

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Gustavo Henrique De Puy e Souza

Associação de comorbidades clínico-laboratoriais nas alterações
histopatológicas observadas em biópsias hepáticas de pacientes
portadores de hepatite C crônica

Belo Horizonte

2017

Gustavo Henrique De Puy e Souza

Associação de comorbidades clínico-laboratoriais nas alterações
histopatológicas observadas em biópsias hepáticas de pacientes
portadores de hepatite C crônica

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal
Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Diniz Silva

Belo Horizonte

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Rodrigo Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Ado Jório de Vasconcelos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Humberto José Alves

Coordenador geral do Centro de Pós-Graduação

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

Subcoordenador geral do Centro de Pós-Graduação

Prof. Edson Samesima Tatsuo

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Coordenador

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Subcoordenadora

Profa. Milene Alvarenga Rachid

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA:

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Prof. Geovanni Dantas Cassali

Prof. Enio Ferreira

Prof. Pedro Guatimosim Vidigal

Profa. Tatiane Alves da Paixão

Profa. Milene Alvarenga Rachid

Profa. Luciana Xavier Pereira

**Aos meus amados pais,
Irene e Antônio, que muito ajudaram
e contribuíram para realização de um sonho.
Obrigado pelo carinho e apoio incondicional
que me deram em todos os momentos da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre estar próximo de mim, guiando-me e iluminando meu caminho. Por mais tortuoso que este seja, Deus nunca me faltou com serenidade, sabedoria e coragem para enfrentar os constantes desafios da vida. Sua proteção tornou possível enfrentar todos estes desafios.

Deixo também um especial agradecimento aos meus pais e irmãos, pelo amor, paciência e, principalmente, pelo apoio incondicional que sempre me deram nos momentos mais difíceis. Sem o amparo de vocês nada disso seria possível.

Aos mestres, fica minha singela menção nesta tese de mestrado. Os conhecimentos transmitidos certamente me fizeram tornar um profissional mais dedicado e comprometido. Se hoje tenho prazer de ensinar é porque isso foi semeado dentro de mim por cada um de vocês.

Agradeço também a minha orientadora e coorientadora, professoras Paula Vidigal e Luciana Diniz, pela paciência que tiveram comigo durante todo este período. Sem o auxílio e a dedicação de vocês essa dissertação de mestrado jamais seria possível.

Nesta breve dedicatória, não poderia de forma alguma deixar de mencionar minha eterna gratidão aos pacientes. A possibilidade de adquirir novos conhecimentos, bem com a realização desse trabalho científico só foi possível pela compreensão e participação de cada um de vocês. Portanto, dedico também essa tese de mestrado a todos os pacientes participantes.

“Aos outros, dou o direito de ser como são.
A mim, dou o dever de ser cada dia melhor.”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite C é uma importante causa de hepatite crônica, cirrose, carcinoma hepatocelular e é a principal causa de transplante hepático em todo o mundo. Além das alterações hepáticas, várias outras alterações sistêmicas já foram descritas em associação com a hepatite C crônica (HCC). Várias evidências mostram que a infecção pelo vírus da hepatite C está associada com a presença de síndrome metabólica e com dislipidemia, uma vez que todas as etapas do ciclo de vida do vírus estão intimamente relacionadas com o metabolismo lipídico intracelular.

Esse estudo tem como objetivo avaliar a influência de fatores do hospedeiro, como a presença de comorbidades clínicas e o estilo de vida, com os achados histopatológicos de fígados de pacientes portadores de hepatite C crônica.

Trata-se de um estudo transversal realizado no ambulatório de hepatites virais do HC-UFMG. Foram revistas biópsias hepáticas de 85 pacientes incluídos no estudo com objetivo de classificar segundo os critérios de METAVIR e avaliar a presença de células inflamatórias, seus tipos, quantidades e distribuição no lóbulo hepático. Os achados histológicos das biópsias hepáticas foram correlacionados com a presença de comorbidades clínicas como diabetes, hipertensão, estado nutricional e perfil lipídico de pacientes portadores de hepatite C crônica.

Foram comparados os achados histopatológicos das biópsias hepáticas de pacientes com e sem níveis de HDL sérico ≥ 55 mg/dl. Na análise univariada, atividade necroinflamatória, infiltrado inflamatório periportal, presença de linfócitos periportais e infiltrado inflamatório lobular estavam associados com HDL < 55 mg/dl. Sobrepeso/obesidade, *diabetes mellitus* e hipertensão arterial sistêmica estavam associados com atividade necroinflamatória hepática. Níveis aumentados de ALT, AST, bilirrubina e triglicérides e menores níveis de HDL também estavam associados à atividade necroinflamatória hepática.

Na análise multivariada, níveis séricos de HDL apresentaram uma associação inversa com o estágio de fibrose (OR 0,96, IC 0,93-0,99, $p = 0,04$) e com a presença de atividade necroinflamatória (OR 0,95, IC 0,92-0,99, $p = 0,007$) nas biópsias examinadas. A correlação se manteve quando se comparou o HDL com os diferentes graus de atividade necroinflamatória ($p = 0,007$).

Estudos recentes tem utilizado o HDL como um marcador de inflamação em diferentes condições. No entanto, a avaliação pontual e isolada dos níveis séricos do HDL pode não ser um bom parâmetro para se medir a composição, funcionalidade e propriedades anti-inflamatórias dessa molécula. Em nosso estudo, níveis séricos de HDL ≥ 55 mg/dl tiveram um papel protetor na evolução da hepatite C crônica. Novos estudos são necessários para melhor entender esta possível relação.

Palavras chave: vírus da hepatite C, hepatite C crônica, *diabetes mellitus*, hipertensão, HDL, estágio de fibrose, atividade necroinflamatória

ABSTRACT

HCV is a relevant cause of chronic hepatitis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma and is the leading cause of liver transplant worldwide. Additionally, several extrahepatic manifestations are also reported in chronic hepatitis C (CHC) subjects. Several evidences have been demonstrated that HCV infection is associated with dyslipidaemia as there is a strong interaction between the HCV life cycle and intracellular lipids metabolism.

In this study, we hypothesized that host factors including clinical comorbidities and lifestyle data would have an influence on liver histopathological features.

In this cross-sectional study conducted at the Viral Hepatitis Outpatient Clinics University Hospital, we reviewed liver biopsies of 85 patients to classify each one based on the METAVIR criteria and to evaluate the presence of inflammatory cells types, quantities and lobular distribution. These histopathological features were correlated clinical comorbidities such as *diabetes mellitus* (DM), hypertension (HTN) and lipid profile in patients with CHC.

Histological findings in the liver specimens of CHC patients with and without HDL cholesterol ≥ 55 mg/dl were compared. Among the histological variables tested during univariate analysis, liver necrosis, periportal inflammatory infiltrate, periportal lymphocytes and lobular inflammatory infiltrate were found to be associated with HDL cholesterol < 55 mg/dl in CHC patients. Overweight, DM, HTN were associated with hepatic necroinflammatory activity. Increased levels of ALT, AST, bilirubin, triglycerides and decreased levels of HDL cholesterol were associated with hepatic necroinflammatory activity as well.

In multivariate analysis HDL cholesterol serum levels had an inverse association with fibrosis stage (OR 0,96, IC 0,93-0,99, $p = 0,04$) and the presence of necroinflammatory activity (OR 0,95, IC 0,92-0,99, $p = 0,007$). The correlation remains when comparing with the degree of hepatic necroinflammatory activity ($p = 0.007$).

Recent studies are suggesting HDL to be a biomarker of inflammatory conditions, however measuring HDL cholesterol levels may not accurately predict the composition, functionality, and anti-inflammatory properties of HDL. In our study, HDL cholesterol serum level ≥ 55 mg/dl had a protective effect in CHC outcome. Further studies are necessary to better understand this relationship.

Key words: hepatitis c virus, chronic hepatitis C, *diabetes mellitus*, hypertension, HDL, fibrosis stage, necroinflammatory activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Prevalência global da infecção pelo vírus da hepatite C segundo a região geográfica	19
Figura 2 - Casos de hepatite C crônica segundo provável fonte ou mecanismo de infecção	20
Figura 3 - Representação esquemática do vírus da hepatite C	20
Figura 4 - Mecanismos de resistência insulínica na hepatite C crônica	28
Figura 5 - Representação esquemática do processo de acoplamento da partícula do VHC com os receptores de membrana plasmática e os mecanismos de entrada do vírus no hepatócito	30
Figura 6 - Representação esquemática do ciclo de vida do vírus da hepatite C no hospedeiro humano	32
Figura 7 (A e B) - Hepatites de interface em HCC (" <i>piecemeal necrosis</i> ")	45
Figura 8 - Hepatite lobular em HCC	45
Figura 9 - Correlação entre o grau de atividade necroinflamatória e níveis séricos de HDL em pacientes com hepatite C crônica	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Manifestações extra-hepáticas do VHC	22
Tabela 2 - Efeitos colaterais do interferon	25
Tabela 3 - Dados clínicos, laboratoriais, demográficos e sociais dos pacientes portadores de hepatite C crônica	41
Tabela 4 - Dados clínicos, laboratoriais, demográficos e sociais de pacientes portadores de Hepatite C crônica	43
Tabela 5 - Achados histopatológicos em biópsia hepática do grupo controle e pacientes portadores de hepatite C crônica	44
Tabela 6 - Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem HAS	46
Tabela 7 - Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem <i>diabetes mellitus</i>	47
Tabela 8 - Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem HDL colesterol ≥ 55 mg/dl	48
Tabela 9 - Variáveis associadas com os achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

AAD	Agentes antivirais diretos
AgAu	Antígeno austrália
AHEV	Ambulatório de hepatites virais
ALT	Alanina aminotransferase
Anti-VHC	Anticorpos contra o VHC
AP	Atividade de protrombina
Apo E	Apolipoproteína E
APRI	AST to platelet ratio index
AST	Aspartato aminotransferase
CC	Circunferência da cintura
CEH	Células estreladas hepáticas
CHC	Carcinoma hepatocelular
CT	Colesterol total
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcoólica
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DP	Desvio padrão
E2	Proteína de superfície E2
EHNA	Esteatohepatite não-alcoólica
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FA	Fosfatase alcalina
FCI-1	Fator de crescimento insulínico tipo 1
GGT	Gama glutamil transferase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HBsAg	Antígeno de superfície do VHB
HC	Hospital das clínicas
HCC	Hepatite C crônica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAG	Instituto alfa de gastroenterologia
IC	Intervalo de confiança
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IFN	Interferon
IFNL3	Gene CC rs12979860

IFN-PEG	Interferon peguilado
IL28B	Interleucina 28B
IMC	Índice de massa corporal
IR	Insuficiência renal
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
IRS-2	Insulin receptor substrate 2
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-R	LDL receptor
MS	Ministério da Saúde
NHANES	National Health Nutrition Examination Survey
NIH	National Institute of Health
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PLV	Partícula lipoviral
RBV	Ribavirina
RI	Resistência insulínica
RNA	Ácido ribonucleíico
RVS	Resposta virológica sustentada
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SM	Síndrome metabólica
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGL	Triglicerídeo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VHCcc	VHC derivadas de cultura celular
VHCpp	Pseudo-partícula de VHC
VHD	Vírus da hepatite D
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. Hepatite C – História, epidemiologia e aspectos clínicos	16
2.1.1 História das hepatites	16
2.1.2 Epidemiologia da hepatite C	18
2.1.3 Aspectos clínicos da hepatite C	20
2.1.4 Manifestações extra-hepáticas da hepatite C crônica	21
2.1.5 Fatores associados com progressão da hepatite C crônica	22
2.1.6 Diagnóstico da hepatite C crônica	23
2.1.7 Tratamento da hepatite C crônica	23
2.1.8 Hepatite C crônica e as comorbidades	25
2.1.9 Ciclo de vida do vírus da hepatite C e as lipoproteínas	29
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. PACIENTES E MÉTODOS	35
4.1. População do estudo	35
4.1.1. Critérios de inclusão	35
4.1.2. Critérios de exclusão	35
4.2. Características histopatológicas	36
4.3. Parâmetros laboratoriais	37
4.4. Parâmetros bioquímicos e hematológicos	38
4.5. Dados comportamentais	38
4.6. Comorbidades clínicas	38
4.7 Dados antropométricos	38
4.8 Aspectos éticos	39
4.9 Análise estatística	39
5. RESULTADOS	40
5.1 Dados clínico-laboratoriais dos pacientes	40

5.2 Achados histológicos das biópsias hepáticas de pacientes portadores de hepatite c crônica e controles	44
5.3 Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem hipertensão arterial sistêmica.....	45
5.4 Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem <i>diabetes mellitus</i>	46
5.5 Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem níveis de HDL \geq 55 mg/dl	47
5.6 Fatores associados com os achados histopatológicos em biópsia hepática de portadores de hepatite C crônica	49
5.7 Comorbidades clínicas, colesterol, carga viral e genótipo do VHC	52
5.8 Correlação do grau de atividade necroinflamatória e os níveis séricos de HDL	52
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
9. ANEXO	77
9.1 ARTIGO (EM FASE DE ELABORAÇÃO)	77
10. FOLHA DE APROVAÇÃO	107
11. ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO	108

1. INTRODUÇÃO:

Existem no mundo mais de 130 milhões de indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C (VHC), constituindo aproximadamente 2 a 3% da população global. Este agente representa a principal causa de doença hepática crônica em todo o mundo, podendo evoluir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular após um período de até três décadas. Além disso, representa a principal indicação de transplante hepático ortotópico em países mais desenvolvidos. Os gastos em saúde relacionados a esse vírus são consideráveis, o que torna imprescindível a adequada compreensão sobre seus mecanismos de infectividade. Apesar destes mecanismos ainda não serem totalmente conhecidos, esforços em compreender adequadamente a biologia e a patogênese desse vírus têm sido realizados.

Atualmente, sabe-se que o ciclo de vida do VHC apresenta íntima relação com o metabolismo lipídico humano, levando a alterações na homeostase lipídica. Compreender a inter-relação do VHC com esse metabolismo é fundamental, tendo em vista que cada etapa do ciclo de vida do vírus, incluindo seus mecanismos de entrada no hepatócito, torna-se um alvo potencial para o desenvolvimento de novas terapias antivirais. Apesar dos recentes avanços no tratamento da hepatite C crônica com a aprovação dos novos agentes antivirais diretos, este tratamento ainda é prolongado e muito oneroso. O surgimento de terapias menos onerosas e, conseqüentemente, mais acessíveis aos indivíduos infectados só será possível após um profundo conhecimento dos mecanismos de infectividade do VHC.

Entretanto, a infecção por esse agente viral também é capaz de interferir no metabolismo da glicose no hospedeiro, aumentando o risco para desenvolvimento de resistência insulínica e *diabetes mellitus* tipo 2. Estas alterações tem um papel essencial na esteatohepatite não-alcoólica, relacionando-se a progressão da doença hepática. Não é raro observar a presença desses elementos em portadores crônicos do VHC, fazendo suscitar que a interposição desses elementos agressores possa acelerar a progressão da doença hepática em indivíduos cronicamente infectados pelo VHC.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hepatite C – história, epidemiologia e aspectos clínicos:

2.1.1 História das hepatites virais:

A história das hepatites virais é bastante antiga. A icterícia epidêmica já havia sido mencionada nos manuscritos de Hipócrates, na Grécia antiga, cerca de 300 - 400 anos a.c., revelando que a doença poderia se localizar no órgão hepático e sendo de natureza provavelmente infecciosa. A literatura chinesa também faz referência a surtos de icterícia em sua população há mais de 5.000 anos, assim como existem relatos semelhantes na Babilônia há mais de 2.500 anos [1].

As epidemias ou pandemias de icterícia ocorrem há séculos, estando associadas geralmente a grandes guerras e/ou catástrofes humanas. Exemplo disso são as Guerras da Sucessão Austríaca (1743), de Napoleão Bonaparte no Egito (1798), a Franco-Prussiana (1870), a Guerra de Secessão Americana (1861 – 1865), além da Primeira e da Segunda Grandes Guerras Mundiais (1917 – 1919 e 1939 – 1945, respectivamente). Durante a Guerra de Secessão Americana aproximadamente 40 mil soldados foram acometidos pela doença icterícia, número bem inferior quando comparada a Segunda Grande Guerra (1939 – 1945), quando cerca de 16 milhões de soldados foram acometidos pela doença [1,2].

O termo hepatite foi utilizado pela primeira vez no século XXVIII por Bianchi JB (*Historia hepatica sem Thoria et práxis omnius morborum hepatitis et bÍlis*, publicado em 1725) para descrever o quadro icterico [1]. Mais de um século após, em 1895, foi suscitada pela primeira vez a hipótese da existência de uma forma de hepatite transmitida por via parenteral [1,3]. Lüdman observou que 191 de um total de 1.289 (14,82%) trabalhadores do porto alemão de Bremen que receberam, por via parenteral, vacina contra varíola - estas até então preparadas a partir de linfa humana - desenvolveram uma doença icterica meses após a vacinação [3,4]. Entretanto, somente no fim dos anos trinta que a transmissão da hepatite por inoculação parenteral foi bem estabelecida [5].

Em 1965, o geneticista americano Baruch Blumberg do *National Institute of Health* (NIH), na Filadélfia, estudando anticorpos contra lipoproteínas em pacientes previamente hemotransfundidos, identificou um antígeno até então desconhecido no soro de um aborígine australiano, o qual foi denominado inicialmente de antígeno Austrália (AgAu). Este seria posteriormente denominado de antígeno de superfície (HBsAg) após ter sido reconhecido como sendo o invólucro externo do vírus da hepatite B (VHB) [6,7].

Em 1973, os pesquisadores americanos Stephen Feinstone, Robert Purcell e Albert Kapikian descreveram pela primeira vez a visualização, através da técnica de microscopia eletrônica, de partículas virais em aspecto esférico nas fezes de uma população carcerária de Washington portadora de hepatite infecciosa [8].

Mario Rizzetto e colaboradores, ao examinarem, por técnicas de imunofluorescência, biópsias hepáticas de pacientes com positividade sorológica para o antígeno de superfície do VHB, identificaram, em 1977, um novo sistema constituído de antígeno e anticorpo, denominado sistema Delta, o qual era composto pelo antígeno Delta e anticorpo anti-Delta. Observaram, ainda, que os anticorpos anti-Delta eram apenas detectados em pacientes com soropositividade para o antígeno de superfície do VHB (HBsAg). Era a descoberta de um novo agente viral denominado vírus da hepatite D (VHD) [9,10].

No ano de 1989, pesquisas de biologia molecular realizadas por Michael Houghton em conjunto com seus colegas Daniel Bradley, George Kuo e Qui-Lim-Choo identificaram um novo agente etiológico responsável por um número expressivo dos casos de hepatites pós-transfusionais não-A e não-B [11,12]. Estava descoberto vírus da hepatite C (VHC). Neste mesmo ano, George Kuo e colaboradores desenvolveram um teste sorológico para a identificação de anticorpos contra o VHC (anti-VHC), o que veio a demonstrar que o vírus hepatotrópico C era responsável por aproximadamente 80 a 90% das hepatites pós-transfusionais não-A e não-B, bem como de alguns casos de cirrose hepática criptogênica [13]. Estas descobertas foram um marco na história da virologia, bem como da hepatologia moderna, representando um dos grandes avanços no controle da disseminação das hepatites pós-transfusionais.

2.1.2 Epidemiologia da hepatite C:

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é uma das principais causas de doença hepática crônica com um acometimento variando entre 130-170 milhões de indivíduos em todo o mundo, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS). Isto corresponde a uma prevalência global entre 2 a 3% [14-18]. Entretanto, apesar da infecção crônica causada por esse agente etiológico ser considerada como endêmica mundialmente, existe uma grande variação geográfica em sua distribuição global ou mesmo dentro de um mesmo país [19].

O Brasil apresenta poucos estudos sobre a prevalência do VHC em seu território. Uma explicação seria a grande extensão territorial brasileira, existindo importantes variações não apenas demográficas, mas também socioculturais entre as diferentes regiões [20-22]. Quando realizados, os estudos abrangem áreas geográficas restritas, como as grandes capitais brasileiras, ou pequenas populações, como a de doadores de sangue.

Apesar dos escassos estudos, estima-se que haja aproximadamente 2,5 milhões de brasileiros cronicamente infectados pelo VHC, o que corresponderia a cerca de 1 a 2% da população geral em nosso país. Entretanto, essa prevalência não se distribui de maneira homogênea para todas as regiões, sendo observado maiores taxas na região norte (2,12%) e baixa prevalência na região sul (0,65%). As regiões sudeste, nordeste e centro-oeste apresentam taxas intermediárias, girando em torno de 1,43%, 1,19% e 1,04%, respectivamente [20].

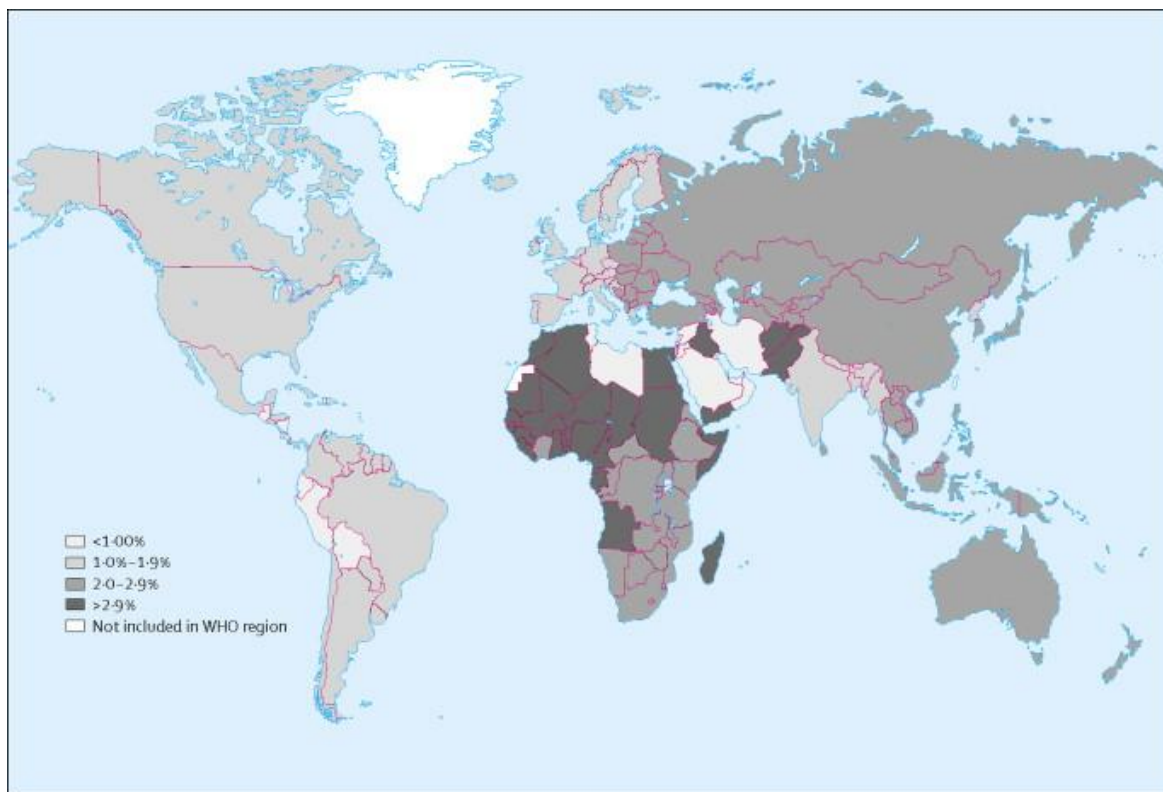


Figura 1 – Prevalência global da infecção pelo vírus da hepatite C segundo a região geográfica. (Fonte: Shepard e cols., 2005)

Dentre os principais fatores de risco para infecção pelo VHC destacam-se a transfusão de sangue e hemoderivados de doadores infectados, o uso de drogas ilícitas injetáveis, exposição ocupacional, transplantes de órgãos, terapias injetáveis com equipamentos contaminados, hemodiálise, transmissão sexual e vertical [23-27].

A transfusão de sangue e hemoderivados de doadores infectados foram consideradas durante muito tempo a principal forma de transmissão do VHC. Porém, com a adoção de testes de rastreamento nos processos de triagem pré-doação pelos hemocentros, ocorreu uma redução importante nesta forma de transmissão [28,29]. Atualmente, estima-se que o risco de transmissão por esta via seja de 0,001% a cada unidade de hemoderivado transfundido [29]. Devido a isso, o compartilhamento de materiais contaminados pelos usuários de drogas ilícitas injetáveis se tornou a principal via de transmissão o VHC (Figura 2) [24].

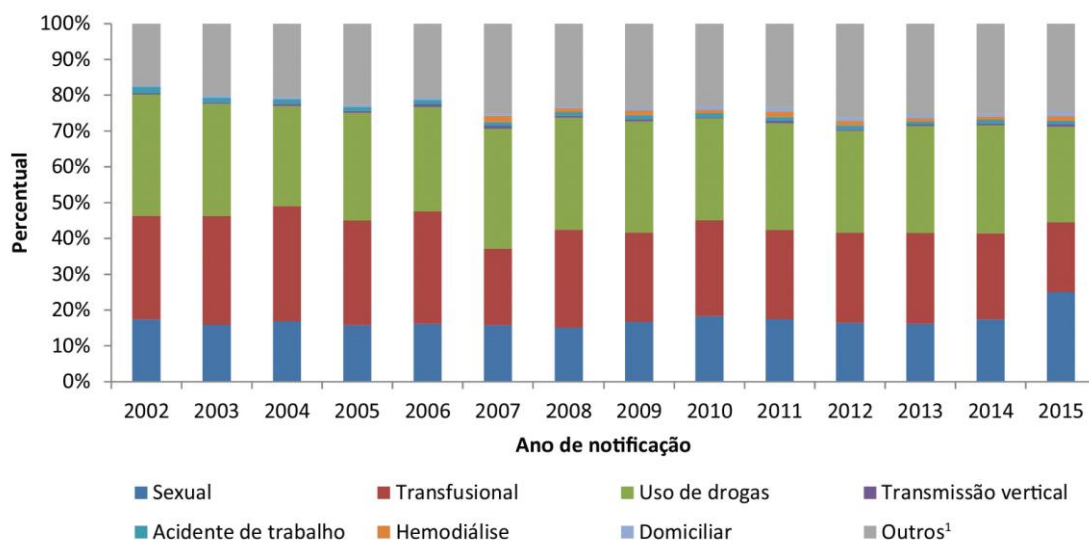


Figura 2 – Casos de HCC segundo provável fonte ou mecanismo de infecção. (Fonte: SINAN/SVS/MS)

2.1.3 Aspectos clínicos da hepatite C crônica:

O vírus hepatotrófico C (VHC) é um agente infeccioso pertencente à família *Flaviviridae*, do gênero *Hepacivirus*, cujo genoma é composto por uma fita simples de ácido ribonucléico (RNA) de polaridade positiva envolvida por um envelope lipídico [30,31]. Existe uma grande variedade de genótipos deste vírus – são ao menos 6 os genótipos descritos - com diferentes subtipos, havendo uma distribuição global bastante heterogênea (Figura 3).

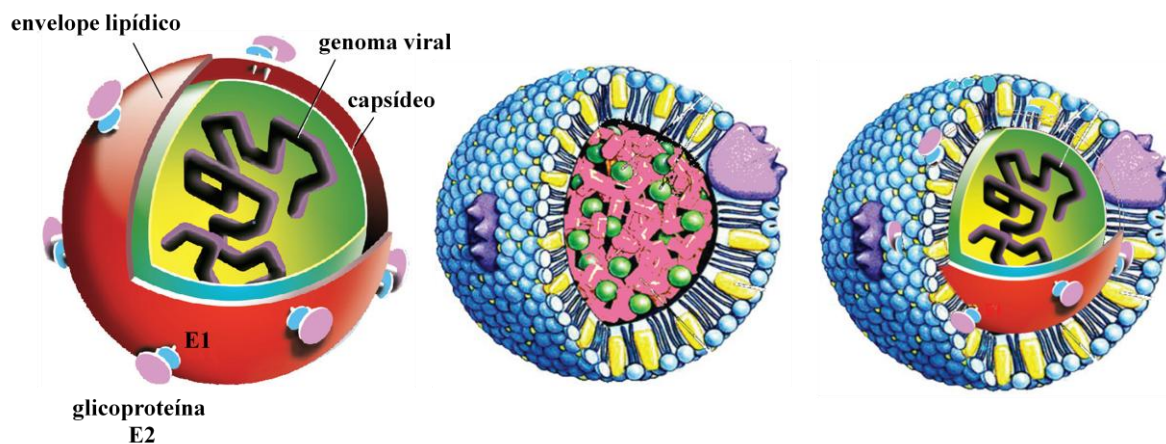


Figura 3 – Representação esquemática do vírus da hepatite C. (Fonte: Pécheur, 2012)

A hepatite C é uma doença infecciosa que pode ter curso agudo ou crônico. Apenas 20-30% dos infectados apresentarão algum sintoma durante a fase aguda. A infecção aguda pelo VHC, por ser assintomática (60-70%) ou oligosintomática (10-20%) em grande parte dos casos, dificilmente é diagnosticada durante essa fase, sendo normalmente descoberta já em fase de cronicidade. Muitos pacientes apenas serão diagnosticados anos mais tarde ao desenvolverem hepatopatia avançada. Vários dos sintomas da fase crônica, quando presentes, são inespecíficos, podendo ser confundidos ou mesmo atribuídos a outras condições patológicas, como, por exemplo, a depressão. A manifestação clínica mais frequentemente relatada é a fadiga, estando presente em 20 a 80% dos pacientes. Outros sintomas inespecíficos incluem a anorexia, perda de peso, náuseas, vômitos, artralgias, mialgias, dor abdominal e fraqueza [32-35].

Dentre aqueles indivíduos que se infectam com o VHC, aproximadamente 50 a 85% desenvolverá hepatite C crônica. Entretanto, o curso desta doença, apesar de variável de indivíduo para indivíduo, apresenta-se usualmente de forma lentamente progressiva, evoluindo em 5 a 30% dos casos para cirrose hepática ao longo de um período de 2 a 3 décadas [32-35].

2.1.4 Manifestações extra-hepáticas na hepatite C crônica:

A infecção crônica pelo VHC pode levar a gama de manifestações extra-hepáticas, podendo estar presente em até 40% dos casos ao longo do curso da doença. Em grande parte dos casos, estas manifestações estão diretamente relacionadas à infecção viral. Estas manifestações estão associadas a uma gama de distúrbios hematológicos e autoimunes, além de doenças renais e acometimentos dermatológicos, destacando-se a crioglobulinemia mista (Tabela 3) [36-38].

Tabela 1 - Manifestações extra-hepáticas do VHC

Manifestações extra-hepáticas do VHC	
Manifestação relacionada ao sistema imunológico	Crioglobulinemia mista Vasculite crioglobulinêmica Linfoma não-Hodgkin Síndrome de Sjögren Produção de auto-anticorpos Poliarterite nodosa Gamopatias monoclonais Trombocitopenia imune
Manifestações relacionadas à inflamação	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2 Resistência insulínica Glomerulonefrite membranoproliferativa Insuficiência renal Fadiga Deterioração cognitiva Depressão

2.1.5 Fatores associados com a progressão da hepatite C crônica:

A história natural da hepatite C crônica (HCC) é variável entre os indivíduos infectados, e os motivos para isso ainda não são totalmente conhecidos. As dificuldades em se estabelecer com exatidão o tempo de infecção bem como o longo curso da doença estão entre os principais motivos para isso. Entretanto, sabe-se que tanto fatores virais quanto do hospedeiro estão envolvidos na progressão da doença hepática. Estudos têm apontado uma série de fatores como causa da fibrose hepática nos indivíduos cronicamente infectados pelo VHC, destacando-se a idade, o gênero, coinfeções virais, presença de outras comorbidades, grupo étnico, abuso de álcool, alterações parenquimatosas do fígado e resposta imune celular ao VHC [39-42]. Dentre os fatores relacionados ao indivíduo que estariam implicados em uma progressão mais rápida da doença, destacam-se o sexo masculino, a não afro-descendência, a contaminação pelo VHC após os 45 a 55 anos de idade e através da hemotransusão [39,43,44]. Dentre os fatores comportamentais, incluem-se o consumo de álcool e maconha, além de uma

dieta rica em colesterol [39,40]. Dentre os fatores relacionados às comorbidades, destacam-se a coinfeção do VHC com o VHB e/ou HIV, a obesidade, a deficiência de vitamina D, o *diabetes mellitus* e a resistência insulínica [44-47].

2.1.6 Diagnóstico da hepatite C crônica:

A hepatite C é uma doença infecciosa que pode ter curso agudo ou crônico. Como a maioria dos indivíduos infectados não desenvolve sintomas durante a fase aguda ou são oligosintomáticos, o diagnóstico é, habitualmente, realizado na fase crônica da infecção. Testes diagnósticos para o VHC são realizados naqueles em que há evidências de algum comprometimento hepático através das alterações dos níveis de aminotransferases, naqueles com manifestações extra-hepáticas ou em indivíduos em situação de risco para exposição ao vírus.

Para o diagnóstico da infecção são utilizados dois testes que incluem prova sorológica para detecção de anticorpos contra o VHC (anti-VHC) e testes moleculares para detecção quantitativa e/ou qualitativa do RNA viral. Os primeiros são testes imunoenzimáticos, baseando-se na detecção de anticorpos contra antígenos do VHC (anti-VHC). Estes testes adquiriram maior sensibilidade e especificidade ao longo dos anos com o surgimento das novas gerações (ELISA II e III). Entretanto, não são capazes de diferenciar infecções agudas, crônicas ou cicatriz imunológica. Já os segundos fundamentam-se em técnicas de biologia molecular para pesquisa do material genético do VHC (VHC-RNA), sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) uma das técnicas mais utilizadas. A confirmação diagnóstica da hepatite C se dá através destes testes, atestando a presença do RNA viral no indivíduo infectado [48-52].

2.1.7 Tratamento da hepatite C crônica:

Desde a descoberta do vírus hepatotrópico C, no final da década de 80, grandes esforços em pesquisas têm sido feitos no intuito de se descobrir novas terapias que proporcionem a interrupção da progressão da doença hepática e, conseqüentemente, uma redução na morbidade e mortalidade relacionadas à infecção crônica por este vírus. Até poucos anos atrás, essa infecção era encarada com pouca possibilidade de cura tendo como

opções terapêuticas drogas que apresentavam importante toxicidade ao indivíduo (Tabela 2), exigindo acompanhamento médico especializado por período prolongado [53-58].

No Brasil, o tratamento da HCC era baseado, até bem pouco tempo (2014), apenas no uso de interferon (IFN) convencional ou IFN peguilado (IFN-PEG) alfa-2a e alfa-2b e no análogo nucleosídeo ribavirina (RBV), seguindo protocolos do Ministério da Saúde (MS) [59]. Essa terapêutica objetivava a inibição da replicação viral e, conseqüentemente, redução da atividade necroinflamatória hepática, controlando da progressão da doença e impedindo sua evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) [59].

Em função de recentes avanços da indústria farmacêutica, novas drogas, como o Sofosbuvir (análogo nucleotídeo que inibe a polimerase do VHC), o Simeprevir (inibidor de protease de segunda geração) e o Daclatasvir (inibidor da NS5A) foram introduzidas no arsenal terapêutico da infecção crônica pelo VHC. Atualmente, o tratamento com esses agentes antivirais diretos (AAD) tem como finalidade a erradicação do vírus do organismo do hospedeiro, evidenciado através de uma resposta virológica sustentada (RVS) adequada [60]. Esta é definida por uma indetectabilidade do RNA viral com 12 ou 24 semana de seguimento após o término do tratamento. Com os AAD, tem se conseguindo alcançar altas taxas de RVS, com valores maiores do que 90% contrastando como a terapia com IFN e ribavirina que atingiam uma efetividade de apenas 50% [60].

Tabela 2 – Efeitos colaterais do interferon

Efeitos colaterais do interferon
- Sintomas gerais: febre, tonteira, mialgias, cefaleia;
- Sintomas neuro-psiquiátricos: depressão, ansiedade, irritabilidade, insônia;
- Mielossupressão;
- Sintomas gastrointestinais: alteração no paladar, estomatite, náuseas, hiporexia, diarreia, dor abdominal;
- Alterações endócrinas e imunológicas: diabetes, hipertireoidismo, hipotireoidismo; hepatite auto-imune, aumento da atividade de doenças auto-imunes;
- Alterações cardiovasculares: infarto do miocárdio, arritmias, miocardiopatias;
- Alterações renais: nefrite intersticial, síndrome nefrótica e insuficiência renal aguda;
- Alterações pulmonares: pneumonite;
- Alterações oftalmológicas: borramento da visão;

2.1.8 Hepatite C crônica e comorbidades:

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é importante causa de doença hepática crônica, havendo uma evolução variável entre os diferentes indivíduos infectados. A maioria daqueles que se infectam com o VHC não conseguem eliminar o agente viral de maneira espontânea, evoluindo para cronificação. Ao longo de duas ou três décadas até 30% dos cronicamente infectados podem progredir para cirrose hepática com todas as suas complicações. Entretanto, uma parcela significativa dos pacientes poderá apresentar evolução benigna, sem qualquer reflexo sobre a saúde do indivíduo.

Os motivos desta variabilidade ainda não são totalmente conhecidos, havendo um crescente número de estudos a este respeito. Fatores relacionados tanto ao VHC quanto ao hospedeiro poderiam contribuir para isso. Estudos têm demonstrado que algumas condições podem desempenhar um papel crucial na história natural da hepatite C crônica. Dentre elas, incluem-se alguns componentes da síndrome metabólica (SM), como a hipertensão, a intolerância à glicose, o *diabetes mellitus* (DM), a dislipidemia e a obesidade [61-63]. Estas são sabidamente condições que influem no desenvolvimento de outras doenças hepáticas como, por exemplo, a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) [63].

A SM é uma entidade complexa relacionada a um conjunto de fatores de risco associados a doenças cardiovasculares. Sua prevalência tem crescido nos últimos anos, tornando este um problema global. Não existem estudos sobre a prevalência dessa síndrome na população geral brasileira, entretanto, segundo dados da *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), estima-se, na população adulta norte-americana, uma prevalência acima de 20% [64,65]. Esta síndrome apresenta estreita correlação com a doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA), uma condição clínico-patológica não relacionada ao álcool associada à deposição de lipídeos nos hepatócitos. Ela representa uma manifestação hepática da SM, com um espectro que vai desde uma simples esteatose hepática até a EHNA, a qual pode resultar em importante morbi-mortalidade ao paciente [63].

Transtornos metabólicos associados a SM relacionam-se com a gravidade das diversas alterações histológicas em biópsias hepáticas em pacientes com EHNA, destacando-se a esteatose, a balonização hepatocitária, a atividade necroinflamatória e a progressão para fibrose hepática [63]. Aliado a isso, evidências tem demonstrado que a infecção pelo VHC tem influência direta no metabolismo da glicose no hospedeiro, aumentando o risco de resistência insulínica (RI) e DM tipo 2 [66-68]. Desta maneira, estudos têm sido realizados no intuito de avaliar o real impacto dos diversos componentes da SM na progressão da doença hepática em pacientes cronicamente infectados pelo VHC.

A resistência insulínica, em conjunto com outros elementos da SM, como a obesidade e o DM tipo 2, tem um papel essencial na progressão da doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA). A EHNA, um espectro da DHGNA, representa uma importante causa de doença hepática crônica, estando associada ao desenvolvimento de cirrose [63,69-71]. Não é raro observar a presença de elementos da SM em portadores crônicos do VHC, fazendo suscitar que a interposição desses elementos agressores possa acelerar a progressão da doença hepática na HCC [63,72,73]. Desta forma, estudos têm avaliado a inter-relação entre RI, DM e obesidade com o VHC na progressão da doença hepática [63,72,73]. Estudos demonstram que portadores de HCC apresentam um risco mais elevado para o desenvolvimento de RI ou DM. O DM tipo 2 é mais prevalente entre o portadores de HCC quando comparados à população geral ou a grupos com outras doenças hepáticas [74-76]. Ao mesmo tempo, foi observado que em grupos de paciente

com o diagnóstico de DM tipo 2 existe uma maior prevalência da HCC quando comparados à população geral [127,128]. Também foi constatado que, entre aqueles que se submetem a transplante hepático ortotópico, a ocorrência de DM no período pós-transplante foi mais elevada naqueles transplantados devido a HCC do que por outras etiologias [77,78]. Allison e cols. 1994 foram os primeiros a descrever a relação entre a RI e o DM tipo 2 com a HCC. Foi observada uma maior prevalência dessas condições metabólicas entre cirróticos devido ao VHC do que em cirróticos por outras etiologias [66]. Hui e cols. 2003 demonstraram que o VHC é capaz de induzir RI no hospedeiro humano e que a própria RI estaria associada a maiores taxas de progressão para fibrose hepática na HCC [79]. Essa influência da RI na fibrose do fígado de portadores crônicos do VHC também foi evidenciada por Moucari e cols. 2008 [80].

Os mecanismos moleculares implicados no desenvolvimento de RI e DM nos portadores de HCC são complexos e ainda não totalmente compreendidos. A interação entre fatores virais e do hospedeiro são as hipóteses mais aceitas atualmente. Dados recentes sugerem que proteínas da partícula viral poderiam reduzir expressão do *insulin receptor substrate 1 e 2* (IRS-1 e IRS-2) bem como inibir o processo de sinalização insulínica [81,82]. Entretanto, outros mecanismos também têm sido relacionados ao desenvolvimento desse distúrbio metabólico. Acredita-se que a inflamação crônica relacionada à infecção pelo agente viral possa estar associada a RI através do aumento dos níveis de interleucinas 1, 6 e 8, do fator de necrose tumoral alfa, do fator de crescimento transformador beta, da leptina e da resistina, bem com a menores níveis de adiponectina [83]. (Figura 4)

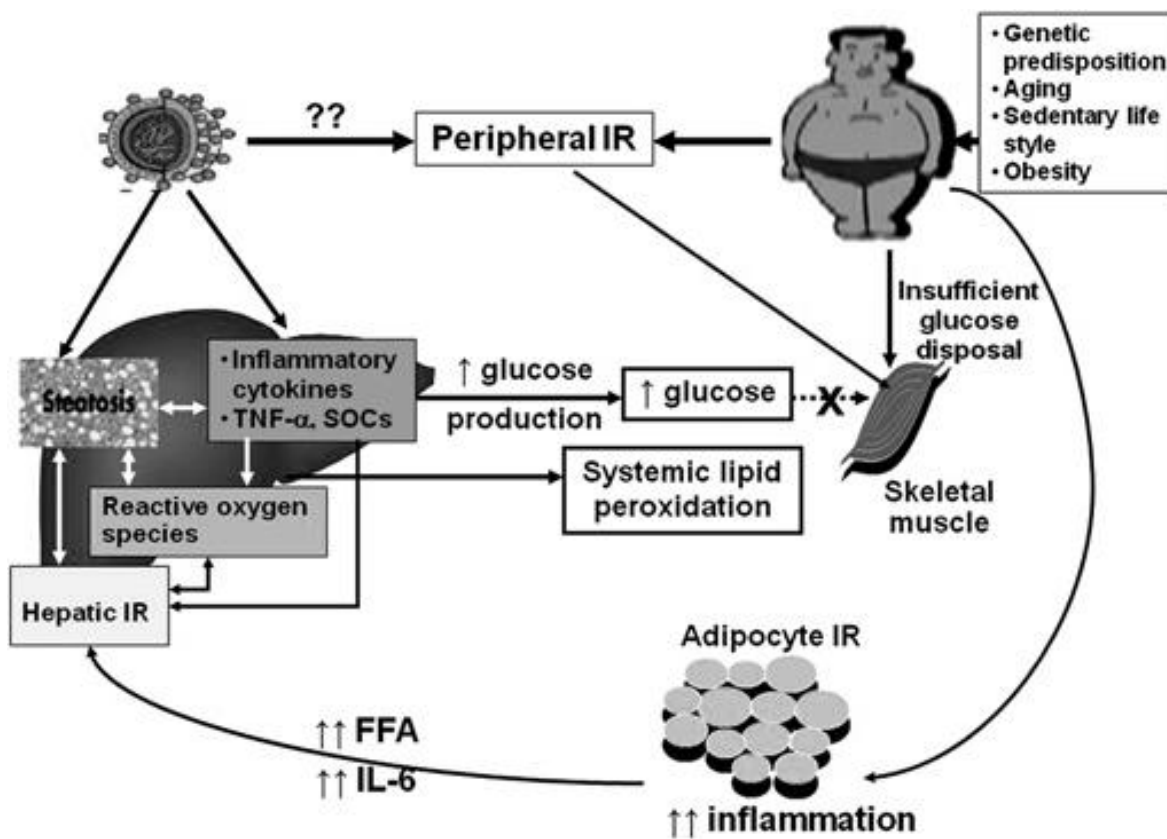


Figura 4 – Mecanismos de resistência insulínica na hepatite C crônica. (Fonte: Eslam e cols., 2011)

Como mencionado anteriormente, não apenas a RI e o DM tem sido implicados em uma pior evolução na história natural da HCC. Outros fatores, com a obesidade, também poderiam influenciar na progressão da fibrose hepática nos portadores crônicos do VHC. A obesidade, atualmente reconhecida como uma doença crônica que se caracteriza pelo excesso de gordura corporal, tem sido estudada como um dos fatores metabólicos que poderiam impactar negativamente a evolução da HCC. Ortiz e cols. 2002 demonstraram que a obesidade, níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT) e a idade avançada durante a infecção pelo VHC são elementos que poderiam prever uma evolução mais acelerada da HCC [84]. A associação entre obesidade e índices de fibrose hepática mais pronunciados também foi encontrada por Kallwitz e cols. 2010 [85].

2.1.9 Ciclo de vida do vírus da hepatite C e as lipoproteínas:

Recentemente, enfoque tem sido dado à inter-relação entre o VHC e as lipoproteínas. Estudos mais atuais têm demonstrado que este vírus está associado a desordens do metabolismo das lipoproteínas, levando a alterações no perfil lipídico do hospedeiro [86]. Quando comparados a indivíduos não infectados, o hospedeiro crônico do VHC apresenta baixos níveis séricos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TGL) e lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL) [87,88]. Este vírus interage de maneira complexa com o metabolismo lipídico do hospedeiro, utilizando-o em diversas etapas de seu ciclo de vida, que vai desde o transporte do agente infeccioso no sistema vascular até a sua entrada e replicação no interior do hepatócito [89]. (Figura 6)

Até pouco mais de uma década atrás, pesquisas voltadas para o entendimento dos mecanismos de infectividade do VHC eram dificultadas devido à falta de um sistema de cultura celular eficaz capaz de reproduzir partículas virais infectantes. Com o advento das pseudo-partículas de VHC (VHCpp) foi dado o primeiro passo na compreensão dos mecanismos do ciclo de vida do VHC, principalmente sobre os mecanismos iniciais de internalização do VHC no hepatócito [90,91]. Estas são partículas retrovirais defeituosas compostas por um envelope lipídico contendo glicoproteínas E1 e E2 em sua superfície e envolvendo o nucleocapsídeo viral. Entretanto, foi somente com o isolamento do genótipo 2a do VHC de uma paciente de origem japonesa com hepatite C fulminante que foi possível replicar e produzir partículas virais infectantes em culturas celulares, os chamados VHC derivados de cultura celular (VHCcc) [92]. Com essas partículas, permitiu-se criar um modelo de pesquisa capaz de estudar todo o ciclo de vida do VHC através em um meio de cultura celular [93,94].

O processo de entrada do vírus dentro do hepatócito envolve a interação entre receptores de superfície viral e de membrana plasmática da célula do hospedeiro. As glicoproteínas E1 e E2 localizadas no envelope viral estão envolvidas na entrada e fusão das membranas [95]. Já na superfície externa da membrana plasmática hepatocitária existem vários receptores ou fatores envolvidos na internalização do VHC. Destacam-se os scavenger receptor classe B tipo 1 (SR-B1), o receptor de LDL (LDL-R), o receptor Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), a tetraspamina CD81, receptores do fator de

crescimento epidérmico e glicosaminoglicanos [96-101]. Os receptores SR-B1, LDL-R e o NPC1L1 estão envolvidos no metabolismo lipídico do hepatócito. (Figuras 5 e 6)

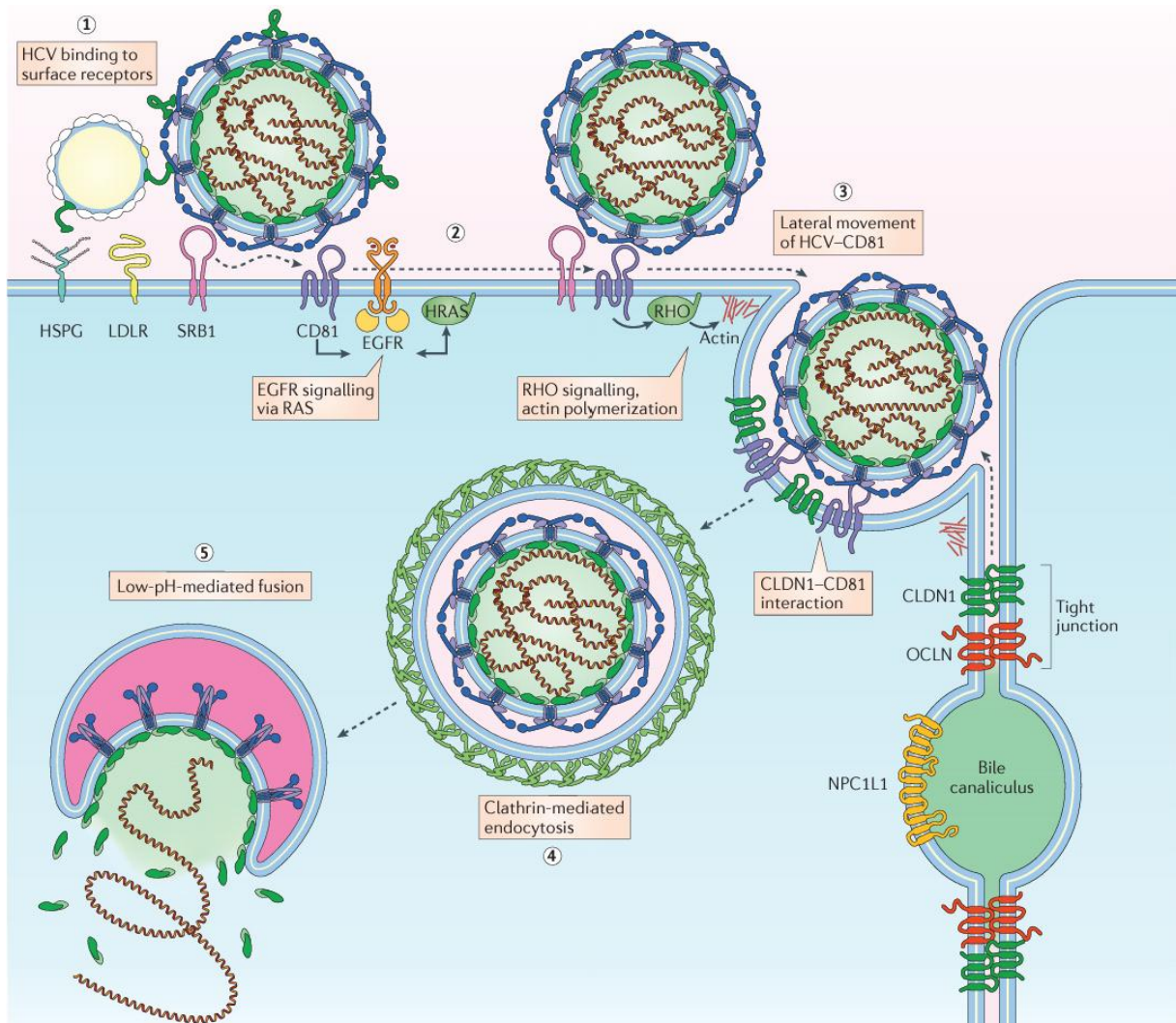


Figura 5 – Representação esquemática do processo de acoplamento da partícula do VHC com os receptores de membrana plasmática e os mecanismos de entrada do vírus no hepatócito. (Fonte: Lindenbach e cols., 2013)

Nos últimos anos, muito enfoque tem sido dado ao receptor SR-B1 no intuito de se descobrir seu real papel no ciclo de vida do VHC. Trata-se de uma glicoproteína ancorada na membrana plasmática do hepatócito, sendo hoje considerado o principal receptor das lipoproteínas de alta densidade (HDL) nestas células. Entretanto, este receptor também é capaz de se ligar a outras moléculas, como as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas oxidadas. Dados demonstram que, após sua ligação ao HDL, este receptor é capaz de

facilitar seletivamente a transferência de ésteres de colesterol do HDL ao interior da célula hepatocitária. Além da sua função original de transferência de lipídeos, o SR-B1 também é capaz de interagir com o VHC, estando supostamente envolvido na internalização desta partícula viral no hepatócito [96,97,101,102]. Estudos experimentais tem demonstrado que partículas virais são capazes de aumentar sua infectividade quando cultivadas em meio enriquecido com HDL. Voisset e cols. 2006 observaram que o HDL não só promoveria a internalização das partículas virais nas células alvo como também reduziria o efeito neutralizante dos anticorpos contra o VHC [103,104].

Como dito anteriormente, além do SR-B1, outros receptores relacionados ao metabolismo lipídico podem estar envolvidos no processo de internalização do VHC. O LDL-R é uma glicoproteína transmembrana responsável pela absorção de partículas de LDL ao meio intra-celular [98,105]. Sua expressão foi relacionada a maiores cargas de partículas virais dentro dos hepatócitos [106]. Mais recentemente, foi constatado o envolvimento do NPC1L1 no ciclo de vida do VHC. Trata-se de uma proteína localizada na membrana canalicular do hepatócitos e de enterócitos responsável pela absorção intestinal de colesterol e na regulação na concentração biliar deste lipídio. Acredita-se que seja capaz de promover a entrada do VHC no hepatócito através de sua interação com colesteróis localizados na superfície das partículas lipovirais (PLV) e pela regulação da homeostase do colesterol [107-110].

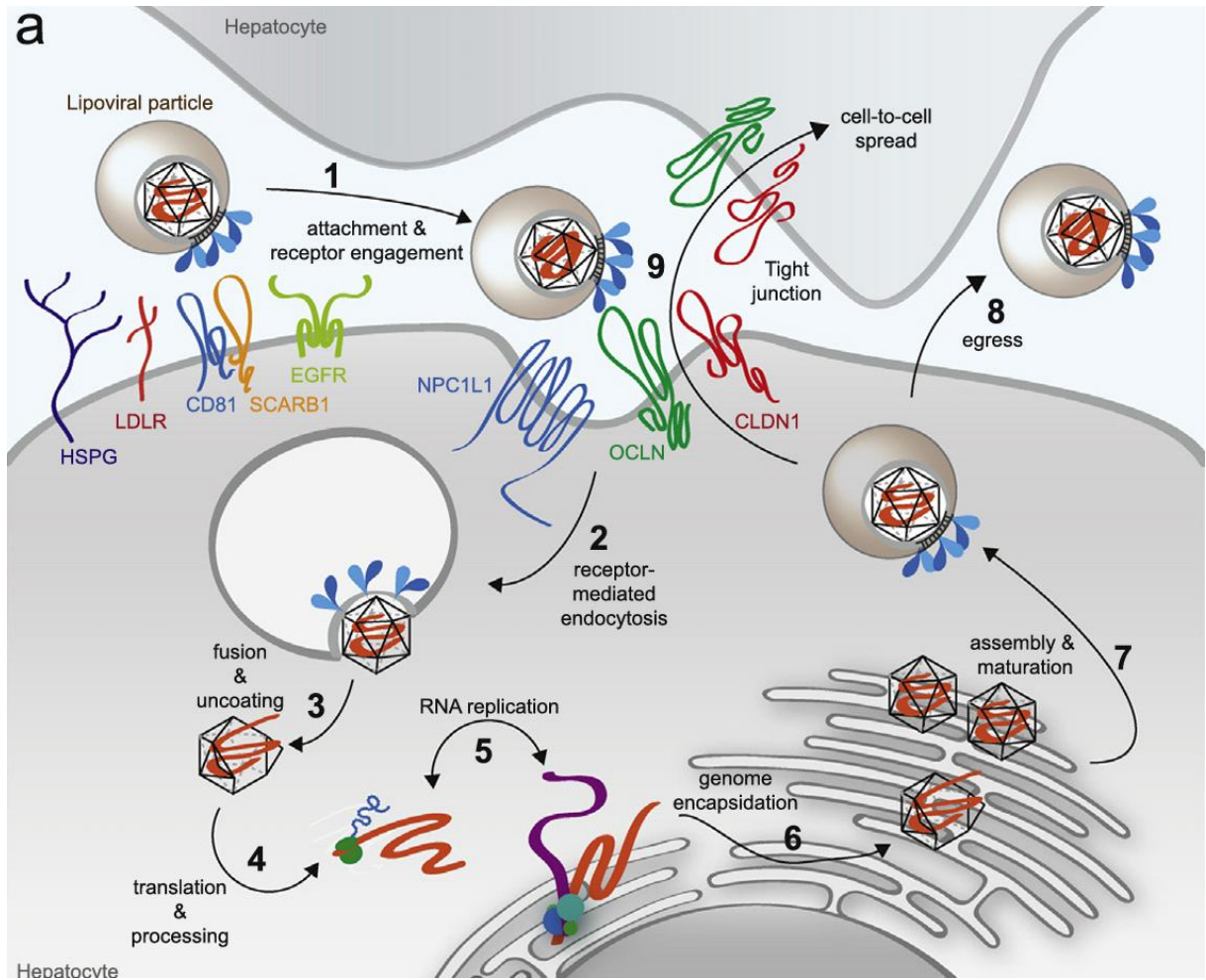


Figura 6 – Representação esquemática do ciclo de vida do vírus da hepatite C no hospedeiro humano (Fonte: Catanese e cols., 2015)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre comorbidades clínico-laboratoriais e os achados histopatológicos de biópsias hepáticas de pacientes portadores de hepatite C crônica.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1- Graduar e estadiar pela classificação de METAVIR as biópsias hepáticas dos pacientes portadores de hepatite C crônica;

3.2.2- Avaliar a presença e a quantidade de células mononucleares e polimorfonucleares nas regiões portais, periportais, mediozonais e perivenulares dos lóbulos hepáticos das biópsias hepáticas dos pacientes portadores de hepatite C crônica;

3.2.3- Avaliar a intensidade da esteatose em biópsias hepáticas dos pacientes portadores de hepatite C crônica;

3.2.4- Comparar os achados histopatológicos das biópsias hepáticas dos pacientes portadores de hepatite C crônica com as biópsias hepáticas do grupo controle;

3.2.5- Comparar o estilo de vida bem como os dados demográficos, clínicos, bioquímicos e virológicos em pacientes com e sem fibrose avançada nas biópsias hepáticas dos pacientes portadores de hepatite C crônica;

3.2.6- Comparar o estilo de vida bem como os dados demográficos, clínicos, bioquímicos e virológicos em pacientes com e sem atividade necroinflamatória nas biópsias hepáticas dos pacientes portadores de hepatite C crônica;

3.2.7- Comparar os achados histopatológicos em biópsias hepáticas dos pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem hipertensão arterial sistêmica;

3.2.8- Comparar os achados histopatológicos em biópsias hepáticas dos pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem *diabetes mellitus*;

3.2.9- Comparar os achados histopatológicos em biópsias hepáticas dos pacientes portadores de hepatite C crônica com os níveis séricos de lipoproteínas de alta densidade;

3.2.10- Avaliar a associação da intensidade da fibrose hepática com o estilo de vida, presença de comorbidades bem como dados demográficos e clínico-laboratoriais nos pacientes portadores de hepatite C crônica;

3.2.11- Avaliar a associação da presença de atividade necroinflamatória hepática com o estilo de vida, presença de comorbidades bem como dados demográficos e clínico-laboratoriais nos pacientes portadores de hepatite C crônica;

3.2.12- Avaliar a associação da hepatite de interface com o estilo de vida, presença de comorbidades bem como dados demográficos e clínico-laboratoriais nos pacientes portadores de hepatite C crônica;

3.2.13- Avaliar a associação da presença de atividade necroinflamatória lobular hepática com o estilo de vida, presença de comorbidades bem como dados demográficos e clínico-laboratoriais nos pacientes portadores de hepatite C crônica;

3.2.14- Avaliar a associação do grau de atividade necroinflamatória hepática com o estilo de vida, presença de comorbidades bem como dados demográficos e clínico-laboratoriais nos pacientes portadores de hepatite C crônica;

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 População de estudo

Trata-se de estudo transversal conduzido no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG-EBSERH entre março de 2013 a dezembro de 2016. Um total de 115 pacientes adultos em acompanhamento ambulatorial no serviço foram convidados e selecionados para participar do estudo após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O diagnóstico de hepatite C crônica foi feito através da confirmação da presença de anticorpos anti-VHC em exames sorológicos dos pacientes. A confirmação diagnóstica foi feita através do teste de VHC-RNA. Todos os pacientes com HCC foram submetidos a pesquisa de outras doenças hepáticas.

4.1.1 Critérios de inclusão

- Ter o diagnóstico confirmado de HCC;
- Ter idade entre 18 e 75 anos;
- Aceitar participar da pesquisa após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE);
- Estar cognitivamente capaz de responder os questionários da pesquisa (avaliação médica);

4.1.2 Critérios de exclusão

- Recusa do paciente em participar da pesquisa (n=4);
- Mulheres gestantes;
- Coinfecção pelos VHB e/ou HIV;
- Tratamento antiviral atual;
- Tratamento atual com antidepressivos;
- Pacientes com diagnóstico de doenças avançadas, com, por exemplo, insuficiência cardíaca (ICC), insuficiência renal (IR), doença pulmonar crônica ou neoplasia;
- Cirrose descompensada;

- Presença de encefalopatia hepática ou outra condição física ou mental que pudesse comprometer o processo de entrevistas;
- Presença de esquistossomose hepática (n=1);
- Pacientes em usos de medicamentos hipolipemiantes como estatina e fibratos (n=16);
- Biópsia inadequada (n=6);
- Características histológicas de NASH em biópsia (n=3);

O diagnóstico de cirrose foi feito baseado em achados clínicos, bioquímicos, radiológicos e histopatológicos [130]. Dados clínicos e bioquímicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos e utilizados para calcular os escores de Child-Turcotte-Pugh [131] e a relação AST/plaqueta (APRI) [132].

Todos os pacientes haviam sido previamente submetidos à biópsia percutânea do fígado. Foram excluídos do estudo seis pacientes com biópsia considerada inadequada (sessão de características histológicas). Também foram excluídos pacientes cujas biópsias apresentassem características histológicas de NASH como balonização de hepatócitos e fibrose perisinusoidal (n=3). Oitenta e cinco pacientes e suas biópsias foram então incluídos na análise final.

Como grupo controle foram usados doadores de fígado [n = 29; 22 (75,9%) homens; idade média 36.8 ± 14.1] cadastrados no Serviço de Transplante Hepático do Instituto Alfa de Gastroenterologia (HC-UFMG).

4.2 Características histopatológicas

Os fragmentos de fígado foram obtidos através de biópsia percutânea utilizando agulha de Menghini. Após a coleta os fragmentos foram fixados em formol 10% e, após preparo histológico, emblocados em parafina. Os cortes histológicos de 3 μ m foram corados com hematoxilina e eosina, tricrômico de Gomori e Picrosirius red e examinados por um único patologista que desconhecia os dados dos pacientes (GHDPS).

A avaliação histológica foi baseada no escore de METAVIR [133] onde se estadia a fibrose como: F0, ausência de fibrose; F1, expansão fibrosa dos tratos portais; F2, expansão fibrosa dos tratos portais com formação de septos conjuntivos portais; F3,

presença de septos conjuntivos com distorção da arquitetura lobular; F4, cirrose hepática. A graduação da atividade necroinflamatória leva em consideração a intensidade e localização do infiltrado inflamatório associado à necrose de hepatócitos e é classificado de A0 a A3, sendo A0, atividade necroinflamatória ausente; A1, atividade necroinflamatória leve; A2, atividade necroinflamatória moderada; A3, atividade necroinflamatória acentuada.

Também foram avaliados, separadamente, a presença e a intensidade de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares) em cada uma das regiões do lóbulo hepático (região portal, periportal, mediozonal ou lobular e perivenular) segundo o escore variando de 0 a 3, sendo 0, ausente; 1, leve; 2, moderado e 3, acentuado).

A esteatose foi graduada de 0 a 3, sendo 0, ausente ou <5%; 1, leve (5% - 33%); 2, moderada (33% - 66%) e 3, acentuada (> 66%).

Para padronizar o tamanho da amostragem, todos os fragmentos foram medidos com régua milimetrada e contados o número de tratos portais. Para minimizar erros de avaliação foram consideradas adequadas biópsias com no mínimo 6 tratos portais.

4.3 Parâmetros laboratoriais

Após jejum de 12-14 horas foi colhido sangue venoso de todos os pacientes para análise dos parâmetros virológicos. Presença de anticorpo anti-VHC foi avaliado pelo teste de ELISA (AxSYM VHC, version 3.0; Abbott GmbH & Co., Wiesbaden, Germany) e a presença do vírus foi confirmada por PCR qualitativo para VHC RNA (AMPLICOR 2.0 assay Roche Diagnostics, Branchburg, NJ). O genótipo do VHC e a carga viral foram determinados usando teste comercial (Cobas Taq Man VHC test V.2.0; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) e o *line probe assay* (VERSANT VHC genotyping assays; Bayer's Diagnostic Corporation, Tarrytown, NY), respectivamente. Carga viral e genótipo do VHC estavam disponíveis em 75 (88,2%) pacientes.

4.4 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Após jejum de 12-14 horas foi colhido sangue venoso de todos os pacientes para análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamyltranspeptidase (γ -GT), fosfatase alcalina (FA), albumina, bilirrubina total, atividade de protrombina (PA), creatinina, glicemia, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TGL) foram dosados por métodos laboratoriais de rotina.

4.5 Dados comportamentais

O dado comportamental avaliado foi o histórico de consumo atual ou progresso de álcool (<20 g/dia vs. \geq 20 g/dia).

4.6 Comorbidades clínicas

Hipertensão arterial sistêmica foi diagnosticada segundo os critérios da Sociedade Europeia de Hipertensão (2013) e os *Guidelines* da Sociedade Europeia de Cardiologia [134]. *Diabetes mellitus* (DM) foi diagnosticada usando os *Guidelines* da Associação Americana de Diabetes para diagnóstico e classificação de diabetes (2014) [135]. A dislipidemia foi diagnosticada de acordo com o *Guidelines* de 2013 do *American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice* [136].

4.7 Dados antropométricos

Peso e altura foram medidos usando balança mecânica de plataforma (FILIZOLA[®]). Índice de massa corporal (IMC) foi calculado segundo a fórmula: $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$. Todas as medidas foram realizadas por nutricionista vinculado ao Ambulatório de Hepatites Virais do Hospital das Clínicas da UFMG.

4.8 Aspectos éticos

O estudo foi planejado e executado de acordo com a Declaração de Helsinki e aprovado pelo Comitê de Ética local segundo o número (ETIC-0404.0.203.000-10).

4.9 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa de estatística SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Análise descritiva foi utilizada para descrever os dados de estilo de vida, demográficos, clínicos, nutricionais e bioquímicos. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar se as variáveis tinham distribuição normal. Para comparação das porcentagens foi utilizado os teste chi-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher. Para comparação das medianas foram usados os testes Mann-Whitney U ou Kruskal-Wallis e para comparação das médias foram usados os testes T de Student ou ANOVA.

A associação entre as características histopatológicas [Modelo 1, Fibrose (F0 - F2 versus F3 - F4); Modelo 2, atividade necroinflamatória hepática; Modelo 3, hepatite de interface; Modelo 4, atividade necroinflamatória lobular] e as seguintes variáveis: demográficas (gênero, idade), comorbidades clínicas (HAS, DM), estilo de vida [uso de álcool (<20 g/dia vs. ≥20 g/dia)] e bioquímicos [colesterol HDL (<55 mg/dl vs. ≥55 mg/dl) e triglicérides (<150 mg/dl vs. ≥ 150 mg/dl)] foram feitos por análise univariada. Todas as associações com $p < 0.25$ foram incluídas no modelo final de regressão logística. Odds ratio (OR) e IC de 95% foram usados como estimativa do risco. O teste de Hosmer-Lemeshow foi usado para avaliar a adequabilidade do modelo.

As variáveis que tinham mais de 10% de perda de dados não incluídas no modelo de análise multivariada. Os níveis de significância considerados foram de valores de $p \leq 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínico-laboratoriais dos pacientes

A média da idade dos pacientes foi de 57.2 ± 10.7 anos e, 40/85 (47.1%) eram homens. Entre os pacientes, 10 (11.8%) tinham diagnóstico de cirrose hepática [Child-Turcotte-Pugh score, (A5): 5 (50.0%), (A6): 3 (30.0%) e (B7) 2 (20.0%), APRI score (media \pm DP): 2.6 ± 1.5]. As características clínico-laboratoriais e demográficas dos pacientes estão resumidas na Tabela 3.

Pacientes com fibrose mais avançada (METAVIR F3 ou F4) eram mais velhos do que os pacientes com fibrose F0 – F1 (Tabela 3). Com relação aos dados bioquímicos e hematológicos, pacientes com fibrose avançada apresentam maiores níveis de ALT, AST, γ -GT, bilirrubina e tempo de protrombina e menores níveis de albumina quando comparados com pacientes F0-F1 (Tabela 3).

Tabela 3 Dados clínicos, laboratoriais, demográficos e sociais dos pacientes portadores de hepatite C crônica ($n = 85$).

Variáveis	Fibrose (F0 - F2)	Fibrose (F3 - F4)	<i>p</i> value
Demográficos			
Pacientes	62	23	
Gênero			
Masculino n (%)	29 (46.8)	11 (47.8)	0.93
Feminino n (%)	33 (53.2)	12 (52.2)	
Idade (anos) ^a	55.5 ± 11.0	61.8 ± 8.9	0.02*
Índice de massa corporal (kg/m ²) ^a	26.4 ± 4.2	26.0 ± 2.9	0.68
Comorbidades clínica n (%)			
DM	13 (21.0)	6 (26.1)	0.62
HAS	23 (37.1)	12 (52.2)	0.21
Estilo de vida n (%)^c			
Uso regular de álcool (> 20g etanol/dia)	12/60 (20.0)	2/22 (9.1)	0.60
Histórico de uso de álcool	52/60 (86.7)	20/22 (90.9)	0.25
Dados Bioquímicos e hematológicos			
Albumina (g/dl) ^b	4.3 ± 0.4	3.9 ± 0.6	0.002*
ALT(U/l) ^b	46.0 (38.0 - 78.0)	79.5 (53.8 - 132.0)	0.006*
FA (U/l) ^b	88.0 (70.8 - 126.5)	114.0 (81.8 - 176.0)	0.10
AST (U/l) ^b	43.0 (32.0 - 66.0)	78.5 (64.8 - 118.5)	< 0.0001*
γ-GT (U/l) ^b	57.0 (30.0 - 106.0)	84.5 (50.8 - 200.8)	0.03*
Glicemia (mg/dl) ^b	91.0 (84.0 - 110.5)	91.5 (84.3 - 104.3)	0.90
Tempo de Protrombina (segundos) ^b	14.1 (13.3 - 14.7)	15.8 (13.0 - 17.4)	0.01*
Bilirubina Total (mg/dl) ^b	0.70 (0.50 - 0.85)	1.10 (0.60 - 1.79)	0.001*
Colesterol Total (mg/dl) ^{b,d}	175.0 (146.0 - 200.5)	156.0 (139.0 - 188.5)	0.14
LDL colesterol (mg/dl) ^{b,d}	90.2 (65.3 - 121.0)	95.0 (82.5 - 105.3)	0.97
HDL colesterol (mg/dl) ^{b,d}	55.0 (44.0 - 69.0)	48.0 (41.5 - 57.3)	0.23
Triglicerídeos (mg/dl) ^{b,d}	85.0 (69.0 - 142.5)	87.0 (70.0 - 115.5)	0.29
Aspectos virológicos^e			
VHC-RNA log10 (IU/ml) ^b	5.9 (5.4 - 6.3)	5.7 (5.5 - 6.2)	0.67
Genótipo 1 n (%)	42/53 (79.2)	20/22 (90.9)	0.32

a, média ± desvio padrão (DP); b, [Mediana e intervalo interquartil (IQR), percentil 25 - 75]; c, 82 pacientes com informações sobre consumo de álcool; d, dados de 78 pacientes (91.8%); e, dados de 75 pacientes (88.2%); ALT, alanina aminotransferase; FO, fosfatase alcalina; AST, aspartato aminotransferase; DM, *diabetes mellitus*; VHC, vírus hepatite C; HAS, hipertensão arterial sistêmica; γ-GT, gama glutamiltransferase; RNA, ácido ribonucléico; *, *p* values ≤ 0.05 foram considerados significantes [the asymptotic Pearson's Chi-square test (variáveis categóricas)]; Test T (média ± DP) ou Mann Whitney [Mediana e intervalo interquartil (IQR, percentil 25th - 75th)].

Sobrepeso, DM e HAS estavam associados com atividade necroinflamatória (Tabela 4). Níveis elevados de ALT, AST, bilirrubina e triglicerídeos, bem como níveis diminuídos de HDL também estavam associados à atividade necroinflamatória hepática (Tabela 4).

Tabela 4 Dados clínicos, laboratoriais, demográficos e sociais de pacientes portadores de Hepatite C crônica ($n = 85$).

Variáveis	Atividade necro-inflamatória ausente	Atividade necro-inflamatória presente	<i>p</i> value
Demográficos			
Pacientes	18	67	
Gênero			
Masculino n (%)	9 (50.0)	31 (46.3)	0.78
Feminino n (%)	9 (50.0)	36 (53.7)	
Idade (anos) ^a	56.1 ± 8.6	57.5 ± 11.3	0.61
Índice de massa corporal (kg/m ²) ^a	24.5 ± 4.5	26.8 ± 3.6	0.02*
Comorbidades clínica n (%)			
DM	1 (5.6)	18 (26.9)	0.05*
HAS	3 (16.7)	32 (47.8)	0.02*
Estilo de vida n (%)^c			
Uso regular de álcool (> 20g etanol/dia)	6 (33.3)	8 (12.5)	0.04*
Histórico de uso de álcool	17 (94.4)	55 (85.9)	0.33
Dados Bioquímicos e hematológicos			
Albumina (g/dl) ^b	4.4 (4.1 - 4.7)	4.3 (4.1 - 4.5)	0.15
ALT(U/l) ^b	44.0 (28.0 - 49.0)	69.0 (44.0 - 95.0)	< 0.001*
FA (U/l) ^b	88.0 (65.5 - 172.0)	105.0 (73.0 - 142.0)	0.61
AST (U/l) ^b	36.0 (28.5 - 46.5)	65.0 (40.0 - 86.0)	< 0.001*
γ-GT (U/l) ^b	43 (23.1 - 129.5)	71.0 (38.0 - 125.0)	0.10
Glicemia (mg/dl) ^b	89.0 (78.0 - 97.0)	91.0 (85.0 - 114.0)	0.07
Tempo de Protrombina (segundos) ^b	14.1 (13.2 - 14.6)	14.2 (13.0 - 15.4)	0.51
Bilirubina Total (mg/dl) ^b	0.60 (0.40 - 0.70)	0.79 (0.51 - 1.21)	0.009*
Colesterol Total (mg/dl) ^{b,d}	175.0 (146.5 - 187.5)	163.0 (140.0 - 201.0)	0.99
LDL colesterol (mg/dl) ^{b,d}	80.0 (52.0 - 107.0)	99.0 (74.0 - 119.8)	0.11
HDL colesterol (mg/dl) ^{b,d}	61.0 (45.0 - 86.5)	51.0 (41.0 - 58.0)	0.02*
Triglicerídeos (mg/dl) ^{b,d}	80.0 (61.0 - 112.5)	87.0 (69.0 - 142.0)	0.02*
Aspectos virológicos^e			
VHC-RNA log10 (IU/ml) ^b	5.69 (5.33 - 5.99)	5.97 (5.63 - 6.32)	0.06
Genótipo 1 n (%)	14 (82.4)	48 (82.8)	0.97

a, média ± desvio padrão (DP); b, [Mediana e intervalo interquartil (IQR), percentil 25 - 75]; c, 82 pacientes com informações sobre consumo de álcool; d, dados de 78 pacientes (91.8%); e, dados de pacientes (88.2%); ALT, alanina aminotransferase; FO, fosfatase alcalina; AST, aspartato aminotransferase; DM, *diabetes mellitus*; VHC, vírus hepatite C; HAS, hipertensão arterial sistêmica; γ-GT, gama glutamiltransferase; RNA, ácido ribonucléico; *, *p* values ≤ 0.05 foram considerados significantes [the asymptotic Pearson's Chi-square test (variáveis categóricas)]; Test T (média ± DP) ou Mann Whitney [Mediana e intervalo interquartil (IQR, percentil 25th - 75th)].

5.2 Achados histológicos das biópsias hepáticas de pacientes portadores de hepatite c crônica e controles

Os achados histológicos das biópsias hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica foram comparadas com os do grupo controle (Tabela 5). Entre as variáveis analisadas, presença de histiócitos em todos os segmentos do lóbulo hepático e neutrófilos distribuídos no lóbulo e na região perivenular não estavam associados com a presença de hepatite C crônica (Tabela 5).

Hepatite de interface e atividade inflamatória lobular em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica estão representados nas **figuras 7 e 8**, respectivamente.

Tabela 5. Achados histopatológicos em biópsia hepática do grupo controle e pacientes portadores de hepatite C crônica ($n = 114$).

Achados histopatológicos	Grupo controle $n = 29$	Pacientes HCC $n = 85$	p value
Fibrose avançada (F3 - F4) n (%)	0	23 (27.1)	0.001*
Atividade Necroinflamatória n (%)	0	67 (78.8)	<0.0001*
Esteatose (mínimo 5,0%)	4 (13.8)	57 (67.0)	<0.0001*
Infiltrado inflamatório portal n (%)	2 (6.9)	85 (100.0)	<0.0001*
Neutrófilos	0	44 (51.8)	<0.0001*
Linfócitos	2 (6.9)	85 (100.0)	<0.0001*
Histiócitos	2 (6.9)	16 (18.8)	0.43
Infiltrado inflamatório periportal n (%)	0	65 (76.5)	< 0.0001*
Neutrófilos	0	19 (22.3)	0.003*
Linfócitos	0	65 (76.5)	<0.0001*
Histiócitos	0	4 (4.7)	0.57
Infiltrado inflamatório lobular n (%)	0	62 (72.9)	<0.0001*
Neutrófilos	0	9 (10.6)	0.35
Linfócitos	0	62 (72.9)	<0.0001*
Histiócitos	0	3 (3.5)	1.00
Infiltrado inflamatório perivenular n (%)	0	18 (21.2)	0.006*
Neutrófilos	0	1 (1.2)	1.00
Linfócitos	0	18 (21.2)	0.007*
Histiócitos	0	1 (1.2)	1.00

HCC, hepatite C crônica; 1; a presença de atividade necroinflamatória e fibrose foi avaliada segundo critérios do escore METAVIR; presença de esteatose foi considerada quando presente em mais de 5% dos hepatócitos; 2, presença de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares), foi graduada de 0 a 3 (0, ausente; 1, leve; 2, moderada e 3, acentuada) separadamente em todas as regiões do lóbulo hepático; * p values ≤ 0.05 foram considerados significantes [the asymptotic Pearson's Chi-square test and Fisher's exact test (variáveis categóricas)].

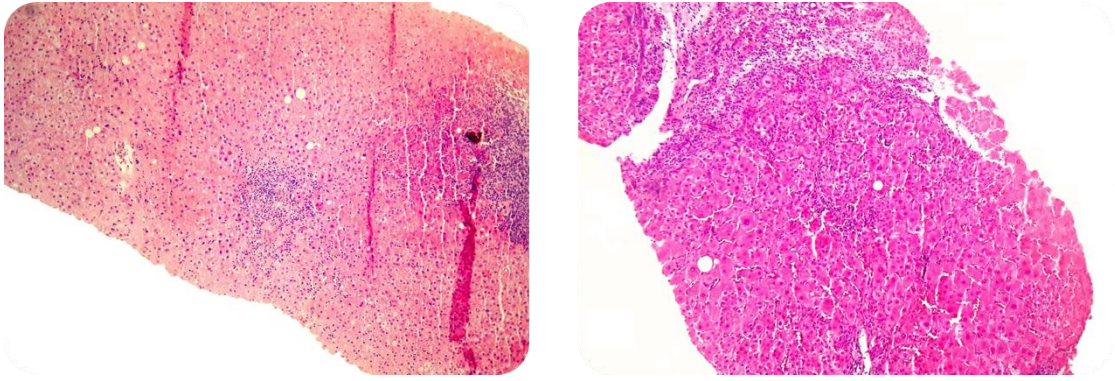


Figura 7: A e B: Hepatites de Interface em HCC ("piecemeal necrosis"): Contorno irregular do trato portal contendo denso infiltrado inflamatório mononuclear que invade a placa limitante de hepatócitos. (H&E - 10x).

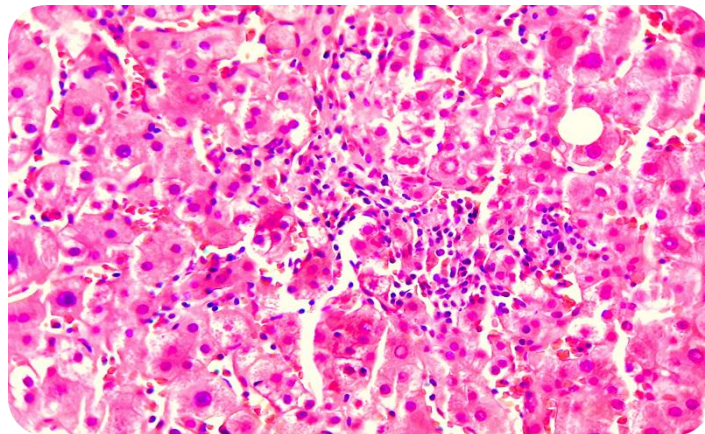


Figura 8: Hepatite lobular em HCC: Focos de infiltrado inflamatório associado a necrose hepatocitária na intimidade do lóbulo hepático. (H&E - 40x).

5.3 Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem hipertensão arterial sistêmica

Os achados histopatológicos das biópsias hepáticas de pacientes portadores de hepatite C crônica foram comparadas quanto a presença ou ausência de hipertensão arterial sistêmica (Tabela 6). Dentre as variáveis testadas na análise univariada, a presença de atividade necroinflamatória,

presença de infiltrado inflamatório periportal, presença de neutrófilos e linfócitos na região periportal mostraram associação com a presença de HAS. (Tabela 6).

Tabela 6. Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem HAS ($n = 85$).

Achados histopatológicos	HAS $n = 35$	sem HAS $n = 50$	p value
Fibrose avançada (F3 - F4) n (%)	12 (33.4)	11 (22.0)	0.21
Atividade Necroinflamatória n (%)	32 (91.4)	35 (70.0)	0.02*
Esteatose (mínimo 5.0%)	24 (68.6)	33 (66.0)	0.80
Infiltrado inflamatório portal n (%)	35 (100.0)	50 (100.0)	0.31
Neutrófilos	22 (62.9)	22 (44.0)	0.10
Linfócitos	35 (100.0)	50 (100.0)	0.35
Histiócitos	9 (25.7)	7 (14.0)	0.25
Infiltrado inflamatório periportal n (%)	32 (91.4)	33 (66.0)	0.03*
Neutrófilos	12 (34.3)	7 (14.0)	0.03*
Linfócitos	32 (91.4)	33 (66.0)	0.03*
Histiócitos	2 (5.7)	2 (4.0)	1.00
Infiltrado inflamatório lobular n (%)	26 (74.3)	36 (72.0)	0.82
Neutrófilos	4 (11.4)	5 (10.0)	0.83
Linfócitos	26 (74.3)	36 (72.0)	0.93
Histiócitos	1 (2.9)	2 (4.0)	1.00
Infiltrado inflamatório perivenular n (%)	4 (11.4)	14 (28.0)	0.10
Neutrófilos	0	1 (2.0)	1.00
Linfócitos	4 (11.4)	14 (28.0)	0.13
Histiócitos	0	1 (2.0)	1.00

HCC, hepatite C crônica; HAS, hipertensão arterial sistêmica 1; a presença de atividade necroinflamatória e fibrose foi avaliada segundo critérios do escore METAVIR; presença de esteatose foi considerada quando presente em mais de 5% dos hepatócitos; 2, presença de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares), foi graduada de 0 a 3 (0, ausente; 1, leve; 2, moderada e 3, acentuada) separadamente em todas as regiões do lóbulo hepático; * p values ≤ 0.05 foram considerados significantes [the asymptotic Pearson's Chi-square test and Fisher's exact test (variáveis categóricas)].

5.4 Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem *diabetes mellitus*

Os achados histopatológicos das biópsias hepáticas de pacientes portadores de hepatite C crônica foram comparadas quanto a presença ou ausência de DM (Tabela 7). Dentre as variáveis testadas na análise univariada, presença de linfócitos e histiócitos em região lobular estavam associados com a presença de DM (Tabela 7).

Tabela 7. Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem *diabetes mellitus* (n = 85).

Achados histopatológicos	DM n = 19	sem DM n = 66	p value
Fibrose avançada (F3 - F4) n (%)	6 (31.6)	17 (25.8)	0.62
Atividade Necroinflamatória n (%)	18 (94.7)	49.0 (74.2)	0.06
Esteatose (mínimo 5.0%)	11 (57.9)	46 (69.7)	0.34
Infiltrado inflamatório portal n (%)	19 (100.0)	66 (100.0)	0.23
Neutrófilos	13 (68.4)	31 (46.9)	0.23
Linfócitos	19 (100.0)	66 (100.0)	0.15
Histiócitos	6 (31.6)	10 (15.2)	0.14
Infiltrado inflamatório periportal n (%)	17 (89.5)	48 (72.7)	0.11
Neutrófilos	6 (31.6)	13 (19.7)	0.27
Linfócitos	17 (89.5)	48 (72.7)	0.10
Histiócitos	2 (10.5)	2 (3.0)	0.26
Infiltrado inflamatório lobular n (%)	17 (89.5)	45 (68.2)	0.08
Neutrófilos	3 (15.8)	6 (9.1)	0.41
Linfócitos	17 (89.5)	45 (68.2)	0.04*
Histiócitos	2 (10.5)	1 (1.5)	0.05*
Infiltrado inflamatório perivenular n (%)	1 (5.3)	17 (25.8)	0.06
Neutrófilos	0	1 (1.5)	1.00
Linfócitos	1 (5.3)	17 (25.8)	0.19
Histiócitos	0	1 (1.5)	1.00

HCC, hepatite C crônica; DM, *diabetes mellitus*; 1, a presença de atividade necroinflamatória e fibrose foi avaliada segundo critérios do escore METAVIR; presença de esteatose foi considerada quando presente em mais de 5% dos hepatócitos; 2, presença de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares), foi graduada de 0 a 3 (0, ausente; 1, leve; 2, moderada e 3, acentuada) separadamente em todas as regiões do lóbulo hepático; * p values ≤ 0.05 foram considerados significantes [the asymptotic Pearson's Chi-square test and Fisher's exact test (variáveis categóricas)].

5.5 Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem níveis de HDL ≥ 55 mg/dl

Níveis elevados de HDL diminuem o risco de doenças cardiovasculares. Níveis séricos de HDL iguais ou maiores que 60 mg/dl ou 1.55 mmol/l são considerados excelentes, enquanto níveis menores que 40 mg/dl or 1.03 mmol/l são considerados abaixo do desejável [137]. Na nossa amostra, a mediana e intervalo (25th - 75th percentil) do colesterol HDL foi de 52,5 (50.0 e 64.3). Baseado nos valores descritos acima, os valores de nível sérico de HDL foram estratificados em <55 mg/dl and ≥ 55 mg/dl na nossa amostra.

Os achados histopatológicos das biópsias hepáticas de pacientes portadores de hepatite C crônica foram comparadas quanto a presença ou ausência de níveis séricos de HDL ≥ 55 mg/dl (Tabela 8). Dentre as variáveis testadas na análise univariada, presença de atividade necroinflamatória, presença de infiltrado inflamatório periportal e lobular e linfócitos periportal estavam associados com níveis séricos de HDL < 55 mg/dl (Tabela 8).

Tabela 8. Achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem HDL colesterol ≥ 55 mg/dl ($n = 85$).

Achados histopatológicos	HDL colesterol ≥ 55 mg/dl $n = 28$	HDL colesterol < 55 mg/dl $n = 50$	p value
Fibrose avançada (F3 - F4) n (%)	5 (17.9)	16 (32.0)	0.18
Actividade Necroinflamatória n (%)	17 (60.7)	43 (86.0)	0.01*
Esteatose (mínimo 5.0%)	20 (71.4)	32 (64.0)	0.42
Infiltrado inflamatório portal n (%)	14 (50.0)	25 (50.0)	0.09
Neutrófilos	10 (35.7)	28 (56.0)	0.09
Linfócitos	28 (100.0)	50 (100.0)	0.09
Histiócitos	2 (7.1)	9 (18.0)	0.19
Infiltrado inflamatório periportal n (%)	16 (57.1)	42 (84.0)	0.03*
Neutrófilos	2 (7.1)	12 (24.0)	0.06
Linfócitos	16 (57.1)	42 (84.0)	0.03*
Histiócitos	0	1 (2.0)	1.00
Infiltrado inflamatório lobular n (%)	16 (57.1)	39 (78.0)	0.05*
Neutrófilos	1 (3.6)	5 (10.0)	0.31
Linfócitos	16 (57.1)	39 (78.0)	0.13
Histiócitos	0	1 (2.0)	1.00
Infiltrado inflamatório perivenular n (%)	7 (25.0)	10 (20.0)	0.61
Neutrófilos	0	1 (2.0)	1.0
Linfócitos	7 (25.0)	10 (20.0)	0.61
Histiócitos	0	0	-

HCC, hepatite C crônica; 1, a presença de atividade inflamatória e fibrose foi avaliada Segundo critérios do escore METAVIR; presença de esteatose foi considerada quando presente em mais de 33% dos hepatócitos; 2, A presença de células inflamatórias (mononucleares and polimorfonucleares), foi graduada de 0 a 3 (0, ausente; 1, leve; 2, moderada and 3 acentuada) separadamente em todas as regiões do lóbulo hepático; * p values ≤ 0.05 foram considerados significantes [the asymptotic Pearson's Chi-square test and Fisher's exact test (variáveis categóricas)].

5.6 Fatores associados com os achados histopatológicos em biópsia hepática de portadores de hepatite C crônica

Na análise univariada, idade, HAS, TGL e HDL foram selecionados. Idade e HDL < 55 mg/dl permaneceram associados, de forma significativa e independente, com o grau de fibrose hepática (F0 - F2 vs. F3 - F4) após análise multivariada (Modelo 1) (Tabela 9).

Na análise univariada, IMC, HAS, DM, TGL e HDL foram selecionados. HAS e HDL < 55 mg/dl permaneceram associados, de forma significativa e independente, com a presença de atividade necroinflamatória após análise multivariada (Modelo 2) (Tabela 9).

Na análise univariada, idade, IMC, HAS, DM e HDL foram selecionados. HAS e HDL < 55 mg/dl permaneceram associados, de forma significativa e independente, com a presença de atividade necroinflamatória periportal após análise multivariada (Modelo 3) (Tabela 9).

Na análise univariada, DM, TGL e HDL foram selecionados. HDL < 55 mg/dl permaneceu associado, de forma significativa e independente, com a presença de atividade necroinflamatória lobular após análise multivariada (Modelo 4) (Tabela 9).

Tabela 9 Variáveis associadas com os achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica ($n = 85$).

Variáveis independentes	Modelo 1			
	Variável dependente - Fibrose (F0 - F2 vs F3 - F4)			
	Análise univariada	Análise multivariada		
	p	OR	IC 95%	p
Gênero	0.44	-	-	-
Idade	0.004	1.08	1.01 - 1.16	0.02*
Índice de massa corporal	0.90	-	-	-
Hipertensão	0.22	1.11	0.25 - 4.94	0.89
<i>Diabetes mellitus</i>	0.52	-	-	-
Uso de álcool (≥ 20 g/dia)	0.60	-	-	-
Triglicerídeos > 150 mg/dl	0.22	0.99	0.98 - 1.01	0.13
HDL < 55 mg/dl	0.08	1.04	1.01 - 1.08	0.04*

Variáveis independentes	Modelo 2			
	Variável dependente – Atividade necroinflamatória			
	Análise univariada	Análise multivariada		
	p	OR	IC 95%	p
Gênero	0.85	-	-	-
Idade	0.40	-	-	-
Índice de massa corporal	0.03	1.11	0.93 - 1.32	0.25
Hipertensão	0.03	5.62	1.28 - 24.65	0.02*
<i>Diabetes mellitus</i>	0.08	2.48	0.25 - 24.87	0.44
Uso de álcool (≥ 20 g/dia)	0.27	-	-	-
Triglicerídeos > 150 mg/dl	0.03	1.01	0.99 - 1.03	0.13
HDL < 55 mg/dl	0.005	1.05	1.01 - 1.09	0.007*

Tabela 9 (continuação). Variáveis associadas com os achados histopatológicos em biópsia hepática de pacientes portadores de hepatite C crônica (n = 85).

Variáveis independentes	Modelo 3			
	Variável dependente – Atividade necroinflamatória periportal			
	Análise univariada	Análise multivariada		
	<i>p</i>	OR	IC 95%	<i>p</i>
Gênero	0.82	-	-	-
Idade	0.02	1.05	0.99 - 1.11	0.14
Índice de massa corporal	0.08	1.11	0.95 - 1.29	0.19
Hipertensão	0.003	7.13	1.95 - 26.15	0.003*
<i>Diabetes mellitus</i>	0.05	1.45	0.25 - 8.48	0.68
Uso de álcool (≥ 20 g/dia)	0.74	-	-	-
Triglicerídeos > 150 mg/dl	0.80	-	-	-
HDL < 55 mg/dl	0.005	1.05	1.01 - 1.09	0.007*

Variáveis independentes	Modelo 4			
	Variável dependente – Atividade necroinflamatória lobular			
	Análise univariada	Análise multivariada		
	<i>p</i>	OR	IC 95%	<i>P</i>
Gênero	0.32	-	-	-
Idade	0.91	-	-	-
Índice de massa corporal	0.49	-	-	-
Hipertensão	0.40	-	-	-
<i>Diabetes mellitus</i>	0.21	1.57	0.29 - 9.38	0.61
Uso de álcool (≥ 20 g/dia)	0.88	-	-	-
Triglicerídeos > 150 mg/dl	0.02	1.02	0.99 - 1.03	0.06
HDL < 55 mg/dl	0.008	1.04	1.01 - 1.07	0.04*

5.7 Comorbidades clínicas, colesterol, carga viral e genótipo do VHC

A carga viral e o genótipo do VHC não estiveram associados com HAS, DM, TGL > 150 mg/dl e HDL < 55 mg/dl.

5.8 Correlação do grau de atividade necroinflamatória e os níveis séricos de HDL

Pacientes portadores de hepatite C crônica com níveis séricos menores de HDL tiveram maiores graus de atividade necroinflamatória do que aqueles com níveis séricos maiores de HDL (Figura 9).

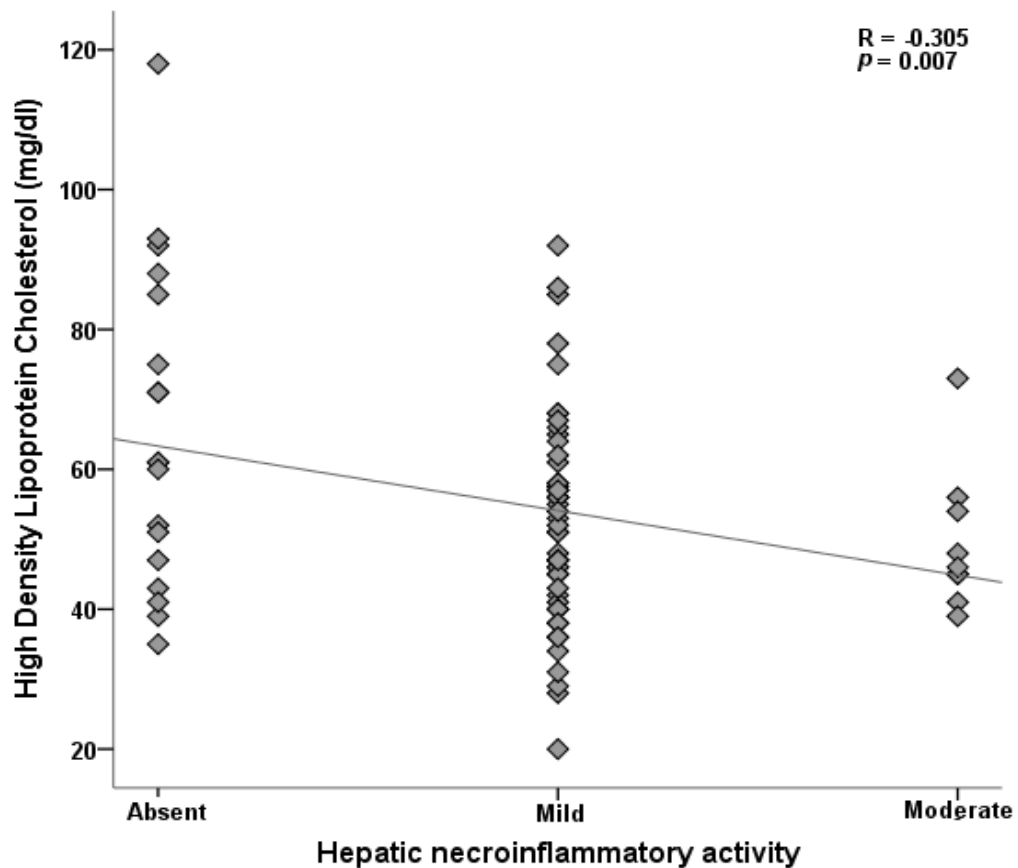


Figura 9 - Correlação entre o grau de atividade necroinflamatória e níveis séricos de HDL em pacientes com hepatite C crônica ($n = 78$). Cada box mostra mediana (barra horizontal) e os quartis superiores e inferiores. Whiskers mostram os valores máximo e mínimo.

6. DISCUSSÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é uma importante causa de doença hepática crônica em todo o mundo, podendo evoluir, em até 30% dos casos, para cirrose num período de duas a três décadas [14-18,32-35]. Esta infecção também se relaciona ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC) bem como a uma gama de manifestações extra-hepáticas, sendo a principal indicação de transplante hepático ortotópico nos países mais desenvolvidos [32-35]. Os custos em saúde relacionados com esse vírus são consideráveis, o que torna muito importante uma adequada compreensão sobre seus mecanismos de infectividade, interação com o sistema imune do hospedeiro, cronificação da doença hepática e desenvolvimento de manifestações sistêmicas. Tal conhecimento permitirá o desenvolvimento de novas terapias antivirais mais eficientes, com menor custo e menos efeitos adversos.

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar a influência de comorbidades clínico-laboratoriais, mormente comorbidades associadas à síndrome metabólica, na evolução da hepatite C crônica. Para tanto, foram avaliados as alterações histopatológicas observadas nas biópsias hepáticas dos pacientes portadores de HCC. Foi feito o estadiamento (fibrose) e graduação (atividade inflamatória) da doença, segundo os critérios de METAVIR, bem como a presença de infiltrado inflamatório, sua intensidade, o tipo celular e sua localização em cada uma das regiões do lóbulo hepático.

Nosso estudo demonstrou uma associação inversa entre os níveis séricos de HDL com estádios mais avançados de fibrose hepática (OR 1,04; $p = 0,04$), presença de atividade necroinflamatória hepática (OR 1,05; $p = 0,007$), hepatite de interface (OR 1,04; $p = 0,02$) e com a atividade inflamatória intralobular (OR 1,04; $p = 0,04$). Essa associação permaneceu quando comparamos os níveis séricos de HDL com o grau de atividade necroinflamatória estabelecido segundo o sistema METAVIR ($p = 0,007$), demonstrando que pacientes com HCC e níveis séricos mais elevados de HDL apresentam estágios menos avançados de fibrose hepática e menor atividade necroinflamatória intra-hepática quando comparados a aqueles infectados com níveis menores de HDL.

Embora muitos estudos tenham relatado níveis anormais de lipídios séricos na HCC, especialmente baixos níveis de colesterol total [138] e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) [87,88, 139], e sua relação com a fibrose hepática [140], pouco se sabe sobre o perfil sérico do HDL nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC bem como a possível interação entre os dois. Enquanto alguns estudos mostram uma associação de fibrose hepática avançada na HCC com altos níveis de HDL [141], outros não demonstram qualquer tipo de correlação [142].

Recentemente, a inter-relação entre o VHC e o metabolismo lipídico do hospedeiro tem sido demonstrada em alguns estudos [86]. O ciclo de vida deste agente viral apresenta estreito vínculo com o metabolismo lipídico humano. O VHC é capaz de alterar a homeostase lipídica ao mesmo tempo em que se utiliza desse processo para perpetuar sua existência no organismo do hospedeiro. Indivíduos cronicamente infectados por esse vírus apresentam um perfil lipídico alterado, expresso por baixos níveis de colesterol total (CT), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TGL) quando comparados a controles não infectados [87,88]. A gravidade dessas alterações está associada não só a progressão da doença hepática, mas também a fatores tanto do hospedeiro quanto viral. Exemplo disso é a relação do polimorfismo no gene CC rs12979860 (IFNL3) com maiores níveis séricos de CT e LDL em pacientes infectados pelo genótipo 1 do VHC [111].

Uma vez dentro da célula, o vírus altera o metabolismo lipídico intracelular, diminuindo o catabolismo dos lípidos bem como a secreção das lipoproteínas ao meio extra-celular. Como resultado, provoca um acúmulo significativo de lípidos dentro dos hepatócitos levando ao desenvolvimento da esteatose hepática. Esta é uma alteração classicamente associada HCC. Estudos tem demonstrado que a infecção pelo genótipo 3 do VHC relaciona-se a graus mais acentuados de esteatose no fígado bem como a uma redução mais pronunciada nos níveis séricos de colesterol quando comparada a infecção por outros genótipos [112-114]. Entretanto, fatores relacionados ao hospedeiro são capazes de influenciar essas alterações no parênquima hepático. Variações genéticas como o polimorfismo do gene interleucina 28B (IL28B) relaciona-se a esteatose mais branda, níveis séricos mais elevados de LDL e melhores taxas de resposta viral sustentada (RVS) em indivíduos que receberam terapia anti-viral [115-117]. Além do elemento

genético, outros fatores relacionados ao acúmulo de lipídeos nos hepatócitos são a resistência insulínica ou *diabetes mellitus* (DM), o consumo de álcool e a síndrome metabólica (SM) [118-120].

O vírus é secretado pelo hepatócito e transportado na circulação sistêmica ligado a lipoproteínas, as chamadas partículas lipovirais. Estas se utilizam de receptores de membrana plasmática, alguns relacionados ao metabolismo lipídico, no processo de internalização do agente dentro do hepatócito. Pesquisas recentes tem dado enfoque ao *scavenger receptor class B member 1* (SR-B1), uma glicoproteína transmembrana localizado na superfície celular dos hepatócitos e em tecidos esteroideogênicos, cuja função biológica principal é a absorção de ésteres de colesterol após sua ligação com lipoproteínas de alta densidade (HDL). Entretanto, o SR-B1 apresenta uma importante interação com o VHC, sendo um dos receptores implicados no processo de entrada do vírus no hepatócito. O processo no qual a partícula viral se adere ao receptor é complexo, envolvendo o reconhecimento da apolipoproteína E (apo E) e da proteína de superfície E2 (E2) do vírus pelo SR-B1, facilitando a entrada do agente infeccioso [96,97,101,102]. Voisset e cols (2005), utilizando-se de modelos com VHCpp, demonstraram que meios enriquecidos com HDL resultam em um aumento de até três vezes na capacidade de internalização das partículas virais, sugerindo que o HDL poderia funcionar como um facilitador neste processo [104]. Isso ocorreria sem haver um aumento nos níveis de expressão do SR-B1 ou uma interação direta entre o HDL e a VHCpp [104]. Em estudo subsequente, Voisset e cols (2006) não apenas expuseram resultados semelhantes ao anterior, como sugeriram que o HDL seria responsável por reduzir o efeito neutralizante do anticorpo anti-VHC [103]. Desta forma, o HDL poderia aumentar o poder de infectividade do VHC uma vez que ambos se ligam nos mesmos receptores de membrana plasmática sem, entretanto, competir por este local de ligação.

Nossos resultados demonstram associação de baixos níveis de HDL com a progressão da fibrose hepática. Poynard e cols (1986) [143] e Imbert-Bismut e cols (2001) [144] demonstraram que os níveis circulantes de apo-lipoproteína A1, a principal lipoproteína do HDL, diminuem com a progressão da fibrose na doença hepática alcoólica e na HCC, e diminuem ainda mais com o estabelecimento da cirrose. Um estudo de Fabris e cols (1997) [145] sugere que níveis séricos diminuídos de HDL em pacientes com HCC

precede o desenvolvimento de cirrose e correlaciona de forma inversa com os níveis séricos de interleucina 6. Em análise multivariada, Habib e cols. (2005) [146] mostraram que baixos níveis séricos de HDL tem valor preditivo, independente do escore MELD, de mortalidade entre 6-12 meses em pacientes com cirrose não colestatia. A diminuição da função hepática observada na cirrose ou em estados avançados de fibrose poderia ser uma explicação para diminuição dos níveis séricos de HDL, no entanto, no nosso estudo, somente 10 pacientes tinham diagnóstico de fibrose acentuada/cirrose. Além disso, a observação de que a cronicidade não é necessária para se observar as alterações nos níveis séricos de lipídeos [147] e que as mesmas tendem a se resolver após a cura da infecção [148, 149] fortalece a hipótese de um efeito citopático direto do VHC sobre o metabolismo lipídico do hospedeiro.

Estudos recentes têm atribuído ao HDL um papel de biomarcador em doenças inflamatórias crônicas, no entanto, os níveis de colesterol sérico podem não ser representativos de sua composição e atuação antiinflamatória [150]. O HDL quando associado a doenças inflamatórias crônicas (diabetes, obesidade, doenças reumáticas, doença renal crônica, doença inflamatória crônica e infecções crônicas) assume um papel pró-inflamatório e disfuncional, o que pode acontecer sem mudanças nos níveis séricos de HDL, o que pode atrapalhar a interpretação dos resultados [151] .

Enquanto a infecção crônica pelo VHC contribui para o desenvolvimento de complicações metabólicas, a presença de doenças concorrentes relacionadas ao metabolismo humano também contribuem para a progressão da doença hepática, com maior risco de CHC [121], menores taxas de RVS ao tratamento anti-viral [122] e progressão mais acelerada para fibrose do fígado entre pacientes com HCC [123-126]. A infecção crônica pelo vírus hepatotrópico C é capaz não apenas de interferir no metabolismo lipídico, mas também a homeostase da insulina no organismo humano. A associação deste vírus com a resistência insulínica (RI) e o *diabetes mellitus* (DM) tipo 2 é bem estabelecida. Estudos demonstram que portadores de HCC apresentam um risco mais elevado para o desenvolvimento de RI ou DM tipo 2 [74,75]. Ao mesmo tempo, foi observado que em grupos de paciente com o DM tipo 2 apresentavam maior prevalência da HCC quando comparados à população geral [127,128]. Dados da *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) entre 1988 a 1994

mostraram uma associação independente de RI e DM com a infecção pelo VHC na população norte-americana [64]. Entretanto, em dados posteriores da NHANES (1998-2008), essas associações deixaram de ser consideradas significativas. Esta relação pode ter sido alterada pelo crescimento de outros fatores de riscos para o DM, sendo o mais importante o rápido aumento da prevalência da obesidade [129]. Além disso, dentre aqueles que se submetem ao transplante hepático, a ocorrência de DM no período pós-transplante tem sido mais elevadas entre pacientes que se submetem a transplante devido ao VHC do que por outras etiologias [77,78]. Portanto, alterações no metabolismo de carboidratos também são comumente observados nos pacientes com HCC.

A resistência insulínica, em conjunto com outros elementos da síndrome metabólica (SM), como a obesidade e o DM tipo 2, tem um papel essencial na progressão da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). A esteatohepatite não-alcoólica (EHNA), um espectro da DHGNA, é considerada um grave e crescente problema de saúde pública mundial. Ela representa a manifestação hepática da SM, sendo uma importante causa de doença crônica no fígado, estando associada ao desenvolvimento de cirrose e CHC [63,69-71]. Não é raro observar a presença de elementos da SM em portadores crônicos do VHC, fazendo suscitar que a interposição desses elementos agressores possa acelerar a progressão da doença hepática em indivíduos cronicamente infectados pelo VHC. Desta forma, estudos têm sido realizados no intuito de se avaliar o sinergismo entre elementos como RI, DM e a obesidade e o VHC na progressão da doença hepática [63,72,73].

Utilizando o estágio de fibrose em biópsia hepática como marcador, vários estudos demonstraram que os pacientes com HCC e SM ou DM concomitantes apresentam uma progressão mais agressiva da doença. Entretanto, em nosso estudo, não conseguimos encontrar qualquer associação entre DM, IMC ou hipertensão arterial sistêmica (HAS) com estágios mais avançados de fibrose do fígado. Também não foi demonstrado associações entre essas condições metabólicas e as presenças de atividade necroinflamatória, atividade inflamatória intra-lobular e hepatite de interface. Kuo e cols. (2016) [152] demonstraram que a SM estava associada a uma maior rigidez hepática medida através da elastografia hepática transitória (FibroscanR) entre

indivíduos com HCC. Ziada e cols. (2012) [153] concluíram que a RI em pacientes com HCC está associada à fibrose progressiva do fígado e que poderia ser um preditor para a ausência de uma resposta virológica rápida e precoce em pacientes de origem egípcia. Patel e cols. (2011) [138] demonstraram resultados semelhantes entre pacientes de etnia asiática. Dyal e cols. (2015) [154], em uma revisão sistemática, demonstraram uma associação significativa entre esteatose e DM com fibrose avançada no fígado de pacientes com HCC, enquanto que a associação entre obesidade e fibrose avançada ficou limitada, com resultados conflitantes. Por fim, em uma meta-análise publicada recentemente e que incluiu 1461 pacientes *Rueger* e cols. (2016) [155] concluíram que a progressão acelerada para fibrose hepática na HCC é explicada principalmente por fatores não modificáveis, como idade, sexo e vias de infecção e não pelo consumo significativo de álcool, DM ou IMC.

A ligação entre a infecção pelo VHC com a RI e o DM é complexa. A RI surge em estádios precoces da HCC resultando em uma progressão mais acelerada para fibrose hepática com todas as suas complicações [156]. A hiperinsulinemia compensatória que ocorre na RI pode estimular a fibrogênese. A incubação de células estreladas hepáticas humanas (CEH), também conhecidas com células de Ito, com insulina e fator de crescimento insulínico tipo 1 (FCI-1) resultou em um aumento na proliferação de CEH e na expressão de genes que codificam a produção do colágeno tipo 1 [157, 158].

Algumas limitações devem ser consideradas ao interpretar esses resultados. O método ideal para avaliar o impacto de doenças metabólicas na progressão da história natural da HCC seria identificar pacientes com antecedentes de doenças metabólicas que posteriormente adquiriram infecção pelo VHC. No entanto, muitos desses estudos, incluindo o nosso, foram de natureza observacional e utilizaram um estudo de caso-controle ou estudo de coorte retrospectivo, o que intrinsecamente limita a capacidade de compreender a causalidade. Os estudos atuais apresentam uma heterogeneidade entre as populações estudadas, nas definições de obesidade e RI e, muitas vezes, não levam em conta medidas mais precisas de risco metabólico como a circunferência da cintura (CC) para avaliação da adiposidade visceral. Isso poderia ser especialmente importante para a avaliação das doenças metabólicas. Além disso, em nosso trabalho, foi estudada uma pequena população (n = 85), com apenas 23 pacientes com fibrose avançada/cirrose e

não havendo casos com atividade necroinflamatória acentuada, o que poderia influenciar nossos resultados.

Entender se a infecção crônica pelo VHC aumenta o risco de desenvolver complicações metabólicas merece especial atenção. No entanto, também é importante compreender o impacto das doenças metabólicas subjacentes na história natural da HCC. Reconhecer o impacto da obesidade, RI e perfil lipídico na progressão da HCC é especialmente importante, dada a crescente prevalência da obesidade e da SM em todo o mundo.

O futuro desafio na área de hepatologia, em uma era em que quase todos os casos de HCC são erradicáveis por eficientes agentes antivirais de ação direta, será determinar se as alterações metabólicas, e consequentes eventos cardiovasculares, associadas ao VHC são também completamente reversíveis ou se poderão agravar após a terapia antiviral com RVS adequada. Essas descobertas poderão proporcionar uma assistência personalizada, mais eficiente e com menor custo que inclui não somente a terapia antiviral mas também a abordagem de todas as comorbidades associadas com esta doença sistêmica que é a hepatite C crônica.

7. CONCLUSÃO

7.1 Não houve diferença entre o grupo controle e os portadores de hepatite C crônica apenas quanto a presença de histiócitos em todas as regiões do lóbulo hepático;

7.2 Os grupos com e sem fibrose avançada foram diferentes no que se refere à idade e aos níveis séricos de albumina, ALT, AST, γ -GT, bilirrubina total e tempo de protombina;

7.3 Os grupos com e sem atividade inflamatória foram diferentes com relação ao IMC, presença de DM, HAS, uso regular de álcool e níveis séricos de ALT, AST, bilirrubina total, HDL e TGI;

7.4 Os grupos com e sem HAS foram diferentes com relação a presença de atividade necroinflamatória, infiltrado inflamatório periportal com presença de neutrófilos e linfócitos;

7.5 Os grupos com e sem DM foram diferentes com relação a presença de linfócitos e histiócitos na região lobular;

7.6 Os grupos com e sem níveis séricos de colesterol ≥ 55 mg/dl foram diferentes com relação a presença de atividade necroinflamatória e presença de infiltrado inflamatório periportal e lobular;

7.7 A análise multivariada mostrou associação dos níveis de fibrose com a idade do paciente e níveis séricos de HDL < 55 mg/dl;

7.8 A análise multivariada mostrou associação da atividade necroinflamatória com a presença de HAS e níveis séricos de HDL < 55 mg/dl;

7.9 A análise multivariada mostrou associação da atividade necroinflamatória periportal com a presença de HAS e níveis séricos de HDL < 55 mg/dl;

7.10 A análise multivariada mostrou associação da atividade necroinflamatória lobular com a presença de níveis séricos de HDL < 55 mg/dl;

7.11 Houve associação entre os níveis séricos de HDL e grau de atividade inflamatória

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1- Reuben A. Landmarks in hepatology: the thin red line. *Hepatology* 2002; 36:770-773.
- 2- *Fonseca*, José Carlos Ferraz da. History of viral hepatitis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*;43(3):322-330, maio-jun.
- 3- Alter HJ. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. *J Hepatology* 2003; 39: 149-152.
- 4- Schmid R. Viral hepatitis: Some Historical Perspectives. *In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, editors. Viral Hepatitis and Liver Disease. 1994. p.1-7.*
- 5- Hollinger FB. The five viruses: a perspective. AASLD Postgraduate Course "Viral hepatitis A to F: An Update; 1994. p 2-20.
- 6- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich A. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965; 191: 541-546.
- 7- Blumberg BS, Gerystley BJS, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Int Med* 1967; 66: 924-931.
- 8- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of virus like antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182: 1026-1028.
- 9- Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, et al. Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system (Delta/anti-Delta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *GUT* 1977; 18: 997-1003.
- 10- Rizzetto M. Hepatitis Delta: The virus and disease. *J Hepatology* 1990; 11: 145-148.
- 11- Houghton M. Discovery of the hepatitis C. *Liver Intern* 2009; 29 (supl I): 82-88.
- 12- Choo QL, Kuo G, Weiner A, Wang KS, Overby L, Bradley D, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- 13- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 30: 1494-1500.
- 14- Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis.* 2000; 20:1-16.

- 15- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5:558-67.
- 16- Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci.* 2006; 3:41-6.
- 17- Yen T, Keeffe EB, Ahmed A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol.* 2003; 36:47-53.
- 18- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:2436-41.
- 19- Ferreira CT, Silveira TR. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol.* 2004; 7:473-87.
- 20- SBH. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. *GED.* 1999; 18:53-58.
- 21- Focaccia R, da Conceicao OJ, Sette H Jr, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, *et al.* Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *Braz J Infect Dis.* 1998; 2:269-84.
- 22- Focaccia R, da Conceicao OJ, Sette H Jr, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, *et al.* Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *Braz J Infect Dis.* 1998; 2:269-84.
- 23- Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. *MMWR Recomm Rep.* 1998; 47:1-39.
- 24- Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology.* 2002; 36:93-8.
- 25- Terrault N. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology.* 2002; 36:99-105.
- 26- Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2002; 36:106-13.
- 27- Puro V, Petrosillo N, Ippolito G. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of HIV and Other Bloodborne Infections. *Am J Infect Control.* 1995; 23:273-7.

- 28- Busch MP, Kleinman SH, Nemo GJ. Current and emerging infectious risks of blood transfusions. *JAMA*. 2003; 289:959-62.
- 29- Donahue JG, Munoz A, Ness PM, Brown DE Jr, Yawn DH, McAllister HA Jr, *et al.* The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 1992; 327:369-73.
- 30- Rosen HR, Gretch DR. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. *Molecular Medicine Today* 5:393-399, 1999.
- 31- Romanos, M. T. V.; Santos, N. S. O.; Wigg, M. D. Introdução à virologia humana, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.144.
- 32- Afdhal, N.H. The natural history of hepatitis C. *Sem Liver Dis*, v. 24(supl 2), p. 3-8, 2004.
- 33- Di Bisceglie, A.M. Natural history of hepatitis C: Its impact on clinical management. *Hepatology*, v. 31, p. 1014-1018, 2000.
- 34- Hoofnagle, J.H. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, v. 36 (supl 1), p. S21-S29, 2002.
- 35- Seef, L.B. Natural history of hepatitis C. *Hepatology*, v. 26(supl I), p. S21-S 28, 1997.
- 36- Agnello, V., De Rosa, F.G. Extra-hepatic disease manifestation of HCV. *J Hepatol*, v. 40, p. 341-352, 2004.
- 37- Hadziyannis, S.J. The spectrum of extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepatitis*, v. 4, p. 9-28, 1997.
- 38- Zignego, A., Bréchet, C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol*, v. 31, p. 369-376, 1999.
- 39- Poynard T, Bedossa P, Opolon P, for the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC Groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997;349:825–832.
- 40- Wiley TE, McCarthy M, Breidi L, McCarthy M, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology* 1998;28:805–809.
- 41- Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, Charlotte F, Azria F, Coutellier A, *et al.* Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus co-infected patients. The multivirc group. *Hepatology* 1999;30:1054–1058.
- 42- Bissell DM. Sex and hepatic fibrosis. *Hepatology* 1999;29:988–989.

- 43-Deuffic-Burban S, Poynard T, Valleron AJ. Quantification of fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C using a Markov model. *J Viral Hepat* 2002;9:114–122.
- 44-Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:730–739.
- 45-Pol S, Fontaine H, Carnot F, Zylberberg H, Berthelot P, Brechot C et al. Predictive factors for development of cirrhosis in parenterally acquired chronic hepatitis C: a comparison between immunocompetent and immunocompromised patients. *J Hepatol* 1998;29:12–19.
- 46-Soriano V, Sulkowski M, Bergin C, Hatzakis A, Cacoub P, Katlama C, et al. Care of patients with chronic hepatitis C and HIV co- infection: recommendations from the HIV–HCV International Panel. *AIDS* 2002;16:813–828.
- 47-Ratziu V, Munteanu M, Charlotte F, Bonyhay L, Poynard T, LIDO Study Group. Fibrogenic impact of high serum glucose in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003;39:1049–1055.
- 48-Schiff ER, Medina M, Kahn RS. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. *Seminars in Liver Diseases* 19:3-15, 1999.
- 49-Cretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: 43-47S.
- 50-Carithers Rl Jr, Marquardt A, Gretch DR. Diagnostic testing for hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 159-71.
- 51-Paulotsky J, Lonjon I, Hézode C et al. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998; 27: 1700-2.
- 52-Camacho R. Diagnóstico e monitorização laboratorial da infecção pelo vírus da hepatite C. *J Port Gastrenterol* 2000; 7: 101-4.
- 53-Sarmiento J. Tratamento da doença hepática por vírus da hepatite C (VHC). *Hepatite C. Biblioteca das Hepatites Víricas. Permanayer Portugal* 2001:33-38.
- 54-Davis G. Current therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2000; 118:S104-114.
- 55-Manns M. Hepatitis C: therapeutic options. *Viral hepatitis* 2002; 11(1): 15-17.
- 56-Davis GL, Esteban-Mur, Rustgi V et al. Interferon alfa 2b alone or in combination with ribavirina for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *International Hepatitis Interventional Therapy Group. N Eng J Med* 1998; 339:1493-1499.

- 57- Poynard T, Marcellin P, Lee SS et al. Randomised trial of interferon alpha 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha 2b for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *Lancet* 1998;352: 1426.
- 58- Glue P, Rouzier-Panis R, Raffanel C et al. A dose range study of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;32:647-653.
- 59- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e coinfeções-2015.
<http://www.aids.gov.br/publicacao/2015/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-c-e-coinfeccoes>.
- 60- Guia de recomendações para tratamento da hepatite C das Sociedades Brasileiras de Hepatologia e Infectologia 2015.
http://sbhepatologia.org.br/pdf/bjid_suplemento1-2016-web.pdf.
- 61- Jonsson JR, Barrie HD, O'Rourke P, Clouston AD, Powell EE. Obesity and Steatosis Influence Serum and Hepatic Inflammatory Markers in Chronic Hepatitis C. *Hepatology*, Vol. 48, No. 1, 2008.
- 62- Kita Y, Mizukoshi E, Takamura T, Sakurai M et al. Impact of diabetes mellitus on prognosis of patients infected with hepatitis C virus. *Metabolism Clinical and Experimental* 56 (2007) 1682–1688.
- 63- Younossi ZM, McCullough AJ. Metabolic syndrome, non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C virus: impact on disease progression and treatment response. *Liver International* 2009; 29 (s2): 3–12.
- 64- Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR et al. The Metabolic Syndrome: Prevalence and Associated Risk Factor Findings in the US Population From the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med.* 2003 February 24; 163(4): 427–436.
- 65- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287: 356–9.
- 66- Allison ME, Wreghitt T, Palmer CR, et al. Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. *J Hepatol* 1994;21:1135-9.
- 67- Mason AL, Lau JY, Hoang N, et al. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999;29:328-33.
- 68- Lecube A, Hernandez C, Genesca J, et al. High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care* 2004;27:1171-5.

- 69- Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol.*2010;5:145–171.
- 70- Fujii H, Kawada N. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *J Gastroenterol.* 2012;47:215–225.
- 71- Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10:330–344.
- 72- Chen W, Wong T, Tomlinson G, Krahn M, Heathcote EJ. Prevalence and predictors of obesity among individuals with positive hepatitis C antibody in a tertiary referral clinic. *Canadian Digestive Diseases Week, 29 February–3 March 2008, Montreal, abstract 246.*
- 73- Pandya PK, Shah P, Callahan P, et al. Metabolic syndrome in veterans with chronic HCV infection correlates with NAFLD activity score. *Gastroenterology* 2006; 130(Suppl. 2): A-284, abstract s1915.
- 74- Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med* 2000;133:592–599.
- 75- Grimbert S, Valensi P, Levy-Marchal C, Perret G, Richardet JP, Raffoux C, Trinchet JC, Beaugrand M. High prevalence of diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C: A case-control study. *Gastroenterol Clin Biol* 1996;20:544–548.
- 76- el-Zayadi AR, Selim OE, Hamdy H, Dabbous H, Ahdy A, Moniem SA. Association of chronic hepatitis C infection and diabetes mellitus. *Trop Gastroenterol* 1998;19:141–144.
- 77- Al Dosary AA, Ramji AS, Elliott TG, Sirrs SM, Thompson DM, Erb SR, Steinbrecher UP, Yoshida EM. Post-liver transplantation diabetes mellitus: an association with hepatitis C. *Liver Transpl* 2002;8:356–361.
- 78- Bigam DL, Pennington JJ, Carpentier A, Wanless IR, Hemming AW, Croxford R, Greig PD, Lilly LB, Heathcote JE, Levy GA, Cattral MS. Hepatitis C-related cirrhosis: a predictor of diabetes after liver transplantation. *Hepatology* 2000;32:87–90.
- 79- Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P *et al.* Insulin Resistance Is Associated With Chronic Hepatitis C and Virus Infection Fibrosis Progression. *Gastroenterology* 2003;125:1695–1704.
- 80- Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H *et al.* Insulin Resistance in Chronic Hepatitis C: Association With Genotypes 1 and 4, Serum HCV RNA Level, and Liver Fibrosis. *Gastroenterology* 2008;134:416–423.

- 81- Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, et al. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through upregulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol* 2004;165:1499-508.
- 82- Aytug S, Reich D, Sapiro LE, et al. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology* 2003;38:1384-92.
- 83- Sheikh MY, Choi J, Qadri I, et al. Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome. *Hepatology* 2008;47:2127-33.
- 84- Ortiz V, Berenguer M, Rayón JM, Carrasco D, Berenguer J. Contribution of Obesity to Hepatitis C-Related Fibrosis Progression. *Am J Gastroenterol* 2002;97: 2408-2414.
- 85- Kallwitz ER, Layden-Almer J, Dhamija M, Berkes J, Guzman G *et al.* Ethnicity and Body Mass Index Are Associated With Hepatitis C Presentation and Progression. *Clinical Gastroenterology And Hepatology* 2010;8:72-78.
- 86- Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel)* 2014; 3: 892-921.
- 87- Ghadir MR, Riahin AA, Havaspour A, Nooranipour M, Habibinejad AA. The relationship between lipid profile and severity of liver damage in cirrhotic patients. *Hepat. Mon.* 2010;10:285-8.
- 88- Hofer H, Bankl HC, Wrba F, Steindl-Munda P, Peck-Radosavljevic M, Osterreicher C, Mueller C, Gangl A, Ferenci P. Hepatocellular fat accumulation and low serum cholesterol in patients infected with HCV-3a. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2880-2885.
- 89- Popescu CI, Dubuisson J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol. Cell.* 2010;102:63-74.
- 90- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL, Infectious hepatitis C virus pseudoparticles containing functional E1-E2 envelope protein complexes, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 633-642.
- 91- Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA, Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100 (2003) 7271-7276.
- 92- Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J, Nagayama K, Tanaka T, Wakita T, Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient, *J. Med. Virol.* 64 (2001) 334-339.

- 93- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM, Complete replication of hepatitis C virus in cell culture, *Science* 309 (2005) 623-626.
- 94- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ, Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome, *Nat. Med.* 11 (2005) 791-796.
- 95- Haid S, Pietschmann T, Pécheur EI, Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 17657-17667.
- 96- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A, The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus, *EMBO J.* 21 (2002) 5017-5025.
- 97- Maillard P, Huby T, Andreo U, Moreau M, Chapman J, Budkowska A, The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins, *FASEB J.* 20 (2006) 735-737.
- 98- Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitelman J, Barbaras R, Graber P, Ghersa P, Smolarsky M, Funaro A, Malavasi F, Larrey D, Coste J, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P, The low density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus, *J. Hepatol.* 46 (2007) 411-419.
- 99- Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doffoel M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert TF, EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy, *Nat. Med.* 17 (2012) 589-595.
- 100- Sainz Jr.B, N. Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL, Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor, *Nat. Med.* 18 (2012) 281-285.
- 101- Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 2003; 278: 41624-41630.
- 102- Catanese MT, Graziani R, von Hahn T, Moreau M, Huby T, Paonessa G, Santini C, Luzzago A, Rice CM, Cortese R, Vitelli A, Nicosia A. High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor

efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *J Virol* 2007; 81: 8063-8071.

- 103- Voisset C, Beeck AO, Horellou P, Dreux M, Gustot T *et al.* High-density lipoproteins reduce the neutralizing effect of hepatitis C virus (HCV)-infected patient antibodies by promoting HCV entry. *Journal of General Virology* 2006; 87, 2577–2581.
- 104- Voisset C, Callens N, Blanchard E, Beeck AO, Dubuisson J, Vu-Dac N. High Density Lipoproteins Facilitate Hepatitis C Virus Entry through the Scavenger Receptor Class B Type I. 2005; Vol. 280, No. 9;7793–7799.
- 105- Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 2009; 29: 431-438.
- 106- Albecka A, Belouzard S, Op de Beeck A, Descamps V, Goueslain L, Bertrand-Michel J, Tercé F, Duverlie G, Rouillé Y, Dubuisson J. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 2012; 55: 998-1007.
- 107- Sainz B, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 2012; 18: 281-285.
- 108- Yu L. The structure and function of Niemann-Pick C1-like 1 protein. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 263-269.
- 109- Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004; 303: 1201-1204.
- 110- Temel RE, Tang W, Ma Y, Rudel LL, Willingham MC, Ioannou YA, Davies JP, Nilsson LM, Yu L. Hepatic Niemann- Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J Clin Invest* 2007; 117: 1968-1978.
- 111- Rojas Á, del Campo JA, Maraver M, Aparcero R, García-Valdecasas M, Diago M, Carmona I, Andrade RJ, Solà R, Romero-Gómez M. Hepatitis C virus infection alters lipid metabolism depending on IL28B polymorphism and viral genotype and modulates gene expression in vivo and in vitro. *J Viral Hepat* 2014; 21: 19-24.
- 112- Siagris D, Christofidou M, Theocharis GJ, Pagoni N, Papadimitriou C, Lekkou A, Thomopoulos K, Starakis I, Tsamandas AC, Labropoulou-Karatzas C. Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations. *J Viral Hepat* 2006; 13: 56-61.

- 113- Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Malé PJ, Mentha G, Spahr L, Zarski JP, Borisch B, Hadengue A, Negro F. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* 2000; 33: 106-115.
- 114- Abid K, Paziienza V, de Gottardi A, Rubbia-Brandt L, Conne B, Pugnale P, Rossi C, Mangia A, Negro F. An in vitro model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglycerides accumulation. *J Hepatol* 2005; 42: 744-751.
- 115- Tillmann HL, Patel K, Muir AJ, Guy CD, Li JH, Lao XQ, Thompson A, Clark PJ, Gardner SD, McHutchison JG, McCarthy JJ. Beneficial IL28B genotype associated with lower frequency of hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C. *JHepatol* 2011; 55: 1195-1200.
- 116- Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, Urban T, Afdhal NH, Jacobson IM, Esteban R, Poordad F, Lawitz EJ, McCone J, Shiffman ML, Galler GW, Lee WM, Reindollar R, King JW, Kwo PY, Ghalib RH, Freilich B, Nyberg LM, Zeuzem S, Poynard T, Vock DM, Pieper KS, Patel K, Tillmann HL, Noviello S, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Goldstein DB, McHutchison JG. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010; 139: 120-129.e18.
- 117- Asselah T, De Muynck S, Broët P, Masliah-Planchon J, Blanluet M, Bièche I, Lapalus M, Martinot-Peignoux M, Lada O, Estrabaud E, Zhang Q, El Ray A, Vidaud D, Ripault MP, Boyer N, Bedossa P, Valla D, Vidaud M, Marcellin P. IL28B polymorphism is associated with treatment response in patients with genotype 4 chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012; 56: 527-532.
- 118- Angulo, P. and Lindor, K.D. (2002): Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol. Hepatol.*, 17, Suppl., S186-190.
- 119- Angulo, P. (2002): Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.*, 346, 1221-1231.
- 120- Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology* 2002; 36:729–736.
- 121- Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K et al. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer* 2003; 97: 3036-3043.
- 122- Poynard T, Ratziu V, McHutchison J et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and Ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 75–85.

- 123- Cholet F, Noursbaum JB, Richecoeur M et al. Factors associated with liver steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28: 272–278.
- 124- Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV and visceral obesity. *Hepatology* 2001; 33: 1358–1364.
- 125- Rubbia-Brandt L, Fabris P, Paganin S et al. Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut* 2004; 53: 406–412.
- 126- FriedenberG F, Pungpapong S, Zaeri N, Braitman LE. The impact of diabetes and obesity on liver histology in patients with hepatitis C. *Diabetes Obes Metab* 2003; 5: 150-155.
- 127- Ozyilkan E, Erbas T, Simsek H, Telatar F, Kayhan B, Telatar H. Increased prevalence of hepatitis C virus antibodies in patients with diabetes mellitus. *J Intern Med* 1994;235:283–284.
- 128- Simo R, Hernandez C, Genesca J, Jardi R, Mesa J. High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 1996;19:998–1000.
- 129- Stepanova M, Lam B, Younossi Y, et al. Association of hepatitis C with insulin resistance and type 2 diabetes in US general population: the impact of the epidemic of obesity. *J Viral Hepat.* 2012;19:341–345.
- 130- Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014; 383 (9930):1749-61.
- 131- Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* 1964;1:1-85.
- 132- Shaheen AA, Myers RP. Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review. *Hepatology* 2007;46(3):912-21.
- 133- Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994; 20: 15–20.
- 134- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2013;34(28):2159-219.
- 135- Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014;37 Suppl 1:S81-90.

- 136- Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC Jr, Watson K, Wilson PW; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Jul 1;63(25 Pt B):2889-934. doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.002. Erratum in: *J Am Coll Cardiol.* 2015 Dec 22;66(24):2812. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Jul 1;63(25 Pt B):3024-3025. PubMed PMID: 24239923.
- 137- Mahdy Ali K, Wonnerth A, Huber K, Wojta J. Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL-C cholesterol--current therapies and future opportunities. *Br J Pharmacol.* 2012;167(6):1177-94.
- 138- Patel K, Thompson AJ, Chuang WL, Lee CM, Peng CY, Shanmuganathan G, Thongsawat S, Tanwandee T, Mahachai V, Pramoolsinsap C, Cho M, Han KH, Shah SR, Foster GR, Clark PJ, Pulkstenis E, Subramanian GM, McHutchison JG. Insulin resistance is independently associated with significant hepatic fibrosis in Asian chronic hepatitis C genotype 2 or 3 patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26 (2011) 1182–1188.
- 139- Dai CY, Chuang WL, Ho CK, Hsieh MY, Huang JF, Lee LP, Hou NJ, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Tsai JF, Chang WY, Yu ML. Associations between hepatitis C viremia and low serum triglyceride and cholesterol levels: A community-based study *Journal of Hepatology* 2008;49:9–16.
- 140- Petit JM, Benichou M, Duvillard L, Jooste V, Bour JB, Minello A, Verges B, Brun JM, Gambert P, Hillon P. Hepatitis C Virus–Associated Hypobetalipoproteinemia Is Correlated With Plasma Viral Load, Steatosis, and Liver Fibrosis. *The American Journal of Gastroenterology* 2003;98(5):1150-1154.
- 141- Nagano T, Seki N, Tomita Y, Sugita T, Aida Y, Itagaki M, Sutoh S, Abe H, Tsubota A, Aizawa Y. Impact of Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1b Infection on Triglyceride Concentration in Serum Lipoprotein Fractions. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16:20576-20594.
- 142- Siagris D, Christofidou M, Theocharis GJ, Pagoni N, Papadimitriou C, Lekkou A, Thomopoulos K, Starakis I, Tsamandas AC, Labropoulou-Karatza C. Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations. *Journal of Viral Hepatitis* 2006; 13:56–61.
- 143- Poynard T, Abella A, Pignon JP, et al. Apolipoprotein AI and alcoholic liver disease. *Hepatology* 1986;6:1391–1395.

- 144- Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069–1075.
- 145- Fabris C, Federico E, Soardo G, et al. Blood lipids of patients with chronic hepatitis: differences related to viral etiology. *Clin Chim Acta* 1997;261:159–165.
- 146- Habib A, Mihas AA, Abou-Assi SG, Williams LM, Gavis E, Pandak WM, Heuman DM. High-Density Lipoprotein Cholesterol as an Indicator of Liver Function and Prognosis in Noncholestatic Cirrhotics. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2005;3:286–291.
- 147- Corey KE, Mendez-Navarro J, Barlow LL, Patwardhan V, Zheng H, Kim AY, Lauer GM, Chung RT. Acute hepatitis C infection lowers serum lipid levels. *J Viral Hepat.* 2011; 18(7): e366–e371.
- 148- Harrison SA, Rossaro L, Hu KQ, Patel K, Tillmann H, Dhaliwal S,² Torres DM, Koury K, Goteti VS, Noviello S, Brass CA, Albrecht JK, McHutchison JG, Sulkowski MS. Serum Cholesterol and Statin Use Predict Virological Response to Peginterferon and Ribavirin Therapy. *Hepatology* 2010;52(3):864-874.
- 149- Schaefer EA, Chung RT. HCV and host lipids: an intimate connection. *Semin Liver Dis.* 2013 Nov;33(4):358-68. doi: 10.1055/s-0033-1358524. Review. PubMed PMID: 24222093.
- 150- Benjamin J. Ansell, MD*; Mohamad Navab, PhD*; Susan Hama, BSc; Naeimeh Kamranpour, MSc; Gregg Fonarow, MD; Greg Hough, MSc; Shirin Rahmani, MD; Rachel Mottahedeh, Ravi BS; Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, Rahmani S, Mottahedeh R, Dave R, Reddy ST, Fogelman AM. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 2003;108:2751–2756.
- 151- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST,¹ Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL as a Biomarker, Potential Therapeutic Target, and Therapy. *Diabetes* 2009;58:2711-2717.
- 152- Kuo YH, Tsai MC, Lu SN, et al. Associated Factors for Metabolic Syndrome in the Older Adults with Chronic Virus Hepatitis in the Community. *PLoS ONE* 2016;11(5):e0155544.
- 153- Ziada DH, El Saadany S, Enaba M, Ghazy M, Hasan A. The interaction among insulin resistance, liver fibrosis and early virological response in Egyptian patients with chronic hepatitis C *Can J Gastroenterol* 2012;26(6):325-329.

- 154- Dyal HK, Aguilar M, Bhuket T, Liu B, Holt EW, Torres S, Cheung R, Wong RJ. Concurrent Obesity, Diabetes, and Steatosis Increase Risk of Advanced Fibrosis Among HCV Patients: A Systematic Review. *Dig Dis Sci* (2015) 60:2813–2824.
- 155- Rüeger S, Bochud PY, Dufour JF, Müllhaupt B, Semela D, Heim MH, Moradpour D, Cerny A, Malinverni R, Booth DR, Suppiah V, George J, Argiro L, Halfon P, Bourlière M, Talal A H, Jacobson IM, Patin E, Nalpas B, Poynard T, Pol S, Abel L, Kutalik Z, Negro F. Impact of common risk factors of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 2015;64:1605–1615.
- 156- Knobler H and Malnick S. Hepatitis C and insulin action: An intimate relationship. *World Journal of Hepatology* 2016; 8(2):131-138.
- 157- Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A *et al.* Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* 1999; 29: 1743–51.
- 158- Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, et al. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: A potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001;34:738-44.
- 159- Catanese MT, Dorner M. Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo. *Virology* 479-480(2015)221–233.
- 160- Pécheur EI. Lipoprotein Receptors and Lipid Enzymes in Hepatitis C Virus Entry and Early Steps of Infection. *Scientifica* 2012.
- 161- Brett D, Lindenbach BD, Charles M, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *NATURE*. 2013 Vol. 11.
- 162- Eslam M, Khattab MA, Harrison SA. Insulin resistance and hepatitis C: an evolving story. *Gut* 2011;60:1139-1151.

9. ANEXO

9.1 ARTIGO (EM FASE DE ELABORAÇÃO)

High Density Lipoprotein Cholesterol in chronic hepatitis C: inverse association with necroinflammatory activity

Gustavo Henrique De Puy Souza¹

Luciana Diniz Silva^{2,3}

Rodrigo Tadeu De Puy e Souza¹

Diego Alves Vieira³

Tatiana Bering³

Gifone Aguiar Rocha⁴

Dulciene Maria de Magalhães Queiroz⁴

Rosangela Teixeira^{2,3}

Agnaldo Soares Lima⁵

Paula Vieira Teixeira Vidigal^{1,*}

Authors' affiliations:

¹Department of Pathology and Legal Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, zip code 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Department of Internal Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, zip code 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³Outpatient Clinic of Viral Hepatitis, Instituto Alfa de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, zip code 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴Laboratory of Research in Bacteriology, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, zip code 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁵Serviço de Transplante, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, zip code 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Corresponding author:

Corresponding author

Paula Vieira Teixeira Vidigal*

Postal address: Av Alfredo Balena 190 - sala 301 / zip code 30130-100 - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Telephone: +55 31 3409-9755, Mobile phone: +55 31 8471-6006.

E-mail: pvidigal@medicina.ufmg.br or paula.vidigal@gmail.com.

ABSTRACT

HCV is a relevant cause of chronic hepatitis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma and is the leading cause of liver transplant worldwide. Additionally, several extrahepatic manifestations are also reported in chronic hepatitis C (CHC) subjects. Several evidences have been demonstrated that HCV infection is associated with dyslipidaemia and there is a strong interaction between the virus HCV life cycle and intracellular lipids metabolism.

In this study, we hypothesized that host factors including clinical comorbidities and lifestyle would have an influence on liver histopathological features.

In this cross-sectional study conducted at the Viral Hepatitis Outpatient Clinics University Hospital, we reviewed liver biopsy of 85 patients to classify each one based on the METAVIR criteria and to evaluate the presence of inflammatory cells types, quantities and lobular distribution. These histopathological features were correlated clinical comorbidities such as *diabetes mellitus* (DM), hypertension (HTN) and lipid profile in patients with CHC.

Histological findings in the liver specimens of CHC patients with and without HDL cholesterol ≥ 55 mg/dl were compared. Among the histological variables tested during univariate analysis, liver necrosis, periportal inflammatory infiltrate, periportal lymphocytes and lobular inflammatory infiltrate were found to be associated with HDL cholesterol < 55 mg/dl in CHC patients. Overweight, DM, HTN were associated with hepatic necroinflammatory activity. Increased levels of ALT, AST, bilirubin, triglycerides and decreased levels of HDL cholesterol were associated to hepatic necroinflammatory activity as well.

In multivariate analysis HDL cholesterol serum levels had an inverse association with fibrosis stage (OR 0,96, IC 0,93-0,99, $p=0,04$) and the presence of necroinflammatory activity (OR 0,95, IC 0,92-0,99, $p=0,007$). The correlation remains when comparing with the degree of hepatic necroinflammatory activity ($p=0.007$).

Recent studies are suggesting HDL to be a biomarker of inflammatory conditions, however measuring HDL cholesterol levels may not accurately predict the composition, functionality, and anti-inflammatory properties of HDL. In our study high serum levels

of HDL cholesterol had a protective effect in HCC outcome. Further studies are necessary to better understand this relationship.

Key words: hepatitis c virus, chronic hepatitis C, *diabetes mellitus*, hypertension, HDL, fibrosis stage, necroinflammatory activity

INTRODUCTION

According to the Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors hepatitis C virus (HCV) affects over 184 million people.¹ HCV is a relevant cause of chronic hepatitis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma and the leading cause of liver transplant worldwide.² In addition, HCV has been associated with extrahepatic disorders including insulin resistance (IR), diabetes mellitus type 2 (T2DM), obesity, dyslipidaemia and metabolic syndrome (MS).³

Regarding the liver as a central organ in lipid metabolism⁶, there have been several evidences demonstrating that HCV infection is associated with dyslipidaemia.⁷ Several studies focusing the HCV life cycle, have shown a strong interaction between the virus and intracellular lipids pointing to an interaction between host lipids and viral replication.⁷⁻⁹ Otherwise, in patients with CHC, cirrhosis was associated with atherosclerosis independently of cardiovascular risk factors.⁹ Furthermore, abnormalities in lipid metabolism and subsequent hepatic steatosis are reported to be a risk factor for progression of liver fibrosis in these patients.¹⁰

Subjects with T2DM have at least a 2-fold greater risk of HCV infection¹¹ whereas, individuals with CHC have elevated risk of T2DM.¹² Recently, in a meta-analysis of published studies, individuals chronically infected by HCV were found to be at increased risk for cardiovascular disease-related morbidity and mortality, especially patients with diabetes and hypertension (HTN).¹³

In the management of CHC patients, it is essential to assess the degree of liver fibrosis, which will determine disease progression, clinical outcomes and urgency of antiviral treatment.¹⁴ The evaluation of both grade and stage, i.e., necroinflammatory activity and the degree of fibrosis, are relevant in therapeutic decision-making.¹⁵ Several histological changes mark the progression of chronic hepatitis C infection to liver cirrhosis. Among them, inflammatory infiltrate, periportal and lobular necrosis degree, lobular degeneration and fibrosis are strongly associated with prognosis and, altogether these histological parameters have been assessed by METAVIR scoring system.¹⁶

In this study, we hypothesized that host factors including clinical comorbidities and lifestyle data would have an influence on liver histopathological features.

Therefore, we aimed to evaluate the association of hepatic histological findings as inflammatory cells types, quantities and zonal distribution with T2DM, HTN and lipid profile in patients with CHC. We also investigated the association between demographic, nutritional, biochemical and virological variables with liver histologic features of the patients with CHC.

PATIENTS AND METHODS

Study population and design

This is a cross-sectional study conducted at the Viral Hepatitis Outpatient Clinics, University Hospital, Belo Horizonte, Brazil from March 2013 to December 2016. A total of 115 consecutive adults outpatients who agreed to participate signed the informed consent form and were selected to participate in the study. The diagnosis of hepatitis C was performed by the presence of serum antibodies to HCV and confirmed by HCV-RNA test.

Patients with CHC were screened for other hepatic diseases. The exclusion criteria were refusal to participate in the study ($n = 4$), pregnancy, hepatic encephalopathy, HBV (Hepatitis B virus)/HCV or HCV/HIV co-infection, current antiviral treatment and the presence of advanced disease (chronic kidney disease, heart failure, chronic pulmonary disease, neoplasia). Patients with clinical liver cirrhosis decompensation or hepatocellular carcinoma were excluded. Sixteen patients who were taking hypolipemiant drugs as statins or fibrates were also excluded ($n = 16$).

The diagnosis of cirrhosis was based on standard clinical, biochemical, radiological and histological parameters.¹⁷ The Child-Turcotte-Pugh¹⁸ and AST to platelet ratio index (APRI)¹⁹ scores were calculated for each participant based on medical data. The clinical and biochemical data were collected from medical records.

All patients had undergone percutaneous needle liver biopsy and we excluded six due to inadequate biopsies. To eliminate any confounding feature we also excluded patients whose biopsies have shown any features of non-alcoholic steatohepatitis

(NASH) such as ballooning and perisinusoidal fibrosis ($n = 3$). Eighty-five patients were included in the final analysis.

As a control group, we included liver donors [$n = 29$; 22 (75.9%) males; mean age, 36.8 ± 14.1] from the Liver Transplant Service of the University Hospital of the Federal University of Minas Gerais who died due to head injury, cerebral haemorrhage or cerebral infarction.

Histological features

Liver fragments were obtained from each patient by percutaneous route using a Menghini needle. The specimens were 10.0% formalin-fixed and paraffin-embedded. A 3 μm thick liver section was routinely stained with hematoxylin and eosin, Gomori's trichromic and Picrosirius red method and the slides were blindly examined by one trained pathologist (GHDPS).

Fibrosis was scored as follows according to METAVIR criteria¹⁶: F0, no fibrosis; F1, portal fibrous expansion; F2, portal fibrous widening with few septa; F3, bridging fibrosis with architectural distortion; and F4, liver cirrhosis. Based on the degree of lymphocyte infiltration and hepatocyte necrosis the level of inflammation was classified from A0 to A3.¹⁶ The degree of mononuclear and polymorfonuclear cells infiltration in portal, periportal, lobular and perivenular regions, were separately graded from 0 to 3 (0, absent; 1, mild; 2, moderate and 3 marked).

To control biopsy size, each biopsy length was measured with a hand ruler and the number of portal areas on one cross-section was counted.²⁰ Thus, to minimize sampling error, the quality of liver biopsies was considered inadequate for histological diagnosis and patient was excluded from analysis if the biopsy were fragmented or had < 6 portal tracts ($n=6$).

Laboratory parameters

Following an overnight fasting (12 to 14-hours) venous blood samples from peripheral vein were obtained from all participants. Antibody to HCV was investigated

by a commercial ELISA (AxSYM HCV, version 3.0; Abbott GmbH & Co., Wiesbaden, Germany) and HCV status was confirmed by a qualitative PCR for HCV RNA (AMPLICOR 2.0 assay Roche Diagnostics, Branchburg, NJ) according to the manufacturers' instructions. HCV genotyping and viral load were determined by using a commercial test (Cobas Taq Man HCV test V.2.0; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) and a line probe assay (VERSANT HCV genotyping assays; Bayer's Diagnostic Corporation, Tarrytown, NY), respectively. The assays were performed according to the manufacturers' recommendations. Viral load and HCV genotyping were accessible in 75 (88.2%) of the included patients.

Biochemical and haematological data

Following an overnight fasting (12 to 14-hours) venous blood samples from peripheral vein were obtained from all participants. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), gamma-glutamyltranspeptidase (γ -GT), alkaline phosphatase (ALP), albumin, total bilirubin, prothrombin activity (PA), creatinine, glycaemia, triglycerides (TGL), total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were evaluated by routine laboratory methods. Non HDL-C cholesterol was evaluated Very low-density lipoprotein (VLDL-C) and low-density lipoprotein (LDL-C) were calculated by using Friedwald's formulae.

Lifestyle assessment

The lifestyle assessment evaluated current and previous history of smoking and/or alcohol use (<20 g/day vs. \geq 20 g/day).

Clinical Comorbidities

HTN was diagnosed according to the 2013 European Society of Hypertension and of the European Society of Cardiology Guidelines²¹, and diabetes mellitus (DM) was defined using the 2014, American Diabetes Association Guidelines diagnosis and classification of DM.²² Dyslipidaemia was diagnosed according to the 2013 American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA) guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the ACC/AHA.²³

Anthropometry Assessment

The weight and height were measured with a mechanical platform scale (FILIZOLA[®]). The body mass index (BMI) was calculated using the formula, BMI = weight/height².

Ethical Statement

The study was designed and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of our Institution (Number: ETIC-0404.0.203.000-10).

Statistical Analysis

Data were analysed with SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) statistical software package version 17.0. Descriptive statistics were used to provide information regarding the demographic, clinical, lifestyle, nutritional, and biochemical data. The Shapiro-Wilk test was used to evaluate whether the data were normally distributed. For the comparison of the percentages the asymptotic Pearson's Chi-square test and Fisher's

exact test were used. For comparisons of medians, the Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis and, for means, the Student's t test or ANOVA were used.

Associations between histological features [Model 1, Fibrosis (F0 - F2 versus F3 - F4); Model 2, hepatic necroinflammatory activity; Model 3, interface hepatitis; Model 4, lobular necrosis] and the following variables: demographic (gender, age), clinical comorbidities (HTN, DM), lifestyle data [alcohol use (<20 g/day vs. \geq 20 g/day)] and biochemical data [HDL-C (<55 mg/dl vs. \geq 55 mg/dl) and triglycerides (<150 mg/dl vs. \geq 150 mg/dl)] were evaluated by univariate analysis. All variables with p values <0.25 were included in the full models of logistic regression. Odds ratio (OR) and 95%CI were used as an estimate of the risk. The Hosmer-Lemeshow test was used to assess the adequacy of the models. Variables that had more than missing data >10% were not selected for the multivariate analysis models.

The strength of association between HDL-C serum levels, triglycerides/HDL-C ratio (TGL/HDL-C) and hepatic necroinflammatory activity and the direction of the relationship were analysed by Spearman's correlation.

The level of significance was set at p values \leq 0.05.

Results

Characteristics of the patients

The mean age of the patients was 57.2 ± 10.7 years and 40/85 (47.1%) were men. Among them, 10 (11.8%) were diagnosed with liver cirrhosis [Child-Turcotte-Pugh score, (A5): 5 (50.0%), (A6): 3 (30.0%) and (B7) 2 (20.0%), APRI score (mean \pm SD): 2.6 ± 1.5]. The characteristics of CHC patients are summarized in Table 1.

Patients with advanced fibrosis (Metavir score, F3 or F4) were older than patients with fibrosis stage F0 - F2 (Table 1). Regarding biochemical and haematological data, patients with advanced fibrosis are more likely than patients with fibrosis stage F0 - F2 to have higher prothrombin time, increased levels of ALT, AST, γ -GT and bilirubin and decreased levels of albumin (Table 1).

Overweight, DM and HTN were associated with hepatic necroinflammatory activity (Table 2). Increased levels of ALT, AST, bilirubin, triglycerides and decreased levels of HDL-C were also associated with liver inflammation and necrosis (Table 2).

Histological findings in the liver specimens of control group and patients with chronic hepatitis C

Histological findings in the liver specimens of patients with CHC were compared with those of the control group. Of the histological variables analysed, histiocytes in all liver zones and neutrophils in lobular and perivenular zones were not found to be associated with HCV chronic infection (**Table 1S; see supplementary material**).

Histological findings in the liver specimens of patients chronically infected by HCV with and without hypertension

In the univariate analysis, the presence of necroinflammatory activity, periportal inflammatory infiltrate, periportal neutrophils and periportal lymphocytes were associated with HTN in CHC patients (Table 2S; see supplementary material).

Histological findings in the liver specimens of patients chronically infected by HCV with and without diabetes mellitus

In the univariate analysis, lobular lymphocytes and lobular histiocytes were associated with DM in CHC patients (**Table 3S; see supplementary material**).

Histological findings in the liver specimens of patients chronically infected by HCV with and without HDL-C cholesterol ≥ 55 mg/dl

It is well defined that HDL-C levels ≥ 60 mg/dl or 1.55 mmol/l and < 40 mg/dl or 1.03 mmol/l are associated with decreased and increased risk of cardiovascular diseases (CVD), respectively.²⁵ Thus, because the median and range (25th - 75th percentile) of HDL-C in the population of this study were 52.5 (50.0 and 64.3), we stratified the HDL-C in < 55 mg/dl and ≥ 55 mg/dl to evaluate associations with histological findings.

Because recently, non-HDL-C was shown to be a better predictor of CVD death than LDL-C, even in patients with triglyceride levels below 200 mg/dl, we included non-HDL-C values instead of LDL-C in the statistical analyses. In the univariate analysis, liver necrosis, periportal inflammatory infiltrate, periportal lymphocytes and lobular inflammatory infiltrate were found to be associated with HDL-C < 55 mg/dl in CHC patients (**Table 3**).

The TGL/HDL-C ratio was positively correlated with both hepatic necroinflammatory ($r = 0.30$, $p = 0.005$) and lobular inflammatory activity ($r = 0.29$, $p = 0.009$).

Factors associated with histological findings in the liver specimens in patients with chronic hepatitis C

In the univariate analysis, age, HTN, TGL and HDL-C < 55 mg/dl were selected. Age and HDL-C < 55 mg/dl remained associated with fibrosis (F0 - F2 vs. F3 - F4) in the multivariate analysis (Model 1) (**Table 4**).

In the univariate analysis, BMI, HTN, T2DM, TGL and HDL-C (< 55 mg/dl) were selected. HTN and HDL-C < 55 mg/dl remained associated with the presence of hepatic necroinflammatory activity in the multivariate analysis (Model 2) (**Table 4**).

In the univariate analysis, age, BMI, HTN, T2DM and HDL-C (< 55 mg/dl) were selected. HTN and HDL-C < 55 mg/dl remained associated with interface inflammatory activity in the multivariate analysis (Model 3) (**Table 4**).

In the univariate analysis, T2DM, TGL and HDL-C were selected. HDL-C (< 55 mg/dl) remained associated with lobular inflammatory activity in the multivariate analysis (Model 4) (**Table 4**).

3.7. Clinical comorbidities, High Density Lipoprotein Cholesterol, HCV viral load and HCV genotype

Neither viral load nor HCV genotype was associated with HTN, T2DM, TGL >150 mg/dl, HDL-C <55 mg/dl and TGL/HDL-C ratio.

3.8 Correlation between the degree of hepatic necroinflammatory activity and High Density Lipoprotein Cholesterol levels

CHC patients with lower HDL-C cholesterol serum levels had higher degree of hepatic necroinflammatory activity than those with lower HDL-C cholesterol levels, **(Figure 3)**.

Discussion

In this study, we showed that lower HDL-C level is associated hepatic necroinflammatory activity in the liver specimens in CHC patients. HDL-C level was also inversely correlated with the degree of hepatic necroinflammatory activity.

Our data point to the relevance of HCV-host interactions determining the hepatitis C outcome. Several lines of evidence have demonstrated that the virus is strongly associated with the metabolism of lipids and lipoproteins.²⁶ During HCV life cycle, the virus utilizes the host lipid metabolism and is secreted from the liver as highly infective lipoviral particles (LVPs).^{27,28} Otherwise, the role played by the host's concurrent metabolic diseases also contributes to the hepatic disease progression.²⁹ In a previous study, it was demonstrated that patients infected with HCV genotype 1, the quantity of plasma HCV-LVPs correlated with plasma TGL/HDL-C ratio, HOMA-IR, and non-response to IFN-based antiviral therapy.³⁰ In the current study, TGL/HDL-C was positively correlated with both hepatic necroinflammatory and lobular inflammatory activity. These results highlight the influence of lipid and glucose metabolism on the maintenance of circulating HCV-LVPs. However, data about the

association between lipid metabolism and CHC are complex and not completely understood.

It has been known that the liver play a crucial role in lipid metabolism, thus alterations of hepatic function are linked to modifications of circulating lipids.³¹ The majority of the studies, that evaluated the HDL-C levels in patients with advanced liver disease, demonstrated an inverse association between this lipid molecule and several adverse outcomes in cirrhotic subjects as survival^{32,33} and poor short-term prognosis^{34,35}. Furthermore, in a study developed in Italy, evaluating serum cholesterol, HDL-C, TGL and liver function in 114 patients chronically infected by HCV, interestingly, decreased HDL-C levels were found in these subjects prior to the onset of cirrhosis.³⁶ Additionally, HDL-C levels were inversely correlated with serum concentrations of interleukin-6 (IL-6).³⁶ Based on these findings, we hypothesized that, in the setting of liver disease, lipid profile might influence the host's immune response (especially cytokine-related effects) as well as inflammatory mediators, probably, may interfere in the liver secretion of emergent HDL-C.

In our study, low HDL-C levels were associated increased periportal and lobular inflammatory infiltrate with predominance of lymphocytes. Beyond the liver, high IL-6 plasma levels were associated with low HDL-C in relevant community dwelling older Italian subjects cohort ($n = 1044$).³⁷ In this population, the prevalence of diabetes mellitus and previous transient ischemic attack (TIA)/stroke was higher in the low HDL-C compared to the normal HDL-C group, while no differences emerged in the prevalence of coronary heart disease, hypertension, and chronic liver diseases.

As previously described the HCV is one of the major causes of cirrhosis and CHC², and it's also closely associated with metabolism of lipids and lipoproteins²⁶, however the role played by the host factors in the progression of CHC should not be disregarded. Currently, it is expected that more than 95.0% of patients with CHC can be "cured" within 12 to 24 weeks of therapy based on direct-acting antivirals (DAAs).³⁸ The development of DAAs for the treatment of CHC represents a remarkable step in the clinical approach of patients chronically infected with HCV. Despite these, a recently study demonstrated that DAAs-induced clearance does not completely restore the altered cytokine and chemokine milieu in CHC patients.³⁹ This data point toward the importance to control other potential and modifiable factors implicated in hepatitis C

progression as glycaemia, lipid profile and weight, i. e., host- and disease-specific factors that affect the progression of liver and liver-related diseases.

In the current study, low HDL-C was associated with liver fibrosis. Similarly, prior studies demonstrated that serum cholesterol level, specifically HDL-C, diminishes among cirrhotic patients. Habib *et al.* (2005) showed that HDL-C in noncholestatic cirrhotic subjects can be an indicator of liver function and prognosis.³¹ In our study, HDL-C was not correlated with albumin, total bilirubin, PA and AST/ALT ratio. These results should be attributed to our small data set with the inclusion of only 10 patients with advanced liver disease.

Despite our results did not demonstrate association between lipid molecules and HCV viral load and genotype, several investigations have been demonstrated a strict connection among the HCV infection and the metabolism of HDL-C.^{40,41} These data indicate the involvement of HDL in HCV entry in the hepatocytes. This process was mediated by the formation of a complex including a lipoprotein receptor recognized as scavenger receptor class B type I (SR-BI), HDL-C and HCV envelope glycoproteins complex.^{40,41} In conclusion, the ability of SR-BI to interact with HDL might be significant for the support or even strengthening of HCV infection.

The limitations of our study should to be considered. The subjects included were recruited from a referral centre and consequently may not be representative of all patients with CHC. In addition, the cross-sectional nature of this investigation precluded the possibility to recognize any cause-effect relationship between serum HDL-C levels and hepatic histological findings in CHC patients.

In summary, the results of our study may influence clinical decision-making and contribute to the development of effective strategies to control potential and modifiable host factors implicated in the hepatic disease progression in individuals chronically infected with HCV.

Conclusion: Low serum HDL-C levels were inversely associated with hepatic necroinflammatory activity and fibrosis. Our results point to the importance of screening non-cholesterol and cholesterol molecules in patients with CHC, particularly prior the onset of cirrhosis.

Reference

1. Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A. D. & Wiersma, S. T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 57, 1333–1342 (2013).
2. Thrift AP, El-Serag HB, Kanwal F. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Feb;14(2):122-132. doi: 10.1038/nrgastro.2016.176. Review. PubMed PMID: 27924080.
3. Younossi Z, Park H, Henry L, Adeyemi A, Stepanova M. Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. *Gastroenterology*. 2016 Jun;150(7):1599-608. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.039. PubMed PMID: 26924097.
4. Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, Sobesky R, Martinot-Peignoux M, Maylin S, Nicolas-Chanoine MH, Paradis V, Vidaud M, Valla D, Bedossa P, Marcellin P. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 416-423 [PMID: 18164296 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.010].
5. Banks DE, Bogler Y, Bhuket T, Liu B, Wong RJ. Significant disparities in risks of diabetes mellitus and metabolic syndrome among chronic hepatitis C virus patients in the U.S. *Diabetes Metab Syndr*. 2016 Dec 13. pii: S1871-4021(16)30278-8. doi: 10.1016/j.dsx.2016.12.025. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27989517.
6. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2008 Jun;92(3):272-83. doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x. Review. PubMed PMID: 18477307.
7. Schaefer EA, Chung RT. HCV and host lipids: an intimate connection. *Semin Liver Dis*. 2013 Nov;33(4):358-68. doi: 10.1055/s-0033-1358524. Review. PubMed PMID: 24222093.

8. Marzouk D, Sass J, Bakr I, El Hosseiny M, Abdel-Hamid M, Rekacewicz C, Chaturvedi N, Mohamed MK, Fontanet A. Metabolic and cardiovascular risk profiles and hepatitis C virus infection in rural Egypt. *Gut* 2007; 56: 1105-1110 [PMID: 16956918].
9. Dai CY, Yeh ML, Huang CF, Hou CH, Hsieh MY, Huang JF, Lin IL, Lin ZY, Chen SC, Wang LY, Chuang WL, Yu ML, Tung HD. Chronic hepatitis C infection is associated with insulin resistance and lipid profiles. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; 30: 879-884 [PMID: 23808794 DOI: 10.1111/jgh.12313].
10. Haga Y, Kanda T, Sasaki R, Nakamura M, Nakamoto S, Yokosuka O. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatic cirrhosis: Comparison with viral hepatitis-associated steatosis. *World J Gastroenterol*. 2015 Dec 14;21(46):12989-95. doi: 10.3748/wjg.v21.i46.12989. Review. PubMed PMID: 26675364; PubMed Central PMCID: PMC4674717.
11. Hammerstad SS, Grock SF, Lee HJ, Hasham A, Sundaram N, Tomer Y. Diabetes and Hepatitis C: A Two-Way Association. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015 Sep 14;6:134. doi: 10.3389/fendo.2015.00134. Review. PubMed PMID: 26441826; PubMed Central PMCID: PMC4568414.
12. White DL, Ratziu V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* (2008) 49(5):831–44.10.1016/j.jhep.2008.08.006.
13. Petta S, Maida M, Macaluso FS, Barbara M, Licata A, Craxì A, Cammà C. Hepatitis C Virus Infection Is Associated With Increased Cardiovascular Mortality: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Gastroenterology*. 2016 Jan;150(1):145-155.e4; quiz e15-6. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.007. Review. PubMed PMID: 26386298.
14. Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, Jalluri C, Ramirez J. Diagnosis and Management of Hepatitis C. *Am Fam Physician*. 2015 Jun 15;91(12):835-42. Review. PubMed PMID:26131943.
15. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol*. 2007 Oct;47(4):598-607. Review. PubMed PMID: 17692984.

16. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994; **20**: 15–20.
17. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014; 383 (9930):1749-61.
18. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* 1964;1:1-85.
19. Shaheen AA, Myers RP. Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review. *Hepatology* 2007;46(3):912-21.
20. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, Mills PR, Keach JC, Lafferty HD, Stahler A, Haflidadottir S, Bendtsen F. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015 ; 149(2):389-97.e10.
21. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2013;34(28):2159-219.
22. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014;37 Suppl 1:S81-90.
23. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC Jr, Watson K, Wilson PW; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jul 1;63(25 Pt B):2889-934. doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.002. Erratum in: *J Am Coll Cardiol*. 2015 Dec

- 22;66(24):2812. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jul 1;63(25 Pt B):3024-3025. PubMed PMID: 24239923.
24. Navar-Boggan AM, Peterson ED, D'Agostino RB Sr, et al. Using age- and sex-specific risk thresholds to guide statin therapy: one size may not fit all. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65:1633.
25. Mahdy Ali K, Wonnerth A, Huber K, Wojta J. Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL-C cholesterol--current therapies and future opportunities. *Br J Pharmacol*. 2012; 167(6):1177-94. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02081.x. Review. PubMed PMID: 22725625; PubMed Central PMCID: PMC3504986.
26. Aizawa Y, Seki N, Nagano T, Abe H. Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. *World J Gastroenterol*. 2015 Sep 28;21(36):10299-313. doi: 10.3748/wjg.v21.i36.10299. Review. PubMed PMID: 26420957; PubMed Central PMCID: PMC4579877.
27. Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel)*. 2014 Dec 15;3(4):892-921. doi: 10.3390/biology3040892. Review. PubMed PMID: 25517881; PubMed Central PMCID: PMC4280516.
28. Bassendine MF, Sheridan DA, Bridge SH, Felmlee DJ, Neely RD. Lipids and HCV. *Semin Immunopathol*. 2013 Jan;35(1):87-100. doi: 10.1007/s00281-012-0356-2. Review. PubMed PMID: 23111699.
29. Dyal HK, Aguilar M, Bartos G, Holt EW, Bhuket T, Liu B, Cheung R, Wong RJ. Diabetes Mellitus Increases Risk of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C Virus Patients: A Systematic Review. *Dig Dis Sci* 2016; 61:636–645
30. Bridge SH, Sheridan DA, Felmlee DJ, Nielsen SU, Thomas HC, Taylor-Robinson SD, Neely RD, Toms GL, Bassendine MF. Insulin resistance and low-density apolipoprotein B-associated lipoviral particles in hepatitis C virus genotype 1 infection. *Gut*. 2011 May;60(5):680-7. doi: 10.1136/gut.2010.222133. PubMed PMID: 20940286.
31. Adil habib*,‡ anastasios a. Mihas*,‡ souheil g. Abou-assi*,‡ leslie m. Williams,‡edith gavis,‡ w. Michael pandak*,‡ and douglas m. Heuman*,‡

- High-Density Lipoprotein Cholesterol as an Indicator of Liver Function and Prognosis in Noncholestatic Cirrhotics *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2005;3:286–291.
32. . Milani A, Marra L, Siciliano M, et al. Prognostic significance of clinical and laboratory parameters in liver cirrhosis. A multivariate statistical approach. *Hepatogastroenterology* 1985;32:270–272.
33. D'Arienzo A, Manguso F, Scaglione G, et al. Prognostic value of progressive decrease in serum cholesterol in predicting survival in Child-Pugh C viral cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:1213–1218.
34. Llovet JM, Planas R, Morillas R, et al. Short-term prognosis of cirrhotics with spontaneous bacterial peritonitis: multivariate study. *Am J Gastroenterol* 1993; 88:388–392..
35. Zauner C, Schneeweiss B, Schneider B, et al. Short-term prognosis in critically ill patients with liver cirrhosis: an evaluation of a new scoring system. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:517–522.
36. Fabris C, Federico E, Soardo G, et al. Blood lipids of patients with chronic hepatitis: differences related to viral etiology. *Clin Chim Acta* 1997;261:159–165.
37. Zuliani G, Volpato S, Blè A, Bandinelli S, Corsi AM, Lauretani F, Paolisso G, Fellin R, Ferrucci L. High interleukin-6 plasma levels are associated with low HDL-C levels in community-dwelling older adults: the InChianti study. *Atherosclerosis*. 2007 Jun;192(2):384-90. PubMed PMID: 16787648; PubMed Central PMCID: PMC2645783.
38. Foster GR, Mangia A, Sulkowski M (2016) Sofosbuvir and Velpatasvir for Patients with HCV Infection. *N Engl J Med* 374, 1687-1688.
39. Hengst J, Falk CS, Schlaphoff V, Deterding K, Manns MP, Cornberg M, Wedemeyer H. Direct-Acting Antiviral-Induced Hepatitis C Virus Clearance Does Not Completely Restore the Altered Cytokine and Chemokine Milieu in Patients With Chronic Hepatitis C. *J Infect Dis*. 2016 Dec 15;214(12):1965-1974. PubMed PMID: 27683821.

40. High density lipoproteins facilitate hepatitis c virus entry through the scavenger receptor class b type I* Cécile Voisset, Nathalie Callens, Emmanuelle Blanchard, Anne Op De Beeck, Jean Dubuisson§ and Ngoc Vu-Dac§From the CNRS-UPR2511, Institut de Biologie de Lille & Institut Pasteur de Lille, Lille, France.
41. Meuleman P, Catanese MT, Verhoye L, Desombere I, Farhoudi A, Jones CT, Sheahan T, Grzyb K, Cortese R, Rice CM, et al. A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology*. 2012;55:364–372. [PMC free article] [PubMed].

Table 1. Demographic, clinical, life style, biochemical and virological data of patients with chronic hepatitis C ($n = 85$).

Variables	Fibrosis (F0 - F2)	Fibrosis (F3 - F4)	<i>p</i> value
Demographics			
Patients	62	23	
Sex			
Male n (%)	29 (46.8)	11 (47.8)	0.93
Female n (%)	33 (53.2)	12 (52.2)	
Age (years) ^a	55.5 ± 11.0	61.8 ± 8.9	0.02*
Body Mass Index (kg/m ²) ^a	26.4 ± 4.2	26.0 ± 2.9	0.68
Clinical Comorbidities n (%)			
DM	13 (21.0)	6 (26.1)	0.62
HTN	23 (37.1)	12 (52.2)	0.21
Life style data n (%)^c			
Current alcohol use (> 20g ethanol/day)	12/60 (20.0)	2/22 (9.1)	0.60
Past alcohol use	52/60 (86.7)	20/22 (90.9)	0.25
Biochemical and haematological data			
Albumin (g/dl) ^b	4.3 ± 0.4	3.9 ± 0.6	0.002*
ALT(U/l) ^b	46.0 (38.0 - 78.0)	79.5 (53.8 - 132.0)	0.006*
ALP (U/l) ^b	88.0 (70.8 - 126.5)	114.0 (81.8 - 176.0)	0.10
AST (U/l) ^b	43.0 (32.0 - 66.0)	78.5 (64.8 - 118.5)	< 0.0001*
γ-GT (U/l) ^b	57.0 (30.0 - 106.0)	84.5 (50.8 - 200.8)	0.03*
Glycaemia (mg/dl) ^b	91.0 (84.0 - 110.5)	91.5 (84.3 - 104.3)	0.90
Prothrombin time (seconds) ^b	14.1 (13.3 - 14.7)	15.8 (13.0 - 17.4)	0.01*
Total bilirubin (mg/dl) ^b	0.70 (0.50 - 0.85)	1.10 (0.60 - 1.79)	0.001*
Total cholesterol (mg/dl) ^{b,d}	175.0 (146.0 - 200.5)	156.0 (139.0 - 188.5)	0.14
LDL-C cholesterol (mg/dl) ^{b,d}	90.2 (65.3 - 121.0)	95.0 (82.5 - 105.3)	0.97
HDL-C cholesterol (mg/dl) ^{b,d}	55.0 (44.0 - 69.0)	48.0 (41.5 - 57.3)	0.23
Triglycerides (mg/dl) ^{b,d}	85.0 (69.0 - 142.5)	87.0 (70.0 - 115.5)	0.29
Virological parameters^e			
HCV-RNA log ₁₀ (IU/ml) ^b	5.9 (5.4 - 6.3)	5.7 (5.5 - 6.2)	0.67
Genotype 1 n (%)	42/53 (79.2)	20/22 (90.9)	0.32

a, mean ± standard deviation (SD); b, [Median and interquartile range (IQR), 25th - 75th percentile]; c, 82 patients with information on alcohol consumption; d, data from 78 subjects (91.8%); e, data from 75 subjects (88.2%); ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline Phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; DM, diabetes mellitus; HCV, hepatitis C virus; HTN, hypertension; γ-GT, gama-glutamyltransferase; RNA, Ribonucleic Acid; *, *p* values ≤ 0.05 were considered significant [the asymptotic Pearson's Chi-square test (categorical variables)]; Test T (mean ± SD) or Mann Whitney [Median and interquartile range (IQR, 25th - 75th percentile)].

Table 2. Demographic, clinical, life style, biochemical and virological data of patients with chronic hepatitis C ($n = 85$).

Variables	Without hepatic necroinflammatory activity	With hepatic necroinflammatory activity	<i>p</i> value
Demographics			
Patients	18	67	
Sex			
Male n (%)	9 (50.0)	31 (46.3)	0.78
Female n (%)	9 (50.0)	36 (53.7)	
Age (years) ^a	56.1 ± 8.6	57.5 ± 11.3	0.61
Body Mass Index (kg/m ²) ^a	24.5 ± 4.5	26.8 ± 3.6	0.02*
Clinical Comorbidities n (%)			
DM	1 (5.6)	18 (26.9)	0.05*
HTN	3 (16.7)	32 (47.8)	0.02*
Life style data n (%)^c			
Current alcohol use (> 20 g ethanol/day)	6 (33.3)	8 (12.5)	0.04*
Past alcohol use	17 (94.4)	55 (85.9)	0.33
Biochemical and haematological data			
Albumin (g/dl) ^b	4.4 (4.1 - 4.7)	4.3 (4.1 - 4.5)	0.15
ALT(U/l) ^b	44.0 (28.0 - 49.0)	69.0 (44.0 - 95.0)	< 0.001*
ALP (U/l) ^b	88.0 (65.5 - 172.0)	105.0 (73.0 - 142.0)	0.61
AST (U/l) ^b	36.0 (28.5 - 46.5)	65.0 (40.0 - 86.0)	< 0.001*
γ-GT (U/l) ^b	43 (23.1 - 129.5)	71.0 (38.0 - 125.0)	0.10
Glycaemia (mg/dl) ^b	89.0 (78.0 - 97.0)	91.0 (85.0 - 114.0)	0.07
Prothrombin time (seconds) ^b	14.1 (13.2 - 14.6)	14.2 (13.0 - 15.4)	0.51
Total bilirubin (mg/dl) ^b	0.60 (0.40 - 0.70)	0.79 (0.51 - 1.21)	0.009*
Total cholesterol (mg/dl) ^{b,d}	175.0 (146.5 - 187.5)	163.0 (140.0 - 201.0)	0.99
LDL-C cholesterol (mg/dl) ^{b,d}	80.0 (52.0 - 107.0)	99.0 (74.0 - 119.8)	0.11
HDL-C cholesterol (mg/dl) ^{b,d}	61.0 (45.0 - 86.5)	51.0 (41.0 - 58.0)	0.02*
Triglycerides (mg/dl) ^{b,d}	80.0 (61.0 - 112.5)	87.0 (69.0 - 142.0)	0.02*
Virological parameters^e			
HCV-RNA log ₁₀ (IU/ml) ^b	5.69 (5.33 - 5.99)	5.97 (5.63 - 6.32)	0.06
Genotype 1 n (%)	14 (82.4)	48 (82.8)	0.97

a, mean ± standard deviation (SD); b, [Median and interquartile range (IQR), 25th - 75th percentile]; c, 82 patients with information on alcohol consumption; d, data from 78 subjects (91.8%); e, data from 75 subjects (88.2%); ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline Phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; DM, diabetes mellitus; HCV, hepatitis C virus; HTN, hypertension; γ-GT, gama glutamyltransferase; RNA, Ribonucleic Acid; *, *p* values ≤ 0.05 were considered significant [the asymptotic Pearson's Chi-square test (categorical variables)]; Test T (mean ± SD) or Mann Whitney [Median and interquartile range (IQR, 25th - 75th percentile)].

Table 3. Histological findings in the liver specimens of patients with chronic hepatitis C with and without HDL-C cholesterol <55 mg/dl ($n = 85$).

Histological findings	HDL-C cholesterol	HDL-C cholesterol	p value
	≥ 55 mg/dl $n = 28$	<55 mg/dl $n = 50$	
Severe liver fibrosis (F3 - F4) n (%)	5 (17.9)	16 (32.0)	0.18
Necro-inflammatory activity n (%)	17 (60.7)	43 (86.0)	0.01*
Steatosis n (at least 5.0%)	20 (71.4)	32 (64.0)	0.42
Portal inflammatory infiltrate n (%)	14 (50.0)	25 (50.0)	0.09
Neutrophils	10 (35.7)	28 (56.0)	0.09
Lymphocytes	28 (100.0)	50 (100.0)	0.09
Histiocytes	2 (7.1)	9 (18.0)	0.19
Periportal inflammatory infiltrate n (%)	16 (57.1)	42 (84.0)	0.03*
Neutrophils	2 (7.1)	12 (24.0)	0.06
Lymphocytes	16 (57.1)	42 (84.0)	0.03*
Histiocytes	0	1 (2.0)	1.00
Lobular inflammatory infiltrate n (%)	16 (57.1)	39 (78.0)	0.05*
Neutrophils	1 (3.6)	5 (10.0)	0.31
Lymphocytes	16 (57.1)	39 (78.0)	0.13
Histiocytes	0	1 (2.0)	1.00
Centrolobular inflammatory infiltrate n (%)	7 (25.0)	10 (20.0)	0.61
Neutrophils	0	1 (2.0)	1.0
Lymphocytes	7 (25.0)	10 (20.0)	0.61
Histiocytes	0	0	-

CHC, chronic hepatitis C; DM, *diabetes mellitus*; 1, the presence of necroinflammatory activity and fibrosis were evaluated taking into account METAVIR classification, the presence of steatosis was considered when higher than 5,0%; 2, The degree of inflammatory cells (mononuclear and polymorfonuclear), was scored from 0 to 3 (0, absent; 1, mild; 2, moderate and 3, marked) separately in all hepatic sites; *, p values ≤ 0.05 were considered significant [the asymptotic Pearson's Chi-square test and Fisher's exact test (categorical variables)].

Table 4. Variables associated with histological findings in the liver specimens in patients with chronic hepatitis C ($n = 85$).

Independent variable	Model 1			
	Dependent variable - Fibrosis (F0 - F2 vs F3 - F4)			
	Univariate analysis	Multivariate analysis		
	p	OR	95%CI	p
Sex	0.44	-	-	-
Age	0.04	1.08	1.01 - 1.16	0.02*
Body mass index	0.90	-	-	-
Hypertension	0.22	1.11	0.25 - 4.94	0.89
Diabetes mellitus	0.52	-	-	-
Alcohol use (≥ 20 g/day)	0.60	-	-	-
Triglycerides mg/dl >150 mg/dl	0.22	0.99	0.98 - 1.01	0.13
HDL-C cholesterol <55 mg/dl	0.08	1.04	1.01 - 1.08	0.04*
Independent variable	Model 2			
	Dependent variable – Hepatic necroinflammatory activity			
	Univariate analysis	Multivariate analysis		
	p	OR	95%CI	p
Sex	0.85	-	-	-
Age	0.41	-	-	-
Body mass index	0.03	1.11	0.93 - 1.32	0.25
Hypertension	0.03	5.62	1.28 - 24.65	0.02*
Diabetes mellitus	0.08	2.48	0.25 - 24.87	0.44
Alcohol use (≥ 20 g/day)	0.27	-	-	-
Triglycerides mg/dl >150 mg/dl	0.03	1.01	0.99 - 1.03	0.13
HDL-C cholesterol <55 mg/dl	0.005	1.05	1.01 - 1.09	0.007*

Table 4 (continuation) - Variables associated with histological findings in the liver specimens in patients with chronic hepatitis C (n = 85).

Independent variable	Model 3			
	Dependent variable - Interface inflammatory activity			
	Univariate analysis	Multivariate analysis		
	<i>p</i>	OR	95%CI	<i>p</i>
Sex	0.82	-	-	-
Age	0.02	1.05	0.99 - 1.11	0.14
Body mass index	0.08	1.11	0.95 - 1.29	0.19
Hypertension	0.003	7.13	1.95 - 26.15	0.003*
Diabetes mellitus	0.05	1.45	0.25 - 8.48	0.68
Alcohol use (≥ 20 g/day)	0.74	-	-	-
Triglycerides mg/dl >150 mg/dl	0.80	-	-	-
HDL-C cholesterol <55 mg/dl	0.005	1.05	1.01 - 1.09	0.007*
Independent variable	Model 4			
	Dependent variable - Lobular inflammatory activity			
	Univariate analysis	Multivariate analysis		
	<i>p</i>	OR	95%CI	<i>P</i>
Sex	0.32	-	-	-
Age	0.91	-	-	-
Body mass index	0.49	-	-	-
Hypertension	0.40	-	-	-
Diabetes mellitus	0.21	1.57	0.29 - 9.38	0.61
Alcohol use (≥ 20 g/day)	0.88	-	-	-
Triglycerides mg/dl >150 mg/dl	0.02	1.02	0.99 - 1.03	0.06
HDL-C cholesterol <55 mg/dl	0.008	1.04	1.01 - 1.07	0.04*

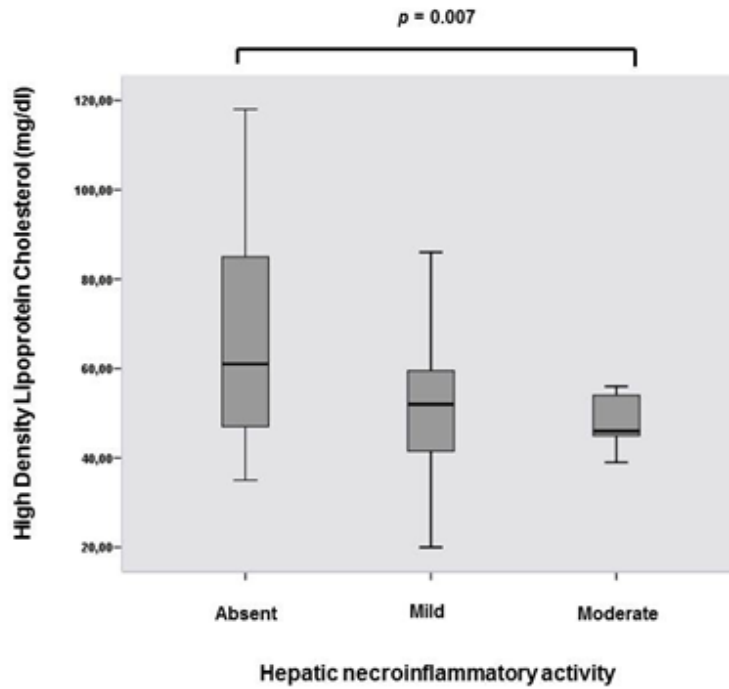


Figure 3. Correlation between the degree of hepatic necroinflammatory activity and High Density Lipoprotein Cholesterol levels in patients with chronic hepatitis C ($n = 78$). Each box shows the median (horizontal bar) and the lower and upper quartiles. Whiskers indicate the minimum and maximum values.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 1S. Histological findings^{1,2} in the liver specimens of control group and patients with chronic hepatitis C ($n = 114$).

Histological findings	Control group $n = 29$	CHC patients $n = 85$	p value
Severe liver fibrosis (F3 - F4) n (%)	0	23 (27.1)	0.001*
Necroinflammatory activity n (%)	0	67 (78.8)	<0.0001*
Steatosis n (at least 5.0%)	4 (13.8)	57 (67.0)	<0.0001*
Portal inflammatory infiltrate n (%)	2 (6.9)	85 (100.0)	<0.0001*
Neutrophils	0	44 (51.8)	<0.0001*
Lymphocytes	2 (6.9)	85 (100.0)	<0.0001*
Histiocytes	2 (6.9)	16 (18.8)	0.43
Periportal inflammatory infiltrate n (%)	0	65 (76.5)	< 0.0001*
Neutrophils	0	19 (22.3)	0.003*
Lymphocytes	0	65 (76.5)	<0.0001*
Histiocytes	0	4 (4.7)	0.57
Lobular inflammatory infiltrate n (%)	0	62 (72.9)	<0.0001*
Neutrophils	0	9 (10.6)	0.35
Lymphocytes	0	62 (72.9)	<0.0001*
Histiocytes	0	3 (3.5)	1.00
Perivenular inflammatory infiltrate n (%)	0	18 (21.2)	0.006*
Neutrophils	0	1 (1.2)	1.00
Lymphocytes	0	18 (21.2)	0.007*
Histiocytes	0	1 (1.2)	1.00

CHC, chronic hepatitis C; DM, *diabetes mellitus*; 1, the presence of necroinflammatory activity and fibrosis were evaluated taking into account METAVIR classification, the presence of steatosis was considered when higher than 5,0%; 2, The degree of inflammatory cells (mononuclear and polymorfonuclear), was scored from 0 to 3 (0, absent; 1, mild; 2, moderate and 3, marked) separately in all hepatic sites; *, p values ≤ 0.05 were considered significant [the asymptotic Pearson's Chi-square test and Fisher's exact test (categorical variables)].

Table 2S. Histological findings in the liver specimens of patients chronically infected by HCV with and without hypertension.

Histological findings	HTN <i>n</i> = 35	Without HTN <i>n</i> = 50	<i>p</i> value
Severe liver fibrosis (F3 - F4) <i>n</i> (%)	12 (33.4)	11 (22.0)	0.21
Necroinflammatory activity <i>n</i> (%)	32 (91.4)	35 (70.0)	0.02*
Steatosis <i>n</i> (at least 5.0%)	24 (68.6)	33 (66.0)	0.80
Steatosis	35 (100.0)	50 (100.0)	0.31
Neutrophils	22 (62.9)	22 (44.0)	0.10
Lymphocytes	35 (100.0)	50 (100.0)	0.35
Histiocytes	9 (25.7)	7 (14.0)	0.25
Periportal inflammatory infiltrate <i>n</i> (%)	32 (91.4)	33 (66.0)	0.03*
Neutrophils	12 (34.3)	7 (14.0)	0.03*
Lymphocytes	32 (91.4)	33 (66.0)	0.03*
Histiocytes	2 (5.7)	2 (4.0)	1.00
Lobular inflammatory infiltrate <i>n</i> (%)	26 (74.3)	36 (72.0)	0.82
Neutrophils	4 (11.4)	5 (10.0)	0.83
Lymphocytes	26 (74.3)	36 (72.0)	0.93
Histiocytes	1 (2.9)	2 (4.0)	1.00
Centrolobular inflammatory infiltrate <i>n</i> (%)	4 (11.4)	14 (28.0)	0.10
Neutrophils	0	1 (2.0)	1.00
Lymphocytes	4 (11.4)	14 (28.0)	0.13
Histiocytes	0	1 (2.0)	1.00

CHC, chronic hepatitis C; DM, *diabetes mellitus*; 1, the presence of necroinflammatory activity and fibrosis were evaluated taking into account METAVIR classification, the presence of steatosis was considered when higher than 5,0%; 2, The degree of inflammatory cells (mononuclear and polymorfonuclear), was scored from 0 to 3 (0, absent; 1, mild; 2, moderate and 3, marked) separately in all hepatic sites; *, *p* values ≤ 0.05 were considered significant [the asymptotic Pearson's Chi-square test and Fisher's exact test (categorical variables)].

Table 3S. Histological findings in the liver specimens of patients with chronic hepatitis C with and without diabetes mellitus ($n = 85$).

Histological findings	DM $n = 19$	Without DM $n = 66$	p value
Severe liver fibrosis (F3 - F4) n (%)	6 (31.6)	17 (25.8)	0.62
Necro-inflammatory activity n (%)	18 (94.7)	49.0 (74.2)	0.06
Steatosis n (at least 5.0%)	11 (57.9)	46 (69.7)	0.34
Portal inflammatory infiltrate n (%)	19 (100.0)	66 (100.0)	0.23
Neutrophils	13 (68.4)	31 (46.9)	0.23
Lymphocytes	19 (100.0)	66 (100.0)	0.15
Histiocytes	6 (31.6)	10 (15.2)	0.14
Periportal inflammatory infiltrate n (%)	17 (89.5)	48 (72.7)	0.11
Neutrophils	6 (31.6)	13 (19.7)	0.27
Lymphocytes	17 (89.5)	48 (72.7)	0.10
Histiocytes	2 (10.5)	2 (3.0)	0.26
Lobular inflammatory infiltrate n (%)	17 (89.5)	45 (68.2)	0.08
Neutrophils	3 (15.8)	6 (9.1)	0.41
Lymphocytes	17 (89.5)	45 (68.2)	0.04*
Histiocytes	2 (10.5)	1 (1.5)	0.05*
Centrolobular inflammatory infiltrate n (%)	1 (5.3)	17 (25.8)	0.06
Neutrophils	0	1 (1.5)	1.00
Lymphocytes	1 (5.3)	17 (25.8)	0.19
Histiocytes	0	1 (1.5)	1.00

CHC, chronic hepatitis C; DM, *diabetes mellitus*; 1, the presence of necroinflammatory activity and fibrosis were evaluated taking into account METAVIR classification, the presence of steatosis was considered when higher than 5,0%; 2, The degree of inflammatory cells (mononuclear and polymorfonuclear), was scored from 0 to 3 (0, absent; 1, mild; 2, moderate and 3, marked) separately in all hepatic sites; *, p values ≤ 0.05 were considered significant [the asymptotic Pearson's Chi-square test and Fisher's exact test (categorical variables)].