

Érica Godinho Menezes

**ANÁLISE DE QUIMIOCINAS/CITOCINAS SÉRICAS COMO
BIOMARCADORES DE RESPOSTA TERAPÊUTICA EM
HEPATITE C CRÔNICA E PROTÓTIPO PARA MONITORAR
IMUNOTERAPIA DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Belo Horizonte - MG

2017

Érica Godinho Menezes

**ANÁLISE DE QUIMIOCINAS/CITOCINAS SÉRICAS COMO
BIOMARCADORES DE RESPOSTA TERAPÊUTICA EM
HEPATITE C CRÔNICA E PROTÓTIPO PARA MONITORAR
IMUNOTERAPIA DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto (área de concentração: Ciências Clínicas)

Orientadora: Profa. Rosângela Teixeira
Coorientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Belo Horizonte

2017

Menezes, Érica Godinho.
M543a Análise de quimiocinas/citocinas séricas como biomarcadores de resposta terapêutica em Hepatite C Crônica e protótipo para monitorar imunoterapia de doenças infecciosas [manuscrito]. / Érica Godinho Menezes. - - Belo Horizonte: 2017.
91f.: il.
Orientador: Rosângela Teixeira.
Coorientador: Olindo Assis Martins Filho.
Área de concentração: Saúde do Adulto.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Hepatite C Crônica. 2. Hepacivirus. 3. Quimiocinas. 4. Interferon-alfa/uso terapêutico. 5. Biomarcadores. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Teixeira, Rosângela. II. Martins Filho, Olindo Assis. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: WC 536

Bibliotecária Responsável: Cibele de Lourdes Buldrini Filogônio Silva CRB-6/999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Prof.a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitora de Pós-Graduação

Prof.a. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitora de Pesquisa

Prof.a. Adelina Martha dos Reia

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor

Prof. Humberto José Alves

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Prof.a. Valéria Maria Augusto

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Selmo Geber

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

Coordenadora

Prof.a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Sub-coordenadora

Prof.a. Suely Meireles Rezende

Colegiado

Prof. Eduardo Garcia Vilela

Prof.a. Gilda Aparecida Ferreira

Prof. Paulo Caramelli

Prof.a. Sarah Teixeira Camargos

Prof.a. Suely Meireles Rezende

Prof.a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Mônica Maria Teixeira (representante discente titular)

Letícia Lemos Jardim (representante discente suplente)

Aos meus pais, pelos traços e pelo sopro constante,

Ao Cristiano, que admirou e fez seguir,

Ao Henrique e à Leticia, porque a história não tem fim.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rosângela Teixeira, Profa. Titular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG, pelos quinze anos de trabalho sério e companheirismo. Ao abrir-me as portas do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, que ela coordena com tanto amor e competência, tornou-se exemplo e norte de vida científica para mim, orientando-me firmemente no desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, pesquisador exemplar e Coordenador do Laboratório de Biomarcadores do Centro de Pesquisas René-Rachou, Fiocruz, pela enorme dedicação, disponibilidade e fundamental otimismo. Oferecendo-nos a parceria do seu Serviço, ele foi capaz de manipular até mesmo as estrelas para que tudo desse certo, ensinando, com doçura e simplicidade, o essencial valor da sabedoria, do trabalho, do empenho, mas também das boas energias para o sucesso.

À Dra. Jordana Reis, pela paciência, presença, conhecimentos e presteza há anos, desde o início, sempre...

À Dra. Andrea Teixeira, pelo interesse, experiência e atuação tão essenciais à conclusão desta etapa.

Aos médicos, acadêmicos e colaboradores do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial aos queridos Geraldo, Diego, Raquel e Isabela, pela colaboração diária e pelo trabalho em equipe.

Aos pesquisadores do Centro de Pesquisas René-Rachou, por me oferecerem a estrutura e o privilégio de trabalhar e aprender com cada um deles.

À acadêmica e agora biomédica Ludmila Melo Cardoso, pela valiosa contribuição e por difundir ainda mais os nossos resultados.

Ao meu pequeno gênio Henrique, que com muita calma e disciplina me ensinou que, agindo assim, tudo dá certo, e à minha princesa Letícia, que consegue ser ainda mais objetiva do que eu, me revelando, com sua alegria, a simplicidade da vida.

Ao Cristiano, que após tantos anos ao meu lado, tornou-se fã incondicional do meu trabalho. Seu incentivo, sua compreensão e seu amor foram fundamentais em todos os momentos.

Ao meu pai poeta, Aloísio, e à mãe mais inteligente do mundo, Tânia, que com fé inabalável souberam ensinar aos filhos que liberdade, perseverança, coragem e humildade são essenciais para se alcançar a plenitude.

Aos meus irmãos Doutores, Rodrigo e Fabiana, que seguem brilhando, com currículos e virtudes que me inspiram cada vez mais.

Aos meus tios Cléa e Maurício, de cujas presenças e torcidas nunca abri mão.

À minha querida avó Maria, presente em todos os momentos especiais da minha vida.

À minha amiga-irmã Juliana Drumond, que sem ao menos sonhar em ver seu nome por aqui, se fez presente em meu caminho, trazendo leveza com suas histórias e sua amizade.

Aos pacientes que constituíram a casuística deste estudo, um agradecimento especial, com o profundo desejo de estar contribuindo para a melhora progressiva da saúde e da qualidade de vida de todos.

RESUMO

Introdução: A monitorização das alterações de biomarcadores desencadeadas por terapia baseada em citocinas pode fornecer informações relevantes capazes de subsidiar o desenvolvimento e a identificação de preditores de resposta terapêutica. Nesse estudo, investigou-se a associação entre níveis séricos de quimiocinas e citocinas com a resposta ao tratamento da hepatite C crônica com interferon peguilado-alfa (PEG-IFN) associado a ribavirina (RBV), que são drogas antivirais e imunomoduladoras.

Métodos: Níveis séricos de quimiocinas/citocinas foram quantificados em medidas longitudinais por citometria de fluxo em pacientes com hepatite C crônica e relacionados com a resposta ao tratamento com PEG-IFN e RBV, categorizada como falha terapêutica (não-resposta/NR ou recidiva/REC) e resposta virológica sustentada (RVS).

Resultados: Pacientes com RVS apresentaram menor estado pró-inflamatório no pré-tratamento, com níveis reduzidos de CXCL8/IL-8, IL-12 e IL-17, enquanto falha terapêutica foi associada a um padrão predominantemente inflamatório no pré-tratamento, com elevação dos níveis de CCL5/RANTES, IFN- α , IFN- γ , redução de IL-10 em NR e elevação de IL-6 e TNF. A incapacidade de sustentar níveis elevados de IFN- α durante o tratamento foi notada em pacientes com NR. O ambiente pró-inflamatório exacerbado no período pré-tratamento observado em pacientes com NR e REC foi acompanhado de uma rede restrita de conexões entre biomarcadores, enquanto pacientes com RVS apresentaram uma rede com conectividade integrada de citocinas.

Também foi notável que, ao longo do tratamento, pacientes com RVS apresentaram tendência ao desenvolvimento de um padrão de citocinas/quimiocinas semelhante ao observado em pacientes NR e REC no pré-tratamento.

O perfil de citocinas de pacientes com REC no per- e pós-tratamento foi semelhante ao de pacientes com RVS no período pré-tratamento.

A análise das alterações do índice 12 semanas de tratamento/pré-tratamento (*baseline-fold* ou índice T12/T0) distinguiu o IFN- α e o TNF como biomarcadores de elevado desempenho na avaliação do resultado do tratamento com PEG-IFN e RBV.

Conclusão: Um perfil de resposta imune pró-inflamatório no pré-tratamento parece ser preditor de falha terapêutica em pacientes infectados pelo HCV, genótipo 1, tratados com PEG-IFN e RBV. Por outro lado, a habilidade de desenvolver um perfil de resposta imune pró-inflamatória ao longo do tratamento parece ser preditora de resposta virológica sustentada. Os resultados

distinguem o IFN- α e o TNF séricos no pré-tratamento como biomarcadores de RVS de alta performance em pacientes infectados pelo GT1 tratados com Peg-IFN e RBV. Este modelo de análise poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas para infecções virais emergentes.

Palavras-chave: HCV; citocinas; quimiocinas; IFN- α ; biomarcadores.

ABSTRACT

Background: The follow-up of biomarker changes triggered by cytokine-based therapy may provide relevant insights to subsidize the development and identification of predictors of therapeutic response. This study related serum chemokine/cytokine levels to the response to chronic hepatitis C treatment with the antiviral and immunomodulator drugs PEG-IFN and RBV.

Methods: Longitudinal measurements of serum chemokine/cytokine levels were performed by cytometric-bead-array in patients with chronic hepatitis C, categorized according to virological response as non-responder/NR, relapser/REL and sustained-virologic-responder/SVR.

Results: Data demonstrated an overall increase of serum chemokine/cytokine levels in HCV patients. In general, therapeutic failure was associated with a predominant baseline proinflammatory pattern with enhanced CCL5/RANTES, IFN- α , IFN- γ , along with decreased IL-10 levels in NR and increased levels of IL-6 and TNF in REL. SVR patients displayed lower baseline proinflammatory status with decreased CXCL8/IL-8, IL-12 and IL-17 levels. The inability to uphold IFN- α levels during treatment was characteristic of NR. The prominent baseline proinflammatory milieu observed in NR and REL patients yielded a restricted biomarker network, whereas SVR displayed a network with integrated cytokine connectivity. Noteworthy was that SVR presented a shift towards a proinflammatory pattern upon immunotherapy, assuming a pattern similar to that observed in NR and REL at baseline. Moreover, REC patients presented cytokines levels after or along treatment towards a profile similar to SVR at baseline. Analysis of baseline-fold changes during treatment pointed out IFN- α and TNF as high-performance biomarkers to monitor immunotherapy outcome.

Conclusion: The baseline proinflammatory status seems to predict non-response to PEG-IFN e RBV therapy in patients with chronic hepatitis C infected with HCV GT1. The ability to develop a proinflammatory profile during the treatment seems to predict SVR. The results highlight baseline IFN α and TNF as high performance biomarkers of SVR in GT1 infected

patients treated by Peg-IFN and RBV. This knowledge may contribute for novel insights into the treatment and control of the continuous public health threat posed by the spreading/emerging viral infections.

Keywords: HCV; cytokines, chemokines; IFN- α ; biomarkers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Overall Profile of Serum Chemokines and Cytokines in Non-treated HCV Patients</i>	<i>63</i>
Figura 2.	<i>Serum Chemokines and Cytokines in HCV Patients According to the Therapeutic Response</i>	<i>65</i>
Figura 3.	<i>Serum Chemokine and Cytokine Signatures in HCV Patients According to the Therapeutic Response</i>	<i>67</i>
Figura 4.	<i>Biomarker Networks of HCV Patients According to the Therapeutic Response</i>	<i>69</i>
Figura 5.	<i>Serum Chemokine and Cytokine Baseline-fold (T12/T0) in HCV Patients According to the Therapeutic Response</i>	<i>71</i>
Figura 6.	<i>Performance of Baseline-fold Changes in IFN-α and TNF (T12/T0) to Monitor HCV Patients According to the Therapeutic Response.....</i>	<i>73</i>
Suppl. Figure 1.	<i>Establishment of Global Median Cut-off point to Quantify the Frequency of Subjects with “High” Serum Levels of Chemokines and Cytokines</i>	<i>75</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	<i>Demographic features and laboratorial records of HCV study group</i>	76
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

HCV	Vírus da hepatite C
Th	Linfócitos T auxiliares
IL-2	Interleucina 2
IFN- γ	Interferon-gama
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
Tregs	Células T regulatórias
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tc1	Células T citotóxicas tipo 1
Tc2	Células T citotóxicas tipo 2
Tc	Células T citotóxicas
IL-10	Interleucina-10
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
IFN- β	Interferon-beta
ROI-C	Regiões de interesse circulares
CCI	Coefficiente de correlação intraclasse
IC	Intervalos de confiança
IMC	Índice de massa corpórea

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. PARECER ETIC – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG.....	82
ANEXO B. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA EM SERES HUMANOS	84
ANEXO C. APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS	85
ANEXO D. ACEITE DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	90
ANEXO E. FOLHA DE APROVAÇÃO	91

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	17
1.1 Aspectos gerais da resposta imune na hepatite C crônica.....	17
1.2 Citocinas e quimiocinas na patogênese da hepatite C crônica.....	19
1.3 Características da resposta imune durante o tratamento antiviral.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3. PACIENTES E MÉTODOS	31
3.1 Desenho do Estudo, pacientes e aspectos éticos.....	31
3.2 Protocolo de tratamento da hepatite C instituído no AHEV/IAG/HC/UFMG	32
3.3 Quantificação de quimiocinas e citocinas séricas.....	33
3.4 Análise estatística e abordagem dos sistemas biológicos.....	35
3.4.1 Análise estatística convencional.....	35
3.4.2 Análise da assinatura de biomarcadores.....	36
3.4.3 Abordagem de Biologia de Sistemas	36
3.4.3.1 Redes de biomarcadores	36
3.4.3.2 Construção dos mapas de calor (<i>heatmaps</i>).....	37
3.4.3.3 Árvores de decisão	37
3.4.3.4 Análise de performance de biomarcadores	38
4. ARTIGO	39
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 Aspectos gerais da resposta imune na hepatite C crônica

A descoberta do vírus da hepatite C (HCV), em 1989, permitiu que inúmeras pesquisas revelassem detalhes do complexo ciclo de vida desse patógeno humano. Trata-se de um vírus hepatotrópico, não-citopático, com alta capacidade de mutação, que resulta em numerosas sequências e quasispécies, todas dotadas de mecanismos bem desenvolvidos de evasão da resposta imune do hospedeiro e dos diferentes agentes antivirais, o que contribui para a cronicidade da infecção (LAUER *et al.*, 2001).

As interações entre o HCV e o sistema imune do hospedeiro são determinantes para a história natural da doença. A resposta imune inata desencadeada pelo HCV, em especial a produção de interferons e de citocinas pró-inflamatórias, modula a defesa antiviral precoce do hospedeiro e coordena a imunidade adaptativa subsequente. O hospedeiro humano apresenta, portanto, inúmeras formas de detectar a presença do HCV e desencadear a resposta imune inata precocemente, mas o HCV também desenvolveu estratégias elaboradas de evasão desse ataque imune (REHERMANN, 2000).

Uma resposta imune antiviral eficaz requer, essencialmente: a) mecanismos efetores da imunidade inata eficientes, como os interferons tipo I; b) órgãos linfóides anatomicamente intactos, capazes de gerar respostas antivirais satisfatórias por células B e T; c) resposta humoral (anticorpos), com capacidade neutralizante; d) mecanismos intactos de apresentação de antígenos; e e) respostas por linfócitos T auxiliares (Th) CD4+ e T citotóxicos CD8+ fortes e sustentadas (ZAJAC *et al.*, 1998).

A resposta imune vigorosa implica na migração de células T específicas para o fígado infectado (LECHNER *et al.*, 2000). Na maioria dos pacientes, essas células são incapazes de clarear a infecção. Assim, uma população de células T não-específicas é recrutada, sendo essas as responsáveis pelas lesões crônicas (BERTOLETTI *et al.*, 2000). O HCV não tem, portanto, ação citopática direta sobre os hepatócitos, e a resposta imune ao vírus parece ser a verdadeira responsável pelas lesões hepáticas. Parece ocorrer também uma transição deficiente da

imunidade inata para a adaptativa durante a infecção crônica pelo HCV (DOLGANIUC *et al.*, 2008), e o esforço coordenado dessas duas respostas é necessário para a eliminação do vírus (REHERMANN, 2009).

De acordo com diferenças fenotípicas e funcionais, as células T CD4⁺ podem ser classificadas em células Th1, que produzem as citocinas Th1 interleucina-2 (IL-2), TNF- α e IFN- γ (este, juntamente com várias células hepáticas parenquimatosas e não-parenquimatosas, induzem as quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11, ligadas ao CXCR3; células T Th1 também expressam CCR1 e CCR5, que levam a interações com CCL5, CCL3 e CCL4); Th2, que secretam as interleucinas -4 (IL-4), -5 (IL-5), -6 (IL-6), -10 (IL-10) e -13 (IL-13); Th17 (secretam IL-22, IL-266 e citocinas da família da IL-17); e regulatórias (Tregs), que secretam as citocinas regulatórias IL-4, IL-10 e TGF- β . As citocinas Th1 favorecem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, levando à resposta inflamatória, enquanto as citocinas Th2 limitam a resposta imune mediada pelas citocinas Th1 e favorecem o desenvolvimento da resposta humoral (Szabo *et al.*, 2005). Na infecção crônica pelo HCV, observa-se uma resposta fraca de células T CD4, com baixa especificidade e pouca produção de citocinas tipo-1 (GERLACH *et al.*, 1999).

As células T citotóxicas CD8⁺ podem clarear o HCV através dos mecanismos citolíticos (indução da apoptose celular) ou não-citolíticos, mediados por citocinas tipo-1 (IFN- γ , TNF- α). Constituem dois tipos: 1 (Tc1) - produzem IFN- γ e várias outras citocinas, mas não secretam IL-4; ou 2 (Tc2), ricas em IL-4, mas que não secretam IFN- γ . Juntas, as células Th e Tc constituem as células efetoras primárias e também as células de memória, com baixa funcionalidade na ausência de antígenos específicos, ou células efetoras de memória, ou seja, reativadas por antígenos específicos. Na infecção crônica pelo HCV, as células T CD8⁺ podem estar presentes em pequeno número e com menor potencial de secreção de citocinas tipo-1, o que pode ou não ser mediado por células T regulatórias (Tregs) (WOODLAND *et al.*, 2003).

Algumas células T têm propriedades regulatórias (Tregs), capazes de suprimir a ativação de células T efetoras em diferentes estágios da resposta imune (CHANG, 2007). Na infecção pelo HCV em humanos, as Tregs encontram-se aumentadas na fase aguda da infecção, estáveis durante as fases crônicas, e diminuídas, semelhantes a indivíduos não infectados, durante a

eliminação viral espontânea ou induzida pelo tratamento (SUGIMOTO *et al.*, 2003). Elas são capazes de, por exemplo, liberar IL-10 (que pode inibir células T CD8+) e TGF- β , bem como inibir a proliferação e a síntese de citocinas, regulando, portanto, as respostas humorais por mecanismos diretos ou indiretos, através de outras citocinas. A presença de Tregs foi demonstrada no fígado de pacientes com hepatite C crônica (CHANG, 2007).

1.2 Citocinas e quimiocinas na patogênese da hepatite C crônica

As citocinas são pequenas proteínas intermediadoras da resposta imune, secretadas por uma variedade de células T em resposta a estímulo imunológico (THIO *et al.*, 2008). Mais de uma centena de citocinas já foram descritas, e são classificadas de acordo com a sua função primária: a) interleucinas (ex: IL-1, IL-2 etc.); b) interferons tipo I (IFN- α e IFN- β); c) interferons tipo II (IFN- γ); d) fatores de necrose tumoral (TNF- α , TNF- β); e) fatores estimuladores de colônia (M-CSF; G-CSF, etc.); f) fatores de crescimento (EGF, NGF, etc.); e e) quimiocinas (CCL, CXCL, CX3CL, XCL- exemplos: CCL5, CXCL10, etc.) (STEINKE *et al.*, 2006). Essas proteínas estão envolvidas em todas as etapas da resposta imune, desempenhando também um papel na sua regulação. A combinação de citocinas liberadas em consequência a um estímulo antigênico específico determina o tipo de resposta imune a ser desenvolvida.

As quimiocinas contribuem para a vigilância, recrutam células imunes (leucócitos) para órgãos-alvo na homeostase e exercem efeitos pleiotrópicos em células não-imunes, influenciando a funcionalidade das células hepáticas estreladas fibrogênicas. As células imunes efectoras, por sua vez, apresentam diferentes combinações de receptores para quimiocinas (MARRA *et al.*, 2014). Assim, diferentes quimiocinas podem induzir efeitos diversos e mesmo antagônicos apesar de atuarem no mesmo receptor. O HCV é capaz de modular por si só a expressão de quimiocinas e de seus receptores, contribuindo para o escape eficiente às respostas imunes (MARRA *et al.*, 2014).

Quimiocinas podem pertencer a quatro subfamílias diferentes: CXC, CC, C e CX3C, dependendo da posição dos dois resíduos N-terminais de cisteína (ZEREMSKI *et al.*, 2007). A subfamília CXC pode ser subdividida em dois grupos, dependendo da presença ou não da

sequência ELR (Glu-Leu-Arg) precedendo a primeira cisteína: as quimiocinas ELR-CXC e as não-ELR-CXC. As quimiocinas da subfamília CC e do grupo não-ELR-CXC, cujos receptores são o CXCR3 e o CCR5, podem ser encontradas em células inflamatórias Th1. As quimiocinas não-ELR-CXC compreendem: a) a proteína 10 indutível pelo IFN- γ (IP-10, CXCL10); b) a monocina induzida pelo IFN- γ (Mig, CXCL9); e c) a célula T α quimioatraente induzida pelo IFN (I-TAC, CXCL11).

Na subfamília CC, em decorrência de sua relação com a inflamação Th1, merecem destaque: a) a célula T normalmente expressa e secretada, regulada por ativação (RANTES, CCL5); b) as proteínas 1 α inflamatórias dos macrófagos (MIP-1 α , CCL3); e c) as proteínas 1 β inflamatórias dos macrófagos (MIP-1 β , CCL4).

As quimiocinas CXCL10, CXCL9 e CXCL11 se ligam ao receptor CXCR3, enquanto as quimiocinas CCL5, CCL3 e CCL4 se ligam ao receptor CCR5. CXCR3 é expresso em células T ativadas e em células NK, e o receptor CCR5 é expresso principalmente em células T ativadas e de memória (ZEREMSKI *et al.*, 2007).

Os macrófagos hepáticos (ou células de Kupffer) são importantes sensores de estresse tecidual, disfunção ou lesão. Juntamente com as células endoteliais sinusoidais hepáticas, células hepáticas estreladas e células imunes locais, constituem as células hepáticas não-parenquimatosas, que atuam como fonte de quimiocinas e respondedoras às mesmas (MARRA *et al.*, 2014).

A agressão aos hepatócitos leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias (ex.: TNF), de quimiocinas e de espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio (LIASKOU *et al.*, 2013). O TNF secretado pelas células de Kupffer tem papel central na magnitude da lesão hepática, induzindo a apoptose de hepatócitos e o comprometimento da microcirculação hepática através do edema e ativação das células endoteliais com subsequente agregação plaquetária sinusoidal e facilitação da entrada das células imunes periféricas. As células de Kupffer ativadas secretam IL-1 β e quimiocinas CXC (como CXCL1, CXCL2 e CXCL8, que são quimiocinas chave para a atração dos neutrófilos, principalmente através dos receptores CXCR1 e CXCR2, levando à

necrose de hepatócitos) (ZIMMERMANN *et al.*, 2011). Paralelamente, as células de Kupffer, hepatócitos lesados e células hepáticas estreladas ativadas secretam altos níveis de CCL2, que promovem o acúmulo hepático de monócitos derivados da medula óssea que expressam CCR2 e que expandem o *pool* local de macrófagos (DAMBACH *et al.*, 2002). Outras quimiocinas também envolvidas na funcionalidade dos monócitos/macrófagos são CCL1 e CCL25, que promovem o recrutamento de monócitos via CCR8 e CCR9 respectivamente, e CX3CL1, que parece limitar as funções inflamatórias dos monócitos/macrófagos e prolongar a sobrevivência dos mesmos, contrabalanceando as vias inflamatórias das quimiocinas (HEYMANN *et al.*, 2012).

O fígado é rico também em componentes linfocitários do sistema imune inato, sendo que as células *natural killer* (NK) correspondem a 30% do total de células linfocitárias intrahepáticas, com funções citotóxicas e imunomoduladoras que respondem a diferentes quimiocinas, incluindo-se aí CCL5 via CCR1 e CXCL9/CXCL10 via CXCR3. Essas células constituem a primeira linha de defesa contra o HCV e são capazes de: a) promover a lise de células infectadas; b) produzir interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) cuja função é inibir a replicação viral sem destruir as células hepáticas; e c) direcionar as células inflamatórias para os hepatócitos infectados (RACANELLI *et al.*, 2006). As células NK podem levar à maturação total ou parcial das células dendríticas (DCs), sendo ativadas pela IL-12 que, por sua vez, é liberada pelas DCs (LARRUBIA *et al.*, 2009). Pacientes com hepatite C crônica apresentam níveis elevados de células NK CXCR3 CD56, porém com degranulação e secreção de IFN- γ deficientes (disfuncionais) (REHERMAN *et al.*, 2013).

As células NKT expressam marcadores de células NK e de células T, sendo responsáveis pela patrulha constante do fígado durante a homeostase. Logo após uma lesão, macrófagos hepáticos expressam altos níveis de CXCL16, que, via CXCR6, levam ao acúmulo de células NKT, o que parece ser um importante mecanismo de amplificação precoce dos sinais inflamatórios (WEHR *et al.*, 2013).

As DC são capazes de processar antígenos virais e apresentá-los a células específicas do sistema imune através de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classes I e II. Uma vez ativadas, essas células secretam vários tipos de citocinas (IL-12, TNF- α , IL-10) reguladoras da resposta de células adjacentes (BANCHEREAU *et al.*, 2000).

A inflamação crônica é fator importante de ativação das células hepáticas estreladas, miofibroblastos e fibroblastos, resultando em estímulo à fibrogênese através da produção e deposição de colágeno, laminina, fibronectina e proteoglicans no parênquima hepático. A ativação dessas células também é regulada por citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α , CCL-21 e PDGF, entre outros. A perpetuação desse processo resulta na cirrose hepática (TAUB *et al.*, 1999).

1.3 Características da resposta imune durante o tratamento antiviral

Estudos revelam que fatores imunes do hospedeiro podem também influenciar nas chances de resposta terapêutica ao esquema de tratamento da hepatite. O IFN- α (inicialmente utilizado em monoterapia) foi a única citocina usada no tratamento da hepatite C crônica, com efeito antiviral direto e imunomodulador, favorecendo a restauração das respostas Th1/Tc1. A ribavirina, que passou a ser associada ao IFN- α , apresenta efeitos imunomoduladores que induzem a produção de citocina tipo-1. A erradicação do HCV com agentes antivirais parece facilitar a resposta T específica, com produção de citocinas tipo-1 (LAGGING *et al.*, 2006).

O estudo do perfil sérico de quimiocinas/citocinas de pacientes com hepatite C crônica poderá colaborar para a maior compreensão da patogenia do HCV, objetivo importante desse estudo. Além disso, supõe-se que poderá ser útil como biomarcador para predizer, de forma não-invasiva, a resposta ao tratamento antiviral.

Dentre as várias quimiocinas estudadas, a CXCL10 destaca-se por seu potencial em tornar-se um importante biomarcador. Em pacientes com hepatite C crônica, a expressão de CXCL10 está aumentada tanto no fígado quanto na corrente sanguínea (MARRA *et al.*, 2014). Há forte associação entre os níveis de CXCL10 no sangue periférico e a atividade necroinflamatória na hepatite C crônica (HARVEY *et al.*, 2003). Sua expressão associa-se também com o grau de apoptose em pacientes com hepatite C, e esta ação é mediada pela ativação do receptor *toll-like* 4 (TLR-4) (SAHIN *et al.*, 2013). Os níveis intra-hepáticos e circulantes de CXCL10 foram ainda associados à extensão da fibrose hepática associada ao HCV (ZEREMSKI *et al.*, 2009; ROMERO *et al.*, 2006; TACKE *et al.*, 2011; ZEREMSKI *et al.*, 2011). Em pacientes tratados

com IFN- α convencional ou peguilado, os níveis periféricos de CXCL10 foram menores em pacientes que apresentaram resposta virológica sustentada (RVS) em relação aos controles, mas permaneceram elevados em indivíduos não-respondedores (NR). Os níveis periféricos de CXCL10 pré-tratamento também foram menores em pacientes com RVS comparados aos NR. (LAGGING *et al.*, 2006).

Níveis de CXCL9 estão elevados em pacientes com hepatite C crônica comparados a não-infectados, com queda ou estabilidade após o tratamento (APOLINARIO *et al.*, 2004; BUTERA *et al.*, 2005). Wan e colaboradores (2009) observaram que CXCL9, CXCL-10 e citocinas relacionadas à inflamação, especialmente a IL-6, encontravam-se temporariamente aumentadas tanto no pré-tratamento quanto nas fases iniciais (semana 2) em pacientes que apresentaram RVS, o que pode indicar uma possível relação entre a presença dessas citocinas e o clareamento do vírus C (WAN *et al.*, 2009). Níveis mais altos de citocinas Th1 (IL-2, TNF- α e IFN- γ) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) foram notados em pacientes sem RVS.

Já os estudos sobre a expressão de CCL5 na hepatite C crônica apresentam resultados divergentes na literatura. Sua expressão foi observada em vários tipos celulares, incluindo hepatócitos, células endoteliais sinusoidais e do epitélio biliar, com níveis intra-hepáticos aumentados em portadores do HCV comparados aos não-infectados (APOLINARIO *et al.*, 2002) e, nesses casos, maior expressão de CCL5 foi associada à atividade inflamatória. Alguns polimorfismos de CCL5 e CCR5 do hospedeiro têm sido associados à diminuição da inflamação portal e da fibrose em portadores crônicos do HCV (APOLINARIO *et al.*, 2002).

Estudos com CCL3 e CCL4 em pacientes com hepatite C crônica revelaram, em sua maioria, níveis intra-hepáticos normais, ao contrário dos níveis séricos, que estão aumentados. A localização celular dessas citocinas variou nos diferentes estudos, sendo detectadas primariamente em células endoteliais dos sinusóides, mas também em linfócitos intra-hepáticos, e, ainda, em algumas células epiteliais biliares ou mesmo no interior dos hepatócitos (LEIFELD *et al.*, 2003).

O tratamento da infecção crônica pelo HCV evoluiu, nos últimos anos, para o uso de esquemas livres de interferon, baseados na associação de inibidores de protease e de polimerase (WATANABE et al., 2016; OGAWA et al., 2016; POIZOT-MARTIN et al., 2016). Estudos vem mostrando, no entanto, que muitas citocinas apresentam potencial clínico no tratamento de doenças infecciosas, parasitárias, degenerativas e de etiologia alérgica. Dado o risco de idiosincrasia induzida pela imunoterapia, esforços devem se concentrar na identificação de biomarcadores capazes de prever precocemente a resposta terapêutica e garantir o monitoramento eficaz e a segurança do tratamento.

Visto que a regulação da ação das citocinas, quimiocinas e de seus receptores pode representar um alvo terapêutico de novas drogas em desenvolvimento, este parece ser um objetivo importante para novas investigações sobre biomarcadores em hepatite C crônica (LARRUBIA et al., 2008). Este modelo de análise poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas para infecções virais emergentes, tais como as arboviroses e as flaviviroses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.
2. Rehermann B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin liver Dis* 2000;20:127-141.
3. Zajac A, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive D, Suresh M, Altman JD and Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 1998;188:2205-2213.
4. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-1512.
5. Bertoletti A, Maini MK. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr Opin Immunol* 2000;12:403-408.
6. Dolganiuc A, Szabo G. T cells with regulatory activity in hepatitis C virus infection: what we know and what we don't. *Journal of Leukocyte Biology* 2008;84:614-622.
7. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *The Journal of Clinical Investigation* 2009;119:1745-1754.
8. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4 (+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999;117:933-941.
9. Woodland DL, Dutton RW. Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2003;15:336-342.
10. Chang KM. Regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *Hepatology Res* 2007;37:S327-S330.
11. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003; 38:1437-1448.
12. Thio C. Host genetic factors and antiviral immune responses to HCV. *Clin Liver Diseases* 2008;12(3):713-727.
13. Steinke JW, Borish L. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:S441-5.
14. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* 2014;147(3):577-94.

15. Zeremski M, Petrovic M, Talal AH. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 2007;14:675-687.
16. Liaskou E, Zimmermann HW, Li KK, et al. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology* 2013;57:385-98.
17. Zimmermann HW, Tacke F. Modification of chemokine pathways and immune cell infiltration as a novel therapeutic approach in liver inflammation and fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2011;10:509-36.
18. Dambach DM, Watson LM, Gray KR, et al. Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* 2002;35:1093-103.
19. Heymann F, Hammerich L, Storch D, et al. Hepatic macrophage migration and differentiation critical for liver fibrosis is mediated by the chemokine receptor C-C motif chemokine receptor 8 in mice. *Hepatology* 2012;55:898-909.
20. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006;43:S54-S62.
21. Larrubia JR, Benito-Martínez S, Miguel-Plaza J, Sanz-de-Villalobos E, González-Mateos F, Parra T. Cytokines-their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas* 2009;101:343-351.
22. Rehermann B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med* 2013;19:859-68.
23. Wehr A, Baeck C, Heymann F, et al. Chemokine receptor CXCR6-dependent hepatic NK T Cell accumulation promotes inflammation and liver fibrosis. *J Immunol* 2013;190:5226-36.
24. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
25. Taub R, Greenbaum LE, Peng Y. Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in the liver regeneration. *Semin Liver Diseases* 1999;19:117-127.
26. Lagging M, Romero AI, Westin J, et al. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 2006;44(6):1617-25.
27. Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 2003;74:360-369.

28. Sahin H, Borkham-Kamphorst E, do O NT, et al. Proapoptotic effects of the chemokine, CXCL 10 are mediated by the noncognate receptor TLR4 in hepatocytes. *Hepatology* 2013;57:797-805.
29. Zeremski M, Dimova R, Brown Q, et al. Peripheral CXCR3-associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2009;200:1774-80.
30. Romero AI, Lagging M, Westin J, et al. Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2006;194:895-903.
31. Tacke F, Zimmermann HW, Berres ML, et al. Serum chemokine receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases. *Liver Int* 2011;31:840-49.
32. Zeremski M, Dimova R, Astemborski J, et al. CXCL9 and CXCL10 chemokines as predictors of liver fibrosis in a cohort of primarily African-American injection drug users with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 2011;204:832-36.
33. Apolinario A, Diago M, Lo Iacono O et al. Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy. *Aliment Pharmacol Therapy* 2004;19:551-562.
34. Butera D, Marukian S, Iwamaye AE et al. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 2005;106:1175-1182.
35. Wan L, Kung YJ, Liao CC, et al. Th1 and Th2 cytokines are elevated in HCV-infected SVR(-) patients treated with interferon-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;379(4):885-60.
36. Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Perez E *et al.* Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *American Journal of Gastroenterology* 2002;97:2861-2870.
37. Leifeld L, Dumoulin FL, Purr I *et al.* Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure. *Journal of Pathology* 2003;199:335-344.
38. Watanabe T, Joko K, Seike H, Michitaka K, Horiike N, Kisaka Y, et al. Simeprevir with peginterferon/ribavirin for patients with hepatitis C virus genotype 1: high frequency of viral relapse in elderly patients. *Springerplus* 2016;5:518.
39. Ogawa E, Furusyo N, Yamashita N, Kawano A, Takahashi K, Dohmen K, et al. Effectiveness and safety of daclatasvir plus asunaprevir for HCV genotype 1b patients aged 75 and over with or without cirrhosis. *Hepatol Res* 2016. Doi: 10.1111/hepr.12738.

40. Poizot-Martin I, Bellissant E, Garraffo R, Colson P, Piroth L, Solas C et al. Addition of boceprevir to PEG-interferon/ribavirin in HIV-HCV-Genotype-1-coinfected, treatment-experienced patients: efficacy, safety, and pharmacokinetics data from the ANRS HC27 study. *HIV Clin Trials* 2016;17(2): 63-71.
41. Larrubia JR, Benito-Martínez S, Calvino M, et al. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology* 2008;14:7149-7159.
42. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções. Portaria SUS/MS nº 221 de 13/07/2011.
43. Zeuzem S. Interferon-based therapy for chronic hepatitis C: current and future perspectives. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 2008;5(11):610-22.
44. Craxi A, Pawlotsky JM, Wedemeyer H, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatitis C Virus Infection. *J Hepatol* 2011;55(2):245-264.
45. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seef LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011;54(4):1433-44.
46. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seef LB. AASLD Practice Guidelines: Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: an Update. *Hepatology* 2009;49(4):1335-74
47. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol.* 2006;146(1):124-32.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Analisar aspectos da imunidade induzida pelo tratamento de pacientes com hepatite C crônica com interferon peguilado (PEG-IFN) (alfa-2a ou alfa-2b) associado a ribavirina (RBV), pela caracterização do perfil de citocinas/quimiocinas séricas antes e durante o tratamento, visando identificar possíveis biomarcadores de infecção e de resposta terapêutica em hepatite C crônica.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Analisar o perfil das citocinas séricas IFN- α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 em pacientes com hepatite C crônica, infectados pelo genótipo 1 e tratados com PEG-IFN alfa-2a ou alfa-2b associado a RBV por 48 semanas, em momentos distintos: pré-tratamento (basal); 12^a semana de tratamento; e 48^a semana de tratamento (final do tratamento).
2. Analisar o perfil das quimiocinas séricas IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5 em pacientes com hepatite C crônica, infectados pelo genótipo 1 e com indicação de tratamento com PEG-IFN alfa-2a ou alfa-2b associado a RBV por 48 semanas, em momentos distintos: pré-tratamento (basal); 12^a semana de tratamento; e 48^a semana de tratamento (final do tratamento).
3. Investigar se há associação entre o perfil de citocinas e quimiocinas e as seguintes possibilidades de resposta terapêutica:
 - 12 semanas de tratamento: resposta virológica precoce completa (HCV RNA negativo); resposta virológica incompleta (HCV RNA positivo, mas queda na viremia maior ou igual a 2 log₁₀); ou falha terapêutica (HCV RNA positivo, com queda na viremia menor que 2 log₁₀).
 - Término do tratamento (48 semanas): respondedor (HCV RNA negativo); ou não-respondedor (NR) (HCV RNA positivo).

- 24 semanas pós-tratamento: resposta virológica sustentada (RVS) (HCV RNA negativo); ou recidiva (REC) da infecção (HCV RNA positivo em paciente respondedor ao término do tratamento).
4. Identificar citocinas e/ou quimiocinas reguladoras como possíveis biomarcadores de resposta ao tratamento da hepatite C crônica com PEG-IFN alfa-2a ou alfa-2b associado a RBV por 48 semanas.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo, pacientes e aspectos éticos

Estudo realizado no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia (coordenado pela Profa. Rosângela Teixeira), em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz – Laboratório de Biomarcadores em Doenças Infecciosas (sob a coordenação do Dr. Olindo Assis Martins Filho), com inclusão de 54 pacientes (33 do sexo masculino e 21 do sexo feminino) com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica e infectados pelo genótipo 1, virgens de tratamento, que aceitaram participar do projeto previamente aprovado pelo COEP/UFMG. Entre 2006 e 2008, eles tiveram amostras seriadas de soro coletadas em veia periférica e armazenadas em freezer a -80°C , após terem concordado por escrito em participar da pesquisa. As amostras foram colhidas em momentos distintos do tratamento da hepatite C (antes, na 12^a e 48^a semanas), conforme o protocolo vigente na ocasião do Ambulatório de Hepatites Virais (AHEV) do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG. Informações relativas aos aspectos demográficos, estadiamento da lesão hepática, aspectos virológicos, bioquímicos e de resposta terapêutica constituem um banco de dados registrado no AHEV/IAG/HC/UFMG.

Os critérios de inclusão e exclusão foram os previamente determinados para o estudo inicial e compreenderam:

1. Inclusão: 54 pacientes com hepatite C crônica (anti-HCV positivo por mais de seis meses, HCV RNA positivo) infectados por genótipo 1, virgens de tratamento, tratados entre 2006 e 2008, com coletas seriadas de amostras de soro em diferentes momentos do tratamento, com consentimento prévio dos mesmos (TCLE), estocadas em freezer a -80°C .
2. Exclusão: infecção por genótipo do HCV diferente do 1; coinfeção com HIV ou HBV; outras doenças hepáticas associadas; uso de drogas imunossupressoras; consumo

regular de álcool acima de 20g/dia (mulheres) e 40g/dia (homens); tratamento prévio da hepatite C crônica e tratamento antiviral por menos de 48 semanas.

Um grupo padrão foi constituído por 19 indivíduos (sexo masculino = 12; sexo feminino = 21) pré-doadores de sangue não-infectados (NI), selecionados no Hemocentro do Hospital Felício Rocho, submetidos a coleta única de amostra de sangue em veia periférica após assinatura do TCLE, para comparação com o grupo de pacientes infectados pelo HCV no período pré-tratamento (T0).

Este estudo visou acrescentar novas informações ao projeto iniciado em 2006 com aprovação pelo COEP/UFMG, conforme parecer ETIC 226/06, que teve como objetivo principal a avaliação transversal de parâmetros fenotípicos celulares de leucócitos do sangue periférico em indivíduos com hepatite C crônica. Em seguida, o COEP/UFMG autorizou a realização do mesmo projeto em amostras seriadas de soros (Declaração COEP, datada em 06 de novembro de 2006). Para a realização do projeto atual foi encaminhada ao COEP/UFMG carta de solicitação de autorização para modificações no projeto original, com aprovação pelo mesmo (vide ANEXO 1). Também foi solicitado aos 54 pacientes incluídos no projeto inicial que comparecessem ao serviço para informações a respeito do atual projeto e, ao concordarem em participar, após esclarecidos os objetivos e dúvidas, foi pedido que assinassem o novo TCLE (vide ANEXO 2) com as modificações propostas no projeto inicial.

As informações coletadas foram confidenciais e não revelaram as identidades dos participantes. Os dados fornecidos pelo estudo foram utilizados somente para fins de pesquisa e publicados apenas no meio científico.

3.2 Protocolo de tratamento da hepatite C instituído no AHEV/IAG/HC/UFMG

O protocolo de tratamento da hepatite C em vigor em 2006 contemplava a realização da biópsia hepática para estadiamento da hepatite C crônica antes do tratamento, realização de testes moleculares de detecção viral (HCV RNA qualitativo por PCR no pré-tratamento, 24^a e 48^a semanas de tratamento, e 24^a semana pós-tratamento, e HCV RNA quantitativo no pré-

tratamento e na 12^a semana de tratamento, em conformidade com os protocolos nacional e internacionais de tratamento da hepatite C crônica (Portaria SUS/MG n° 221, 2011; ZEUZEM, 2008; EASL Internacional Consensus Conference on Hepatitis C, 2011; GHANY *et al.*, 2011; AASLD Practice Guidelines – GHANY *et al.*, 2009). Esses testes moleculares são padronizados e não foram realizados para a finalidade de pesquisa, uma vez que são parte do protocolo de assistência e de tratamento da hepatite C crônica nos centros de referência em hepatites, sendo realizados na rotina no serviço público e de acordo com kits comerciais previamente estabelecidos para essa finalidade. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e a RT-PCR foram feitas no plasma, usando kit comercial (AMPLICOR v1.0, Roche Diagnostics Systems, Pleasanton, CA, USA), e a genotipagem do HCV é feita pela técnica de sequenciamento.

O padrão de resposta virológica, conforme previamente definido (CRAXI *et al.*, 2011; GHANY *et al.*, 2011), consiste em:

1. Resposta virológica precoce completa ou total: HCV-RNA sérico indetectável (avaliado por PCR) na décima segunda semana de tratamento antiviral.
2. Resposta virológica precoce incompleta ou parcial: queda de pelo menos duas escalas logarítmicas ($2 \log_{10}$) ou 100 vezes no valor da carga viral do HCV-RNA na décima segunda semana de tratamento antiviral comparada à carga viral pré-tratamento.
3. Resposta virológica ao final do tratamento: HCV-RNA indetectável ao término do tratamento antiviral.
4. Resposta virológica sustentada (RVS): HCV-RNA indetectável na vigésima quarta semana de seguimento após o término do tratamento antiviral.

Este perfil de resposta terapêutica dos pacientes passíveis de inclusão no estudo faz parte do banco de dados do AHEV/IAG/HC/UFMG.

3.3 Quantificação de quimiocinas e citocinas séricas

A dosagem dos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisas René-Rachou – FIOCRUZ, por citometria de fluxo, usando kits de alta sensibilidade (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

Para a determinação do nível de citocinas plasmáticas, utilizaram-se amostras de sangue periférico obtidas pelo sistema de coleta a vácuo em tubos contendo o EDTA, processadas e armazenadas em alíquotas a -80° . As amostras foram centrifugadas a $4000 \times g$ durante 15 minutos a 18°C , distribuídas em alíquotas e mantidas a -80°C até a realização dos experimentos. A quantificação dos níveis plasmáticos de citocinas pelo sistema CBA - Becton Dickinson-BD empregou uma mistura de seis esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas, que foram detectadas no canal FL-3. Essa metodologia permitiu a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra.

Neste estudo, a metodologia de CBA foi adaptada dos protocolos originais propostos por CHEN *et al.* (1999), modificada por PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.* (2006), como descrito a seguir: alíquotas de $25\mu\text{L}$ de plasma teste diluído 1:5 com diluente G (reagente presente no kit CBA), alíquotas de $25\mu\text{L}$ dos padrões de citocinas, submetidos a diluição seriada com diluente G (“Top Standart” – 5000pg/mL , 1:2 – 2500pg/mL , 1:4 – 1250pg/mL , 1:8 – 625pg/mL , 1:16 – $312,5\text{pg/mL}$, 1:32 – 156pg/mL , 1:64 – 80pg/mL , 1:128 – 40pg/mL e 1:256 – 20pg/mL) e $25\mu\text{L}$ de diluente G apenas (Controle Negativo), foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon no 2052). Em seguida, a cada tubo foram adicionados $15\mu\text{L}$ da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit / Human Inflammation CBA Kit) com subsequente incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente (T.A.), ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com $500\mu\text{L}$ da solução F (“Wash buffer”, reagente presente no kit CBA), centrifugadas a $600 \times g$, por 7 minutos a 18°C , e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram então reincubadas na presença de $20\mu\text{L}$ do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, T.A., ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com $500\mu\text{L}$ da solução F, centrifugadas a $600 \times g$, por 7 minutos a 18°C , e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em $250\mu\text{L}$ de reagente F e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo FACSVerse® (BD), que fez a aquisição dos dados.

Após as etapas de marcação, um total de 1.800 eventos/região (R1) foram obtidos com base em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC).

Para a análise dos dados, inicialmente as microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura correspondentes a cada citocina foram segregadas em gráficos de distribuição puntual FL-4 x FL-2, onde as seis esferas com intensidades de fluorescência distintas ocuparam posições específicas ao longo do eixo Y (FL-4). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL-2) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada citocina presente na amostra. Na análise, foi utilizado o software FCAP ArrayTM versão 2.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa de citocinas plasmáticas, uma curva padrão foi construída utilizando os dados dos padrões de citocinas em concentrações conhecidas (20pg/mL – 5000pg/mL) e empregada para determinar as concentrações de cada citocina no plasma teste. As concentrações de quimiocinas foram expressas em “picogramas/mL” (pg/mL) e os níveis de citocinas em “intensidade média de fluorescência” (MFI). Além disso os níveis de quimiocinas/citocinas foram expressos como dados categóricos (frequência de indivíduos com níveis séricos elevados) e como alterações em relação ao pré-tratamento (*baseline-fold* ou índice T12/T0).

3.4 Análise estatística e abordagem dos sistemas biológicos

3.4.1 Análise estatística convencional

Para descrever as variáveis quantitativas utilizaram-se medidas de tendência central, posição e dispersão, e, para as variáveis categóricas, as frequências absolutas e relativas. Para verificar, no pré-tratamento, a homogeneidade epidemiológica dos grupos tratamento e não-infectado (NI) e dos grupos que responderam ao tratamento de hepatite C e dos que não responderam, utilizou-se o teste T para as variáveis quantitativas normalmente distribuídas e o teste de Mann-Whitney para as variáveis que não apresentam distribuição normal. Para as variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui-Quadrado, e quando necessário, o teste Exato de Fisher. Para comparar o perfil das citocinas séricas e o perfil das quimiocinas séricas entre os grupos tratamento e NI no pré-tratamento, utilizou-se o teste T para as variáveis normalmente distribuídas, e o teste de Mann-Whitney para as variáveis que não apresentarem distribuição normal. Para a seleção do conjunto de variáveis que influenciam significativamente o

tratamento da hepatite C crônica foi utilizado o algoritmo Stepwise (Efroymson, 1960). O software utilizado na análise foi o R versão 3.0.3, que pode ser conhecido em: www.R-project.org. O software usado para as artes gráficas e estatísticas foi o Graph-Pad Prism (versão 5.03, San Diego, California, USA).

3.4.2 Análise da assinatura de biomarcadores

As assinaturas ascendentes das quimiocinas/citocinas foram adaptadas do protocolo prévio proposto por Luiza-Silva *et al.* (2011), modificadas conforme a seguir: resumidamente, os valores médios globais foram calculados para cada biomarcador sérico, considerando todo o universo dos dados (NI em T0 + HCV em T0 + HCV em T12 + HCV em T48 = 149 no total). A mediana global foi usada como o ponto de corte para categorizar cada sujeito como portador de níveis séricos “baixos” (iguais ou inferiores à mediana global) ou “elevados” (acima da mediana global). Na etapa seguinte, os dados foram compilados em diagramas em preto e branco para calcular a frequência de sujeitos com níveis séricos elevados por estratégias de análises qualitativas de dados discretos binários. Gráficos de dispersão mostrando o ponto de corte para cada biomarcador, a compilação do diagrama e as análises qualitativas podem ser visualizados na Fig. 1 suplementar. A frequência de indivíduos com níveis séricos elevados foi agrupada para construir as curvas globais ascendentes de biomarcadores. A análise dos dados considerou como biomarcadores relevantes aqueles com frequência de indivíduos com níveis séricos elevados acima do percentil 50. O software GraphPad Prism (versão 5.03, San Diego, California, USA) foi usado para construção dos gráficos de barras, curvas ascendentes e artes gráficas.

3.4.3 Abordagem de Biologia de Sistemas

3.4.3.1 Redes de biomarcadores

Associações entre quimiocinas e citocinas para cada subgrupo de pacientes infectados pelo HCV (NR, REC e RVS) foram calculadas pelo teste de correlação de Spearman para gerar matrizes de “p” e “r”. Correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram selecionadas

para montagem de redes usando o software Cytoscape, versão 3.1.1. As redes de biomarcadores foram construídas com *layouts* circulares, nos quais cada biomarcador é representado por um nó globular. As bordas de conexão representando o índice de correlação “r” foram classificadas como: fortemente positiva ($r = 0.68$), moderadamente positiva ($0.36 \leq r < 0.68$), fortemente negativa ($r = -0.68$), moderadamente negativa ($-0.68 < r = -0.36$), conforme proposto por Taylor (1990).

3.4.3.2 Construção dos mapas de calor (*heatmaps*)

Os índices T12/T0 foram calculados para cada biomarcador, sendo que o universo completo de dados obtidos de 43 pacientes com respostas distintas ao tratamento da hepatite C (NR + REC + RVS = total de 43) foi usado para definir os valores da mediana global. A mediana global foi usada para categorizar o índice T12/T0 de cada indivíduo como: “baixo” (menor ou igual à mediana global) ou “elevado” (acima da mediana global). Os *heatmaps* foram construídos para demonstrar a proporção geral de pacientes com índice T12/T0 baixo ou elevado, usando software Microsoft Excel. A frequência de indivíduos com índice T12/T0 elevado foi compilada por estatísticas de coluna para gerar o número equalizado de sujeitos. Aqueles biomarcadores associados com frequências de índice T12/T0 elevado acima de 50% foram selecionados como ferramentas para discriminar subgrupos de pacientes infectados pelo HCV (NR, REC e RVS). Software GraphPad Prism (versão 5.03, San Diego, California, USA) foi usado para gráfico de barras, curvas ascendentes e artes gráficas.

3.4.3.3 Árvores de decisão

Esta nova abordagem é baseada em um algoritmo mecanizado de aprendizagem largamente utilizado para selecionar um grupo mínimo de atributos que segregam eficientemente aglomerados (*clusters*), sem viés. Índices T12-T0 também foram empregados no conjunto de dados para criar as árvores de decisão. Elas foram construídas usando o software *Waikato Environment for Knowledge Analysis* (WEKA, versão 3.6.11, Waikato, New Zealand). Esse método busca atributos para a segregação em grupos com a máxima acurácia de classificação e elege nódulos periféricos (secundários).

3.4.3.4 Análise de performance de biomarcadores

A análise de performance compreendeu duas abordagens distintas, incluindo a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e a análise *Two-Graph* ROC (TG-ROC). As curvas ROC foram montadas considerando a sensibilidade e o complemento da especificidade (1-Sp) em valores de corte distintos. A análise da curva ROC confirmou os limites de corte propostos pela análise da árvore de decisão e também determinou a acurácia global (área abaixo da curva – AUC) de biomarcadores selecionados. Os índices estatísticos: sensibilidade = $[\text{verdadeiros positivos} / (\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos})] \times 100$ e especificidade = $[\text{verdadeiros negativos} / (\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos})] \times 100$. As plotagens TG-ROC validaram a seguir os pontos de corte propostos. O software MedCalc (versão 7.3) foi utilizado para a análise da curva ROC. O software GraphPad Prism (versão 5.03, San Diego, California, USA) foi utilizado para plotagem de ROC e TG-ROC. A análise discriminadora dos principais componentes (PCA) foi realizada para acessar a associação entre os níveis pré-tratamento dos biomarcadores e sua variabilidade T12/T0, para identificar biomarcadores capazes de agregar respondedores à imunoterapia (NR *versus* RVS). Os gráficos de PCA foram construídos como plotagens XY considerando o Log10 dos níveis pré-tratamento (T0) e o Log2 das alterações T12/T0 de todos os biomarcadores, respectivamente.

Os autores agradecem o apoio financeiro para a compra dos kits e demais materiais necessários para os experimentos, oferecido pelas seguintes instituições: FAPEMIG, CAPES, CNPq, PIBIC, FIOCRUZ, PDTIS, CPqRR.

4 ARTIGO

Strategies for serum chemokine/cytokine assessment as biomarkers of therapeutic response in HCV patients as a prototype to monitor immunotherapy of infectious diseases

Erica Godinho Menezes^{1,2}; Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis^{3*}; Ludmila Melo Cardoso³; Ágata Lopes-Ribeiro³; Juan Jonathan-Gonçalves³; Marco Túlio Porto Gonçalves³; Rodrigo Dias Cambraia²; Eric Bassetti Soares²; Luciana Diniz Silva^{1,2,4}; Vanessa Peruhype-Magalhães³; Maria Rios⁵; Caren Chancey⁵; Andréa Teixeira-Carvalho^{3#}; Olindo Assis Martins-Filho³ and Rosângela Teixeira^{1,2,4}.

1. Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
2. Ambulatório de Hepatites Virais, Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas/UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
3. Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
4. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
5. Center for Biologics and Evaluation Research – US Food and Drug Administration, Silver Spring, Maryland, United States.

Running Title: Serum biomarkers during treatment of chronic hepatitis C infection

*Co-first author

Corresponding Author: Andréa Teixeira Carvalho

Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ/MG. Av. Augusto de Lima 1715, Barro Preto - Belo Horizonte – Minas Gerais – Brazil, CEP 30190-002 - e-mail: andreat@cpqrr.fiocruz.br Tel: +55 31 3349 7764 – Fax: +55 31 3291 3115

Abstract

Background: The follow-up of biomarker changes triggered by cytokine-based therapy may provide relevant insights to subsidize the development and identification of predictors of therapeutic response.

Methods: In the present study, longitudinal measurements of serum chemokine/cytokine levels were performed by cytometric-bead-array in patients with chronic hepatitis C, categorized according to virological response as non-responder/NR, relapser/REL and sustained-virologic-responder/SVR.

Results: Data demonstrated an overall increase of serum chemokine/cytokine levels in HCV patients. In general, therapeutic failure was associated with a predominant baseline proinflammatory pattern with enhanced CCL5/RANTES, IFN- α , IFN- γ , along with decreased IL-10 levels in NR and increased levels of IL-6 and TNF in REL. SVR patients displayed lower baseline proinflammatory status with decreased CXCL8/IL-8, IL-12 and IL-17 levels. The inability to uphold IFN- α levels during treatment was characteristic of NR. The prominent baseline proinflammatory milieu observed in NR and REL patients yielded a restricted biomarker network, whereas SVR displayed a network with integrated cytokine connectivity. Noteworthy was that SVR presented a shift towards a proinflammatory pattern upon immunotherapy, assuming a pattern similar to that observed in NR and REL at baseline. Moreover, the immunotherapy guided REL towards a profile similar to SVR at baseline. Analysis of baseline-fold changes during treatment pointed out IFN- α and TNF as high-performance biomarkers to monitor immunotherapy outcome.

Conclusion: This knowledge may contribute for novel insights into the treatment and control of the public health threat posed by HCV infection worldwide and the development of immunotherapy strategies for spreading/emerging arbovirus/ flavivirus infections.

Keywords: HCV; cytokines, chemokines; IFN- α ; biomarkers

1 Introduction

Immunotherapy has been proposed as an alternative approach to etiological treatment of parasitic and infectious diseases aiming to assist the natural immune system in achieving control over infection (Vanham et al., 2012). Several immunotherapy formats have been evaluated over the years, including non-antigen specific strategies, the use of immunomodulators, antibodies that block negative regulatory pathways, as well as cytokines that activate the immune response to control pathogenic agents (D'Elia et al., 2013; Guo et al., 2014; Kong et al., 2010; Qian et al., 2016; Xiang et al., 2015).

Hepatitis C virus (HCV) infection affects approximately 170 million people worldwide (Alavian et al., 2016; Chassagne et al., 2016; Han et al., 2016; King et al., 2014; Muñoz-Gómez et al., 2016; Sharma et al., 2016; Tang et al., 2016; Wirth et al., 2016). Efficient therapeutic interventions have been developed in the last two decades to control/minimize the impact of this worldwide health problem. Firstly, type-1 interferon alpha (IFN- α) monotherapy was recommended and, subsequently, combination of IFN- α or pegylated-IFN- α (Peg-IFN- α) with ribavirin (RBV) was extensively used to treat HCV infection. However, the virologic response with IFN- α based therapy depends on the HCV genotype (Dresch et al., 2016; Watanabe et al., 2016). Indeed, patients infected with genotypes 2 and 3 have higher chances of sustained virologic response (SVR), while less impact has been reported for patients infected with genotype 1 (Ogawa et al., 2016; Rizk et al., 2016; Poizot-Martin et al., 2016; Łucejko et al., 2016; Kao et al., 2016; Punzalan et al., 2015), suggesting that the immunological status observed prior to treatment, or the shift of the immune response observed after treatment onset, might be involved in the virologic response. In fact, it has been demonstrated that genetic variations of IFN- λ -related genes are strongly associated with distinct patterns of therapeutic response to Peg-IFN- α /RBV dual therapy. Moreover, it has been reported that early change in the baseline cytokine pattern is critical to support the sustained virologic response following

Peg-IFN- α /RBV therapy in chronic hepatitis C (de Souza-Cruz et al., 2016; Araujo et al., 2013; Zarife et al., 2011). Several efforts have been made to establish novel biomarkers with relevant predictive values to monitor immunotherapy of HCV infection (Araujo et al., 2013; Rizk et al., 2016; Zarife et al., 2011).

In the last five years, the treatment of HCV infection has evolved from the use of IFN- α (monotherapy or combined with RBV) towards the use of IFN-free protease and polymerase inhibitor combination regimens (Watanabe et al., 2016; Ogawa et al., 2016; Poizot-Martin et al., 2016). However, preclinical studies have shown that several cytokines have considerable clinical potential in treating infectious, parasitic diseases at acute and chronic stages as well as allergic and degenerative conditions. As the field of cytokine-based immunotherapy expands, side effects, development of blocking antibodies and immunotolerance may emerge as idiosyncratic events that limit therapeutic effectiveness.

Effort to reduce or minimize such idiosyncratic effects of immunotherapy may be focused on identifying biomarkers to serve as predictors of therapeutic response. The detailed characterization of biomarker changes triggered by a given cytokine-based therapy may provide relevant insights to subsidize the development of therapeutic monitoring strategies as follow-up to immunotherapy of infectious diseases.

The main goals of the present study was to perform a longitudinal analysis of serum biomarkers in HCV patients upon IFN- α -based immunotherapy, using novel approaches to evaluate the balance, baseline-fold changes, network connectivity and performance to identify predictors of therapeutic response to follow-up immunotherapy of infectious diseases.

2 Material and Methods

2.1 Study Population

A total of 73 subjects were included in the investigation by non-probabilistic convenience sampling. Fifty-four treatment-naive patients (33 males and 21 females, age range from 20-70 years old), with confirmed chronic hepatitis C (HCVRNA positive for more than six months) and infected with HCV genotype 1a or 1b, were enrolled for a longitudinal follow-up investigation in parallel with recruitment of age/gender matching non-infected (NI=19) blood donors (12 males and 7 females, age range from 19-58 years old).

The HCV patients under recommendation of antiviral therapy with Peg-IFN- α (2a or 2b)/RBV dual therapy were followed by multidisciplinary medical care at the Outpatient Liver Unit, Instituto Alfa de Gastroenterologia, affiliated to the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Therapeutic response was assessed by viral load analysis carried out by competitive reverse transcription (RT)-PCR by AMPLICOR v1.0 assay, according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics Systems, Pleasanton, CA, USA).

Three sub-groups of HCV patients were considered according to the virologic response: i) Non-responders (NR=16, 09 males and 07 females, age range from 20-62 years old), consisting of patients presenting median viral load of 615,000 IU/mL at T0 and showing less than 2 log₁₀ drop in viral load at T12, or patients without RNA HCV clearance at T48; ii) Relapsers (REL=14, 11 males and 03 females, age range from 38-69 years old), comprising patients presenting median viral load of 634,000 IU/mL at T0 and showing negative RNA HCV results at T48, but showing breakthrough in the first 24 weeks after treatment; and iii) Sustained virologic responders (SVR=24, 13 males and 11 females, age range from 24-70 years old), including patients presenting median viral load of 579,000 IU/mL at T0 and showing negative qualitative RNA HCV results at T48 and at 24 weeks after treatment. Ten milliliters of

peripheral blood were drawn by a trained health care professional, according to standard operational procedures. Samples were collected before treatment (T0; NR=16, REL=13 and SVR=24) and throughout antiviral treatment: at 12 weeks (T12; NR=15, REL=11 and SVR=17) and 48 weeks (T48; NR=06, REL=12 and SVR=18).

The Table 1 summarizes the major demographic and laboratorial records of HCV patients and subgroups.

The exclusion criteria were: 1) patients infected by HCV genotype other than 1; 2) HBV and/or HIV coinfection; 3) other concomitant liver diseases; 4) use of immunosuppressants; 4) active alcohol consumption (>20g/day for women and >40g/day for men); 5) previous antiviral treatment for chronic hepatitis C; 6) duration of HCV treatment with Peg-IFN- α /RBV less than 48 weeks.

Healthy blood donor controls were recruited at the Blood Bank Unit at Felício Rocho Hospital, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Serum samples were obtained, aliquoted and stored at -80°C until use for chemokine/cytokine analysis by flow cytometry.

Informed written consent was obtained from all participants. The protocols were approved by the local Ethics Committee (Federal University of Minas Gerais, protocol number ETIC 226/06).

2.2 Chemokine and Cytokine quantitation by cytometric bead array - CBA

Serum levels of chemokines (IL-8/CXCL-8, MCP-1/CCL-2, MIG/CXCL-9, IP-10/CXCL-10 and RANTES/CCL5) and cytokines (INF- α , IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, INF- γ , IL-4, IL-10 and IL-17) were measured by enhanced sensitivity CBA kits (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), according to manufacturer's protocol. Samples were run in a FACSVerser flow cytometer using the FACSuite™ software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for acquisition. Data analysis was performed using the FCAP Array™ software version 2.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the mean fluorescence intensity (MFI) of each bead cluster was determined for each

chemokine/cytokine tested. Forth logistic regression analyses were used to generate standard curves for each analyte. Concentrations (pg/mL) were extrapolated according to the standard curves. Chemokine concentrations were expressed as pg/mL. Cytokine levels were expressed in MFI. Additionally, chemokine/cytokine levels were expressed as categorical data (frequency of subjects with high serum levels) and baseline-fold changes (T12/T0) as described in the Data Analysis section.

2.3 Data mining, Statistics and Systems Biology Approaches

2.3.1 Conventional statistical analysis

Comparative analysis between NI and HCV groups was carried out by non-parametric Mann-Whitney test. Multiple comparisons amongst HCV subgroups (NR, REL and SVR) and NI were performed by non-parametric Kruskal-Wallis variance analysis followed by Dunn's post-test. In all cases, significance was considered at $p < 0.05$. GraphPad Prism software (version 5.03, San Diego, California, USA) was used for statistical and graphical arts.

2.3.2 Biomarker signature analysis

Chemokine/cytokine ascendant signatures were performed as previously reported by Luiza-Silva et al. (2011), modified as follows: briefly, the global median values were calculated for each serum biomarker, considering the whole data universe (NI + HCV at T0 + HCV at T12 + HCV at T48 = total of 149). The global median was used as the cut-off to categorize each subject as they present "Low" (below or equal the global median) or "High" (above the global median) serum levels. In the next step, data was compiled on black-and-white diagrams to calculate the frequency of subjects with "High" serum levels by column statistics. The scatter plots displaying the cut-off for each biomarker, the diagram compilation and the column statistics are provided in supplementary figure 1. The frequency of subjects with "High" serum levels was assembled to build the overall ascendant biomarker curves. Data mining was carried out considering as relevant biomarkers those with frequency of subjects with "High" serum

levels above the 50th percentile. GraphPad Prism software (version 5.03, San Diego, California, USA) was used for bar charts and ascendant curve assembling and graph arts.

2.3.3 Systems Biology Approaches

2.3.3.1 Biomarker networks

Correlations between chemokines and cytokines for each HCV subgroups (NR, REL and SVR) were calculated by Spearman correlation test to generate a “p” and “r” matrices. Significant correlations at $p < 0.05$ were selected for network assembling using the open source Cytoscape software, version 3.1.1. The biomarker networks were constructed using circular layouts in which each biomarker is represented by a globular node. Connecting edges representing “r” correlation index underscored: strong positive ($r \geq 0.68$), moderate positive ($0.36 \leq r < 0.68$), strong negative ($r \leq -0.68$), moderate negative ($-0.68 < r \leq -0.36$) as proposed by Taylor (1990).

2.3.3.2 Heatmap constructions

The baseline-fold (T12/T0) indices were calculated for each biomarker and the whole data universe (NR + REL + SVR = total of 43) used to define the global median values. The global median was used to categorize each subject as they present “Low” (below or equal the global median) or “High” (above the global median) baseline-fold index. The heatmaps were assembled to display the overall proportion of subjects with “Low” and “High” baseline-fold index (T12/T0) using Microsoft Excel software. The frequency of subjects with “High” baseline-fold index (T12/T0) was compiled by column statistics to generate the equalized number of subjects. Those biomarkers associated with frequencies of “High” baseline-fold index (T12/T0) above 50% were selected as putative tools to discriminate HCV subgroups (NR, REL and SVR). GraphPad Prism software (version 5.03, San Diego, California, USA) was used for bar charts and ascendant curve assembling and graph arts.

2.3.3.3 Decision trees

This novel approach is a widely used machine learning algorithm to select the minimal set of attributes that efficiently segregates unbiased clusters. Baseline-fold indices (T12/T0) were also employed in the dataset to create decision trees. The decision trees were built using the Waikato Environment for Knowledge Analysis software (WEKA, version 3.6.11, Waikato, New Zealand). This method searches attributes for group segregation with maximum classification accuracy and elects root and branch attribute nodes.

2.3.3.4 Performance analysis

The performance analysis was comprised of two distinct approaches including the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve and Two-Graph ROC (TG-ROC) analysis. The operating-characteristic curves were assembled considering the sensitivity and specificity at distinct cut-off values. The ROC curve analysis confirmed the cut-off edges proposed by the decision tree analysis and also determined the global accuracy (area under the curve - AUC) of selected biomarkers. The statistical indices: (Se) sensitivity = $[\text{true positives}/(\text{true positives} + \text{false negatives})] \times 100$ and (Sp) specificity = $[\text{true negatives}/(\text{true negatives} + \text{false positives})] \times 100$. The TG-ROC plots further validated the proposed cut-off thresholds. The MedCalc software package (ver. 7.3) was used for the operating-characteristic curve analysis. GraphPad Prism software (version 5.03, San Diego, California, USA) was utilized for TG-ROC plotting and graphical arts. Principal components discriminant analysis (PCA) was carried out to assess the association between serum biomarker baseline levels and the baseline-fold variability (T12/T0) to identify biomarkers able to clusterize the immunotherapy responders (NR *versus* SVR). The PCA graphs were built as XY plots considering the Log_{10} Baseline Levels (T0) and Log_2 Baseline-fold changes (T12/T0) of all biomarkers, respectively.

3 Results

3.1 Overall profile of serum chemokines/cytokines in non-treated HCV patients

Quantitative analysis of serum chemokines (IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 and RANTES/CCL5) and cytokines (IFN- α , IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17) were performed to characterize the overall profile of non-treated HCV patients as compared to healthy non-infected blood donors (NI). The median values of serum concentrations are shown in figure 1. Data analysis demonstrated that HCV patients presented an overall storm of serum biomarkers except for IL-4 when compared to NI reference values (Figure 1).

3.2 Serum chemokines/cytokines in HCV patients according to the virologic status after HCV treatment

Follow-up analysis of serum chemokines and cytokines were carried out at baseline (T0), 12 weeks (T12) and 48 weeks (T48) after immunotherapy onset. The biomarker levels were compared amongst HCV patients categorized according to the therapeutic response in three subgroups named non-responders (NR), relapsers (REL) and sustained virologic responders (SVR). The median values of serum concentrations are provided in figure 2. In general, therapeutic failure profiles (NR and REL) were associated with a prominent proinflammatory pattern at baseline, composed of increased levels of CCL5/RANTES, IFN- α and IFN- γ . While NR displayed decreased levels of IL-10, REL showed increased baseline levels of IL-6 and TNF as compared to SVR. Nonetheless, SVR displayed an evident and significant decrease of proinflammatory status as compared to NR and REL, with decreased levels of CXCL8/IL-8, IL-12 and IL-17 (Figure 2). Noteworthy was that NR patients lacked the ability to uphold increased IFN- α serum levels as compared to SVR, throughout the immunotherapy follow-up

(T12 and T48). No correlations between each serum biomarker and viral load levels were observed at baseline or after treatment onset (data not shown).

3.3 Ascendant biomarker signatures in treated HCV patients are consistent with distinct patterns of virological response

The chemokine/cytokine signatures were assembled in order to further characterize the reference groups (NI and untreated HCV) as well as HCV patients undertaking immunotherapy at baseline, 12 and 48 weeks follow-up (T0, T12 and T48). Biomarker signatures were constructed by converging continuous values of chemokine/cytokine serum concentration into categorical data (low and high levels), taking the global median as the cut-off edge (supplementary Figure 1). The ascendant frequency of subjects with high serum levels were compared by overlaid curves for NI vs HCV as well as for NR vs REL vs SVR at each time-point of immunotherapy follow-up (Figure 3).

The results showed that serum chemokine/cytokine signatures further corroborate that non-treated HCV patients display a massive serum biomarker storm as compared to NI, except for IL-4 (Figure 3). Moreover, the overlaid ascendant chemokine/cytokine curves further support the deleterious effect of prominent proinflammatory status at baseline (T0) for achieving successful results upon immunotherapy. In fact, at baseline (T0), an increased frequency of subjects with high levels of proinflammatory biomarkers was observed in NR and REL as compared to SVR. The ability of mounting a robust balanced proinflammatory/regulatory response at T12 seems to be critical to support the therapeutic success of SVR. This balanced profile could also be observed in SVR at T48 (Figure 3).

The relevance of persistent elevated IFN- α levels throughout immunotherapy in generating the sustained virologic response was also highlighted by the ascendant biomarker signature analysis. Indeed, an increased frequency of subjects with high serum levels of IFN- α was

observed selectively in SVR throughout the immunotherapy follow-up (T12 and T48), but not in NR (Figure 3).

3.4 Restricted biomarker network connectivity at baseline reflects therapeutic failure, whereas robust cytokine linkage predicts sustained virologic response

Systems biology approaches applied to identify biomarker connectivity as predictive parameters for virologic response following immunotherapy are presented in figure 4.

Data mining demonstrated that the prominent proinflammatory milieu observed in NR and REL at baseline, yielded a restricted biomarker network with a small number of neighborhood connections. Conversely, SVR displayed integrated cytokine connectivity, characterized by a large number of inter-node edges.

Noteworthy was that SVR presented, at T12, a shift towards a proinflammatory pattern upon immunotherapy, assuming a pattern similar to that observed in NR and REL at baseline.

The immunotherapy intervention guided REL forward into developing, at T12 through T48, a profile similar to that observed for SVR at baseline (Figure 4).

3.5 Baseline-fold changes during immunotherapy (T12/T0) allowed for the selection of putative predictive hallmarks of therapeutic failure as well as sustained virologic response

Baseline-fold changes are a reliable strategy to evaluate at the individual level changes in biomarker profiles, avoiding bias due to idiosyncratic features observed before immunotherapy onset. Figure 5 shows changes in serum chemokine and cytokine levels observed at T12 relative to autologous levels at T0 (T12/T0). The analysis of individual baseline-fold values showed that changes towards higher levels of CXCL8, CCL2 and IFN- α are observed for SVR, as displayed in scatter plot distribution (Figure 5 – top panels). Categorical analysis of subjects with high baseline-fold index revealed that amongst a range of biomarkers able to discriminate

NR, REL and SVR, only CCL2 and IFN- α were selective for SVR (Figure 5 – middle panels in gray background).

Decision tree analysis further demonstrated that CCL2 and IFN- α are root biomarkers for categorizing immunotherapy outcome (Figure 5 – decision trees). In fact, whereas the baseline-fold change in CCL2 is the root attribute followed by CCL5 and CXCL10 nodes for identifying therapeutic failure with moderate performance (REL – 55% and NR – 75%), IFN- α root followed by TNF as first level node yields a decision tree able to segregate NR (92%) from SVR (72%) with superior performance.

3.6 Performance indices supported the baseline-fold changes of IFN- α as a useful biomarker for monitoring sustained virologic response after immunotherapy.

Intending to determine the value of IFN- α and TNF for monitoring post-therapeutic outcome (NR *versus* SVR), scatter plot analysis was carried out using the cut-offs elected by the decision tree analysis, further confirmed by ROC and TG-ROC plots (Figure 6). Data indicated that IFN- α baseline-fold change above 14 and a drop of TNF below 0.8 are hallmarks of SVR, with high-performance operating-characteristics (Sensitivity = 71%; 82% and Specificity = 92%; 100%, respectively). Data mining by principal component analysis revealed that the cross-matching pairs (baseline-levels/baseline-fold change) of IFN- α individual values stand out amongst all biomarkers evaluated. In fact, a cluster of patients with high baseline-fold changes of IFN- α (T12/T0) can be clearly identified selectively in SVR (Figure 6 – bottom panels).

4 Discussion

Immunotherapy is a rational approach to empower the natural immune system with effector mechanisms in order to achieve clearance of etiological agents causing parasitic/infectious diseases (Vanham et al., 2012). The understanding of chemokine/cytokine changes induced by immunotherapy could provide insights to support the development of novel therapeutic strategies and minimize idiosyncratic effects.

The treatment of HCV infection has evolved over the years and the protease/polymerase/NS5 inhibitors era has started worldwide (Ogawa et al., 2016; Poizot-Martin et al., 2016; Watanabe et al., 2016). In Brazil, these protocols based on third-generation antiviral drugs are still restricted to patients with moderate/severe fibrosis. Although the IFN- α -based treatment is no longer indicated for chronic HCV infection in several countries, the lessons learned from this immunotherapy strategy has clearly demonstrated the role of the immunological status on therapeutic outcome.

The present study assessed the pattern of serum chemokine/cytokine levels in HCV patients over treatment with IFN- α -based immunotherapy as a prototype evaluation following immunotherapy of infectious diseases. The results demonstrated that, in general, therapeutic failure was associated with presence of a predominant proinflammatory pattern at baseline composed of enhanced CCL5/RANTES, IFN- α and IFN- γ along with decreased IL-10 levels in NR and increased IL-6 and TNF in REL. In addition, SVR displayed lower proinflammatory status with decreased levels of CXCL8/IL-8, IL-12 and IL-17. The prominent proinflammatory milieu observed in NR and REL at baseline built a restricted biomarker network with a small number of neighborhood connections. Noteworthy was that NR fails to uphold IFN- α levels during immunotherapy. It is possible that NR patients may have developed a “sink effect” or a clearance mechanism mediated by the generation of anti-IFN- α antibodies. Moreover, repeated IFN- α administration resulted in “tolerance”, and overdosing could even result in paradoxical

immune suppression. Interestingly, the immunotherapy guided REL forward into developing a profile similar to SVR at baseline. These data may suggest that monitoring the immunological status at baseline in order to prescribe an anti-inflammatory therapy prior to treatment onset may contribute to successful response in NR and REL. It has been previously demonstrated that the presence of a modulated pro-inflammatory profile at baseline favors SVR, whereas a strong inflammatory response at baseline predisposes to therapeutic failure. Moreover, an increase on serum IL-12 levels in patients under treatment is critical to support the SVR, while the early upregulation of IL-10 correlates to treatment relapse (Araujo et al., 2013). Previous reports have shown that CCL5/RANTES levels did not differ between responders and non-responders at baseline and that an early CCL5/RANTES response after treatment seems to be a predictor biomarker for a sustained response to virological treatment (Florholmen et al., 2011). Conversely, other studies have shown that CCL5/RANTES levels were higher in responders as compared to non-responders at baseline and that no changes in CCL5/RANTES response could be observed after treatment (Yoneda et al., 2011). As noticed, the applicability of CCL5/RANTES as a putative biomarker for predicting therapeutic response is still controversial in the literature. Corroborating the present results observed at T12, it has been reported recently that the lower fold change in CXCL8/IL-8 levels at four weeks after treatment are associated with therapeutic failure (Nguyen et al., 2016).

It has been proposed that higher levels of CXCL9/MIG plasma levels could reflect a beneficial immunological state for response to pegIFN/RBV treatment (Johansson et al., 2016). However, the data reported here did not confirm these findings. It is possible that the inclusion of relapsers amongst non-responders may account for these paradoxical observations.

System biology analysis pointed out that SVR showed a biomarker network with integrated cytokine connectivity at baseline and shifted towards a proinflammatory pattern upon immunotherapy, assuming a pattern similar to that observed in NR and REL at baseline. In fact,

a critical role of increased and persistent IFN- α levels throughout immunotherapy was imperative to guarantee the SVR. The serum IFN- α , a pivotal asset of the innate antiviral response, has been shown as essential for controlling viral replication. The ability of IFN- α therapy in eliciting early changes in the baseline immune response towards a proinflammatory microenvironment has been pointed out as a critical event that leads to effective SVR (Araujo et al., 2013). Analysis of chemokine/cytokine baseline-fold changes during treatment pointed out IFN- α and TNF as high-performance biomarkers to monitor immunotherapy outcome. These findings were further validated by data mining of principal components, which shows that patients with baseline-fold changes of IFN- α (T12/T0) higher than 14 can be clearly identified as SVR.

The results clearly support that an exacerbated proinflammatory status at baseline has a deleterious effect during HCV immunotherapy, leading to therapeutic failure. Our findings indicated that while the immune response was boosted by IFN- α therapy in SVR, the IFN- α sink effect was clearly detected in NR. We hypothesize that controlling the exacerbated inflammatory microenvironment, composed especially by high levels of IFN- α , should be considered as a beneficial intervention prior to treatment onset to guarantee success of IFN- α therapy. Previous reports have demonstrated that a pro-inflammatory state at treatment onset is risky to support the SVR following Peg-IFN- α /RBV therapy in chronic hepatitis C (Araujo et al., 2013; Sharafi et al., 2012; Yoneda et al., 2011). This inappropriate immune activation was partly due to exacerbated IFN- α level at baseline in NR. Consistently, increased type-1 IFN activity has been related to a bad prognosis of viral infection (Craxi et al., 1995).

It is important to mention that one limitation of the present investigation was the small sample size, which may restrict the drawing of definitive conclusions and generalizations about other population especially due to the non-probabilistic nature of our sampling approach.

Efforts to reduce or minimize such idiosyncratic effects of immunotherapy based on identifying biomarkers predictors of therapeutic response are a plausible approach to generate scientific support for future immunotherapeutic protocols. It has been demonstrated that modifying or targeting nonspecific immune responses is an important aspect of intervention of ongoing viral infections. The understanding provided by IFN- α -based approaches has paved the way into orchestrating the immune system favoring viral clearance. This knowledge may contribute for novel insights into the treatment and control of the continuous public health threat posed by HCV infection worldwide and the spreading/emerging viral infections, caused by Zika, Chikungunya and Dengue viruses.

5 Conclusions

Analysis of baseline-fold changes during treatment pointed out IFN- α and TNF as high-performance biomarkers to monitor immunotherapy outcome. This knowledge may contribute for novel insights into the treatment and control of the continuous public health threat posed by HCV infection worldwide.

6 Acknowledgments

The authors would like to thank the funding agencies and the PDTIS/FIOCRUZ core facility for the use of its resources. The authors also thank the Instituto Alfa de Gastroenterologia da UFMG for support the Outpatient Clinic of Viral Hepatitis.

7 Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

8 Funding statement

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - grant APQ 402457/2012-9), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-MINAS) and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG - grants APQ-01797-12 and APQ-01070-13). The authors thank the program for technological development in tools for health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities. ATC and OAMF thank CNPq for fellowships (PQ). JGCdR received fellowship from Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD/CAPES).

9 References

Alavian SM, Haghbin H, 2016. Relative Importance of Hepatitis B and C Viruses in Hepatocellular Carcinoma in EMRO Countries and the Middle East: A Systematic Review. *Hepat Mon.* 16(3), e35106.

Araújo AR, Peruhype-Magalhães V, Coelho-dos-Reis JG, Chaves LP, de Lima TA, Pimentel JP, et al., 2013. Dual role of IL-12 in the therapeutic efficacy or failure during combined PEG-Interferon- α 2A and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Immunol Lett.* 154(1-2), 61-69.

Chassagne F, Rojas Rojas T, Bertani S, Bourdy G, Eav S, Ruiz E, et al., 2016. A 13-Year Retrospective Study on Primary Liver Cancer in Cambodia: A Strikingly High Hepatitis C Occurrence among Hepatocellular Carcinoma Cases. *Oncology.* 91(2), 106-116.

Craxì A, Magrin S, Fabiano C, Linea C, Almasio P., 1995. Host and viral features in chronic HCV infection: relevance to interferon responsiveness. *Res Virol.* 146(4), 273-278.

D'Elia RV, Harrison K, Oyston PC, Lukaszewski RA, Clark GC, 2013. Targeting the “cytokine storm” for therapeutic benefit. *Clin Vaccine Immunol.* 20(3), 319–327.

de Souza-Cruz S, Victória MB, Tarragô AM, da Costa AG, Pimentel JP, Pires EF, et al. 2016. Liver and blood cytokine microenvironment in HCV patients is associated to liver fibrosis score: a proinflammatory cytokine ensemble orchestrated by TNF and tuned by IL-10. *BMC Microbiol.* 16, 3.

Dresch KF, de Mattos AA, Tovo CV, de Onofrio FQ, Casagrande L, Feltrin AA, et al. 2016. Impact Of The Pegylated-Interferon And Ribavirin Therapy On The Treatment-Related Mortality Of Patients With Cirrhosis Due To Hepatitis C Virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 58, 37.

Florholmen J, Kristiansen MG, Steigen SE, Sørbye SW, Paulssen EJ, Kvamme JM, et al., 2011. A rapid chemokine response of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β and the

regulated on activation, normal T expressed and secreted chemokine is associated with a sustained virological response in the treatment of chronic hepatitis C. *Clin Microbiol Infect.* 17(2):204-209.

Guo F, Zhao X, Gill T, Zhou Y, Campagna M, Wang L, et al., 2014. An interferon-beta promoter reporter assay for high throughput identification of compounds against multiple RNA viruses. *Antiviral Res.* 107, 56–65.

Han QY, Liu ZW. Current treatment of chronic hepatitis C in China: dilemma and potential problems, 2016. *World J Gastroenterol.* 22(19), 4615-4618.

Johansson S, Talloen W, Tuefferd M, Darling J, Fanning G, Fried MW, AerssensJ, 2016. High MIG (CXCL9) plasma levels favours response to peg-interferon and ribavirin in HCV-infected patients regardless of DPP4 activity. *Liver Int.* 36(3):344-352.

Kao JH, Lee YJ, Heo J, Ahn SH, Lim YS, Peng CY, et al., 2016. All-oral daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection: a sub-analysis in Asian patients from the Hallmark Dual study. *Liver Int.* 36(10), 1433-1441.

King A, Bornschlegel K, Johnson N, Rude E, Laraque F., 2016. Barriers to treatment among New York City residents with chronic hepatitis C virus Infection, 2014. *Public Health Rep.;* 131(3), 430-437.

Kong YC, Wei WZ, Tomer Y., 2010. Opportunistic autoimmune disorders: from immunotherapy to immune dysregulation. *Ann N Y Acad Sci.* 1183, 222-236.

Łucejko M, Parfieniuk-Kowerda A, Flisiak R., 2016. Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir plus dasabuvir combination in the treatment of chronic HCV infection. *Expert Opin Pharmacother.* 17(8):1153-1164.

Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, da Silveira Lemos D, et al., 2011. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever

vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *J Infect Dis.*; 204(6), 873-883.

Maia LP, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Speziali E, Vermhren R, Lira EF, et al., 2009. Hepatitis C virus screening and clinical monitoring of biomarkers in patients undergoing hemodialysis. *J Med Virol.* 81, 1220–1231.

Mangia A, Santoro R, Copetti M, Massari M, Piazzolla V, Spada E, et al., 2013. Treatment optimization of and prediction of HCV clearance in patients with acute HCV infection. *J Hepatol.* 59(2), 221-228.

Muñoz-Gámez JA, Salmerón J, Ruiz-Extremera Á. Hepatitis C during pregnancy, vertical transmission and new treatment possibilities. *Med Clin (Barc).* 2016. pii: S0025-7753(16)30075-6.

Nguyen TT, Niloofar R, Rubbo PA, Nils K, Bollore K, Ducos J, et al., 2016. Cytokine Response Associated with Hepatitis C Virus Clearance in HIV Coinfected Patients Initiating Peg Interferon- α Based Therapy. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 1;8(1):e2016003.

Ogawa E, Furusyo N, Yamashita N, Kawano A, Takahashi K, Dohmen K, et al., 2016. Effectiveness and safety of daclatasvir plus asunaprevir for HCV genotype 1b patients aged 75 and over with or without cirrhosis. *Hepatol Res.* doi: 10.1111/hepr.12738.

Poizot-Martin I, Bellissant E, Garraffo R, Colson P, Piroth L, Solas C et al., 2016. Addition of boceprevir to PEG-interferon/ribavirin in HIV-HCV-Genotype-1-coinfected, treatment-experienced patients: efficacy, safety, and pharmacokinetics data from the ANRS HC27 study. *HIV Clin Trials.* 17(2), 63-71.

Punzalan CS, Barry C, Zacharias I, Rodrigues J, Mehta S, Bozorgzadeh A, et al. 2015. Sofosbuvir plus simeprevir treatment of recurrent genotype 1 hepatitis C after liver transplant. *Clin Transplant.* 29 (12), 1105-1111.

- Qian XJ, Zhang XL, Zhao P, Jin YS, Chen HS, Xu QQ, et al., 2016. A Schisandra-derived compound schizandronic acid inhibits entry of pan-HCV genotypes into human hepatocytes. *Sci Rep.* 6, 27268.
- Rizk HH, Hamdy NM, Al-Ansari NL, El-Mesallamy HO, 2016. Pretreatment Predictors of Response to PegIFN-RBV Therapy in Egyptian Patients with HCV Genotype 4. *PLoS One.*11, 4.
- Sharafi H, Pouryasini A, Alavian SM, Behnava B, Keshvari M, Mehrnoush L, et al., 2012. Development and Validation of a simple, rapid and inexpensive PCR-RFLP method for genotyping of common IL28B polymorphisms: a useful pharmacogenetic tool for prediction of hepatitis C treatment response. *Hepat Mon.*12,190–195.
- Sharma A, Halim J, Jaggi T, Mishra B, Thakur A, Dogra V, et al., 2016. Time trends of seroepidemiology of hepatitis C virus and hepatitis B virus coinfection in human immunodeficiency virus-infected patients in a Super Specialty Hospital in New Delhi, India: 2012-2014. *Indian J Sex Transm Dis.*37(1), 33-37.
- Tang L, Marcell L, Kottlilil S., 2016. Systemic manifestations of hepatitis C infection. *Infect Agent Cancer.*11:29.
- Taylor R., 1990. Interpretation of the correlation coefficient: a basic review, *Journal of Diagnostic Medical Sonography*, 6(1), 35–39.
- Vanham G, Van Gulck E, 2012. Can immunotherapy be useful as a "functional cure" for infection with Human Immunodeficiency Virus-1? *Retrovirology.* 9, 72.
- Watanabe T, Joko K, Seike H, Michitaka K, Horiike N, Kisaka Y, et al., 2016. Simeprevir with peginterferon/ribavirin for patients with hepatitis C virus genotype 1: high frequency of viral relapse in elderly patients. *Springerplus.* 5, 518.
- Wirth TC, Manns MP., 2016. The impact of the revolution in hepatitis C treatment on hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol.* 27(8), 1467-1474.

Xiang Y, Tang JJ, Tao W, Cao X, Song BL, Zhong J., 2015. Identification of cholesterol 25-hydroxylase as a novel host restriction factor and a part of the primary innate immune responses against hepatitis C virus infection. *J Virol.* 89(13), 6805–6816.

Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamijo A, Joshita S, Komatsu M, et al., 2011. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Infect Dis.* 203(8), 1087–1095.

Yoneda S, Umemura T, Joshita S, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, et al., 2011. Serum chemokine levels are associated with the outcome of pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 41(6):587-593.

Zarife MA, Reis EA, Meira GC, Carmo TM, Lopes GB, Malafaia EC, et al., 2011. IL-8 is associated with non-viremic state and IFN- γ with biochemical activity in HCV-seropositive blood donors. *Intervirology.* 54(2), 87-96.

Figure Captions

Figure 1 - *Overall profile of serum chemokines and cytokines in non-treated HCV patients.*

Chemokine (IL-8/CXCL-8, MCP-1/CCL-2, MIG/CXCL-9, IP-10/CXCL-10 and RANTES/CCL5) and cytokine (IFN- α , IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17) levels were measured in serum samples from Non-treated HCV patients (HCV=■) and Non-infected Controls (NI=□) by cytometric bead array as described in Methods. The results are presented by bar plots, in Log scale, displaying the median serum concentration and 75% interquartile range. Significant differences at $p < 0.05$ between groups are highlighted by connecting lines.

Overall Profile of Serum Chemokines and Cytokines in Non-treated HCV Patients

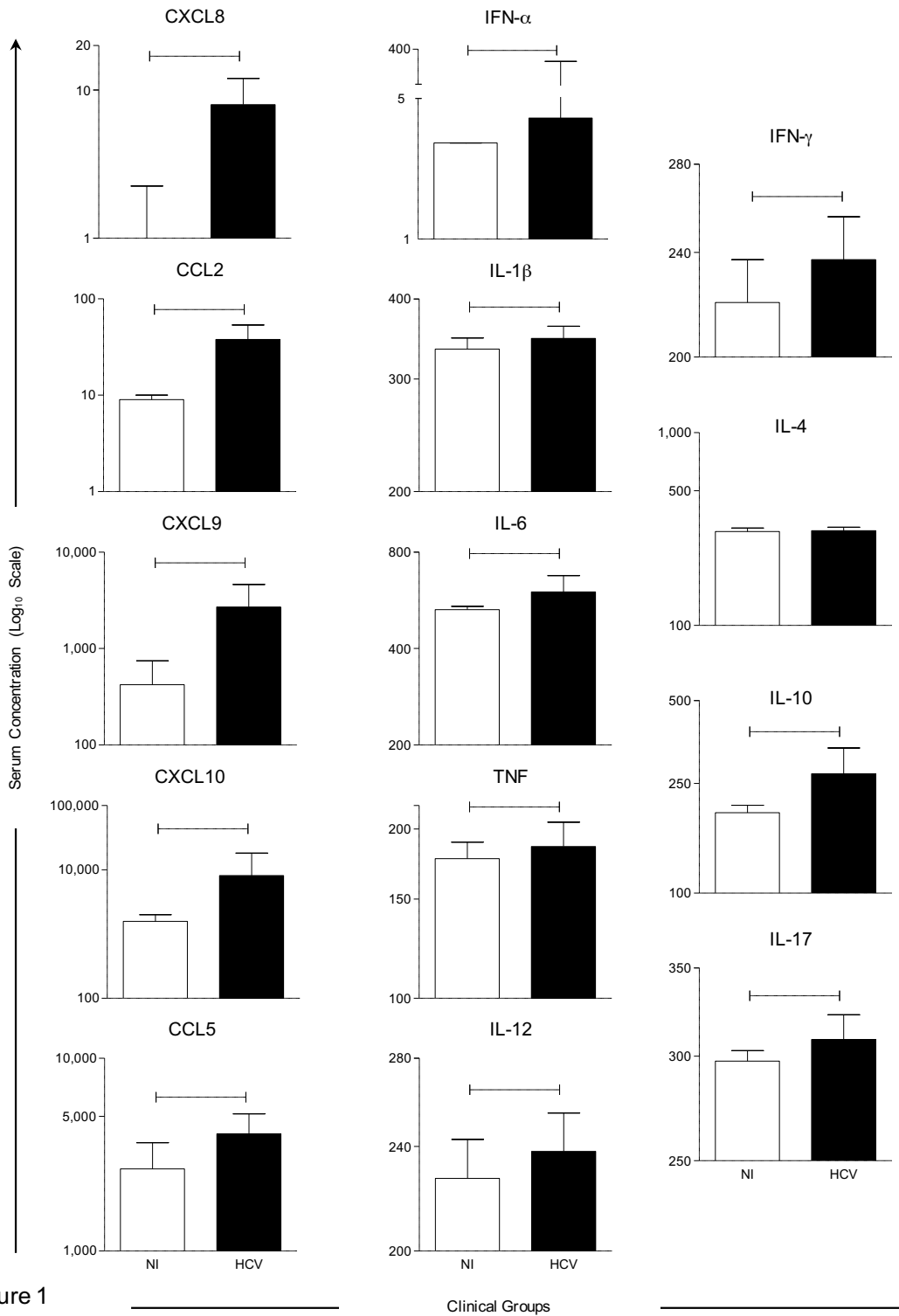


Figure 1

Clinical Groups

Figure 2 - *Serum chemokine/cytokine levels in HCV patients according to the therapeutic response.* Chemokine (IL-8/CXCL-8, MCP-1/CCL-2, MIG/CXCL-9, IP-10/CXCL-10 and RANTES/CCL5) and cytokine (IFN- α , IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17) levels were quantified by cytometric bead array in serum samples from HCV patients, subgrouped according to the therapeutic response (NR=■; REL=■ and SVR=□), as described in Methods. The chemokine/cytokine level assessment was performed before (T0) and throughout the immunotherapy intervention (T12 and T48). The reference ranges of values for non-infected controls are provided in the figure as indicated by dashed lines. The results are presented by bar plots, in Log scale, displaying the median serum concentration and 75% interquartile range. Significant differences at $p < 0.05$ between groups are underscored by *, # and § for comparisons with NR, REL and SVR, respectively.

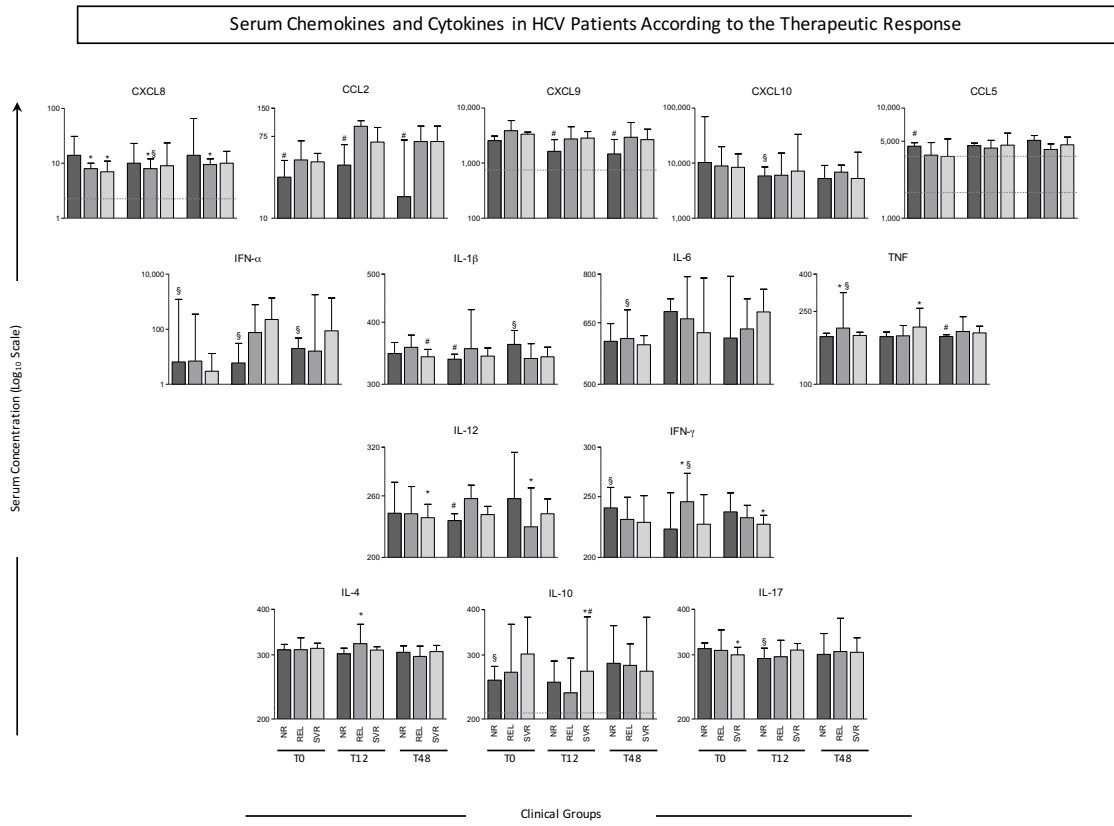


Figure 2

Figure 3 - *Serum chemokine and cytokine signatures in HCV patients according to the therapeutic response.* Ascendant chemokine/cytokine signatures were constructed for reference groups (HCV=■ and NI=□) along with HCV sub-groups (NR=■; REL=■ and SVR=□), assessed before (T0) and throughout the immunotherapy intervention (T12 and T48). Data are expressed as ascendant frequency of subjects with high serum biomarker levels as described in Methods. Biomarkers for which the frequency of subjects with “High” serum levels was above the 50th percentile were used for data mining and are highlighted with gray rectangle backgrounds.

Serum Chemokine and Cytokine Signatures in HCV Patients According to the Therapeutic Response

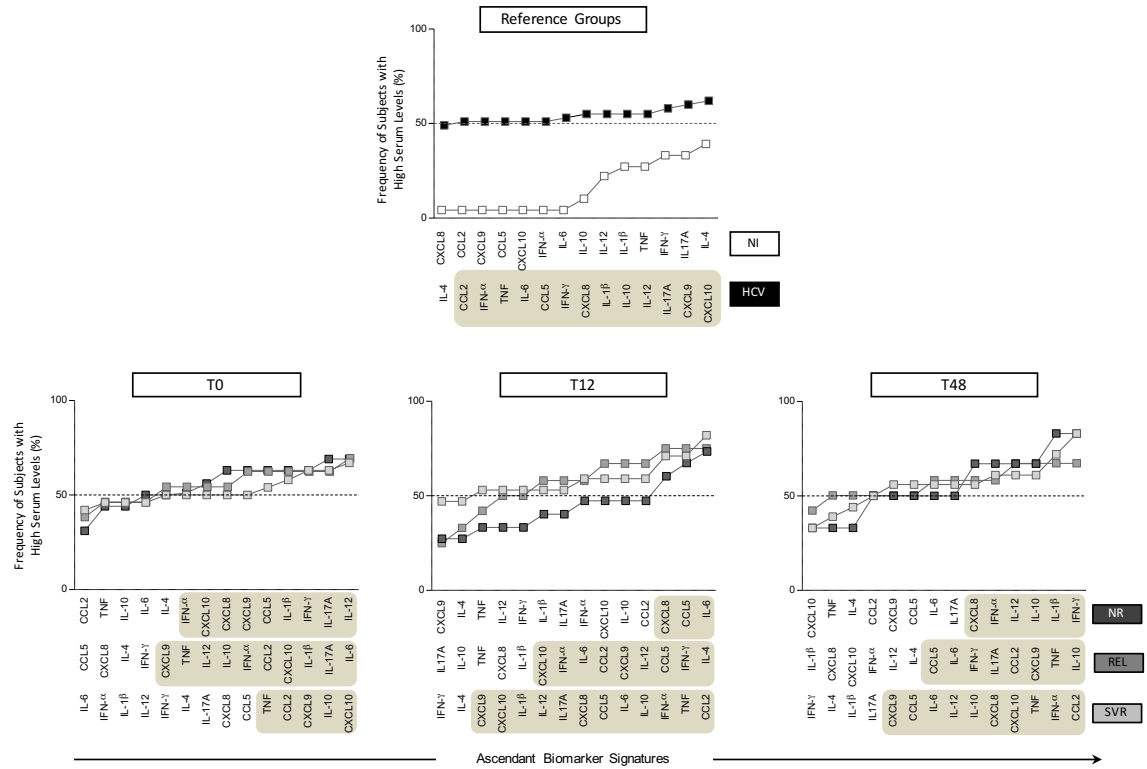


Figure 3

Figure 4 - *Biomarker networks of HCV patients according to the therapeutic response.* Networks of Chemokine/cytokine were assembled for HCV sub-groups (NR=●; REL=● and SVR=○), assessed before (T0) and throughout the immunotherapy intervention (T12 and T48). Correlation matrices were built with significant indices and circular layouts with globular nodes representing each biomarker connected by edges to identify significant ($p < 0.05$) correlation, as described in Methods. Connecting edges representing “r” correlation index underscored: strong positive ($r \geq 0.68$) and moderate positive ($0.36 \leq r < 0.68$) represented by solid lines; strong negative ($r \leq -0.68$) and moderate negative ($-0.68 < r \leq -0.36$) as dashed lines as proposed by Taylor (1990) [27].

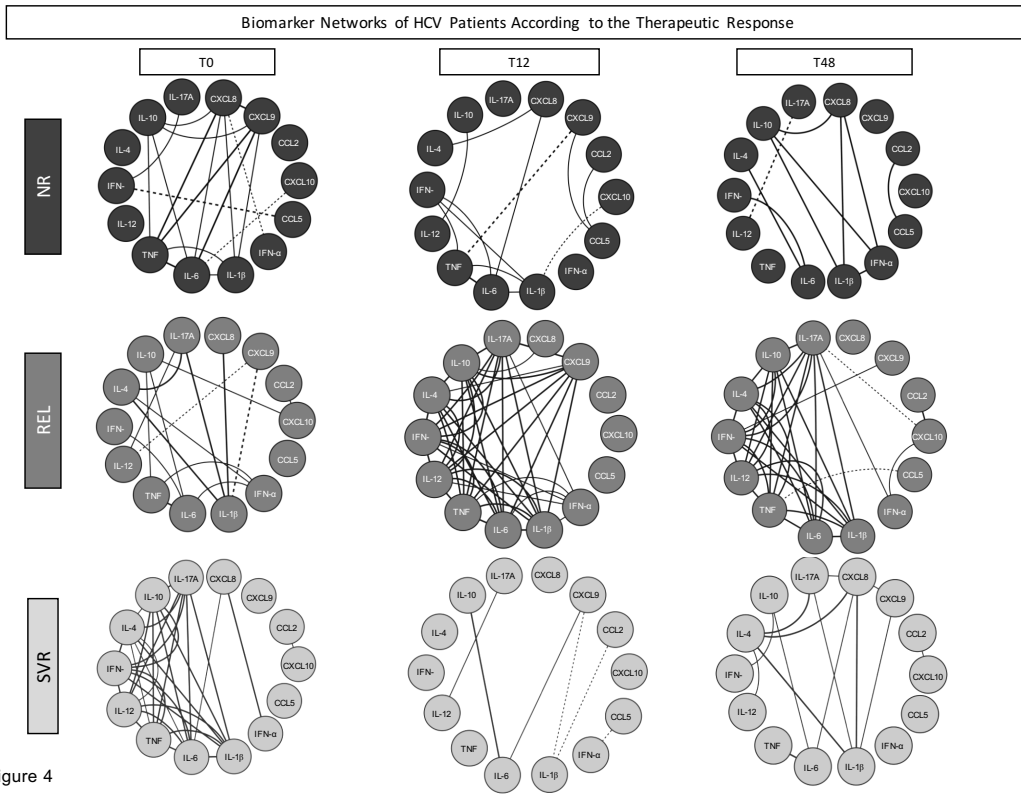
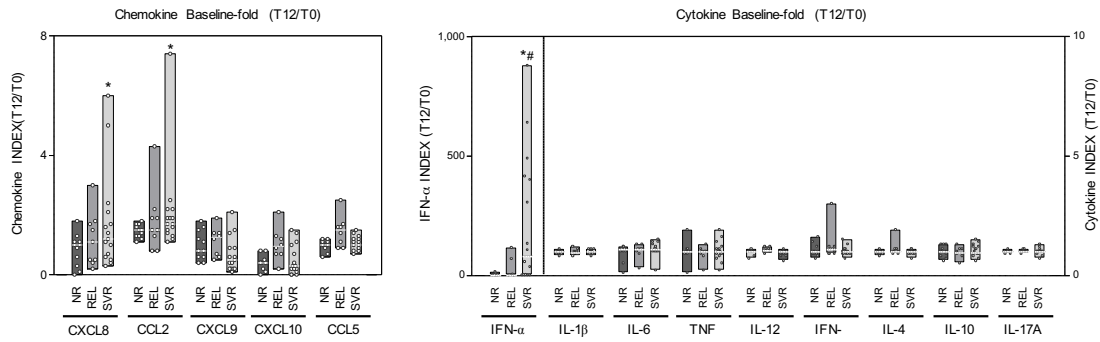


Figure 5 - Serum chemokine and cytokine baseline-fold (T12/T0) in HCV patients according to the therapeutic response. Baseline-fold of chemokine/cytokine index were calculated for HCV sub-groups (NR=■; REL=■ and SVR=□) as the ratio T12/T0, as described in Methods. The baseline-fold (T12/T0) indices were displayed as floating bars of minimum and maximum values overlaid by scatter plots of individual values for each biomarker. The heatmaps of equalized number of subjects, shown in the middle panels, were assembled to display the overall proportion of subjects with “High” baseline-fold index (T12/T0) according to the therapeutic response. Those biomarkers associated with frequencies of “High” baseline-fold index (T12/T0) above 50% were selected as relevant tools to differentiate HCV subgroups (NR, REL and SVR). Decision trees with putative biomarkers were assembled by machine learning algorithm in order to select unbiased clusters. Significant differences at $p < 0.05$ between groups are either underscored by connecting lines (lower panels) as well as symbols (*, # and §) for comparisons with NR, REL and SVR, respectively.

Serum Chemokine and Cytokine Baseline-fold (T12/T0) in HCV Patients According to the Therapeutic Response



Frequency of HCV Patients with "High" Baseline-fold (T12/T0) According to the Therapeutic Response

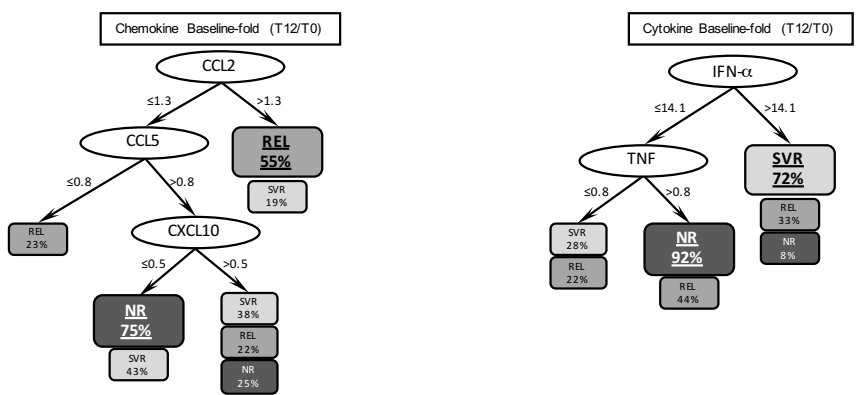
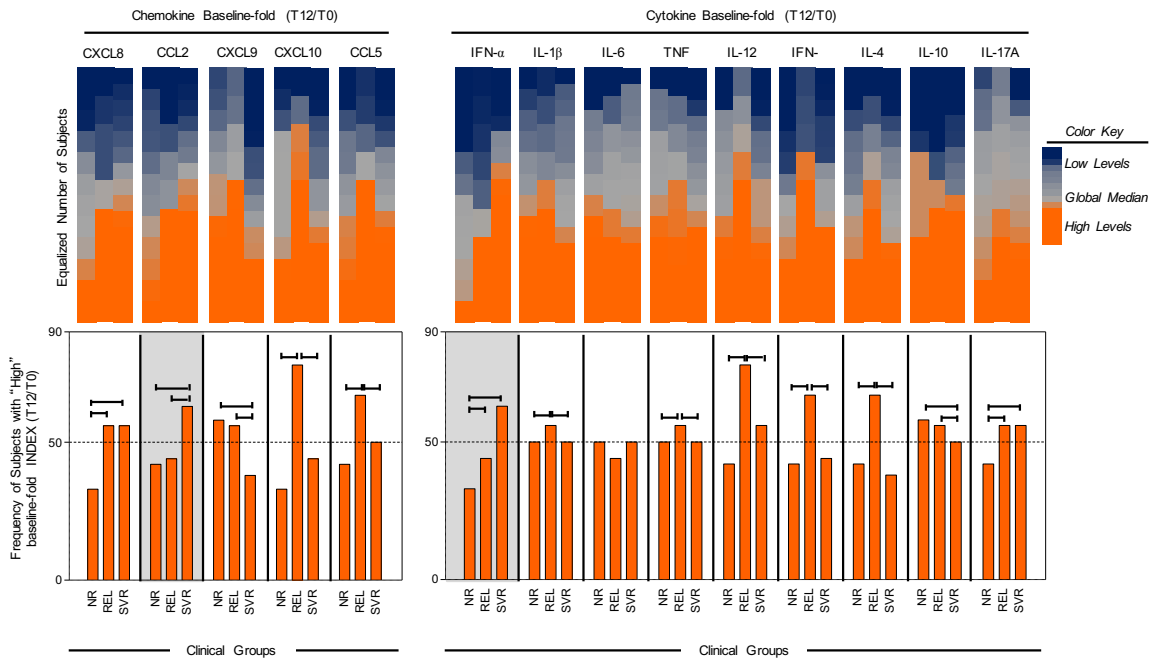


Figure 5

Figure 6 - Performance of baseline-fold changes in IFN- α and TNF (T12/T0) to monitor HCV patients according to the therapeutic response. Baseline-fold indices (T12/T0) of IFN- α followed by TNF were assembled for HCV sub-groups (NR=● and SVR=○), assessed by cytometric bead array as described in Methods. Proportions of subjects from NR and SVR subgroups confined below (dashed rectangles) and above (continuous line rectangles) the cut-off value are provided in panel A. Receiver Operating Characteristics (ROC) as well as Two-Graph ROC curves were constructed for the performance analysis of IFN- α followed by TNF as the biomarker algorithm for segregating NR versus SVR. Performance of operating characteristics such as the sensitivity (Se), specificity (Sp) and area under the curve (AUC) are displayed as insets in panel B. The principal component analysis displayed in panel C were built as XY plots considering the Log₁₀ Baseline Levels (T0) and Log₂ Baseline-fold changes (T12/T0) of all biomarkers. Amongst the total of components considered, the IFN- α (●) results were able to clusterize (dashed-line ellipsis) most SVR subjects above the cut-off edge (baseline-fold= \pm 14; dashed lines).

Performance of Baseline-fold Changes in IFN- α and TNF (T12/T0) to Monitor HCV Patients According to the Therapeutic Response

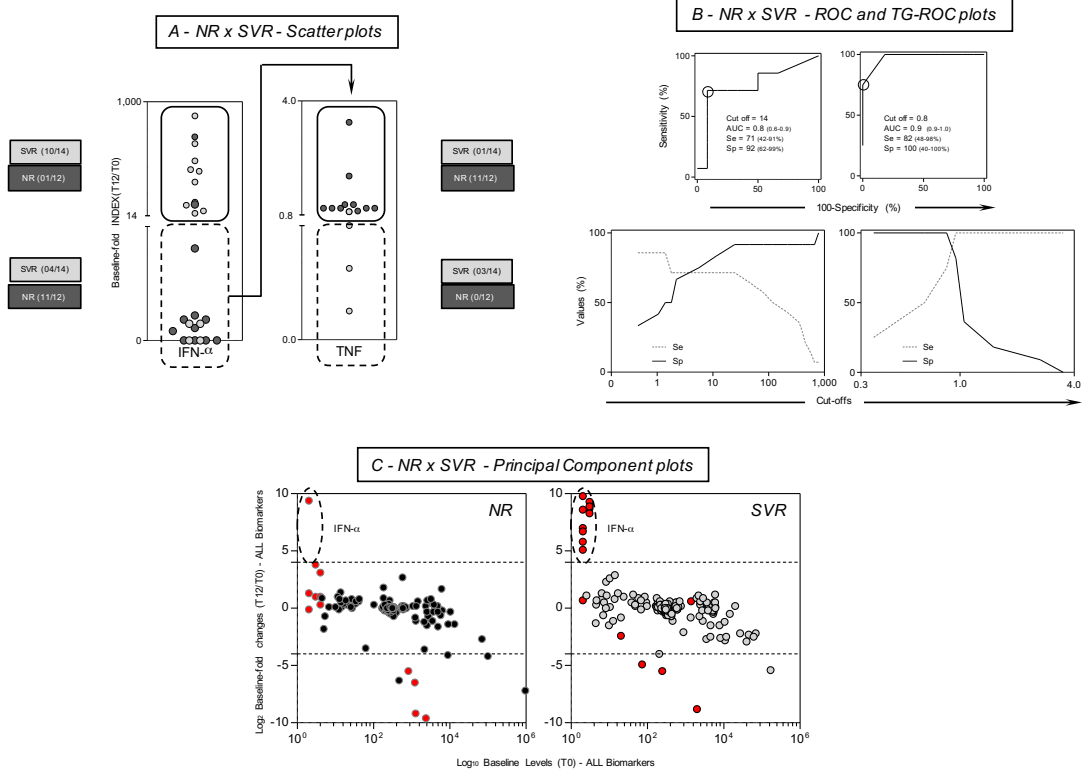
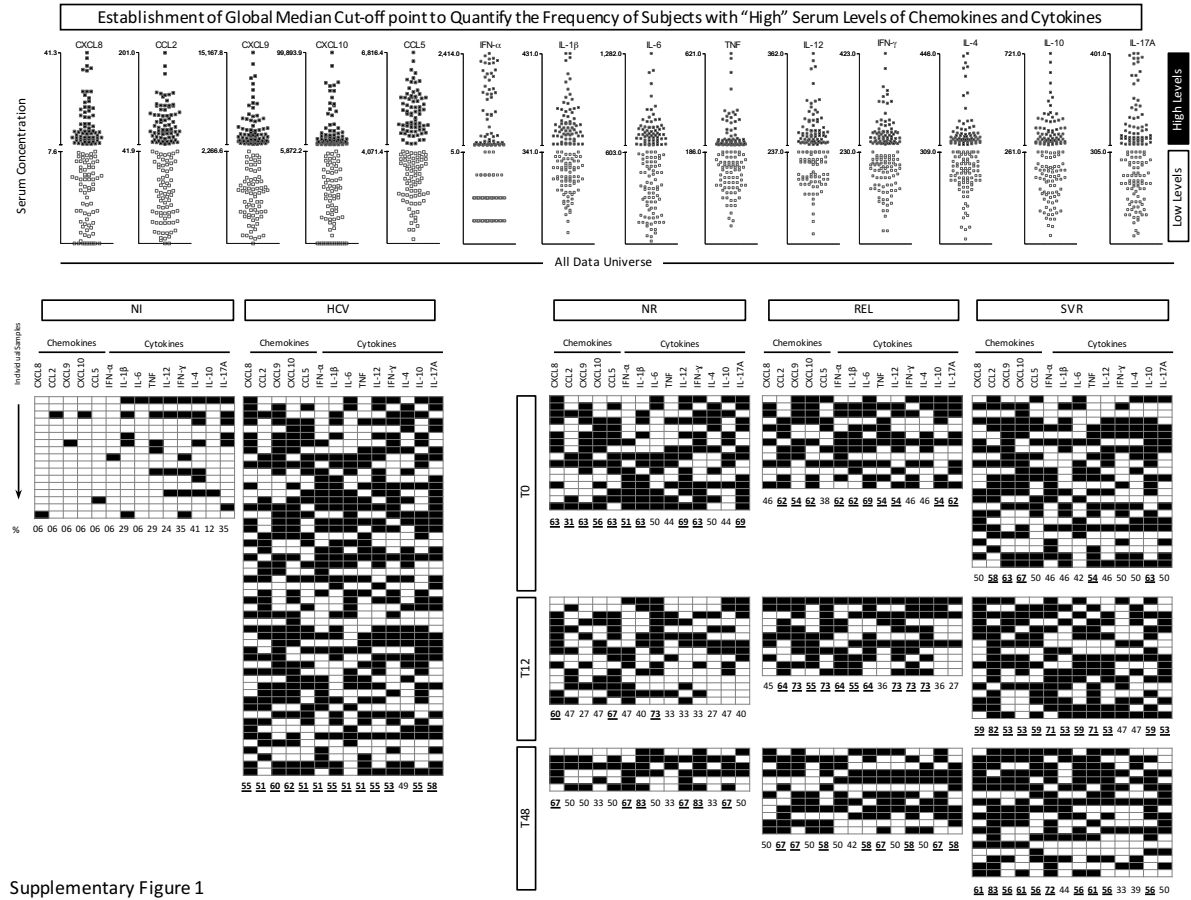


Figure 6

Caption for supplementary Material

Supplementary Figure 1 - *Establishment of Global Median Cut-off point to Quantify the Frequency of Subjects with “High” Serum Levels of Chemokines and Cytokines.* Quantitative biomarker analysis was performed to identify the levels of Chemokines (IL-8/CXCL-8, MCP-1/CCL-2, MIG/CXCL-9, IP-10/CXCL-10 and RANTES/CCL5) and cytokines (IFN- α , IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17) by cytometric bead array in serum samples from HCV patients before (T0) and after immunotherapy (T12 and T48), as well as non-infected controls. A total of 149 serum samples were used to calculate the global median value of each biomarker that was further used to classify each individual sample as “Low” (□) or “High” (■) serum levels. Black-and-white diagrams were assembled to calculate the frequency of subjects with “High” serum levels of each biomarker by column statistics. Relevant frequencies ($\geq 50\%$) of subjects with “High” serum levels are highlighted by bold underline format.



Supplementary Figure 1

Table 1. Demographic features and laboratorial records of HCV study group

PARAMETERS	HCV	HCV SUBGROUPS*		
		NR	REL	SVR
Age	53 (20-70)	53 (20-62)	57 (38-69)	51 (24-70)
Gender (n)				
Males	33	09	11	13
Females	21	07	03	11
ALT (IU)	80.5 (18.0-238.0)	65.0 (26.0-161.0)	103.0 (33.0-191.0)	83.0 (18.0-238.0)
AST (IU)	74.0 (5.0-241.0)	74.0 (5.0-241.0)	76.0 (31.0-169.0)	59.0 (21.0-158.0)
Albumin (g/dL)	4.2 (3.3-5.2)	4.0 (3.3-5.2)	4.4 (4.0-5.0)	4.2 (3.3-5.1)
Platelets (counts/mm³)	164,500 (50,000-395,000)	123,000 (50,000-246,000)	164,000 (111,000-244,000)	207,000 (97,000-395,000)
PA (%)	95.5 (61.0-117.0)	91.6 (61.0-100.0)	100 (79.0-110.0)	98 (67.0-117.0)
INR	1.03 (0.91-1.29)	1.06 (0.99-1.29)	1.00 (0.91-1.19)	1.01 (0.92-1.23)
Viral Load (IU/mL)	597,000 (135,000-4,914,583)	615,000 (135,000-4,914,583)	634,000 (149,841-1,513,889)	579,000 (180,587-850,000)
METAVIR Score (%)				
A1F2	17.6	6.3	15.4	27.3
A1F4	9.8	12.5	23.1	0.0
A2F1	7.8	6.3	7.7	9.1
A2F2	23.5	18.8	30.8	22.7
A2F3	11.8	12.5	0.0	18.2
A2F4	19.6	37.5	15.4	9.1
A3F2	3.9	0.0	0.0	9.1
A3F4	5.9	6.3	7.7	4.5

HCV subgroups were considered according to the virologic response; NR = non-responders; REL= relapsers; SVR = sustained virologic response; PA = prothrombin activity; INR = international normalized ratio; data are reported as median (min-max) values. METAVIR score (A=activity; F=fibrosis score), where F0 = no fibrosis; F1 = portal fibrosis without septa; F2 = portal fibrosis with septa; F3 = numerous septa without cirrhosis; F4 = cirrhosis and Activity score: A0 = no activity; A1 = mild activity; A2 = moderate activity; A3 = severe activity. No significant differences were observed in demographic features or laboratorial records amongst the HCV subgroups.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A despeito das dificuldades e da inabilidade em cultivar vírus humanos diretamente em laboratório, o HCV tornou-se um modelo de estudo, definindo novos paradigmas na virologia, imunologia e na biologia¹ (BUCK *et al*, 2016). Várias moléculas críticas para a entrada e replicação do HCV foram identificadas no hospedeiro humano, permitindo o desenvolvimento de agentes terapêuticos voltados para esses alvos. Mais ainda, a caracterização de proteínas codificadas do HCV e de suas unidades funcionais contribuiu para o desenvolvimento de agentes antivirais de ação direta (DAA's) altamente efetivos contra a protease NS3 e as polimerases NS5A e NS5B. Combinados, esses inibidores permitiram difundir esquemas de terapia da hepatite C crônica livres de interferon a partir de 2014, com taxas de cura acima de 90%² (AFIFY *et al*, 2016).

Apesar do IFN- α não ser mais uma droga de primeira escolha no tratamento da hepatite C crônica em muitos países, incluindo o Brasil, seu uso por vários anos, em monoterapia ou associado à ribavirina, contribuiu para maior compreensão a respeito do papel da imunidade na resposta terapêutica³ (JARRET *et al*, 2016). Com mecanismos efetores capazes de fortalecer o sistema imune inato no processo de eliminação de patógenos infecciosos, o IFN- α é um importante agente imunoterapêutico, e a compreensão das alterações do painel de quimiocinas/citocinas induzidas pela imunoterapia pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas drogas e para a compreensão e atenuação de eventuais efeitos adversos.

A elevação dos níveis de todas as quimiocinas/citocinas séricas testadas (à exceção de IL-4) nos pacientes com hepatite C crônica deste estudo em comparação aos pacientes não-infectados (grupo padrão) demonstra o caráter misto pró-inflamatório/regulador do HCV. No entanto, observou-se que um estado pró-inflamatório exacerbado no período pré-tratamento tem um efeito deletério, levando à falha terapêutica.

¹ Buck J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J Hepatol* 2016;65(1Suppl): S2-S1.

² Afify M, Hamza AH, Alomari RA. Correlation between serum cytokines, interferons, and liver functions in hepatitis C virus patients. *J Interferon Cytokine Res* 2016;11.

³ Jarret A, McFarland AP, Horner SM, Kell A, Schwerk J, Hong M et al. Hepatitis-C-virus-induced microRNA's dampen interferon-mediated antiviral signaling. *Nat Med* 2016;12:1475-81.

Estudos prévios sugerem que a presença de um perfil pró-inflamatório modulado no período pré-tratamento favorece a RVS, enquanto a resposta inflamatória exacerbada antes do tratamento predispõe à falha ou não-resposta⁴ (ARAÚJO *et al.*, 2013). Os resultados demonstraram que, de maneira geral, a falência terapêutica poderá estar associada com a presença, antes do tratamento, de um padrão sérico predominantemente pró-inflamatório, representado pela elevação de CCL5, IFN- α e IFN- γ , associados a níveis diminuídos de IL-10 em pacientes não-respondedores, e níveis elevados de IL-6 e TNF em recidivantes. Pacientes com RVS apresentaram perfil pró-inflamatório menos acentuado, com níveis diminuídos de CXCL8, IL-12 e IL-17.

Outro resultado importante deste estudo diz respeito ao index 12 semanas/pré-tratamento (índice T12/T0). A habilidade em organizar uma resposta proinflamatória/regulatória robusta e balanceada na semana 12 de tratamento parece crítica para garantir o sucesso terapêutico, e esse padrão se sustenta ao longo da imunoterapia (T48) em pacientes com RVS. Isso foi observado especialmente com os níveis de IFN- α , componente importante da resposta imune inata. A análise ascendente da assinatura deste biomarcador evidenciou a relevância da elevação de seus níveis e persistência da mesma ao longo do tratamento como forma de garantir a RVS, em conformidade com relatos prévios (ARAÚJO *et al.*, 2013), afirmando seu papel essencial no controle da replicação viral. A elevação consistente da atividade do IFN tipo 1 também vem sendo relacionada há anos a um pior prognóstico da infecção viral⁵(CRAXI *et al.*, 1995).

O TNF também apresentou, na análise do index 12 semanas/pré-tratamento, resultados que o validam como biomarcador de alta performance na monitorização da evolução do tratamento da hepatite C crônica com interferon peguilado α -2a/2b + ribavirina. De fato, pacientes com RVS apresentaram, no pré-tratamento, padrões integrados de redes de biomarcadores com elevada conexão de citocinas, que modificou-se ao longo do tratamento, assumindo um padrão pró-inflamatório semelhante àquele observado em pacientes NR e REC antes do tratamento.

Pacientes não-respondedores não elevaram significativamente os níveis de IFN- α ao longo da imunoterapia (IFN peguilado α -2a e 2b), o que poderia ser explicado pela produção de anticorpos contra esta substância, ou ainda pelo desenvolvimento de um possível estado de

⁴ Araújo AR, Perhype-Magalhães V, Coelho-dos-Reis JG, Chaves LP, de Lima TA, Pimentel JP, et al. Dual role of IL-12 in the therapeutic efficacy or failure during combined PEG-Interferon- α 2A and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Immunol Lett* 2013;154(2):61-9.

⁵ Craxi A, Magrin S, Fabiano C, Linea C, Almasio P. Host and viral features in chronic HCV infection: relevance to interferon responsiveness. *Res Virol* 1995;146(4):273-8.

tolerância e imunossupressão paradoxal decorrentes das repetidas administrações de IFN- α peguilado. Pacientes REC desenvolveram, após imunoterapia, um perfil semelhante ao observado no pré-tratamento de pacientes com RVS. Esses dados levantam a hipótese de que a monitorização do estado imunológico do paciente antes do tratamento com droga antiinflamatória poderia contribuir para uma resposta satisfatória em pacientes NR e REC.

Um grupo de pesquisadores italianos observou que os níveis de IL-8 foram mais baixos tanto durante quanto após o tratamento dos pacientes que apresentaram resposta virológica sustentada comparados aos não respondedores, sugerindo possível utilidade da IL-8 como marcador preditivo não-invasivo da resposta ao tratamento da hepatite C com a combinação de PEG-IFN mais RBV⁶ (CACOPARDO *et al.*, 2008). Apesar dos resultados individuais do index 12 semanas/pré-tratamento (*baseline-fold*) para CXCL8 terem se apresentado mais elevados nos pacientes com RVS no presente estudo, assim como ocorreu com IFN- α e CCL2, CXCL8 não se revelou biomarcador capaz de prever NR, REC ou RVS. Por outro lado, à semelhança do estudo conduzido por Cacopardo e colaboradores (2008), níveis séricos mais elevados de IL-8 foram observados em pacientes com infecção pelo HCV comparados aos controles não infectados. Em outro estudo⁷ (JIA *et al.*, 2007), a IL-8 mostrou-se inclusive capaz de atenuar as ações antivirais do IFN- α , o que pode, em última instância, colaborar para a resistência do HCV ao tratamento com esquemas baseados no IFN.

Os resultados desta investigação mantêm o papel de CCL5 ainda controverso como possível preditor de resposta terapêutica. Da mesma maneira, estudos sobre a expressão de CCL5 na hepatite C crônica apresentam resultados discordantes na literatura. Em estudo com pacientes submetidos ao tratamento da hepatite C crônica, os níveis séricos de CCL5 não diferiram entre respondedores e não-respondedores no pré-tratamento, e a elevação precoce de CCL5 durante o tratamento pareceu ser preditora de RVS⁸ (FLORHOLMEN *et al.*, 2011). Outros estudos, por

⁶ Cacopardo B, Nigro L, Nunnari G, La Medica G, Cappellani A, Palermo F, Cappello E, Russo R. Association between raised IL-8 serum levels and resistance to combined peg-interferon plus ribavirin therapy in HCV + active chronic hepatitis. *Infez Med* 2008;16(2):80-5.

⁷ Jia Y, Wei L, Jiang D, Wang J, Cong X, Fei R. Antiviral action of interferon-alpha against hepatitis C virus replicon and its modulation by interferon-gamma and interleukin-8. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22(8):1278-85.

⁸ Florholmen J, Kristiansen MG, Steingen SE, Sorbye SW, Paulssen EJ, Kvamme JM, et al. A rapid chemokine response of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β and the regulated on activation, normal T expressed and secreted chemokine is associated with a sustained virological response in the treatment of chronic hepatitis C. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(2):204-9.

sua vez, revelaram níveis de CCL5 mais elevados em respondedores *versus* NR no pré-tratamento, sem alterações detectadas após o mesmo⁹ (YONEDA *et al.*, 2011).

Os resultados não confirmaram os achados de Apolinario *et al.* (2004), Butera *et al.* (2005), nem de Wan *et al.* (2009) ou, mais recentemente, de Johansson *et al.* (2016)¹⁰. Eles sugeriram que níveis mais elevados de CXCL9 criam um estado imunológico favorável à resposta virológica ao tratamento com IFN- α associado a RBV, o que não foi observado. A inclusão de REC entre NR pode ter contribuído para esses resultados paradoxais. Sabe-se que os níveis intra-hepáticos e periféricos de CXCL9 se apresentam elevados em pacientes com hepatite C crônica quando comparados a indivíduos sadios (APOLINARIO *et al.*, 2004; BUTERA *et al.*, 2005). CXCL9 é detectada principalmente nas células endoteliais sinusoidais. O número de células intra-hepáticas que expressam CXCL9 é, também, significativamente aumentado em indivíduos com hepatite C crônica e tem correlação com a atividade inflamatória (APOLINARIO *et al.*, 2002).

O pequeno tamanho da amostra deste estudo limita a possibilidade de conclusões definitivas e a generalização dos resultados encontrados, que apontam o IFN- α e o TNF como biomarcadores de alta performance na monitorização da evolução do tratamento antiviral (imunoterapia). É inegável, no entanto, a sua importante contribuição para o incentivo de estudos mais amplos, em busca de biomarcadores como ferramenta de monitorização visando a otimização da resposta terapêutica, a duração adequada do tratamento, a redução de custos e de eventos adversos associados ao tratamento da hepatite C, cuja morbidade e importância global a situam entre as doenças de grande impacto em saúde pública.

Um grande desafio persiste sobretudo na era dos novos tratamentos antivirais diretos para o tratamento da hepatite C: a resistência virológica. Eventos adversos, anticorpos neutralizadores e imunotolerância são também limitadores da efetividade terapêutica. Pesquisas caracterizando os processos de neutralização do vírus por anticorpos e de eliminação viral pelas células T são

⁹ Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamijo A, Joshita S, Komatsu M, et al. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Infect Dis* 2011;203(8): 1087-95.

¹⁰ Johansson S, Talloen W, Tuefferd M, Darling J, Fanning G, Fried MW, Aerssens J. High MIG (CXCL9) plasma levels favours response to Peg-Interferon and Ribavirin HCV-infected patients regardless of DPP4 activity. *Liver Int* 2016;36(3):344-52.

essenciais nesses esforços. Da mesma forma, a redução ou minimização de efeitos idiossincráticos decorrentes da imunoterapia deve estar focada na identificação de biomarcadores preditores de resposta terapêutica¹¹ (RIZK *et al.*, 2016). Somente o estudo detalhado e acompanhamento das alterações desses biomarcadores (resposta induzida de citocinas) poderá prover informações relevantes para o desenvolvimento de estratégias de monitorização da imunoterapia em portadores de doenças infecciosas.

¹¹ Rizk HH, Hamdy NM, Al-Ansari NL, El-Mesallamy HO. Pretreatment predictors of response to PegIFN-RBV therapy in egyptian patients with HCV genotype 4. PLoS One 2016;11:4.

ANEXO A

**FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

Belo Horizonte, 25 de novembro de 2011

Ilma Sra. Prof. Dra. Maria Teresa Marques do Amaral, Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

REFERÊNCIA: PARECER ETIC 226/06 de 18 de outubro de 2006 e sua DECLARAÇÃO datada de 06 de novembro de 2006

Prezada Prof. Maria Teresa,

Em 18 de outubro de 2006, depois de atendidas as solicitações de diligência, o COEP-UFMG aprovou o projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de parâmetros fenotípicos celulares de leucócitos do sangue periférico em indivíduos cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C”, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto, coordenado pela professora Rosângela Teixeira. Esse projeto resultou em duas teses de doutorado defendidas em 2006 (Dr. Eric Bassetti Soares) e 2008 (Dra. Kátia Valéria Bastos Dias Barbosa) e teve importantes conclusões. Assim, foi possível identificar que os pacientes com hepatite C crônica apresentam um conjunto de biomarcadores fenotípicos em leucócitos do sangue periférico que permitem discriminá-los de indivíduos saudáveis. Portanto, o estudo deveria prosseguir. Nesse contexto, foi solicitado parecer do COEP/UFMG na forma de adendo a esse projeto inicial, a aprovação de um estudo visando a análise de parâmetros fenotípicos celulares em amostras seriadas de soros de pacientes durante o tratamento da hepatite C. O objetivo seria identificar biomarcadores celulares de resposta virológica. Esse projeto seria realizado em parceria internacional com o Mount Sinai School of Medicine, em Nova York, onde as amostras seriam processadas, e foi aprovado pelo COEP/UFMG conforme declaração datada de 06 de novembro de 2006 (em anexo). Contudo, por razões logísticas, operacionais e do alto custo, essa nova proposta não foi realizada e as amostras colhidas foram armazenadas a -80°. C no nosso laboratório de pesquisas em hepatites virais. Não obstante, permaneceu o nosso interesse em realizá-lo em razão de sua grande contribuição potencial para a melhor compreensão dos fenômenos imunes associados à resposta ao tratamento da hepatite C, até o momento não esclarecidos na literatura científica.

Portanto, investigações nessa linha de pesquisa devem prosseguir e, particularmente, os estudos de biomarcadores moleculares séricos serão de grande importância para verificar a influência de mecanismos imunes associados à resposta virológica sustentada no tratamento da hepatite C com interferon-peguilado e ribavirina. De fato, um estudo piloto que avaliou biomarcadores moleculares séricos foi recentemente conduzido pelo nosso grupo em parceria com o grupo de pesquisas da Fundação Oswaldo Cruz de Salvador permitiu identificar citocinas e quimiocinas séricas como biomarcadores promissores para o acompanhamento de pacientes infectados com o vírus da Hepatite C. Esses resultados preliminares foram recentemente publicados num artigo científico: ZARIFE et al, IL-8 Is Associated with Non-Viremic State and IFN- with Biochemical Activity in HCV-Seropositive Blood Donors. Intervirology, (54), 87-96, 2010.

Com o surgimento dessas novas evidências científicas há, no momento, o interesse do nosso grupo, em parceria com a FIOCRUZ, em adaptar os objetivos iniciais para investigar os parâmetros fenotípicos moleculares séricos (perfil de citocinas e quimiocinas) (e não celulares) de resposta/não resposta ao tratamento da hepatite C crônica. Assim, as amostras de soros de pacientes portadores de hepatite C crônica já colhidas e armazenadas no serviço seriam

processadas para a dosagem de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta pró-inflamatória e reguladora durante o tratamento da hepatite C crônica. Para esta finalidade, será pertinente a adequação do título anterior do projeto para “Aplicabilidade de biomarcadores séricos na monitorização do tratamento da hepatite C”. Com essa perspectiva e visando a ampliar as pesquisas de nossos alunos de pós-graduação, as amostras colhidas à época para o referido projeto seriam analisadas visando esse objetivo modificado do inicial. Os custos para a execução do projeto modificado são menores, não haverá mais a necessidade de envio de amostras de nossos pacientes para o exterior como previsto previamente, uma vez que o Laboratório de Biomarcadores da Fundação Oswaldo Cruz dispõe de toda a infra-estrutura laboratorial para a sua realização.

A privacidade e sigilo da identidade dos pacientes e dos seus dados serão assegurados por todos os pesquisadores interessados. As informações obtidas serão analisadas em conjunto e não serão divulgados dados em separado de nenhum paciente.

Não haverá custos ou qualquer prejuízo para os pacientes que já foram tratados e concordaram em participar da pesquisa entre 2006 e 2008. A maioria dos participantes continua em acompanhamento ambulatorial no nosso serviço. Portanto, será solicitado a esses pacientes uma autorização para que as suas amostras de sangue colhidas previamente sejam analisadas com vistas aos novos objetivos do estudo proposto. Para esta finalidade, serão esclarecidos os objetivos do projeto atual e será solicitada a assinatura dos pacientes conforme o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido atualizado. Para os pacientes que, por motivos diversos, não são mais acompanhados no serviço, solicitamos ao COEP/UFMG a isenção do termo de consentimento para que suas amostras possam ser analisadas.

À disposição para outras informações, se necessárias,
Atenciosamente,

Dra. Erica Godinho Menezes
Pesquisadora – Faculdade de Medicina da UFMG

Prof. Rosângela Teixeira
Prof. Associada III do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG
Orientadora

ANEXO B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA EM SERES HUMANOS

Título do projeto de pesquisa: Biomarcadores séricos na monitorização do tratamento da hepatite C crônica com interferon peguilaado mais ribavirina

Prezado Sr.(a) _____

O Sr.(a) foi convidado para retornar ao Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG por ter participado de um projeto de pesquisa entre os anos de 2006-2008, coordenado pela Prof. Rosângela Teixeira. Na ocasião, o objetivo do estudo era descobrir, no exame de sangue de pessoas com hepatite C, alguns aspectos da imunidade – quais células estavam relacionadas com a resposta ao tratamento da hepatite C crônica. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG que é o órgão que regulamenta a pesquisa em seres humanos na UFMG (Parecer ETIC 226/06).

Naquela época, os nossos laboratórios não eram suficientes para realizar esta pesquisa e, portanto, o Comitê de Ética aprovou o envio das amostras de sangue dos pacientes da pesquisa para os Estados Unidos, onde seriam analisadas. É importante lembrar que essas amostras foram todas marcadas com números e que a sua identidade pessoal jamais foi revelada. Não havia nenhum interesse em mostrar seu nome ou características pessoais, o objetivo era apenas a análise dos aspectos imunes de pacientes com hepatite C crônica tratados com interferon peguilaado mais ribavirina.

Contudo, esse projeto inicial não pode ser realizado. Os custos eram muito altos e isso inviabilizou a pesquisa naquele tempo. Mas nosso interesse no projeto continuou e, portanto, todas as amostras de sangue colhidas foram armazenadas no nosso freezer que tem características específicas para preservar esse material.

Com o passar dos últimos 3 anos, fizemos uma parceria com pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz. Essa instituição de pesquisa dispõe, atualmente, de todos os equipamentos necessários para pesquisas como a que propomos agora. Assim, nosso objetivo, um pouco modificado do anterior, visa estudar, no sangue guardado no freezer, algumas substâncias no sangue chamadas citocinas e quimiocinas que poderão nos indicar, retrospectivamente, quais dessas substâncias tem relação com as chances de resposta ao tratamento da hepatite C. Portanto, nosso objetivo é descobrir o que chamamos de biomarcadores, ou seja, substâncias do sangue que seriam indicadoras de resposta ou não resposta ao tratamento.

Como no projeto anterior, sua identidade será preservada e o seu sangue será utilizado somente com o objetivo de identificar essas substâncias que tem relação com as chances de resposta. Não haverá benefícios para você, contudo novos conhecimentos poderão beneficiar pacientes no futuro. Você não terá despesas com esse projeto.

Pelas razões acima, solicitamos que, caso concorde em participar dessa pesquisa, assine esse novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se você não tiver mais dúvidas sobre sua participação que é voluntária. Caso não queira participar, por algum motivo, o seu atendimento no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG continuará normalmente, como vem acontecendo nesses últimos anos.

Se você necessitar de mais esclarecimentos a respeito desta pesquisa, por favor, entre em contato com a Dra. Erica Godinho Menezes ou a Dra. Rosangela Teixeira, no telefone 31 3409 9933 ou no nosso Serviço, todas as quintas-feiras pela manhã. Caso tenha dúvidas, você poderá também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, presidido pela Dra. Maria Teresa Marques do Amaral, que fica situado na Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – sala 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Telefax: 31 3409-4592.

Eu, _____, concordo em participar do estudo.

Assinatura do paciente _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Belo Horizonte, _____ de _____ de 2012

ANEXO C- APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS

1. Jornada de Hepatologia do Nordeste/ 2014 – João Pessoa, PB - Premiada como o melhor tema livre oral.

De: SBH - Sociedade Brasileira de Hepatologia [mailto:eventos@sbhepatologia.org.br]

Enviada em: segunda-feira, 15 de setembro de 2014 16:10

Para: egodinhomenezes@gmail.com

Cc: 'Katia Santos'; 'Ana Paula Firmino - Sociedade Brasileira de Hepatologia'

Assunto: Trabalhos - II Simpósio de Hepatologia do Nordeste

Prezado (a) Dr(a). ÉRICA GODINHO MENEZES,

Temos a grata satisfação de informar que o seu trabalho intitulado:

BIOMARCADORES SÉRICOS NA MONITORIZAÇÃO DO TRATAMENTO DA HEPATITE C CRÔNICA COM INTERFERON PEGUILADO ASSOCIADO A RIBAVIRINA

Foi aceito para apresentação na modalidade **TEMA LIVRE ORAL** .

Cordialmente,

Prof. Dr. Edison Roberto Parise
Presidente da SBH

Prof. Dr José Eymard de Medeiros Filho
Presidente do Simpósio

2. XXIII Congresso Brasileiro de Hepatologia/ 2015 - São Paulo, SP - Tema Livre Oral



CERTIFICADO



SBH 2015
XXIII Congresso Brasileiro de Hepatologia
30 de setembro a 03 de outubro de 2015 - São Paulo - SP

Certificamos que **Menezes EG, Reis JGC, Cardoso LM, Silva LD, Magalhães VP, Carvalho AT, Filho OAM, Teixeira R** participaram do XXIII Congresso Brasileiro de Hepatologia com o trabalho: Biomarcadores séricos na monitorização do tratamento da hepatite C crônica com interferon peguilado associado a ribavirina, como ORAL.

Promoção
São Paulo, 30 de setembro a 03 de outubro de 2015





Edison Roberto Parise
Presidente do Congresso



Edna Strauss
Presidente da Comissão Científica

Apoio



3. The Viral Hepatitis Congress/ 2015 – Frankfurt, Alemanha – Poster

Viral Hepatitis Congress - Abstract submission - Reviewers decision

2 mensagens

Viral Hepatitis Scientific Programme Committee <hep@ashfieldhealthcare.com> 6 de julho de 2015
06:36

Responder a: Viral Hepatitis Scientific Programme Committee <hep@ashfieldhealthcare.com>

Para: egodinhomenezes@gmail.com

Dear Abstract Submitter

Serum biomarkers for monitoring pegylated interferon- α plus ribavirin therapy response in chronic hepatitis C patients

On behalf of the Scientific Committee, we are delighted to advise you that the above submitted abstract with the reference 3184008 has been accepted for **poster presentation** at the Viral Hepatitis Congress. If you have submitted other abstracts to the Congress you will hear separately about the outcome of these.

We would be grateful if you could confirm by email to hep@ashfieldhealthcare.com your willingness to present your paper at the Congress. Please find attached an information sheet for presenters, which will assist you in your poster preparations.

Your accepted abstract will appear online as a supplement to the *Journal of Viral Hepatitis* (JVH). Furthermore, the Committee hope to include all posters as a PDF on the Congress website post-event. For this purpose please supply a PDF of your poster to the Secretariat prior to the congress and latest by Tuesday 1 September. This will allow us to check that we can successfully access and use the file you provide ahead of time.

Finally, the registration deadline for the Congress is Tuesday 1 September. **All poster presenters must be registered for the Congress.** If you have not already done so you are requested to complete your congress registration. Please go to: www.viral-hep.org/register in order to register. If you are being registered by a group perhaps you could let us know so that we can make a note of this in our records.

We would like to thank you in advance for your contribution to the Congress and look forward to meeting you in Frankfurt in September.

Ira Jacobson and Stefan Zeuzem
Co-Chairs of the Scientific Committee

4. International Congress of Immunology (ICI) 2016 – Melbourne, Australia - Poster

Dear ERICA,

Congratulations! On behalf of the Organising Committee, we are pleased to confirm that your abstract has been **accepted for POSTER presentation** at the International Congress of Immunology (ICI) 2016 to be held in Melbourne, Australia from 21-26 August 2016.

Please find details below regarding your accepted presentation/s:

Immunological biomarkers of virological response in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon and ribavirin

Session Date: Tuesday 23 August 2016

Session Time: 15:30 – 16:30

You will have the option to present your poster either as a hard copy traditional poster via a board or as an electronic poster.

We greatly appreciate and look forward to your involvement in the program. The full Congress program is available via the [Congress website](#). The poster listing is not currently listed on the website, however a full poster listing will be available on the website in the coming weeks.

Your accepted abstract will be included in the ICI 2016 abstract book. Accepted abstracts will also be published as an online supplement in the European Journal of Immunology.

Please be advised that all presenters are required to register and pay to attend the Congress by the **early bird registration date which is 11 May 2016** which indicates to us that you plan on presenting a poster at the Congress. Once we have received your registration, we will contact you requesting that you notify your presentation preference – hard copy or electronic. Poster Presentation Briefing Notes will be provided to you by the end of May based on your preferred poster presentation type.

To register for the Congress, please [click here](#).

The Congress is unable to offer any financial assistance for accommodation and travel expenses. If you have applied for one of the travel grants below you will be notified of the decision before the end of April:

- BioLegend
- The Bill and Melinda Gates Foundation
- ICI-AAI

Regarding notifications for grants through the various societies please [click here](#). Please note these grants are not managed through the Congress Managers. Please contact the relevant society directly.

Should you have any questions regarding the above please do not hesitate to contact us.

Kind regards,

ICI 2016 Congress Managers

Managed by Arinex Pty Ltd
91 – 97 Islington Street
Collingwood VIC 3066, Australia
Phone: [+61 3 9417 0888](tel:+61394170888)
Fax: [+61 3 9417 0899](tel:+61394170899)
Email: ici2016@arinex.com.au
Website: www.ici2016.org

5. XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado (ALEH)/ 2016 – Santiago, Chile - Poster



ANEXO D. ACEITE DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

From: **David Durantel (Antiviral Research)** <EviseSupport@elsevier.com>
Date: 2017-02-01 5:59 GMT-02:00
Subject: Your manuscript AVR_2016_460_R1 has been accepted
To: atcteixeira@gmail.com

Ref: AVR_2016_460_R1

Title: Strategies for serum chemokine/cytokine assessment as biomarkers of therapeutic response in HCV patients as a prototype to monitor immunotherapy of infectious diseases
Journal: Antiviral Research

Dear Dr. Teixeira-Carvalho,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. My own comments as well as any reviewer comments are appended to the end of this letter. Now that your manuscript has been accepted for publication it will proceed to copy-editing and production.

Thank you for submitting your work to Antiviral Research. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

David Durantel
Editor
Antiviral Research

Comments from the editors and reviewers:**- Reviewer 1**

- It is important that researchers have considered the suggestions.

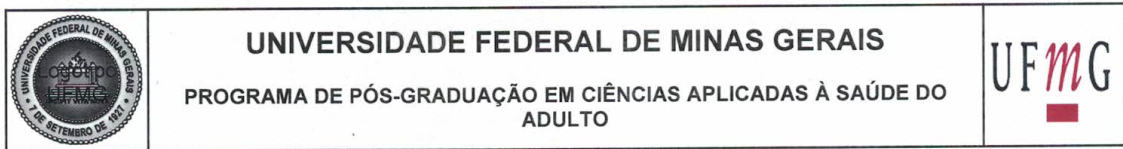
Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

ANEXO E. FOLHA DE APROVAÇÃO



FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DE QUIMIOCINAS/CITOCINAS SÉRICAS COMO BIOMARCADORES DE RESPOSTA TERAPÊUTICA EM HEPATITE C CRÔNICA E PROTÓTIPO PARA MONITORAR IMUNOTERAPIA DE DOENÇAS INFECCIOSAS

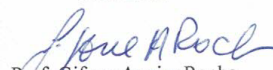
ÉRICA GODINHO MENEZES

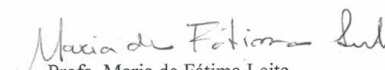
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.


Aprovada em 29 de novembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:


 Profa. Rosângela Teixeira - Orientadora
 UFMG


 Prof. Olindo Assis Martins Filho - Coorientador
 FIOCRUZ


 Prof. Gifone Aguiar Rocha
 UFMG


 Profa. Maria de Fátima Leite
 UFMG


 Prof. Alexandre de Magalhães Vieira Machado
 FIOCRUZ


 Profa. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira - por videoconferência
 USP

Belo Horizonte, 29 de novembro de 2017.