%) e prevaleceu o genótipo 1 (42/72), seguido do tipo 3 (20/72). O genótipo 2 foi encontrado apenas em 1 paciente. No Brasil, há poucos estudos de soroprevalência de genótipos. Em geral predomina o genótipo 1 em 50% a 60% dos casos; o tipo 2 em 3% a 5% (mais freqüente na região Centro-Oeste); e o tipo 3 em cerca de 35% dos casos (mais freqüente na região Sul). Os genótipos 4 e 5 são bastante raros. Não houve descrição do tipo 6 até agosto de 2005 (Focaccia *et al*, 2007).

A síntese hepática neste estudo foi avaliada através da dosagem da albumina sérica que estava normal em 83% dos casos e do INR que apresentou índices normais em 72% dos pacientes. Esses valores demonstraram que a maioria dos pacientes incluídos apresentava boa reserva funcional hepática, condizendo com o que nos demonstra a histologia, onde 67% dos pacientes apresentavam graus de fibrose de 0 a 2. Em pacientes com doença hepática crônica, a atividade de protrombina - INR pode ser usada como método não-invasivo para diagnóstico de cirrose (Oberti *et al*, 1997), bem como a menor taxa de albumina no soro significa, em geral, diminuição da síntese hepática (Sherlock S & Dooley J, 1997).

A análise prévia ao tratamento antiviral dos parâmetros bioquímicos mostrou que o nível sérico de AST estava acima do limite superior da normalidade (LSN) em 67% dos pacientes. A média dos valores séricos de AST foi  $77 \pm 57,46$  UI/L. Corroborando nossos resultados, Testa *et al* (2006) mostraram uma variação de AST entre 45 e 88 UI de acordo com o nível da agressão hepática em portadores crônicos do VHC. Murawaki *et al* (1996) mostraram uma variação na média da AST entre 48 e 111 UI também relacionados ao estadiamento em 115 hepatopatas.

Os níveis séricos de ALT estavam elevados em 52 pacientes no início do estudo; a média da ALT foi de  $91 \pm 68,32$  UI/L, superior à média da

AST, perfil típico da infecção crônica pelo VHC em fases iniciais e intermediárias, que corresponde ao estadiamento da maioria dos nossos pacientes. De forma semelhante, Granot, Shouval & Ashur (2001) mostraram uma variância entre 71 e 100 UI nos níveis de ALT correlacionados ao score de fibrose, com redução dos níveis de ALT na fase de cirrose hepática comparada às fases de hepatite crônica.

A dosagem sérica pré-tratamento da gamaGT foi de  $95 \pm 74,85$  UI/L. Em 43 pacientes, os níveis de gamaGT estavam acima do limite superior. Neste estudo a elevação não estava associada a alcoolismo ou a uso crônico de medicações, visto que estes foram critérios de exclusão do estudo. A GGT é considerada um dos marcadores da fibrose hepática, tendo sido incluída no FIBROINDEX desenvolvido por Imbert-Bismut *et al* (2001) e validado por Poynard *et al* (2002). A elevação de gamaGT é atribuída à presença de lesões em ductos biliares nos portadores de Hepatite Crônica C (Giannini *et al*, 2001).

A contagem de plaquetas estava abaixo do limite inferior de normalidade ( $<140.000/\text{mm}^3$ ) em apenas 13 pacientes (18%) e, mesmo nesses casos, os índices foram superiores a  $50.000/\text{mm}^3$ . A maioria dos valores dentro da normalidade é atribuída ao predomínio de pacientes em estágio inicial da hepatopatia viral C em nossa série. Em outros estudos que compararam os marcadores séricos e teciduais de fibrose, com prevalência de pacientes em estágios iniciais da doença hepática, à semelhança do que avaliamos, a contagem de plaquetas estava próxima da normalidade (Serfaty *et al*, 1994; Esmat *et al*, 2007). Entretanto, Romagnuolo *et al* (2001) observaram baixos índices de plaquetas em cerca de 70% dos portadores crônicos do VHC com fibrose hepática avançada ou cirrose.

A trombocitopenia é uma complicação comum das doenças hepáticas crônicas. No entanto os mecanismos envolvidos na sua patogênese não estão totalmente elucidados (Fusegawa *et al*, 2002). Têm sido propostos como possíveis mecanismos causadores da trombocitopenia a hipertensão portal, a esplenomegalia (Adinolfi *et al*, 2001), a diminuição da produção de trombopoietina (Nagamine *et al*, 1996) e o aumento das plaquetas associado à IgG (Koruk *et al*, 2002).

Em estudo envolvendo 209 pacientes portadores de hepatite crônica viral, a trombocitopenia estava presente em 71% dos pacientes com esplenomegalia e apenas em 23% dos pacientes sem esplenomegalia (Adinolfi *et al*, 2001). Pacientes com contagem plaquetas normais mostraram níveis de trombopoietina mais altos do que aqueles com plaquetopenia. O estudo de Koruk *et al* (2002) revelou que os níveis de trombopoietina eram normais em pacientes com hepatite crônica, mas, em pacientes com cirrose hepática, esses níveis estavam reduzidos. Concluíram que a deterioração da produção de trombopoietina pode contribuir para o desenvolvimento da trombocitopenia em pacientes com doença hepática em estágio avançado. Nagamine *et al* (1996) avaliaram 368 pacientes com hepatite crônica C e observaram trombocitopenia em 41%. Foram observados elevados títulos de plaquetas associados à imunoglobulina G em 88,1% dos pacientes, principalmente na fase de cirrose hepática. Esses dados indicam que a infecção crônica pelo VHC pode produzir uma significativa reação auto-imune nas plaquetas, levando à trombocitopenia.

Fusegawa *et al* (2002) demonstraram em seu estudo que a trombocitopenia e a ativação plaquetária coexistem na doença hepática crônica, especialmente em pacientes com Hepatite Crônica Viral C. O processo de fibrose dos sinusóides pode lesar e ativar as plaquetas. As micropartículas plaquetárias (PMP) são consideradas fragmentos de membranas de plaquetas que aumentam quando as plaquetas são ativadas por estímulos de elevada tensão. Neste estudo, a dosagem das PMP mostrou uma correlação positiva com o ácido hialurônico e ambos com o grau histológico de fibrose.

Os níveis séricos de ácido hialurônico apresentaram neste estudo média de 41,19ng/ml e desvio padrão de 32,32 ng/ml. Os valores da média do AH pouco elevados justificam-se pelo predomínio de pacientes em estágios iniciais da hepatopatia - 2/3 apresentavam graus de fibrose de 0 a 2. Em nosso estudo tivemos apenas 5 pacientes com grau 4 de fibrose - cirrose hepática. Nesses pacientes, os valores médios de AH foram de 116 ng/ml. De forma semelhante, Patel *et al* (2004) apresentaram valores médios de 43,84 ng/ml em pacientes portadores de hepatite crônica C com fibrose inicial, concordante com o nosso estudo, no entanto, os pacientes em fase avançada da doença apresentam média superior (149,9±15,30).

Os estudos mostram que a média do AH varia de acordo com o estadiamento dos pacientes avaliados. O estudo de Murawaki *et al* (1996) mostra média de 19 ng/ml em pacientes saudáveis e 190 ng/ml em portadores de cirrose hepática. Mendes (2002), estudando 100 pacientes portadores crônicos do VHC, sendo 17% em fase de cirrose hepática, observou que a média do AH obtida de  $70,1 \pm 78,7$  ng/ml. Oliveira (2003) apresentou valores médios de AH em pacientes com fibrose hepática inicial (F0 a F2) de  $35 \pm 3$  ng/ml - coincidente com nossos achados, porém no grupo com estadiamento avançado, que incluiu 35% de pacientes cirróticos a média foi superior à que obtivemos ( $192 \pm 12,7$  ng/ml).

O estudo histoquímico de Ichida *et al* (1996) sugere que o ácido hialurônico poderia ser influenciado nas doenças hepáticas crônicas por vários fatores: a) aumento da produção de ácido hialurônico devido à inflamação e remodelação tecidual através da ativação das células de Ito nas hepatites crônicas; b) redução da degradação do ácido hialurônico, especialmente nas células endoteliais sinusoidais, na cirrose hepática; e c) progressão da fibrose com marcado aumento do tecido conjuntivo no trato portal, tanto na hepatite crônica como na cirrose hepática.

Em nossa casuística, a análise de parâmetros histológicos em 72 pacientes revelou que 48 pacientes apresentavam estágios iniciais da hepatopatia crônica, sendo a maior parte das biópsias hepáticas (40,3%) classificadas como grau 2 de fibrose segundo os critérios do grupo de METAVIR (1993). Um terço dos pacientes apresentava estágios mais avançados da doença hepática - graus 3 e 4 de METAVIR e destes encontramos apenas 5 pacientes (6,9%) na fase de cirrose hepática.

Confirmando nossos achados, os estudos de progressão da fibrose em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C mostram que a evolução do estadiamento ocorre em um terço dos pacientes e menos de 10% evoluem para a cirrose após 20 anos de infecção (Ryder *et al*, 2004; Poynard *et al*, 2001). Em nosso estudo, a co-infecção com HBV e HIV e a ingestão alcoólica, que contribuem para a rápida progressão da fibrose hepática, foram critérios de exclusão.

O estadiamento na fase inicial da maioria dos nossos pacientes foi concordante com os achados de outros autores, como Poynard *et al* (2001) que avaliaram a progressão da hepatopatia crônica C em grande número de pacientes não tratados (N=2.313). Encontraram como resultados que a porcentagem de pacientes sem cirrose após 20 anos de infecção foi de 91% e 56% após 40 anos de infecção pelo VHC. Três fatores independentes estavam associados à rápida progressão para cirrose: idade da infecção, consumo de álcool de 50 g ou mais por dia e gênero masculino. O modo de infecção, a atividade histológica, o genótipo e a carga viral não foram associados à fibrose.

Para análise da associação entre os níveis séricos dos marcadores indiretos de fibrose (GGT, plaquetas, ácido hialurônico, índice APRI e índice AST/ALT) e o estadiamento histológico através da biópsia hepática, os pacientes foram divididos em grupos de acordo com os graus de fibrose. O grupo I correspondeu aos estágios iniciais de fibrose (0, 1 e 2) e o grupo II correspondeu aos graus mais avançados de fibrose (3 e 4). De forma semelhante, Mendes (2002), Oliveira (2003) e Patel *et al* (2004) agruparam os pacientes conforme o desarranjo da arquitetura lobular para avaliar sua associação com marcadores indiretos de fibrose.

Determinamos a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivo e negativo dos marcadores séricos que apresentaram diferença relacionada ao estadiamento histológico da fibrose hepática; o ponto de corte ideal foi definido através da curva ROC construída para GGT, plaquetas, índice APRI e AH. A área da curva ROC tem sido utilizada para determinar o valor diagnóstico dos marcadores de fibrose. Poynard *et al* (2007) concluíram, através da avaliação de 1.312 pacientes e revisão de 18 estudos diagnósticos, que as expressões das áreas sob as curvas ROC dos marcadores de fibrose devem ser standardizadas de acordo com a prevalência dos estágios de fibrose hepática, definidos como iniciais e avançados.

Em nosso estudo, não foi observada associação estatisticamente significativa ( $p=0,91$ ) entre os valores do índice AST/ALT e os graus de estadiamento hepático. Neste estudo, o quociente AST/ALT não foi adequado para discriminar o grau da fibrose. Entretanto, vários estudos têm mostrado que

a razão AST/ALT está correlacionada ao grau histológico de fibrose em pacientes com hepatites crônicas e com a severidade da doença clínica em pacientes com cirrose hepática (Williams & Hoofnagle, 1988; Giannini *et al*, 2003; Parise *et al*, 2006). Em 1988, Williams & Hoofnagle demonstraram que o raio AST/ALT era maior em pacientes com cirrose, comparado aos pacientes com hepatite crônica.

Giannini *et al* (2003), avaliando 252 pacientes portadores de infecção crônica pelo VHC em vários estágios da doença hepática, observaram, nos pacientes com índice AST/ALT < 1, que 90% estavam na fase de hepatite crônica (desde o estágio 0 até o 4) e apenas 10% na fase de cirrose hepática; já entre os pacientes com relação AST/ALT >1, 90% eram portadores de cirrose hepática e apenas 10% se encontravam na fase de hepatite crônica.

Corroborando os nossos achados, Reedy *et al* (1998) ao avaliarem 77 pacientes portadores de infecção crônica pelo vírus C, observaram que o índice AST/ALT >1 foi encontrado em apenas 10 pacientes dos 23 em fase de cirrose hepática. A baixa sensibilidade desse marcador também foi observada por Imperiale *et al* (2000) que verificaram que o índice AST/ALT > 1 estava presente em apenas 23 de 41 pacientes portadores de cirrose hepática. Em nosso estudo houve predomínio de pacientes em estágios iniciais da hepatopatia e apenas 5 pacientes apresentavam grau 4 de fibrose hepática. Essa distribuição dificultou a avaliação da relação AST/ALT, que se presta especialmente para estadiamento e prognóstico dos pacientes cirróticos. A média do índice AST/ALT entre os nossos pacientes cirróticos foi de 1,32.

Observamos que a média do nível sérico da GGT foi maior nos pacientes com grau de fibrose 3 ou 4 do que naqueles com grau de 0 a 2 ( $p < 0,01$ ), sendo, portanto, verificada uma associação estatisticamente significativa entre os níveis séricos de GGT e os graus histológicos de fibrose. A melhor relação entre sensibilidade e especificidade ocorreu para o ponto de corte igual a 69 U/L, onde a sensibilidade dessa enzima na determinação de graus mais avançados de fibrose foi de 75%, a especificidade de 58,3%, o valor preditivo positivo de 47% e o valor preditivo negativo de 82%.

A associação entre os graus de fibrose e os níveis de GGT foi também observada por outros autores (Hwang *et al*, 2000, Gianinni *et al*, 2001; Koda *et al*, 2007). Em estudo com 112 pacientes portadores de Hepatite Crônica C, níveis superiores a 60 U/L se associaram a scores avançados de fibrose, com grau de significância estatística (Hwang *et al*, 2000). Koda *et al* (2007), avaliando 360 pacientes portadores de hepatite crônica viral C com graus de fibrose que variaram de F0 a F4, obtiveram média da GGT nos pacientes com graus de fibrose F0 a F3 de  $69 \pm 66$  U/L; a média da GGT após inclusão dos pacientes no estágio F4 aumentou para  $77 \pm 75$  U/L, resultados esses semelhantes aos nossos achados.

A GGT tem sido empregada associada a outros marcadores na avaliação da fibrose hepática. Imbert-Bismut *et al* (2001) validaram um índice de fibrose que avalia 5 marcadores bioquímicos: alfa2-macroglobulina, haptoglobina, GGT, bilirrubina total e apolipoproteína. Esse índice de fibrose foi empregado por Poynard *et al* (2002) na avaliação de 165 pacientes portadores crônicos do VHC submetidos à terapia antiviral com Interferon, que observaram associação desse índice de fibrose à resposta virológica e às variações histológicas daqueles pacientes.

A análise dos resultados da contagem de plaquetas permitiu concluir que valores abaixo do ponto de corte determinado neste estudo ( $168.000/\text{mm}^3$ ) se associaram a graus mais avançados de estadiamento ( $p < 0,01$ ). Verificamos, para esse ponto de corte, que a contagem de plaquetas apresenta, na determinação de graus mais avançados de estadiamento hepático (3 e 4), sensibilidade de 75% e especificidade de 72,9%, valor preditivo positivo de 58% e valor preditivo negativo de 85%. Quando determinamos pontos de corte inferiores ( $140.000/\text{mm}^3$ ), a sensibilidade reduz para 38% e a especificidade eleva para 90%.

A contagem de plaquetas vem sendo empregada por outros autores na determinação de graus avançados de fibrose. Adinolfi *et al* (2001) avaliaram a distribuição da contagem de plaquetas relacionada ao grau de fibrose hepática em portadores crônicos de hepatite B e C sem esplenomegalia e verificaram variação de  $121 \times 10^3$  a  $276 \times 10^3$  nos estágios menos avançados (F0 a F2) e  $117 \times 10^3$  a  $258 \times 10^3$  nos graus avançados, com média de  $108 \times 10^3$  nos

pacientes que apresentavam estágio F4 de fibrose. Essa média também foi observada por Koruk *et al* (2002) que avaliaram apenas pacientes portadores de cirrose hepática.

Calculamos em nossos pacientes o índice APRI e o relacionamos com os graus de fibrose hepática. O índice APRI foi maior nos pacientes do grupo II (F3 e F4) do que no grupo I (F1 e F2) ( $p < 0,001$ ), sendo verificada uma adequada relação entre sensibilidade e especificidade para graus avançados de fibrose no ponto de corte igual a 0,84, com sensibilidade igual a 79,2%, especificidade igual a 79,2%, valor preditivo positivo de 79% e valor preditivo negativo de 83%. Para o ponto de corte 0,70 a sensibilidade é a mesma, porém a especificidade reduziu para 70%. Parise *et al* (2006) aplicaram o índice APRI na avaliação de pacientes portadores crônicos do VHC e determinaram, através da curva ROC, que a sensibilidade e especificidade desse índice no diagnóstico de fibrose hepática avançada foram de 85% e 66% respectivamente ( $APRI > 0,70$ ). A área sob a curva ROC (AUC) foi 0,82, semelhante ao nosso resultado de 0,85.

Em nossos pacientes, os níveis séricos do ácido hialurônico foram relacionados aos graus de fibrose hepática divididos em grupos. A análise dos resultados mostrou que o nível sérico médio de ácido hialurônico foi maior nos pacientes do grupo II (F3 e F4) do que nos pacientes do grupo I (F0 a F2). A avaliação individualizada dos graus de fibrose correlacionados com os níveis de ácido hialurônico confirmou que os maiores valores de ácido hialurônico são encontrados nos pacientes em estágios mais avançados de fibrose hepática - graus 3 e 4.

A análise dos resultados demonstrou que valores acima do ponto de corte determinado através da curva ROC (40,1 ng/ml) se associam a graus mais avançados de fibrose hepática ( $p < 0,01$ ). A sensibilidade dos níveis séricos de ácido hialurônico na determinação de graus avançados de desarranjo estrutural hepático foi de 79,2%, especificidade foi de 85,4 %, valor preditivo positivo de 73% e valor preditivo negativo de 89%. Não há consenso quanto ao ponto de corte ideal do AH para diagnóstico de fibrose hepática avançada, como podemos observar nos vários estudos que utilizam o ácido hialurônico como preditor de fibrose nos pacientes com hepatite crônica C



(Takamatsu S *et al*, 1997; McHutchison *et al*, 2000; Murawaki *et al*, 2001; Halfon *et al*, 2005; Parise *et al*, 2006). Corroborando nossos achados, Halfon *et al* (2005), ao reunirem 405 portadores crônicos de hepatite crônica C, observaram que a ausência de fibrose significativa, fibrose severa e cirrose foi predita pelos níveis de ácido hialurônico de 16, 25 e 50 ng/l, respectivamente, com valores preditivos negativos de 82%, 89% e 100% na mesma ordem. O estudo concluiu que o ácido hialurônico poderia ser usado clinicamente como um marcador não-invasivo para fibrose e/ou cirrose.

McHutchison *et al* (2000) avaliaram 486 pacientes portadores crônicos do VHC, e demonstraram que a ausência de cirrose hepática pré-tratamento antiviral poderia ser predita em 99% das vezes através da dosagem do ácido hialurônico com nível inferior a 60 ng/L. No mesmo estudo, verificou-se que níveis séricos > 60 ng/L predisseram a presença de cirrose em apenas um terço dos pacientes com comprovação desta por biópsia. Segundo os autores, a utilidade clínica desse teste reside na capacidade de excluir a presença de cirrose. Os dados obtidos no estudo indicaram que os pacientes com fibrose avançada apresentavam valores > 110 ng/L, coincidindo com a média dos nossos pacientes portadores de cirrose hepática.

Murawaki *et al* (2001), ao compararem os níveis séricos do ácido hialurônico com outros marcadores de fibrose - procolágeno peptídeo III, colágeno tipo IV, metaloproteinases da matriz e inibidor tecidual das metaloproteinases, concluíram que o ácido hialurônico foi o melhor teste para prever o estágio de fibrose hepática na hepatite crônica C. Outro estudo (Yamada *et al*, 1998) avaliou 36 pacientes hemofílicos através da biópsia hepática e da dosagem de marcadores séricos de fibrose - o procolágeno peptídeo III, o colágeno tipo IV e o ácido hialurônico. Foi verificado nesses pacientes que a concentração sérica do ácido hialurônico estava correlacionada com o grau de fibrose hepática.

Parise *et al* (2006), avaliando 206 pacientes portadores de hepatite crônica C, observaram que valores do ácido hialurônico >34,2 ng/ml poderiam ser usados para detectar graus de fibrose >2 com sensibilidade de 85% e especificidade de 71% e valores iguais ou maiores que 78,6 ng/ml poderiam

ser usados no diagnóstico da cirrose hepática com sensibilidade de 91% e especificidade de 81,5%.

A área sob a curva ROC (AUC) dos marcadores séricos tem sido alvo de interesse de vários pesquisadores (Sebastiani & Albert, 2006; Parise *et al*, 2006; Poynard *et al*, 2007). Em nosso estudo, encontramos 2/3 dos pacientes com graus de fibrose iniciais e 5 pacientes com grau de fibrose 4 (7%). Devido à grande concentração de pacientes em estágios iniciais de fibrose, construímos uma única curva ROC para cada parâmetro avaliado. A análise das AUCs nos mostrou que os *parâmetros* que apresentaram maior associação com a fibrose foram o índice APRI e o ácido hialurônico, com área de 0,85 e 0,86 respectivamente, semelhante ao relatado por Parise *et al* (2006) ao avaliarem pacientes nos estágios F2 a F4 com APRI >0,7.

Concluimos, através da análise dos nossos resultados pré-tratamento antiviral, que houve correlação estatisticamente significativa entre a fibrose hepática histológica (padrão-ouro) e as variáveis: GGT, plaquetas, índice APRI e ácido hialurônico (AH).

A avaliação, através de marcadores teciduais e séricos, da reversão da fibrose na hepatite C pós-tratamento com interferon alfa tem despertado interesse de vários autores (Ishibashi *et al*, 1996; Shiffman *et al*, 1999; Shiratori *et al*, 2000; Poynard *et al*, 2002; Poynard, 2004; Serpaggi *et al*, 2006).

Reavaliemos os marcadores séricos seis meses após conclusão do tratamento antiviral para estabelecer uma comparação entre os pacientes com resposta virológica sustentada e não-respondedores. A análise pós-tratamento apresentada representou nossos resultados preliminares, visto que incluiu apenas os 33 pacientes que concluíram a terapia antiviral. A biópsia hepática pós-tratamento não foi realizada por não fazer parte do protocolo de seguimento a curto prazo dos pacientes portadores de hepatite crônica viral C; consideramos também a lenta progressão da hepatopatia crônica C, os riscos de um procedimento invasivo e a ausência de indicação clínica.

O índice AST/ALT apresentou média maior no período pós-tratamento quando comparado aos valores iniciais, porém não mostrou variação de acordo com a resposta virológica. A maioria dos pacientes apresentou após o tratamento antiviral índice AST/ALT > 1, mesmo aqueles

com resposta virológica sustentada; diferentemente, Anderson *et al* (2000) mostraram elevação do índice AST/ALT > 1 após o tratamento com interferon nos pacientes que apresentaram progressão do dano hepático à histologia, sendo maior nos pacientes cirróticos.

A análise dos níveis séricos de GGT pós-tratamento demonstrou redução dos valores pós-tratamento em ambos os grupos ( $p=0,009$ ). Apesar da queda dos níveis da GGT ter sido maior no grupo de pacientes com RVS, nenhuma diferença significativa entre os dois grupos foi observada ( $p=0,849$ ). A variação da dosagem sérica da GGT com o tratamento antiviral tem sido avaliada de forma isolada ou associada a outros índices de fibrose (Serfaty *et al*, 1994; Imbert-Bismut *et al*, 2001; Poynard *et al*, 2002). Redução em seus níveis é atribuída à melhora da colestase hepática.

A contagem de plaquetas apresentou níveis mais elevados no grupo de pacientes com RVS, em ambos os instantes de observação (antes e após a terapia antiviral). Alguns autores têm relatado elevação da contagem de plaquetas em relação aos níveis pré-tratamento nos pacientes com resposta virológica sustentada e também nos pacientes com normalização dos níveis de ALT (resposta bioquímica), como Taniguchi *et al* (2006) que observaram, na monitorização de 429 pacientes tratados com Interferon, redução da contagem de plaquetas nos pacientes não-respondedores, porém aumento nos pacientes respondedores. Resultados semelhantes foram observados por outros autores (Iga *et al*, 2005). Em nosso estudo não foi observada diferença significativa nos níveis de plaquetas pré e pós-tratamento, ressaltando que em sua maioria os pacientes apresentaram índices normais desta variável nos dois instantes avaliados, característica inerente aos graus de fibrose pouco avançados que predominou nesta série.

O índice de APRI apresentou redução pós-tratamento antiviral, tanto nos pacientes com RVS como nos não respondedores, diferentemente do que observaram Yu *et al* (2006), ao avaliar 776 pacientes portadores de hepatite crônica C submetidos ao tratamento com interferon, nos quais houve redução do índice APRI apenas naqueles que obtiveram RVS.

Em nosso estudo obtivemos uma diminuição dos níveis séricos do ácido hialurônico entre os períodos pré e pós-tratamento para os pacientes que

obtiveram RVS; nos pacientes que se mantiveram positivos a concentração do AH não se alterou após a terapia com interferon. O mesmo resultado obtiveram Kojima *et al* (2001), numa série com 118 pacientes tratados com interferon, nos quais os níveis séricos de AH diminuíram significativamente após o tratamento apenas nos pacientes com RVS. Outros autores também relataram resultados semelhantes, com significativa redução dos valores do ácido hialurônico nos pacientes que apresentaram resposta virológica sustentada e naqueles com reversão da fibrose (Guéchet *et al*, 1995; Yamada *et al*, 1996; Ninomiya *et al*, 1998; Ueno *et al*, 2001; Serpaggi *et al*, 2006). Entretanto, resultado divergente foi obtido por Poynard *et al* (2002) na avaliação de 165 portadores crônicos do VHC submetidos à terapia com interferon, não havendo variação estatisticamente significativa entre a dosagem inicial e os valores pós-tratamento, em pacientes respondedores e não-respondedores.

Dentre os marcadores avaliados neste estudo, o ácido hialurônico se destacou como um importante preditor da resposta virológica; os demais marcadores estudados não demonstraram acurácia na avaliação da resposta terapêutica. Em nossa casuística, a análise dos marcadores séricos de fibrose pós-terapia antiviral e a resposta virológica foram limitadas pelo tamanho da amostra, que deverão ser ampliadas com a conclusão do tratamento de 32 pacientes (total de pacientes tratados N=65).

Neste trabalho encontramos relação entre os marcadores séricos de fibrose - GGT, plaquetas, índice APRI e ácido hialurônico - e o estadiamento histológico (padrão ouro). Nossos resultados nos permitem inferir que os marcadores séricos estudados, especialmente o ácido hialurônico e o índice APRI, podem sugerir o estadiamento hepático nos pacientes com contra-indicação à realização de procedimentos invasivos e contribuir na monitorização da terapia antiviral e que o ácido hialurônico parece representar um importante marcador de resposta virológica pós-terapia antiviral.

Novos estudos validando os marcadores séricos de fibrose hepática são necessários para que estes sejam incorporados ao diagnóstico e seguimento dos pacientes portadores de hepatopatia crônica de forma padronizada.



**CONCLUSÕES**

---

## 6. Conclusões

A análise dos resultados deste estudo em pacientes portadores de hepatite crônica viral C nos permite concluir que:

1. os valores séricos de GGT, plaquetas, índice APRI e ácido hialurônico foram capazes de identificar formas avançadas de fibrose hepática;
2. o índice AST/ALT não apresentou acurácia na avaliação da fibrose hepática;
3. entre os marcadores séricos avaliados, o índice APRI e a dosagem sérica de ácido hialurônico apresentaram maior valor preditivo do estadiamento hepático;
4. os níveis séricos de ácido hialurônico apresentaram redução após terapia antiviral nos pacientes com resposta virológica sustentada com grau de significância estatística;
5. os demais marcadores – níveis séricos de GGT, contagem de plaquetas, índices AST/ALT e APRI não apresentaram diferença significativa após o tratamento com interferon e ribavirina.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---



## 7. Referências bibliográficas

Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, Kench J, Farrell G, McCaughan GW, Jeffrey GP. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005; 51(10): 1867-73.

Adinolfi LE, Giordano MG, Andreana A, Trípoli MF, Utili R, Cesaro G, Ragone E, Durante Mangoni E, Ruggiero G. Hepatic fibrosis plays a central role in the pathogenesis of Thrombocytopenia in patients with chronic viral hepatitis. *Bras J Haematol* 2001; 113(3): 590-5.

Albanis E, Friedman SL. Antifibrotic agents for liver disease. *Am J Transplant* 2006; 6(1): 12-9.

Alcolado R, Arthur MJ, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci* 1997, 92(2): 103-12.

Alter MJ. The detection, transmission and outcome of hepatitis C virus infection. *Infect Agents Dis* 1993; 2: 155-66.

Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in United States, 1988-1994. *New Engl J Med* 1999; 341: 556-62.

Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13(17): 2436-41.

Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* 2006; 144(10): 705-14.

Asselah T, Bieche I, Paradis V, Bedossa P, Vidaud M, Marcellin P. Genetics, genomics, and proteomics: implications for the diagnosis and the treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2007; 27(1): 13-27.

Attallah AM, Toson ESA, El-Waseef AM, Abo-Seif MA, Omran MM, Shiha GE. Discriminant function based on hyaluronic acid and its degrading enzymes and degradation products for differentiating cirrhotic from non-cirrhotic liver diseased patients in chronic HCV infection. *Clin Chim Acta* 2006; 369(1): 66-72.

Bedossa P. Presentation of a grid for computer analysis for compilation of histopathologic lesions in chronic viral hepatitis C. *Ann Pathol* 1993; 13(4): 260-5.

Bedossa P, Bioulac-Sage P, Callard P, Chevallier M, Degott C, Deugnier Y, Fabre M, Reynés M, Voigt JJ, Zafrani ES. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994; 20(1 Pt 1):15-20.

Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24(2): 289-93.

Bourliere M, Penaranda G, Renou C, Botta-Fridlund D, Tran A, Portal I, Lecomte L, Castellani P, Rosesenthal-Allieri Ma, Gerolami R, Ouzan D, Deydier R, Degott C, Halfon P. Validation and comparison of indexes for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients: proposal for a pragmatic approach classification without liver biopsies. *J Viral Hepat* 2006;13(10): 659-70.

Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P; Blatt L, Hezode C, Picchio G, Dhumeaux D, Neumann AU, McHutchison JG, Pawlotsky JM. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002; 36: 211-8.

Bowden DS, Berzsenyi MD. Chronic hepatitis C virus infection: genotyping and its clinical role. *Future Microbiol* 2006; 1:103-12.

Braga WSM, Brasil LM, Souza RAB, Melo MS, Rosas MDG, Castilho MC, Fonseca JCF. Prevalência da infecção pelos vírus da Hepatite B (VHB) e da Hepatite Delta (VHD) em Lábrea, Rio Purus, Estado do Amazonas. *Epidemiol Serv Saúde* 2004; 13(1): 35-46.

Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344(7): 495-500.

Brenner DA, Alcorn JF. Therapy for hepatic fibrosis. *Sem Liv Dis* 1990; 10: 75-83.

Bueno MR, Danerei A, Armendariz-Borunda J. Cholestasis-induced fibrosis is reduced by interferon alpha-2<sup>a</sup> and is associated with elevated liver metalloprotease activity. *J Hepatol* 2000; 33(6): 915-25.

Burt RD, Hagan H, Garfein RS, Sabin K, Weinbaum C, Thiede H. Trends in hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus prevalence, risk behaviors, and preventive measures among Seattle injection drug users aged 18-30 years. *J Urban Health* 2007; 84(3): 436-54.

Carrilho JF, Baldy JLS, Takata PK, Adum S, Zeitune JM. Prevalência e estudo de portadores do antígeno de superfície dos vírus da hepatite B (AgHBs) em Londrina, Paraná. *GED Gastroenterol Endosc Dig* 1984; 3(1): 13-20.

Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Lédighen V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128(2) 343-50.

Castera L, Foucher J, Bertet J, Couzigou P, Ledinghen V. Fibroscan and Fibrotest to assess liver fibrosis in HCV with normal aminotransferases. *Hepatology* 2006; 43(2): 373-6.

Caturelli E, Giacobbe A, Facciorusso D, Bisceglia M, Villani MR, Siena DA, Fusilli S, Squillante MM, Andriulli A. Percutaneous biopsy in diffuse liver disease: increasing diagnostic yield and decreasing complication rate by routine ultrasound assessment of puncture site. *Am J Gastroenterol* 1996; 91(7): 1318-21.

Cavalheiro NP. Métodos de Genotipagem e Sorotipagem. In: Focaccia R. *Tratado de Hepatites Virais*. 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. cap.4.17, p. 291-5.

Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV related chronic disease. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998; 47(RR-19):1-39.

Centers for Disease Control and Prevention. *Hepatitis surveillance report nº 57*. Atlanta: CDC, 2000.

Cheinquer H. Uso da biologia molecular no diagnóstico e tratamento das hepatites virais. In: Mattos AA, Dantas W (org.). *Compêndio de Hepatologia*. 2ª ed. São Paulo: Fundo editorial BYK; 2001. p.51-70.

Cheinquer H, Strauss E, Ferreira A, Silva AO, Sette H, Amorim WP, Ferraz MLG, Parise ER, Mello CEB, Silveira TR, Marroni CA, Rosa H, Crespo D, Bittencourt, Portella F, Mattos AA. *Consenso sobre condutas nas Hepatites Virais B e C*. Sociedade Brasileira de Hepatologia. São Paulo, 2005.

Choo QI, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a c DNA clone derived from a blood borne non a non b viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.

- Clarke A, Kulasegaram R. Hepatitis C transmission - where are we now? *International Journal of STD & AIDS* 2006; 17:74-80.
- Clouston AD, Jonsson JR, Powell EE. Steatosis as a cofactor in other liver diseases: hepatitis C virus, alcohol hemochromatosis, and others. *Clin Liver Dis* 2007; 11(1): 173-89.
- Coco B, Oliveri F, Maina AM, Ciccorossi P, Sacco R, Colombatto P, Bonino F, Brunetto MR. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J Viral Hepat* 2007; 14(5): 360-9.
- Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gible J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, Cheung L, Di Bisceglie A, Hoofnagle J, Shih JW. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996; 334(26): 1691-6.
- Davison F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follet EA; Seed CR; Krusius T; Lin C; Medgyesi GA. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non coding region. *J Gen Virol* 1995; 76(Pt 5): 1197-204.
- De Minicis S, Brenner DA. NOX in liver fibrosis. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462(2): 266-72.
- Osterreicher CH, Stickel F, Brenner DA. Genomics of liver fibrosis and cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2007; 27(1): 28-43.
- Dienstag JL. Sexual and perinatal transmission of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: 66S-70S.
- Dofour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 127: 981-5.

Esmat G, Metwally M, Zalata KR, Gadalla S, Abdel-Hamid M, Abouzied A, Shaheen AA, El-Raziky M, Khatab H, El-Kafrawy S, Mikhail N, Magder LS, Afdhal NH, Strickland GT. Evaluation of serum biomarkers of fibrosis and injury in Egyptian patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2007; 46: 620-7.

Fabris C, Smirne C, Toniutto P, Colletta C, Rapetti R, Minisini R, Falletti E, Pirisi M. Assessment of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and normal alanine aminotransferase values : The role of AST to the platelet ratio index. *Clin Biochem* 2006; 39(4): 339-43.

Falkner S, Samuelson G, Sjölin S. Penicillamine-induced normalization of clinical signs, and liver morphology and histochemistry in case of Wilson's disease. *Pediatrics* 1970; 45: 260-8

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292(15): 767-70.

Feitelson MA. Hepatitis C Virus: From laboratory to clinic. Cambridge University Press 2002. p.41-53.

Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML, Smith CI, Marinos G, Gonçalves FL, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Chaneac M, Reddy KR. Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD)/ribavirin. *J Hepatol* 2005; 43(3): 425-33.

Ferraz ML, Oliveira PM. Diagnóstico Laboratorial Específico. In: Focaccia R. *Tratado de Hepatites Virais*. 2ª edição. São Paulo: Atheneu, 2007. p.199-204.

Ferreira CT, Silveira TR. Hepatites Virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7(4): 473-87.

Figueiredo G. Estudo de Prevalência de Base Populacional das Infecções pelos Vírus A, B e C nas Capitais Brasileiras - Resultados preliminares. In: XI Workshop Internacional de Hepatites Virais de Pernambuco; 2007; Porto de Galinhas. Pernambuco: Instituto do Fígado de Pernambuco; 2007.

Focaccia R, Conceição OJ, Sette Júnior H, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, Lorenço R, Souza FV, Kiffer CR, Santos EB, Gonzales MP, Sáez-Alquézar A, Riscal JR, Fischer D. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of São Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *Braz J Infect Dis* 1998; 2(6): 269-84.

Focaccia, R. Prevalência das hepatites virais A, B, C e E. Estimativa de prevalência na população geral da cidade de São Paulo, medida por marcadores séricos, em amostragem populacional estratificada com sorteio aleatório e coleta domiciliar [Tese Livre Docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1998.

Focaccia R, Galante VC, Oliveira UB. Epidemiologia. In: Focaccia R. Tratado de Hepatites Virais. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.211-6.

Forns X, Ampurdanes S, Liovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez- Bauer E, Bruguera M, Sanchez-Tapias JM, Rodes J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002; 36(4-1): 986-92.

Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castera L, Le Bail B, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, De Ledinghen V. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective Study. *Gut* 2006; 55(3): 403-8.

Fraser JRE, Kimpton WG, Laurent TC, Cahill RNP & Vakakis N. Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue. *Biochem J* 1988; 256: 153-8.

Fried MW. Diagnostic testing for hepatitis C: practical considerations. *Am J Med* 1999; 107: S31-51.

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales Júnior FL, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347(13): 975-82.

Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-35.

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105.

Fujii T, Sun YL, An KN, Luo ZP. Mechanical properties of single hyaluronan molecules. *J Biomech* 2002; 35(4): 527-31.

Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty MC, Nelson KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Public Health* 1996; 86(5): 655-61.

Gayotto LCC, Quarentei A C, Cabral, Geraldo Lustosa. Soroepidemiologia das hepatites A e B nas regiões dos rios Bia e Alto Juruá, Amazônia Ocidental. *GED Gastroenterol Endosc Dig* 1984; 3(4): 106-12.

Gayotto LCC. Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. *Gastroenterol Endosc Dig* 2000; 19: 137-40.

Gayotto LCC, Alves VAF. Biópsia hepática. In: Castro LP, Coelho LGV. *Gastroenterologia*. Rio de Janeiro: Medsi, 2004. p.1687-716.



Gebo KA, Herlong HF, Torbenson MS, Jenckes MW, Chander G, Ghanem KG, El-Kamary SS, Sulkowski M, Bass EB. Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. *Hepatology* 2002; 36(5-Suppl 1): S161-72.

Goldberg DM. Structural, functional, and clinical aspects of gamma-glutamyltransferase. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1980; 12(1): 1-58.

Granot E, Shouval D, Ashur Y. Cell adhesion molecules and hyaluronic acid as markers of inflammation, fibrosis and response to antiviral therapy in chronic hepatitis C patients. *Mediators of Inflammation* 2001; 10: 253-8.

Gretch D. Standardization of hepatitis C virus-RNA quantification: advances and unfinished business. *Hepatology* 2000; 31: 788-9.

Guéchet J, Loria A, Serfaty L, Giral P, Giboudeau J, Poupon R. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of alpha-interferon therapy. *J Hepatol* 1995; 22(1): 22-6.

Guéchet J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by roc curve analysis. *Clin Chem* 1996; 42(4): 558-63.

Guéchet J, Serfaty L, Bonnand AM, Chazouilleres O, Poupon RE, Poupon R. Prognostic value of serum hyaluronan in patients with compensated HCV cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2000; 32(3): 447-52.

Hadziyannis SJ, Sette Júnior H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer Jr H, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM, for the PEGASYS International Study Group. Peginterferon- $\alpha$ 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of Internal Medicine* 2004; 140: 346-55.

Halfon P, Bourlière M, Pénaranda G, Deydier R, Renou C, Botta-Fridlund D, Tran A, Portal I, Allemand I, Rosenthal-Allieri A, Ouzan D. Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comparative Hepatology* 2005; 4:6.

Heathcote J. Treatment of Hepatitis C. American Association for the Study of Liver Diseases. Boston: Postgraduate Course, 2004. p.21-6.

Hwang SJ, Luo JC, Lai CR, Chu CW, Tsay SH, Lu CL, Wu JC, Chanf FY, Lee SD. Clinical, virologic and pathologic significance of elevated serum gamma-glutamyl transpeptidase in patients with chronic hepatitis C. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2000; 63(7): 527-35.

Ichida T, Sugitani S, Satoh T, Matsuda Y, Sugiyama M, Yonekura K, Ishikawa T, Asakura H. Localization of hyaluronan in human liver sinusoids: a histochemical study using hyaluronan-binding protein. *Liver* 1996; 16:365-71.

Idobe Y, Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, Kawasaki H. Post-prandial serum hyaluronan concentration in patients with chronic liver disease. *Internal Medicine* 1998; 37(7): 568-75.

Iga D, Tomimatsu M, Endo H, Ohkawa S, Yamanda O. Improvement of thrombocytopenia with disappearance of HCV RNA in patients treated by interferon-alpha therapy: possible etiology of HCV - associated immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2005; 75(5): 417-23.

Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poinard T. Multiviric Group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis c virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001; 357(Supl.9262): 1069-75.

Imperiale TF, Said AT, Cummings OW, Born LJ. Need validation of clinical decision aids: use of the AST/ALT ratio in predicting cirrhosis in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2005; 95(9): 2328-32.

- Ishibashi K, Kashiwagi T, Ito A, Tanaka Y, Nagasawa M, Toyama T, Ozaki S, Naito M, Azuma M. Changes in serum fibrogenesis markers during interferon therapy for chronic hepatitis type C. *Hepatology* 1996; 24(1):27-31.
- Kettaneh A, Marcellin P, Douvin C, Poupon R, Ziol M, Beaugrand M, Ledinghen V. Features associated with success rate and performance of FibroScan measurements for the diagnosis of cirrhosis in HCV patients: a prospective study of 935 patients. *J Hepatol* 2007; 46(4): 628-34.
- Khokhar N. Serum aminotransferase levels and platelet count as predictive factor of fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C infection. *J Pak Med Assoc* 2003; 53(3): 101-4.
- Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(3): S84-7.
- Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 45(2): 297-306.
- Kojima H, Hongo Y, Harada H, Inoue T, Miyaji K, Kashiwagi M, Momose T, Arisaka Y, Fukui H, Murai S, Tokita H, Kamitsukasa H, Yagura M, Katsu K. Long-term histological prognosis and serum fibrosis markers in chronic hepatitis C patients treated with interferon. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(9): 1015-21.
- Koruk M, Onuk MD, Akcay F, Savas MC. Serum thrombopoietin levels in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis, and its relationship with circulating thrombocyte counts. *Hepatogastroenterology* 2002; 49(48): 1645-8.
- Kuo G, Choo GL, Alter HJ, Gitnik GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE. An assay for circulating antibodies to a major etiology virus of human non A non B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-4.

Lackner C, Struber G, Liegl B, Leibl S, Ofner P, Bankuti C, Bauer B, Stauber RE. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41(6): 1376-82.

Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C viral infection. *N Engl J Med* 2001; 345 (1): 41-52.

Laurent UB, Tengblad A. Determination of hyaluronate in biological samples by a specific radioassay technique. *Anal Biochem* 1980; 109(2): 386-94.

Leandro G, Mangia A, Hui J, Fabris P, Rubbia-Brandt L, Colloredo G, Adinolfi LE, Asselah T, Jonsson JR, Smedile A, Terrault N, Paziienza V, Giordani MT, Giostra E, Sonzogni A, Ruggiero G, Marcellin P, Powell EE, George J, Negro F. Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology* 2006; 130(6): 1636-42.

Lee WM. The silent epidemic of hepatitis C. *Gastroenterology* 1993; 104: 661-662.

Leroy V, Traversay C, Barnoud R, Hartmann JD, Baud M, Ouzan D, Zarski J. Changes in histological lesions and serum fibrogenesis markers in chronic hepatitis C patients non-responders in interferon alpha. *J Hepatol* 2001; 35(1): 120-6.

Lewin M, Poujol-Robert A, Boelle PY, Wendum D, Lasnier E, Viallon M, Guechot J, Hoeffel C, Arrive L, Tubiana JM, Poupon R. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 46(3): 658-65.

Liang TJ, Reherman B, Seef LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Annals of Internal Medicine* 2000; 132: 296-305.

Luo JC, Hwang SJ, Chang FY, Chu CW, Lai CR, Wang YJ, Lee SD. Simple blood tests can predict compensated liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2002; 49(44): 478-81.

Lyra A, Braga E, Lyra L. Hepatite C: Da transmissão ao tratamento. *Moderna Hepatologia*, 2004; 30: 11-19.

Mallat A, Preaux AM, Blazejewski S, Rosenbaum J, Dhumeaux D, Mavrier P. Interferon alfa and gamma inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture. *Hepatology*. 1995; 21(4): 1003-10.

Manns M, McHutchison J, Gordon S, Rustgi V, Shiffman M, Reindollar R, Goodman Z, Koury K, Ling M, Albrecht J. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-965.

Martinot-Peignoux M, Boyer N, Lê Breton V, Lê Guludec G, Castelnau C, Akremi R, Marcellin P. A new step toward standardization of serum hepatitis C vírus - RNA quantification in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31:726-29.

Martins JR, Passerotti CC; Maciel RM, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay an serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem* 2003; 319(1): 65-72.

McHutchison JG, Blatt LM, Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, Tong MJ. Measurement of Serum Hyaluronic Acid in Patients with Chronic Hepatitis C and Its Relationship to Liver Histology. Consensus Interferon Group. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15(8): 945-51.

McHutchison JG, Dienstag JL. American Gastroenterological Association. Medical Position Statement on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 2006; 130: 225-30.

Mendes CGF. Estudo de marcadores indiretos do grau de desarranjo estrutural do parênquima hepático em portadores do vírus da hepatite C. [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 2002.

Menghini G. One-second needle biopsy of the liver. *Gastroenterology* 1958; 35: 190-9.

Moreno MG, Muriel P. Remission of liver fibrosis by interferon-alpha 2b. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(4): 515-20.

Muerhoff AS, Jiang L, Shah DO, Gutierrez RA, Patel J, Garolis C, Kyrk CR, Leckie G, Frank A, Stewart JL, Dawson GJ. Detection of HCV core antigen in human serum and plasma with an automated chemiluminescent immunoassay. *Transfusion* 2002; 42(3): 349-56.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative. Biology* 1986; 51:263-73.

Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, Nishimura Y, Kawasaki H. Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11(5): 459-65.

Murawaki Y, Ikuta Y, Idobe Y, Koda M, Kawasaki H. Molecular weight of hyaluronate in the serum of patients with chronic liver disease. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998; 99(2): 207-16.

Murawaki Y, Koda M, Okamoto K, Mimura K, Kawasaki H. Diagnostic value of serum type IV collagen test in comparison with platelet count for predicting the fibrotic stage in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(7): 777-81.

Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging

and grading in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2001; 36(6): 399-406.

Myers RP, Ratziu V, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Poynard T. Multiviric Group. Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with histological features in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(9): 2419-25.

Myers RP, Torres M, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Charlotte F, Poynard T. Biochemical markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis c: a comparison with prothrombin time, platelet count and age-platelet index. *Dig Dis Sci* 2003; 48(1): 146-53.

Nagamine T, Ohtuka T, Takehara K, Arai T, Takagi H, Mori M. Thrombocytopenia associated with hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 1996; 24(2): 135-40.

National Digestive Diseases Information Clearinghouse (NDDIC). Chronic Hepatitis C: Current Disease Management. NIH Publication 2006; 07-4230: 1-26.

Nguyen-Khac E, Capron D. Noninvasive diagnosis of liver fibrosis by ultrasonic transient elastography. (Fibroscan). *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18(12): 1321-5.

Ninomiya T, Yoon S, Hayashi Y, Sugano M, Kumon Y, Seo Y, Shimizu K, Kasuga M. Clinical Significance of serum hyaluronic acid as a fibrosis marker in chronic Hepatitis C Patients treated with interferon- alpha: histological evaluation by a modified histological activity index scoring system. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13(1):66-74.

Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Aube C, Gallois Y, Rifflet H, Maiga MY, Penneau-Fontbonne D, Cales P. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113(5): 1609-16.

Ogawa E, Furusyo N, Toyoda K, Takeoka H, Otaguro S, Hamada M, Murata M, Sawayama Y, Hayashi J. Transient elastography for patients with chronic hepatitis B and C virus infection: Non-invasive, quantitative assessment of liver fibrosis. *Hepatology* 2007; 37(12): 1002-10.

Oh S, Afdhal N. Hepatic fibrosis: are any of the serum markers useful? *Current Gastroenterology Reports* 2001; 3:12-18.

Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Izuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 1991; 72: 2697-704.

Olga O, Nikolai D. Invasive and non-invasive monitoring of hepatitis C virus induced liver fibrosis: alternatives or complements? *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2003; 4; 195-209.

Oliveira AC. Níveis séricos de ácido hialurônico e laminina e do teste respiratório da <sup>13</sup> c -metacetina na avaliação das alterações estruturais e da ativação microssomal hepática em portadores de hepatite crônica pelo vírus C. [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 2003.

Parés A, Deulofeu R, Giménez A, Caballería L, Bruguera M, Caballería J, Ballesta AM, Rodés J. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1996; 24(6):1399-403.

Parise ER. Fibrose Hepática. In: Silva AO, D'Albuquerque LAC. Doenças do Fígado. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001, p.1359-68.

Parise ER, Meirelles A, Martinelli A, Lacet C, Crespo D, Correa E, Cotrim H, Sette H, Cheinquer H, Gallizi J, Fonseca JC, Pessoa M, Lima L, Pereira L, Paraná R, Silva RC, Teixeira R, Spinelli, Amorim W, Tatsch F. Peginterferon



alfa-2 a (40KD) and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C who did not response to, or relapsed after combination interferon alfa and ribavirin treatment: preliminary results of an ongoing prospective multicenter trial. *J Hepatology* 2003; 38(sup2):161.

Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, Lanzoni V, Martins J, Nader H, Ferraz ML. Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C Virus infection. *Liver Int* 2006; 26(9): 1095-9.

Passos ADC, Gomes UA, Figueiredo JFC, Nascimento MMP, Oliveira JM, Gaspar AMC, Yoshida CFT. Influência da migração na prevalência de marcadores sorológicos de hepatite B em comunidade rural. 1- Análise da prevalência segundo local de nascimento. *Rev Saúde Pública* 1993; 27(1): 30-5.

Patel K, Lajoie A, Heaton S, Pianko S, Behling CA, Bylund D, Pockros PJ, Blatt LM, Conrad A, McHutchison JG. Clinical uses of hyaluronic acid as a predictor of fibrosis change in hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 18(3) 253-7.

Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, Pawlotsky JM, McHutchison JG. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004; 41(6): 935-42.

Pawlotsky JM, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, Soussy CJ, Dhumeaux D. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998; 27(6): 1700-2.

Penin F. Structural biology of hepatitis c virus. *Clin Liv Dis* 2003; 7: 1-22.

Plevris JN, Haydon GH, Simpson KJ, Dawkes R, Ludlum CA, Harrison DJ, Hayes PC. Serum hyaluronan - a non invasive test for diagnosing liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(10): 1121-7.

Pohl A, Behling C, Oliver D, Kilani M, Monson P, Hassanein T. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(11).

Pol S, Carnot F, Nalpas B, Lagneau JL, Fontaine H, Serpaggi J, Serfaty L, Bedossa P, Bréchet C. Reversibility of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hum Pathol* 2004; 35(1):107-12.

Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2000; 31(4): 828-33.

Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology*; 2005; 42(1): 5-13.

Powell LW, Kerr JF. Reversal of "cirrhosis" in idiopathic hemochromatosis following long-term intensive venesection therapy. *Australas Ann Med* 1970; 19(1): 54-7.

Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Chevret S, Jardel C, Moussalli J, Messous D, Degos F. Germed Cyt04 Group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *Journal of Viral Hepatitis* 2002; 9:128-33.

Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122(5):1303-13.

Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, Myers RP, Muntenau M, Ratziu V, Manns M, Vogel A, Capron F, Chedid A, Bedossa P. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003; 38(3) 257-65.

- Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003; 362: 2095-100.
- Poynard T. Treatment of cirrhotic patients in the pegylated interferon era. *Dig Liver Dis* 2004; 36: S344-8.
- Poynard T, Halfon P, Castera L, Charlotte F, Le Bail B, Munteanu M, Messous D, Ratziu V, Benhamou Y, Bourlière M, De Ledinghen V. Variability of the area under the receiver operating characteristic curves in the diagnostic evaluation of liver fibrosis markers: impact of biopsy length and fragmentation. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25(6): 733-9.
- Poynard T, Halfon P, Castera L, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Benhamou Y, Bourliere M, de Ledinghen V. Standardization of ROC curve areas for diagnostic evaluation of liver fibrosis markers based on prevalences of fibrosis stages. *Clin Chem* 2007; 53(9): 1615-22.
- Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, Millian SJ. Long incubation post transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. *Lancet* 1974; 2: 241-6.
- Reedy DW, Loo AT, Levine RA. AST/ALT ratio  $\geq 1$  is not diagnostic of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1998; 43(9): 2156-9.
- Regev A, Schiff ER. Viral hepatitis A, B, and C. *Clin Liv Dis* 2000; 4:47-71.
- Richardson MM, Powell EE, Barrie HD, Clouston AD, Purdie DM, Jonsson JR. A combination of genetic polymorphisms increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C. *J Med Genet* 2005; 42(7): 45.
- Romagnuolo J, Jhangri GS, Jewell LD, Bain VG. Predicting the liver histology in chronic hepatitis C: how good is the clinician? *Am J Gastroenterol* 2001; 96(11): 3165-74.

Romão JRJE. Hepatite B em hemodiálise. *J Bras Nefrol* 1984; 6: 2-3.

Roy KM, Goldberg D, Taylor A, Mills P. Investigating the source of hepatitis C virus infection among individuals whose route of infection is undefined: a study of ten cases. *Scand J Infect Dis* 2003; 35(5): 326-8.

Rustgi VK. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. *J Gastroenterol* 2007; 42(7) 513-21.

Ryder SD, Irving WL, Jones DA, Neal KR, Underwood JC. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut* 2004; 53(3): 451-5.

Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R. Transient Elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29(12): 1705-13.

Santos VN. Valor das dosagens séricas de laminina, ácido hialurônico e colágeno tipo IV em predizer fibrose na doença hepática gordurosa não alcoólica. [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 2002.

Sarrazin C, Teuber G, Kokka R, Rabenau H, Zeuzem S. Detection of residual hepatitis C virus RNA by transcription-mediated amplification in patients with complete virologic response according to polymerase chain reaction-based assays. *Hepatology* 2000; 32(4): 818-23.

Schiavon LL, Schiavon JL, Filho RJ, Sampaio JP, Lanzoni VP, Silva AE, Ferraz ML. Simple blood tests as noninvasive markers of liver fibrosis in hemodialysis patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2007; 46(6): 307-14.

Sebastiani G; Alberti A. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J Gastroenterol* 2006; 12(23): 3682-94.

Seef L. Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S 35-46.

Sene D, Limal N, Messous D, Ghillani-Dalbin P, Charlotte F, Thiolliere JM, Piette JC, Imbert-Bismut F, Halfon P, Poynard T, Cacoub P. Biological markers of liver fibrosis an activity as non-invasive alternatives to liver biopsy in patients with chronic hepatitis C and associated mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Clin Biochem* 2006; 39(7) 715-21.

Serfaty L, Giral P, Loria A, Andreani T, Legendre C, Poupon R. Factors predictive of the response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 1994; 21(1)12-7.

Serpaggi J, Carnot F, Nalpas B, Canioni D, Guechot J, Lebray P, Vallet-Pichard A, Fontaine H, Bedossa P, Pol S. Direct and indirect evidence for the reversibility of cirrhosis. *Hum Pathol* 2006; 37(12): 1519-26.

Shaw-Stiffel T. Epidemiology and transmission. In: Shaw-Stiffel T. *Hepatitis C Infection*. London: Science Press, 2004, p.13-8.

Sherlock S, Dooley J. Assessment of liver function. In: *Diseases of the Liver and Biliary System*. London: Blackwell Science, 1997, 10<sup>a</sup> ed, chapter 2, p.17-32.

Sherman KE, Goodman ZD, Sullivan ST, Faris-Young S. Liver biopsy in cirrhotic patients. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(4): 789-93.

Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *AM J Gastroenterol* 1998; 93(1): 44-8.

Shiffman ML, Hofmann CM, Contos MJ, Luketic VA, Sanyal AJ, Sterling RK, Ferreira-Gonzalez A, Mills AS, Garret C. A randomized, controlled trial of maintenance interferon therapy for patients with chronic hepatitis C virus and persistent viremia. *Gastroenterology* 1999; 117(5): 1164-72.

Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, Yano M, Arakawa Y, Yokosuka O, Kuroki T, Nishiguchi S, Sata M, Yamada G, Fujiyama S, Yoshida H, Omata M. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 2000; 132(7): 517-24.

Silva AO, Santos TE, Sesti FS, Melo CRR, D'Albuquerque LAC. Biópsia hepática. In: Silva AO, D'Albuquerque LAC. *Doenças do Fígado*. Rio de Janeiro, 2001, cap. 21, p. 214-218.

Silva IS, Feraz ML, Lanzoni VP, Figueiredo VM, Silva AE. Role of gamma-glutamyl transferase activity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19(3): 314-8.

Stickel F, Poeschl G, Schuppan D, Conradt C, Anke-Streng-Hesse, Fuchs FS, Hofmann WJ, Seitz HK. Serum hyaluronate correlates with histological progression in alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 945-50.

Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 1996; 34(9): 2259-66.

Suzuki K, Endo R, Takikawa Y, Nakadate I & Sato S. Serum hyaluronate in patients with acute and fulminant hepatitis. *J Gastroenterol* 1996; 31(2): 237-41.

Takamatsu S, Nakabayashi H, Okamoto Y, Nakano H. Noninvasive determination of liver collagen content in chronic hepatitis. Multivariate regression modeling with blood chemical parameters as variables. *J Gastroenterol* 1997; 32(3): 355-60.

Tallo T, Lappalainen M, Tefanova V, Priimägi I. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C in northern Estonia. *Acta Virol*; 2000; 44(3):175-8.

Taniguchi H, Iwasaki Y, Fujiwara A, Sakaguchi K, Moriya A, Yu PC, Takaki A, Fujioka S, Shimomura H, Shiratori Y. Long-term monitoring of platelet count, as a non-invasive marker of hepatic fibrosis progression and/or regression in patients with chronic hepatitis C after interferon therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; (1-2): 281-7.

Tengblad A. Quantitative analysis of hyaluronate in nanogram amounts. *Biochem J* 1980; 185(1): 101-5.

Testa E, Malfatti F, Milazzo S, Cordiviola C, Cotellessa T, Marabotto E, Giannini E, Ceppa P, Mamone M, Risso D, Testa R. Hyaluronic acid and aspartate aminotransferase levels normalized by liver function can reflect sinusoidal impairment in chronic liver disease. *Liver International* 2006; 26(4): 439-44.

Ueno T, Ide T, Hashimoto O, Uchimura Y, Torimura T, Kumashiro R, Inuzuka S, Satã M. Long-term follow-up of interferon-treated chronic hepatitis C and serum hepatitis fibrosis markers. *Hepatogastroenterology* 2001; 48(40): 1124-8.

Van Leeuwen DJ, Wilson L, Crowe DR. Liver biopsy In the Mid 1990s: Questions and Answers. *Sem Liver Dis* 1995; 15:340-59.

Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38(2): 512-26.

Wasley A, Alter M. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Sem Liver Dis* 2000; 20: 1-16.

Williams AL, Hoofnagle JH. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. *Gastroenterology* 1988; 95(3): 734-9.

Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DG, Petrik J, Alexander GJ. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1998; 5 (3): 187-92.

World Health Organization. Global surveillance and control of hepatitis C: Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J. Viral Hepat* 1999; 6(1): 35-47.

World Health Organization. Hepatitis C - global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec.* 2000;75(3):18-9.

Xie SB, Yao JL, Zheng RQ, Peng XM, Gao ZL. Serum hyaluronic acid, procollagen type III and IV in histological diagnosis of liver fibrosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2(1): 69-72.

Yamada M, Fukuda Y, Koyama Y, Nakano I, Urano F, Katano Y, Hayakawa T. Serum hyaluronic acid reflects the effect of interferon treatment on hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11(7): 646-51.

Yamada M, Fukuda Y, Nakano I, Isao N, Katano Y, Takamatsu J, Hayakawa T. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in hemophiliacs with hepatitis C virus associated chronic liver disease. *Acta Haematol* 1998; 99(4): 212-6.

Yu ML, Lin SM, Lee CM, Dai CY, Chang WY, Chen SC, Lee LP, Lin ZY, Hsieh MY, Wang LY, Chuang WL, Liaw YF. Simple noninvasive index for predicting long-term outcome of chronic hepatitis C after interferon-based therapy. *Hepatology.* 2006; 44(5): 1086-97.



Yun Z, Lara C, Johansson B, Rivera IL, Sönnnerborg A. Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. *J Med Virol* 1996; 49(3): 155-60.

Zaman A, Rosen HR, Ingram K, Corless CL, Oh E, Smith K. Assessment of FIBROSpect II to detect hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Am J Med* 2007; 120(3): 280. e9-14.

Zarife MA, Silva LK, Silva MB, Lopes GB, Barreto ML, Teixeira MG, Dourado I, Reis MG. Prevalence of hepatitis C vírus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100(7): 663-8.

Zheng M, Cai W, Weng H, Liu R. Determination of serum fibrosis indexes in patients with chronic hepatitis and its significance. *Chin Med J* 2003; 116(3): 346-9.

### **Referências da Análise Estatística**

Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. *Bioestatística* São Paulo: EPU, 1981.

Kleinbaum DG, Kupper LL, Muller KE, Nizam A. *Applied regression analysis and other multivariable methods*. Belmont: Duxbury Press, 1998.

Morettin P & Bussab W. *Estatística Básica*. São Paulo: Atual ED, 1982.

Siegel S. *Estatística não paramétrica*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981.

## ABSTRACT

**Introduction:** The chronic hepatitis C (CHC) has highly variable course, being habitually asymptomatic. The used laboratorial tests do not reflect with fidedignity the assessment of hepatic fibrosis. The hepatic biopsy involves costs, risks and difficulty of repetition during the evolution of chronic hepatitis. Some serum markers have been studied as alternative method for diagnosis of the liver fibrosis. **Objectives:** This study proposes to correlate the index aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT), the serum levels of gama-glutamyltransferase (GGT), platelet count, the index APRI (AST to platelet ratio index) and the hyaluronic acid (HA) to the histological assessment (the gold standard) in CHC patients and to assess the variation of indirect markers of fibrosis antiviral after therapy. **Materials and methods:** The 72 studied patients were divided-up into two groups according to the degree of fibrosis (F), using the METAVIR score (GI:F= 0, 1 and 2; n=48 / GII:F=3 and 4; n=24). The concentrations of AST, ALT, GGT, platelets and HA, were dosed in the blood peripheral (by means of immunefluorimetric method), and from these values the indexes AST/ALT and APRI were calculated. The values were expressed with mean±standard shunting and the statistic analysis were used the tests t of student and correlation of Spearman. In the cases which the means were different, the curves ROC were constructed and calculated sensibility, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of these variables. 65 patients received treatment with Interferon associated to Ribavirina. The patients that have completed the treatment were submitted to new dosage of the serum markers six months after the ending of the antiviral therapy and we have used techniques of analysis of variance (ANOVA) for assessment of the repeated measures. **Results:** The levels of hyaluronic acid were significantly more raised in the group with advanced liver fibrosis (GII 68,9±41,2ng/ml x GI 27,3±12.5ng/ml) and correlated themselves to the assessment of hepatic fibrosis ( $p<0,01$ ); sensibility, specificity, PPV and NPV were 79,2%, 85,4%, 73% and 89% respectively. The others markers tested - GGT, platelet count and index APRI - also have presented significant difference among the groups with initial and advanced fibrosis, except the index AST/ALT. The analysis of the areas under the ROC curves (AUC) evidenced that the markers which more have correlated themselves with the degree of liver fibrosis were the index APRI and HA levels - AUC (APRI) = 0,85 and AUC (HA) = 0,86. Until the final assessment of this study, 33 patients concluded the treatment (19 responders and 14 non-responders). Among the studied markers, the serum concentration of GGT and the index APRI have shown

reduction in responders and non-responders, but just hyaluronic acid felt only complete responders ( $p < 0,05$ ). The serum markers haven't presented association with the virological response. **Conclusions:** The index APRI and the hyaluronic acid have shown greater predictive value in the histological assessment of CHC patients and might be an alternative to liver biopsy. Serum hyaluronic acid measurement presented association with the virological response.

**ANEXO**

---

## Anexo I - Dados referentes aos 72 pacientes incluídos

Paciente	nome	Sexo	Idade	Tratamento antiviral	Metavir	AST/ ALT	GGT	Plaquetas	APRI	AH	Albumina	INR	PCRHCV	Genotipo	PCR pós- trat.	AST/ALT pós-trat.	GGT pós- trat.	PLT pós- trat.	APRI pós- trat.	AH pós- trat.
1	FCC	M	52	não concluído	A1F1	0,83	110	222000	0,65	18,5	4	1	2026106	1						
2	VMOF	F	56	não concluído	A2F1	1,08	33	105000	0,64	6,5	4,3	1,05	177226	3						
3	ATL	M	52	não concluído	A2F3	0,69	103	204000	1,58	24,3	4,25	1,03	727585	3						
4	MQP	F	41	Interrompido	A2F0	0,56	30	265200	0,21	14,1	3,53	0,99	494940							
5	NBM	M	66	Concluído (Peg/Rib)	A2F2	0,7	287	158000	0,82	39,8	3,1	1,15	1803730	1	negativo	0,83	155	116000	0,73	35,5
6	JLS	M	65	Concluído (Peg/Rib)	A1F2	1,31	16	138000	0,69	24,7	4,73	1,17	129572	1	positivo	1,44	17	59000	0,97	24,1
7	IBC	M	48	Concluído (Peg/Rib)	A2F3	0,57	175	155000	0,94	11,4	3,5	1	31259	3	negativo	0,89	127	207000	0,41	13,4
8	WLMM	M	44	Concluído (Peg/Rib)	A2F2	0,45	58	159000	1,53	29,7	3,2	1,1	448189	3	negativo	1,8	30	322000	0,14	6,9
9	NBW	F	46	não concluído	A2F1	0,86	28	293000	0,6	12,8	2,5	1,2	293421	3						
10	LCMA	M	44	não tratado	A3F2	0,23	40	168700	0,39	8,6	3,4	1,36	122222							
11	CPS	F	57	não concluído	A2F4	0,94	138	164000	2,15	80,4	4,32	1,14	1215	3						
12	LMSRA	F	49	não concluído	A2F3	1,08	46	167000	0,57	42,2	2,9	1,2	528047	3						
13	ADL	M	46	Concluído (Peg/Rib)	A2F1	0,59	78	184000	1,98	12,6	4,42	1,18	705833	3	positivo	1,4	46	220000	0,32	26,2
14	CSS	F	62	Concluído (Peg/Rib)	A1F2	1,31	81	249000	0,21	45,2	4,4	1,34	113977	1	positivo	2,11	178	240000	0,39	73,5
15	ISC	F	53	Concluído (Peg/Rib)	A2F2	1,07	145	372000	0,3	23,3	3,8	1	48578	1	negativo	1,26	51	321000	0,18	11,2
16	DVA	F	51	Concluído INF 3.0/Rib	A1F1	0,59	114	271000	0,2	17,3	3,8	1,08	61934	1	negativo	2,14	24	206000	0,18	26,7
17	EAF	M	41	não tratado	A2F1	0,57	22	239000	0,6	13,4	4,14	0,9	1280125	3						
18	MFS	M	57	não concluído	A2F1	0,8	195	352000	0,52	36,9	3,8	1,6	657405	1						
19	MBF	M	54	Interrompido	A3F4	1,62	145	181000	1,55	116,5	3,8	1,22	38138	3						
20	EAS	M	52	não concluído	A2F1	0,47	117	214000	0,44	17,9	4,8	0,88	151965	1						
21	SC	M	49	não concluído	A2F2	0,94	121	114000	3,29	52,6	4,29	1,05	406483	3						
22	LAO	M	65	Concluído (Peg/Rib)	A2F3	0,81	71	84000	1,79	44	4,2	1,34	164598	1	positivo	4	51	177000	0,62	78,3
23	MFBD	F	49	Concluído INF 3.0/Rib	A1F1	0,94	118	162000	0,48	5,6	2,9	1,2	166362	1	negativo	1,37	78	222000	0,12	5,0
24	RNL	F	38	Concluído INF 3.0/Rib	A2F1	0,76	34	341000	0,21	9,4	4,4	1	95586	3	negativo	1,64	19	245000	0,23	11,5
25	TMP	M	56	não concluído	A2F2	1,81	122	159000	1,26	31,2	3,88	1,04	570917	1						
26	BOD	M	62	não tratado	A2F1	0,65	78	211000	0,78	39,9	4,1	1,02	850000	1						
27	AJCG	M	49	não concluído	A2F3	0,84	165	124000	3,65	113,5	3,5	1	152580	1						
28	SICC	M	59	não concluído	A0F2	0,5	27	224000	0,32	16,1	3,5	1,2	1115000	1						
29	JFCN	M	51	não tratado	A1F2	0,49	260	268000	1,04	17,6	3,4	1,03	246761	3						
30	IPS	F	53	Concluído (Peg/Rib)	A2F3	1,17	103	51000	9,71	48,2	4,03	1,55	92584	3	negativo	4,5	101	166000	0,54	47,3
31	JSSF	M	53	Concluído (Peg/Rib)	A1F1	3,85	36	240000	0,52	27,1	3,87	1	753242	1	negativo	1,27	12	160000	0,44	8,2
32	ESS	M	47	Concluído (Peg/Rib)	A2F3	1,07	53	148680	1,83	96,4	3,56	1,34	318493	1	positivo	1,21	121	55000	5,27	90,9

Paciente	nome	Sexo	Idade	Tratamento antiviral	Metavir	AST/ ALT	GGT	Plaquetas	APRI	AH	Albumina	INR	PCRHCV	Genotipo	PCR pós- trat.	AST/ALT pós-trat.	GGT pós- trat.	PLT pós- trat.	APRI pós- trat.	AH pós- trat.
33	MJS	F	46	Concluído (Peg/Rib)	A0F2	1,13	28	172000	0,38	25,9	4	1	520186	1	positivo	1,8	52	167000	0,27	18,2
34	MJS 2	F	70	Interrompido	A2F4	1,67	64	337000	1,59	167,8	4,85	1,41	749091							
35	AAP	M	61	não concluído	A2F3	0,73	44	161000	0,61	32,9	4,19	1	481954	1						
36	JPAS	M	20	Concluído (Peg/Rib)	A0F2	0,65	23	144000	0,85	24,2	4,4	1,03	323074	1	positivo	0,54	4	148000	0,61	11,4
37	MILN	F	70	Concluído (Peg/Rib)	A2F3	0,86	102	131000	0,61	32,6	4,3	1,01	1987052	1	negativo	1,03	59	145000	0,46	23,6
38	EMM	M	63	não concluído	A0F1	1,02	103	230000	0,45	37,6	4,1	1	974	1						
39	NFVB	F	60	não tratado	A1F2	1,26	57	241000	0,35	26,9	3,4	1,14	17217	1						
40	JRS	M	62	não concluído	A0F2	2,02	51	193000	1,13	43,1	4,5	1,23	1795440	1						
41	JGAB	M	62	não concluído	A0F1	0,64	43	157000	0,57	33,9	3,8	1	40808	1						
42	CAA	M	53	não concluído	A2F2	1,07	140	85400	4,22	56,9	4,2	1	823543	1						
43	SBS	M	53	não concluído	A3F4	1,38	321	71000	5,6	73,2	4	1,48	771041	1						
44	JLFL	M	47	Concluído (Peg/Rib)	A3F3	1,09	267	113000	4,45	108,4	3,3	1,3	850000		negativo	0,89	194	82800	1,2	63,8
45	MJGS	F	51	não concluído	A2F2	1,24	127	251400	0,56	31,7	4,2	1,1	positivo	3						
46	ACCL	M	32	não concluído	A2F2	0,58	32	131000	0,72	47,6	4,2	1,1	10030212	1						
47	AMGS	M	54	Concluído (Peg/Rib)	A2F3	0,75	209	143000	1,42	52,7	4,27	1,24	130657	1	positivo	0,88	39	109000	0,66	55,0
48	HBR	F	68	não concluído	A2F2	1,07	47	250000	0,88	38,7	4,22	1,03	520270	3						
49	CRS	M	66	não concluído	A2F3	0,69	168	140000	1,86	57,9	3,4	1,25	251911	1						
50	JGS	M	65	Concluído (Peg/Rib)	A2F3	0,69	89	167000	1,74	64,1	4	1,12	32026670	1	negativo	1,09	19	193000	0,31	17,3
51	RCJ	M	49	não concluído	A1F2	0,63	21	207000	0,31	27,3	4,75	1	6581517	1						
52	GLS	F	42	Concluído (Peg/Rib)	A2F3	1,07	35	402000	0,37	20	4	1,08	126093	1	negativo	1,14	33	339000	0,17	3,5
53	SMRM	F	66	Concluído (Peg/Rib)	A3F3	0,98	204	143000	4,98	120,3	3,9	1	482012	3	negativo	1,23	56	138000	0,49	79,0
54	ABM	M	54	não tratado	A2F2	3	139	333000	0,54	22,6	3,7	1,24	204266	2						
55	MLLM	F	64	não tratado	A2F1	1,27	46	223000	0,43	37	4,09	1,04	490456	3						
56	NCR	F	61	Concluído (Peg/Rib)	A0F2	1,63	32	240000	0,32	26	4,31	1,16	80769	1	negativo	1,72	45	161000	0,29	10,4
57	JCAS	M	38	Concluído (Peg/Rib)	A1F2	0,73	65	251000	0,49	38	3,7	1,85	850000		positivo	0,79	118	157000	0,56	138,0
58	JTS	M	52	Concluído (Peg/Rib)	A2F3	0,69	330	104000	5,05	51	4,5	1	602914	1	positivo	3,19	284	104000	2,84	32,3
59	JCRB	M	45	não concluído	A1F2	0,48	127	147000	0,49	45,8	4	1,08	3086440	1						
60	VLGA	F	46	Concluído (Peg/Rib)	A2F3	1,34	54	194000	0,97	40,3	3,95	1	positivo	1	positivo	2,92	26	138000	0,63	47,0
61	JPC	M	38	não concluído	A2F1	0,55	27	224200	0,29	16,4	4,7	1,12	7520							
62	TCAF	F	51	não concluído	A2F2	0,46	17	241000	0,43	25,1	4,2	1,12	88352	3						
63	EFO	F	52	Concluído (Peg/Rib)	A0F2	0,83	15	255000	0,25	22,3	4,16	1	144445	1	negativo	0,95	11	222000	0,22	12,4
64	JFS	M	51	Concluído INF 3.0/Rib	A1F1	1,11	14	220000	0,22	18,6	4,4	1,34	272414	1	negativo	1,63	12	180000	0,25	14,1
65	PJA	M	57	Interrompido	A2F3	0,64	100	142000	1,69	69,4	4,18	1,55	7000	1						
66	IJF	M	54	Concluído (Peg/Rib)	A3F4	0,98	125	138000	0,85	144,1			positivo		positivo	2,3	116	119000	0,63	98,8
67	EAJ	M	51	não concluído	A1F1	0,58	81	270000	0,73	21,2	3,98	1,06	525714	3						

Paciente	nome	Sexo	Idade	Tratamento antiviral	Metavir	AST/ALT	GGT	Plaquetas	APRI	AH	Albumina	INR	PCRHCV	Genotipo	PCR pós-trat.	AST/ALT pós-trat.	GGT pós-trat.	PLT pós-trat.	APRI pós-trat.	AH pós-trat.
68	MFMS	F	49	Concluído (Peg/Rib)	A1F3	0,68	134	240000	0,67	42,1	3,67	0,98	399990	1	negativo	1,35	32	241000	0,24	7,2
69	JHS	M	64	Concluído (Peg/Rib)	A2F2	0,81	106	226000	2,12	15	3,3	1,14	881183	1	positivo	2,09	50	167000	0,66	36,3
70	MJPS	M	38	Concluído (Peg/Rib)	A0F2	1,1	11	210000	0,48	37,5	3,55	1,1	positivo		negativo	7	32	236000	0,22	6,9
71	EBS	M	49	não concluído	A2F2	0,71	67	299000	0,55	40,5	3,3	1,11	positivo							
72	SPC	F	60	Concluído (Peg/Rib)	A2F2	0,85	15	162000	0,86	28,5	3,6	1,14	2128944	1	positivo	0,85	32	159000	0,83	21,4

Diagnóstico histológico dos pacientes incluídos (N=72)

Estadiamento	N (%)
A0F1	2 (2,8)
A0F2	7 (9,7)
A1F1	6 (8,3)
A1F2	7 (9,7)
A1F3	1 (1,4)
A2F0	1 (1,4)
A2F1	10 (13,9)
A2F2	14 (19,4)
A2F3	16 (22,2)
A2F4	2 (2,8)
A3F2	1 (1,4)
A3F3	2 (2,8)
A3F4	3 (4,2)

A = Atividade necro-inflamatória; F = fibrose hepática

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)