

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO
ADULTO

Remodelação de biomarcadores imunológicos em pacientes com hepatite C crônica tratados
com agentes antivirais de ação direta

Isabela Gomes Ribeiro

Belo Horizonte

2020

Isabela Gomes Ribeiro

Remodelação de biomarcadores imunológicos em pacientes com hepatite C crônica tratados
com agentes antivirais de ação direta

Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Saúde do Adulto

Orientação: Prof.^a Dra. Rosângela Teixeira

Coorientação: Dr. Olindo Martins Filho

Belo Horizonte

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

R484r Ribeiro, Isabela Gomes.
Remodelação de Biomarcadores Imunológicos em pacientes com Hepatite C Crônica tratados com Agentes Antivirais de ação direta [manuscrito]. / Isabela Gomes Ribeiro. - - Belo Horizonte: 2020.
103f.: il.
Orientador (a): Rosângela Teixeira.
Coorientador (a): Olindo Martins Filho.
Área de concentração: Saúde do Adulto.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hepatite C Crônica. 2. Terapêutica. 3. Biomarcadores. 4. Antivirais. 5. Dissertação Acadêmica. I. Teixeira, Rosângela. II. Martins Filho, Olindo. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 541

Universidade Federal de Minas Gerais

Reitora: Prof.^a Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Fabio Alves da Silva Junior

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Humberto José Alves

Vice-Diretora da Faculdade de Medicina: Prof.^a Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof.^a Eli Iola Gurgel Andrade

Chefe do Departamento de Clínica Médica: Prof.^a Valéria Maria Augusto

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto: Prof.^a Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto: Prof.^a Gilda Aparecida Ferreira

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto:

Prof. Eduardo Garcia Vilela

Prof.^a Gilda Aparecida Ferreira

Prof.^a Luciana Costa Faria

Prof.^a Luciana Diniz Silva

Prof.^a Maria de Lourdes de Abreu Ferrari

Prof.^a Suely Meireles Rezende

Prof.^a Teresa Cristina de Abreu Ferrari

DECLARAÇÃO DE DEFESA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

REMODELAÇÃO DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA TRATADOS COM AGENTES ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA

ISABELA GOMES RIBEIRO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia vinte e seis de novembro de dois mil e vinte, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Rosângela Teixeira - Orientadora
UFMG

Olindo Assis Martins Filho - Coorientador
FIOCRUZ

Eduardo Garcia Vilela
UFMG

Silvana Maria Elói Santos
UFMG

Mariléia Chaves Andrade
UNIMONTES

Mário Reis Álvares da Silva
UFRGS

Belo Horizonte, 26 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Olindo Assis Martins Filho**, **Usuário Externo**, em 26/11/2020, às 09:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariléia Chaves Andrade**, **Usuário Externo**, em 26/11/2020, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvana Maria Eloi Santos**, **Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 26/11/2020, às 12:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rosângela Teixeira**, **Cidadã**, em 26/11/2020, às 13:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Garcia Vilela**, **Professor do Magistério Superior**, em 06/12/2020, às 20:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mário Reis Álvares da Silva**, **Usuário Externo**, em 11/01/2021, às 18:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0412115** e o código CRC **E9ED4DD7**.

Dedico este trabalho ao meu esposo Romero

"... Dando sempre graças por tudo a nosso Deus e Pai, em nome de nosso Senhor Jesus Cristo..."

Efésios, 5:20. BÍBLIA

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dra. Rosângela Teixeira por todo o apoio profissional e amizade. Um exemplo de médica que exerce a medicina em sua mais nobre forma. Compreensão em momentos difíceis, alegria nos momentos felizes.

Ao meu coorientador Dr. Olindo Assis Martins Filho pela gentileza em abrir as portas do LBDM me dando o privilégio de participar deste grupo e me dar a oportunidade de ver a sua mente brilhante.

Ao meu esposo Romero, sem você nada disso seria possível, você sabe de tudo e tudo bem, o que eu sou de verdade, muito obrigada.

Ao Ismael pela generosidade em me ensinar.

À Jordana Fradico pela incansável ajuda e disponibilidade.

À Prof. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, pela enorme colaboração no manuscrito.

Aos colaboradores do Ambulatório de Hepatites Virais do Hospital das Clínicas/UFMG, Dr. Rodrigo Dias Cambraia, Prof.^a Dra. Luciana Diniz Silva, em breve Dr. Diego Alves Vieira, Geraldo Scarabelli Pereira, Raquel da Piedade Fonseca (*in memoriam*), os meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Andréa Teixeira Carvalho agradeço a oportunidade de aprendizado.

À minha família, minha mãe Lourdes, meu pai Agostinho, meus irmãos Erica, Gustavo e Fernanda, sempre me apoiando, Valéria, Carolina, Letícia, Arthur, Vítor, Handerson, Tia Maria e todos outros.

Às minhas amigas Julianne e Silvia pela amizade sincera.

Aos amigos do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração pela acolhida.

Aos pacientes do IAG- Instituto Alfa de Gastroenterologia especialmente os que participaram deste trabalho, obrigada pelo aprendizado científico e humano.

Às agências financiadoras.

A todos em todos os hospitais em que atuei que participaram da minha jornada de evolução, dando-me a oportunidade de tornar-me um espírito melhor sendo um instrumento para o cuidado do corpo e da alma.

Aos irmãos de farda da Força Aérea Brasileira.

Às minhas amigas do HMC, Simone, Sheila, Virgínia e Adriana.

A Deus, Jesus e Maria de Nazaré que me carregaram nos momentos em que a caminhada foi dura.

Aos amigos da Associação Espírita Helil.

Aos amigos da Associação Espírita Irmão Gorich.

Aos amigos da Associação Espírita André Luiz.

Aos amigos de Luz Divina.

A todos que me apoiaram e me fortaleceram o meu MUITO OBRIGADA!

À querida Sarah.

RESUMO

Remodelação de biomarcadores imunológicos em pacientes com hepatite C crônica tratados com terapia antiviral de ação direta

Antecedentes e objetivos: O tratamento do HCV com agentes antivirais de ação direta (DAAs) constitui oportunidade única para analisar as mudanças no sistema imunológico causadas pela rápida inibição da replicação viral. Portanto, esse estudo objetivou analisar a cinética dos biomarcadores séricos em pacientes com hepatite C crônica tratados com essas drogas.

Métodos: Cinquenta pacientes com HCV foram incluídos nesta investigação longitudinal realizada antes (linha de base), durante (S2-4 e S8-12 semanas) e após o tratamento (S12-24 semanas) com sofosbuvir mais daclatasvir \pm ribavirina (n = 36) ou simeprevir (n = 14). A distribuição dos genótipos de HCV 1a / b, 2 e 3 foi 80%, 6% e 14%, respectivamente. Todos os pacientes apresentaram RVS. Quinze doadores de sangue não infectados formaram o grupo controle (NI). Biomarcadores séricos CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2 foram quantificados pela plataforma Luminex Bio-Plex Pro™. Utilizaram-se os testes de Mann-Whitney (HCV e NI), Kruskal Wallis (múltiplo) e Dunn (sequencial em pares) para comparações entre grupos. A significância foi $p \leq 0,05$. Análises estatísticas e artes gráficas utilizaram o software Prism Graph Pad 8.0. O estudo foi aprovado pelas instâncias éticas e institucionais da UFMG e FIOCRUZ / Minas e os participantes assinaram o termo de consentimento.

Resultados: Observou-se ampla remodelação de biomarcadores em pacientes com HCV no início do estudo comparados aos NI, caracterizada por altos níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, e pequeno aumento de citocinas regulatórias. A linha do tempo da cinética das alterações basais com DAAs revelou declínio precoce de CXCL8, CCL4, IL-6, IL-15, IL-17, IL-9, GM-CSF e IL-7 em S8-12 e remodelação tardia de CCL3, CCL2, CCL5, IL1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL1-Ra, IL-4, IL-10, IL-13, PDGF, VEGF, G-CSF em W12-24. ALT ≥ 69 U/L, plaquetas ≤ 150.000 /mm³ e cirrose hepática no pré-tratamento foram associados à remodelação tardia da resposta imune.

Conclusões: A erradicação do HCV com DAAs resulta em reajuste notável do microambiente dos biomarcadores séricos da resposta imune, podendo ser mais lenta naqueles com cirrose compensada e ALT alta. Esses resultados acrescentam evidências ao conhecimento do processo de remodelação imunológica associado à rápida erradicação viral do HCV com as potentes drogas antivirais diretas atuais.

ABSTRACT

Remodeling of immunological biomarkers in patients with chronic hepatitis C treated with direct-acting antiviral therapy

Background & Aims: The HCV treatment with direct-acting antiviral agents (DAAs) has offered a unique opportunity to analyze the changes in the immune system caused by the rapid inhibition of viral replication. We sought to analyze the kinetics profiles of serum biomarkers in patients with chronic hepatitis C upon DAAs treatment.

Methods: Fifty HCV patients were enrolled in a longitudinal investigation carried out before (baseline), during (W2-4 and W8-12 weeks) and post-treatment (W12-24 weeks) with sofosbuvir plus daclatasvir \pm ribavirin (n=36) or simeprevir (n=14). Distribution of HCV genotypes 1a/b, 2 and 3 was 80%, 6% and 14%, respectively. All patients had SVR. Fifteen uninfected blood donors formed the control group (NI). Serum biomarkers CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2 were quantified by Luminex Bio-Plex Pro™ platform. Mann-Whitney (HCV and NI), Kruskal Wallis (multiple), and Dunn (sequential in pairs) tests were used for comparisons between groups. The significance considered was $p \leq 0.05$. The Prism Graph Pad 8.0 software was used for statistical analysis and graphic arts. The study was approved by the institutional and ethical boards of UFMG and FIOCRUZ/Minas. All participants signed the consent form.

Results: The results demonstrated a clear biomarker remodeling in HCV patients at baseline as compared to NI, characterized by high levels of chemokines, pro-inflammatory cytokines, and growth factors, with minor increase of regulatory cytokines. The kinetics timeline of baseline fold changes upon DAAs treatment revealed an early decline of CXCL8, CCL4, IL-6, IL-15, IL-17, IL-9, GM-CSF and IL-7 at W8-12 and a late remodeling of CCL3, CCL2, CCL5, IL1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL1-Ra, IL-4, IL-10, IL-13, PDGF, VEGF, G-CSF at W12-24. ALT ≥ 69 U/L, platelet $\leq 150,000/\text{mm}^3$ and liver cirrhosis at baseline were factors related to delayed immune response remodeling.

Conclusions: The HCV eradication with DAAs results in a profound readjustment of the microenvironment of serum biomarkers of the immune response, which is notable in patients with chronic hepatitis C, and may be slower in those with compensated cirrhosis and high ALT

levels. These results add evidence to the knowledge of the process of immune remodeling associated with the rapid viral eradication of HCV with the current potent antiviral drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese dos agentes antivirais de ação direta utilizados no tratamento da hepatite C

Figura 9. Perfil de biomarcadores NI versus HCV pós tratamento

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Principais citocinas e suas funções imunológicas

Tabela 2–Famílias de quimiocinas CC e CXC

Tabela 3 – Características clínicas e demográficas dos participantes com hepatite C crônica tratados com os agentes antivirais de ação direta sofosbuvir e daclatasvir ou simeprevir

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	- Percentual
*	- Asterisco
µL	- Microlitro
°C	- Graus Celsius
AHEV	- Ambulatório de Hepatites Virais
ALT	- Alanina aminotransferase
APRI	- AST-to-Platelet Ratio Index (Índice de relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas)
CCL	- Ligante de quimiocinas (motivo C-C)
CHC	- Carcinoma hepatocelular
CTA	- Comitê Técnico Assessor
CXCL	- Ligante de quimiocinas CXC (motivo C-X-C)
DAAs	- Antivirais de Ação Direta (do inglês, <i>direct acting antivirals</i>)
DDAHV	- Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais
ELISA	- do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	- do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FGF-basic	- Fator de crescimento de fibroblastos (do inglês <i>basic fibroblast growth factor</i>)
FIB	- The Fibrosis-4 Index for Liver Fibrosis
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
g	- Grama
G-CSF	- Fator de crescimento de granulócitos, do inglês <i>Granulocyte colony stimulating fator</i>
GIPB	- Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores
GM-CSF	- Fator de crescimento de colônias granulócitos e macrófagos. Do inglês <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HBV	- Vírus da hepatite B
HC	- Hospital das Clínicas
HCV	- Vírus da hepatite C
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
IAG	- Instituto Alfa de Gastroenterologia

IFN	- Interferon
IL	- Interleucina
IRR	- Instituto René Rachou
KDa	- Kilodaltons
Kg	- Quilograma
LSN	- Limite superior de normalidade
MG	- Minas Gerais
Mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
mm³	- Milímetro cúbico
NK	- do inglês <i>Natural killer</i> (células)
NS	- Proteínas não estruturais (NS2 a NS5)
p7	- Proteína 7
PBS	- Tampão fosfato salínico
PCDT	- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PDGFBB	- Fator de crescimento BB derivado de plaquetas (do inglês <i>Platelet derived growth factor</i>)
PegIFN	- Interferon-alfa peguilado
RIBA	- do inglês <i>recombinant immunoblott assay</i>
RNA	- Ácido Ribonucleico
RVS	- Resposta virológica sustentada
SUS	- Sistema Único de Saúde
TA	- Temperatura ambiente
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	- Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor</i>)
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
UI	- Unidade Internacional
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>)

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	16
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	20
1.1 - Hepatite C crônica: aspectos epidemiológicos e clínicos	20
1.2 - Aspectos terapêuticos da hepatite C crônica – uma breve revisão	21
1.3 - Antivirais de ação direta utilizados no Brasil em 2015	23
1.4 - Aspectos da farmacologia dos antivirais de ação direta sofosbuvir, simeprevir e daclatasvir	25
1.5 - O sistema imune na infecção pelo HCV.....	26
1.6 - A modulação do sistema imune na hepatite C crônica durante o tratamento com os agentes antivirais de ação direta	33
1.7 - Justificativa.....	35
1.8 – Referências Bibliográficas	36
2. OBJETIVOS	44
2.1 - Geral	44
2.2 – Específicos	44
3. MÉTODOS	45
3.1 - Caracterização dos participantes da pesquisa	45
3.2 - Amostras biológicas	48
3.3 - Locais de realização da pesquisa	48
3.4 - Aspectos éticos	48
3.5 - Procedimentos experimentais	48
3.5.1 - Dosagem de biomarcadores solúveis.....	48
3.5.2 Etapas do desenvolvimento da análise estatística e assinatura de biomarcadores	50
4. ARTIGO CIENTÍFICO	51
5. ANÁLISE COMPLEMENTAR	897
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
6.1 – Discussão	89
6.2 - Limitações	95
6.3 - Novas perspectivas	95
7. APÊNDICE.....	96

1 - Termos de consentimento livre e esclarecido.....	96
2- Aprovações COEP	107

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 - Hepatite C crônica: aspectos epidemiológicos e clínicos

A hepatite C constitui um grande problema de saúde pública mundial. Sua importância decorre do fato de que, em pelo menos 20% dos casos, há evolução para a cirrose hepática, sendo que um a quatro por cento dos cirróticos evoluem, a cada ano, para o carcinoma hepatocelular (CHC) (DI BISCEGLIE, 2000).

Estima-se que 71,1 milhões de pessoas no mundo são portadoras do vírus da hepatite C (HCV) (SPEARMAN et al., 2019). Esta estimativa, menor que a relatada em 2013, da ordem de 80,2 milhões (GOWER et al., 2014), é atribuída ao envelhecimento da população infectada, à mortalidade dos pacientes por doença hepática avançada ou causas não relacionadas ao fígado e, sobretudo, à recente evolução do tratamento da hepatite C com a disponibilização dos agentes antivirais de ação direta (DAAs) que oferecem alta chance de cura da infecção (>95%) com tratamentos de curta duração (oito a 12 semanas) e excelente tolerância. Além disso, essas drogas ampliaram a possibilidade de tratamento de pacientes até então excluídos, como aqueles com comorbidades importantes, como cardiopatias e doenças autoimunes, os transplantados de outros órgãos sólidos excetuando-se o fígado, e os com doença hepática avançada descompensada. Esses fatos, em conjunto, têm contribuído para o rápido declínio da prevalência global da infecção pelo HCV.

A transmissão do HCV ocorre principalmente por via parenteral, sendo considerados de alto risco os indivíduos que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993 e os que compartilham injeções. No entanto, há diversas formas possíveis de exposição percutânea, como tatuagem e *piercing*, procedimentos médicos, odontológicos e estéticos sem o devido cumprimento das normas de biossegurança. A transmissão de hepatite C por via sexual não é desprezível e pode ocorrer entre pessoas com comportamentos sexuais de risco (LAUER&WALKER, 2001). A transmissão intrauterina é incomum, a perinatal também é rara, mas é possível no momento ou logo após o parto. Apesar de possível transmissão do HCV através do aleitamento materno, uma vez que partículas virais foram encontradas no colostro e leite materno, não há, até agora, evidências conclusivas de aumento do risco de transmissão exceto na vigência de fissuras ou sangramento nos mamilos (BRASIL, 2013).

O início da infecção pelo HCV é, em geral, inaparente ou oligossintomático, embora em cinco a 10% dos casos possa haver quadro agudo, com elevação de aminotransferases e icterícia. A infecção aguda tem grande chance de cronificação, o que acontece com cerca de 85% dos pacientes que adquirem o vírus. No entanto, essas cifras podem ser menores, de 55 a 65%, quando a infecção é adquirida na infância ou na fase adulta jovem (DI BISCEGLIE, 2000).

É fato conhecido que a hepatite C crônica é doença que evolui em décadas. Isto porque é silenciosa, e a evolução para cirrose, quando ocorre, tende a ser muito lenta, da ordem de 25 a 30 anos, embora tal período possa ser mais curto, de cinco a dez anos, em pacientes imunodeprimidos, alcoolistas, coinfectados pelo HBV ou HIV e no pós-transplante hepático (LAUER & WALKER, 2001; POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS, 2015). Por conseguinte, é preocupante a proporção de indivíduos infectados por mais de dez anos e assintomáticos, o que leva a crer que haverá aumento no número de casos de cirrose hepática e suas complicações, de CHC e de demanda por transplante hepático caso os infectados permaneçam ignorados e não tratados.

A compreensão da hepatite C crônica aumentou consideravelmente na última década graças ao desenvolvimento de métodos diagnósticos e melhorias no tratamento e nas medidas preventivas. O objetivo principal do tratamento é curar a infecção, ou seja, obter a resposta virológica sustentada (RVS), definida como a indetectabilidade do RNA viral 12 semanas (RVS12) ou 24 semanas (RVS24) após o término do tratamento. As chances de recidiva tardia com as novas drogas são baixas, no entanto a reinfeção pode ocorrer nos casos de re-exposição viral. A RVS geralmente resulta em normalização de enzimas hepáticas, melhora ou desaparecimento da necroinflamação do fígado e regressão da fibrose hepática principalmente em pacientes não cirróticos. A genotipagem do HCV é desnecessária para o diagnóstico, no entanto, é importante caso a medicação a ser utilizada seja genótipo específica (DUSTIN et al., 2016).

1.2 - Aspectos terapêuticos da hepatite C crônica – uma breve revisão

O tratamento da hepatite C teve início na década de 80 com o interferon-alfa convencional que resultava em taxas de RVS da ordem de 10% a 15%. Em seguida, sua associação com a ribavirina aumentou essas taxas para 35% a 40% e, mais adiante, o interferon peguilado alfa 2a ou 2b associado à ribavirina conferia RVS em cerca de 56% dos pacientes. No entanto, é

notável o avanço recente no tratamento da hepatite C livre de interferon. Desse modo, o desenvolvimento e a disponibilidade dos DAAs altamente eficazes na última década revolucionaram o manejo da infecção pelo HCV (BRASIL, 2013; BRASIL, 2015; BRASIL, 2019).

No Brasil, o sistema público de saúde fornece tratamento universal para todos os pacientes infectados pelo HCV de acordo com os princípios do Sistema Único de Saúde (SUS), instituído pela Constituição Federal de 1988, baseado nos princípios da saúde como direito dos cidadãos e dever do Estado. Assim, em 2014 o Ministério da Saúde passou a prover o acesso aos DAAs. Entre 2004 a 2017, cerca de 70.000 pessoas foram tratadas com DAAs em todo o país (BENZAKEN et al., 2019).

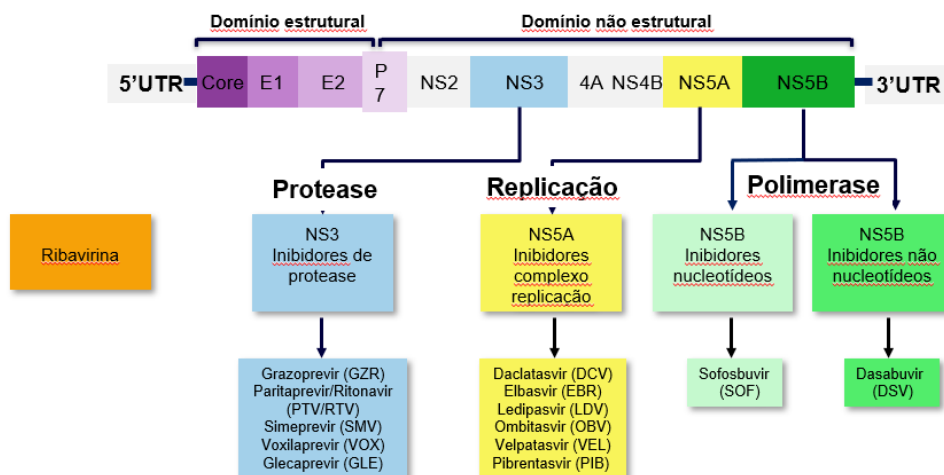
Os primeiros DAAs aprovados em 2011 foram o telaprevir e o boceprevir. Foram essas as primeiras drogas inibidoras diretas das enzimas virais do ciclo replicativo do HCV utilizadas junto com os interferons, agentes cuja ação principal é modular a resposta imune. Portanto, o tratamento da hepatite C passou a ser triplo - interferon peguilado, ribavirina e um antiviral direto inibidor de protease, telaprevir ou boceprevir (BRASIL, 2013; BRASIL, 2015; BRASIL, 2019).

A despeito do aumento nas taxas de RVS de 50% para próximo de 75% em pacientes virgens de tratamento infectados pelo genótipo 1 com esse esquema tríplice, o tratamento era complexo uma vez que tanto telaprevir quanto boceprevir tinham ação específica no genótipo 1, resultavam em múltiplos eventos adversos e havia o inconveniente do grande número de pílulas a serem ingeridas diariamente. Além disso, somaram-se os conhecidos eventos adversos da combinação interferon e ribavirina (POORDAD et al., 2011; ZEUZEM et al., 2011; JACOBSON et al., 2011)

Mudanças significativas ocorreram entre 2013 e 2017, quando cinco inibidores da protease viral NS3/4a (simeprevir, paritaprevir potencializado por ritonavir, grazoprevir, voxilaprevir, glecaprevir), seis inibidores da NS5A (ledipasvir, ombitasvir, daclatasvir, elbasvir, velpatasvir, pibrentasvir), e dois inibidores da polimerase NS5B (sofosbuvir e dasabuvir) foram aprovados pela agência reguladora de medicamentos dos Estados Unidos, o *Food and Drug Administration*, (FDA), para o tratamento da hepatite C em adultos. Esses novos DAAs são

utilizados em esquemas combinados de duas ou três drogas de classes distintas, com duração do tratamento variável de oito a 24 semanas (Figura 1).

Figura 1 – Síntese dos agentes antivirais de ação direta utilizados no tratamento da hepatite C



Fonte: POL S, et al., 2016.

Todos os DAAs são de administração oral, a maioria em dose única diária, com taxas de RVS que ultrapassam 90% independentemente do genótipo do HCV e da condição do paciente, *naive* ou experimentado, além do baixo risco de desenvolvimento de resistência virológica, poucos eventos adversos e excelente tolerância.

Além dessas vantagens, os esquemas terapêuticos ampliaram as possibilidades de tratamento de pacientes com disfunção renal, coinfectados com HIV, pacientes com cirrose hepática descompensada e transplantados. A maioria das interações medicamentosas é conhecida e, na prática, requerem atenção e avaliação cuidadosa.

1.3 - Antivirais de ação direta utilizados no Brasil em 2015

Em 2015, três DAAs foram introduzidos para o tratamento da hepatite C crônica no Brasil: sofosbuvir, daclatasvir e simeprevir. O tratamento foi indicado para pacientes com fibrose hepática avançada (METAVIR F3 ou F4) de acordo com a tradicional classificação METAVIR (THE METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP, 1996) ou com biópsia hepática prévia

há mais de três anos com fibrose hepática classificada como METAVIR F2. Pacientes com outras categorias de fibrose hepática deveriam manter monitorização clínica e aguardar novo protocolo de indicação de tratamento (BRASIL, 2015).

O estadiamento da fibrose hepática pôde ser feito pela biópsia hepática ou, quando indisponível ou contraindicada, por métodos não invasivos, como a elastografia hepática e os escores APRI e FIB4. Estas facilitações objetivaram reduzir as disparidades do acesso aos serviços de saúde no Brasil em relação aos procedimentos de média e alta complexidade, ampliar o acesso à terapêutica e minimizar dificuldades inerentes à realização de biópsia hepática. Assim, os escores de APRI e FIB4, que valem-se de resultados de exames laboratoriais realizados rotineiramente no acompanhamento de pacientes com hepatite C crônica, foram incorporados para identificar pacientes com fibrose hepática avançada e indicar o tratamento imediato (WHO, 2014; PAGGI, et al., 2008; BRASIL, 2015).

Na ocasião, priorizou-se o tratamento de pacientes mono infectados pelo HCV com APRI > 1,5 ou FIB4 > 3,25, sugestivos de fibrose hepática avançada (METAVIR \geq F3) (BRASIL, 2015). Os pacientes nunca tratados e os tratados previamente sem RVS foram designados “virgens de tratamento” (*treatment-naive*) e “experimentados” (*treatment-experienced*), respectivamente. A terminologia obedeceu ao léxico internacional para proporcionar fácil interpretação dos esquemas terapêuticos.

Os pacientes mono infectados pelo genótipo 1a ou 1b foram tratados com a associação de sofosbuvir e simeprevir ou sofosbuvir e daclatasvir, por 12 semanas. Pacientes com cirrose hepática categorizados pelo tradicional sistema Child-Turcotte-Pugh (CTP) como B ou C (CHILD, C. & TURCOTTE, J., 1964) e os experimentados prévios ao tratamento com boceprevir ou telaprevir deveriam ser tratados com sofosbuvir e daclatasvir por 24 semanas.

A adição de ribavirina aos regimes acima foi aconselhada para pacientes com cirrose hepática experimentados ou co infectados pelo HIV, independentemente do estágio de fibrose, na posologia de 11mg/kg/dia, ou 1g para pacientes com peso < 75kg e 1,25g > 75kg.

1.4 - Aspectos da farmacologia dos antivirais de ação direta sofosbuvir, simeprevir e daclatasvir

O sofosbuvir é um análogo de nucleotídeo inibidor da região viral NS5B que, associado a outras drogas, é recomendado para o tratamento de pacientes com hepatite C infectados pelos genótipos 1a, 1b, 2, 3 (KEATING et al., 2014; KOFF et al., 2014; AASLD/IDSA, 2015; GILEAD SCIENCES, 2019). Após administração oral, ocorre a fosforilação intracelular da droga gerando o produto farmacologicamente ativo análogo do trifosfato de nucleotídeo que, inserido no processo de replicação da fita de RNA viral, resulta em sua terminação prematura.

Há somente uma mutação conhecida (Ser282Thr) que conferiu resistência a todos os inibidores da região NS5B (TONG et al., 2014). No entanto, não se detectou essa mutação nos estudos de registro da droga, o que foi atribuído à sua alta barreira genética (KEATING et al., 2014). A metabolização do sofosbuvir é hepática e, após a fosforilação ao trifosfato de nucleotídeo, ocorre a desfosforilação que resulta na formação do metabólito GS-331007, responsável por mais de 90% da exposição sistêmica à droga (KIRBY et al., 2015).

Alimentos e refeições gordurosas não têm efeito na absorção ou concentração sérica do sofosbuvir. Após a administração da dose oral única de 400mg, 80% da droga é recuperada na urina e 12% nas fezes. Cerca de 78% da droga eliminada pelos rins consiste no metabólito GS-331007. A meia-vida é de 0,5 horas e a do GS-331007 de 27 horas. Raça e sexo não têm efeito na sua farmacocinética (KIRBY et al., 2015). As concentrações de sofosbuvir e GS-331007 estão aumentadas em pacientes com insuficiência renal.

O simeprevir é um inibidor da protease viral NS3/4a e, associado ao sofosbuvir, tem ação antiviral contra os genótipos 1a e 1b (OLYSIO, 2013). Diferentemente dos dois inibidores NS3/4A utilizados inicialmente, telaprevir e boceprevir, o simeprevir apresenta maior barreira genética à resistência (SCHINAZI et al., 2014). A droga atinge a concentração sérica máxima quatro a seis horas após ingerida e a administração com alimentos aumenta a concentração sistêmica em 60-70%. A metabolização é hepática, através do citocromo CYP3A e, em menor proporção, dos citocromos CYP2C8 e CYP2C19, sendo posteriormente eliminada pelo trato biliar. Após administração oral, 91% da droga é recuperada nas fezes e menos de 1% na urina. Não são necessários ajustes de dose para insuficiência renal leve ou insuficiência hepática leve

a moderada. Contudo, observa-se aumento de cerca de cinco vezes na sua concentração em pacientes com insuficiência hepática grave e, portanto, é contra indicada nessa condição.

O daclatasvir é um inibidor da região NS5A do HCV e, associado ao sofosbuvir, está indicado para o tratamento de pacientes infectados pelos genótipos 1a, 1b, 2 e 3. A potência antiviral é diminuída em pacientes com polimorfismos basais que conferem resistência à região NS5A, e resistência cruzada pode ocorrer com outras drogas da classe dos inibidores NS5A (BMS, 2019).

Após administração de dose única, 88% do daclatasvir é recuperado nas fezes e 6% na urina. A sua metabolização é feita principalmente pela família da enzima CYP3A4 e, portanto, requer análise criteriosa da administração conjunta com outros inibidores ou indutores da família CYP. Insuficiência renal, insuficiência hepática, raça, sexo e idade não afetam significativamente o seu perfil farmacocinético e nenhum ajuste de dose ou precauções especiais são necessárias nessas situações.

Essas novas drogas antivirais diretas representam um marco muito importante na história da hepatite C crônica. As taxas de cura virológica com qualquer regime superam 90%. As interações medicamentosas são importantes e devem ser rigorosamente avaliadas. A tolerância a qualquer esquema terapêutico é ótima, a facilidade posológica e a raridade de eventos adversos garantem maior chance da infecção pelo HCV e melhor qualidade de vida para os pacientes.

1.5 - O sistema imune na infecção pelo HCV

Os mecanismos associados à resposta imunológica nas infecções virais envolvem um harmonioso e complexo sistema molecular e celular. Assim, desequilíbrios que possam ocorrer nesse refinado processo orquestrado podem resultar em resposta imune insuficiente ou mesmo exacerbada, ambas danosas ao organismo (DUSTIN, 2017).

O processo imune de defesa antiviral é mediado pelos interferons (IFN) tipo I (IFN- α e IFN- β), pelos macrófagos e pelas células *natural killer* (NK). Os IFNs do tipo I são produzidos pelas células infectadas pelos vírus e, em cadeia, macrófagos e células NK são ativados para atuar na eliminação dessas células. Nesse processo, destaca-se a citocina IL-12, produzida

pelas células apresentadoras de antígenos e macrófagos, que estimula as células NK para atuarem na eliminação viral através da citotoxicidade e da produção de IFN- γ que, por sua vez, potencializa a eliminação viral dos macrófagos, estabelecendo, assim, uma resposta imune eficaz (DUSTIN, 2017).

Peculiaridades da infecção pelo HCV, como o genótipo e a carga viral, fatores do hospedeiro, como idade à infecção, sexo e resposta imune, e a concomitância de outros fatores de agressão hepática, como o álcool e as coinfeções com o vírus da hepatite B (HBV) ou da imunodeficiência humana (HIV), podem interferir no curso da doença (DI BISCEGLIE et al., 1991). Contudo, as interações entre o HCV e o sistema imune do hospedeiro parecem ser determinantes da história natural da infecção pelo HCV (REHERMANN, 2000).

Sabe-se que o HCV não tem ação citopática direta sobre os hepatócitos e, portanto, a resposta imune ao vírus parece ser a verdadeira responsável pelas lesões hepáticas (THIO, 2008). Os hepatócitos são o alvo principal do HCV, mas o vírus também interage com monócitos, linfócitos, células endoteliais, eritrócitos e plaquetas (DUSTIN& RICE, 2007). Contudo, a escassez de modelos animais e/ou sistemas de cultura celular adequados para estudos sobre a resposta imune à infecção pelo HCV dificultam o conhecimento preciso dos componentes dessa resposta (THIO, 2008).

Resposta imune vigorosa específica e sustentada é observada em pacientes com clareamento viral espontâneo que ocorre em cerca de 20% a 30% dos casos de infecção aguda (DUSTIN, 2017; LAPA et al., 2019). A migração das células T CD4+ aumenta as interleucinas IL-2 e IL17, IFN- γ e TNF- α . e IL 17 que atuam em diversos epítomos virais. A atuação da resposta imune humoral nesse contexto não é bem conhecida uma vez que, mesmo ausente, pode ocorrer o clareamento viral espontâneo (BALL et al., 2014). Já nas formas crônicas da infecção, há recrutamento de células T inespecíficas para o sítio da infecção (MISSALE et al., 1996; GRAKOUÏ et al., 2003; THIO, 2008). É provável que ocorra atuação de proteínas virais no processo de sinalização celular ou no bloqueio de funções celulares específicas da imunidade inata (HORNER&GALE, 2013).

Entre as células imunes inatas, as NK, abundantes no fígado, atuam diretamente na resposta imune antiviral através da produção de citocinas, como IFN- α , IFN- γ e TNF- α , de inibidores da replicação viral e da liberação de quimiocinas que participam diretamente do processo de

lise de hepatócitos infectados (DUSTIN & RICE, 2007). No entanto, o HCV, através de mecanismos de escape não completamente conhecidos, é capaz de inibir as funções dessas células (YOON et al., 2011).

As células dendríticas também atuam na produção de IFN e citocinas, mas algumas proteínas virais alteram as suas funções, cenário oposto ao encontrado nas situações de clareamento viral espontâneo (PELLETIER et al., 2010).

Os monócitos, macrófagos e as células de Kupffer, presentes em grande número no fígado, atuam na modelação dos processos de inflamação, imunidade e fibrose liberando citocinas como IL-10, IL-6, IL-12, TNF- α e TGF- β (BOLTJES et al., 2014).

Em síntese, a modulação do conjunto desses processos é importante para a resposta imune eficaz contra o HCV. No entanto, falhas ocorrem e resultam no escape e persistência da infecção viral.

A despeito de os hepatócitos serem o alvo principal do HCV, o vírus pode também interagir com outros fenótipos celulares, como monócitos, linfócitos, células endoteliais, eritrócitos e plaquetas. Essas associações podem afetar a disponibilidade do vírus circulante e influenciar na patogênese da infecção e na resposta do hospedeiro à terapia antiviral (DUSTIN & RICE, 2007).

O papel das citocinas, quimiocinas e seus receptores na fisiopatologia da hepatite C crônica tem sido progressivamente investigado. As citocinas são moléculas proteicas que atuam na diferenciação de células imunocompetentes e nos mecanismos efetores da resposta imune. São classificadas em citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-17A, IL-2, IL-15) ou reguladoras (IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13).

A IL-1 β atua na estimulação das células CD4⁺ para a proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos e monócitos/macrófagos. Já a IL-6 estimula a produção de proteínas de fase aguda da inflamação dos hepatócitos e atrai eosinófilos (HEINRICH et al., 1990). O TNF- α é mediador na defesa antiviral através da indução da síntese de macrófagos (AREND, 1991). A IL-12 e a IL-2 promovem proliferação celular e estão aumentadas na resposta imune inflamatória (ABBAS et al., 1999). Já o IFN- γ tem função imunomoduladora e atua na

estimulação de receptores IgG em macrófagos e monócitos (DE MAEYER & DE MAEYER-GUINARD, 1992). Por sua vez, a IL-17A atua na maturação preferencialmente de neutrófilos (FOSSIEZ et al., 1996), enquanto a IL-15 promove a produção de mastócitos (LEE et al., 1996).

Quanto às citocinas reguladoras, a IL-1ra atua na defesa antitumoral e antiviral, a IL-4 induz proliferação e diferenciação celular (LI et al., 2018) e a IL-5 age especificamente no crescimento e diferenciação de eosinófilos (CLUTTERBUCK et al., 1987). As células progenitoras são estimuladas pela IL-9, enquanto a IL-10 promove diminuição da resposta imunológica (BENJAMIN et al., 1992) e a IL-13 age inibindo a atividade quimiotática e fagocitária de monócitos e macrófagos (AMAN et al., 1996). As principais citocinas e suas funções estão mencionadas na tabela 1.

Tabela 1 – Principais citocinas e suas funções imunológicas

Citocina	Função	Referência
<i>INFLAMATÓRIAS</i>		
IL-1 β	Indução da síntese de quimiocinas, incluindo a IL-8 que é potente quimioatraente de neutrófilos	MITSUYAMA, 1994
IL-6	Diferenciação de linfócitos, proliferação celular	BARTON, 1997
TNF- α	Mediador na defesa antitumoral e antiviral. Atividades pró-inflamatória e citotóxica nos monócitos e macrófagos	CONNOLLY et al., 2009
IL-12	Ativação indireta da atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral dos macrófagos e promove atividade citolítica de células NK e células NK ativadas por linfocinas	KOBAYASHI, 1989
IFN- γ	Ativação de macrófagos, atua na maturação e diferenciação celular como das células NK	POYNARD et al., 2009
IL-15	Produzida por monócitos, tem função nas células T, regula o reparo tecidual, modula a inflamação e ativa células NK	PATIDAR et al., 2016
IL-17	Mantém a proliferação de progenitores hematopoiéticos e sua maturação preferencial em neutrófilos	FOSSIEZ et al., 1996
<i>REGULADORAS</i>		
IL-1 ra	Inibição específica da ativação celular mediada por IL-1a- e IL-1b no nível do receptor celular de IL-1	OPAL, 1996
IL-4	Atuação nas parasitoses e reações alérgicas, promove proliferação de linfócitos Th2, inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias	KELSO, 1995
IL-5	Atua nas parasitoses e reações alérgicas, fator específico de crescimento e diferenciação de eosinófilos, atua na estimulação de precursores e na ativação de eosinófilos	TAVERNIER et al., 1991
IL-9	Inibição da resposta imune por ação direta nas células inflamatórias e outras citocinas, como a IL-2	GALLAGHER, 2001
IL-10	Inibição da resposta imune, da produção de citocinas de monócitos/macrófagos e neutrófilos e inibe a resposta de linfócitos Th1	OPAL, et al., 1998
IL-13	Inibe a resposta quimiotática e fagocitária de monócitos	DE WAAL MALEFYT et al., 1993

Fonte: compilação de informações elaborada pela autora

Em razão da incapacidade de modulação da inflamação na infecção crônica pelo HCV, ocorre remodelamento do excesso da produção de citocinas, variável conforme o estágio da infecção.

Algumas citocinas são consideradas biomarcadores de progressão e gravidade da doença. Entre essas destaca-se o TNF- α que é associado ao desenvolvimento de resistência à insulina observada em pacientes com hepatite C crônica. Trata-se de uma citocina pró-inflamatória associada à evolução da fibrose hepática e ao desenvolvimento do CHC. Mais recentemente, a IL-6 também foi considerada biomarcador de progressão para a cirrose hepática (LI et al., 2018).

As quimiocinas pertencem à família das citocinas com funções seletivas de adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária. São pequenas moléculas com peso molecular variável entre 7 a 15kDa e estão envolvidas na inflamação e homeostasia celular. Juntamente com seus receptores, atuam no desencadeamento da resposta imune contra agentes invasores exercendo funções pró-inflamatória ou homeostática no controle da migração das células do sistema imune. São classificadas em duas famílias, CC e CXC. As pertencentes ao grupo CC atuam estimulando monócitos, basófilos, eosinófilos, linfócitos T e células NK, enquanto as da família CXC estimulam a quimiotaxia neutrofílica. Os seus receptores possuem expressões diferenciadas conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2–Famílias das quimiocinas CC e CXC

Quimiocina	Outros nomes	Receptor	Função imune
CCL1	I-309	CCR8	Tráfego de Th2 e Treg
CCL2	MCP-1	CCR2	Tráfego de monócitos
CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5	Migração macrófagos NH; interação célula T/DC
CCL4	MIP-1 β	CCR5	Migração macrófagos NH; interação célula T/DC
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	Migração macrófagos NH; interação célula T/DC
CCL6	C-10	Desconhecido	?
CCL7	MCP-3	CCR2, CCR3	Mobilização de monócitos
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	Resposta Th2
CCL9	MIP-1 γ	Desconhecido	?
CCL10	MIP-1 γ	Desconhecido	?
CCL11	Eotaxina	CCR3	Migração de eosinófilos e basófilos
CCL12	MCP-5	CCR2	Tráfego de monócitos
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3, CCR5	Resposta Th2
CCL14	HCC-1	CCR1	?
CCL15	HCC-2	CCR1, CCR3	?
CCL16	HCC-4	CCR1, CCR2, CCR5	?
CCL17	TARC	CCR4	Resposta Th2, migração de célula Th2, <i>Tregehogin</i> (endereçoamento) para pulmão e pele
CCL18	PARC	CCR5	Resposta Th2, marcador AAM e <i>homing</i> (endereçoamento) para a pele
CCL19	MIP-3 β	CCR7	Célula T/DC com <i>homing</i> (endereçoamento) para linfonodo
CCL20	MIP-3 α	CCR6	Resposta Th 17, célula B e DC com <i>homing</i> (endereçoamento) para tecido linfoide associado ao intestino
CCL21	SLC	CCR6, CCR7	Célula T e CD com <i>homing</i> (endereçoamento) para linfonodo
CCL22	MOC	CCR4	Resposta Th2, migração de célula Th2, migração de Treg
CCL23	MIP-3	Desconhecido	?
CCL24	Eotaxina-2	CCR3	Migração de eosinófilos e basófilos
CCL25	TECK	CCR9	<i>Homing</i> (endereçoamento) de célula T para intestino, migração de timócitos
CCL26	Eotaxina-3	CCR3, CX3CR1	Migração de eosinófilos e basófilos
CCL27	CTAK	CCR10	Célula T com <i>homing</i> (endereçoamento) para a pele

CCL28	MEC	CCR3, CCR10	Célula T e plasmócitos de IgA com <i>homing</i> (endereçamento) mucosa
CXCL1	GRO α	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL2	GRO β	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL3	GRO γ	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL4	PF4	?	Pró-coagulante
CXCL5	ENA78	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL7	NAP-2	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL9	MIG	CXCR3	Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK
CXCL10	IP-10	CXCR3	Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK
CXCL11	I-TAC	CXCR3	Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK
CXCL12	SDF-1	CXCR4	<i>Homing</i> (endereçamento) para medula óssea
CXCL13	BLC	CCR5	Posicionamento de célula B e Tfn no linfonodo
CXCL14	BRAK	?	<i>Homing</i> (endereçamento) de macrófagos para pele
CXCL15	Lungkine	?	?
CXCL16	5R-PSOK	CXCR6	Migração e sobrevivência de NKT e ILC
CXCL17	DMC	?	?
XCL1	SCM-1 α	XCR1	Apresentação cruzada por CD8+ DC
XCL2	SCM-1 β	XCR2	Apresentação cruzada por CD8+ DC
CX3CL1	Fractalquina	CX3CR1	Migração de NK, monócito e célula T

Fonte: Murphy et al., 2000.

Na hepatite C crônica, os níveis de quimiocinas variam de acordo com o estágio da doença e com a resposta ao tratamento (LI et al., 2018) e, por esta razão, algumas têm sido investigadas como biomarcadores tanto de progressão da doença quanto de resposta ao tratamento independentemente do esquema terapêutico utilizado.

Exemplo de potencial biomarcador é a quimiocina CXCL-10, amplamente investigada. Estudos tem revelado que esta quimiocina correlaciona diretamente com o estágio da doença (YOU et al., 2011; HARVEY et al., 2003). Além disso, níveis aumentados de CXCL-10 têm sido associados a resposta imune insuficiente para o clareamento viral, infecção crônica e mais inflamação hepática (ZEREMSKI et al., 2016).

1.6 - A modulação do sistema imune na hepatite C crônica durante o tratamento com os agentes antivirais de ação direta

O tratamento da hepatite C com os DAAs resulta em rápida eliminação viral e reequilíbrio da resposta antiviral inata (BURCHILL et al., 2017). No entanto, a dinâmica imunológica durante e após o tratamento ainda permanece pouco estudada.

Em recente estudo realizado no Brasil, ao analisar a evolução da resposta imune em pacientes tratados com DAAs que atingiram RVS, os autores observaram redução dos níveis séricos de quimiocinas e citocinas após o tratamento e melhora da função hepática (PEREIRA et al., 2019). No entanto, não houve reversibilidade completa da resposta imune, analisada pelo perfil de quimiocinas e citocinas 12 e/ou 24 semanas após o término do tratamento.

Resultado semelhante foi observado também por outros autores (HENGST, et al., 2016) que notaram restituição imune incompleta, quantificada por biomarcadores séricos após a cura virológica. Portanto, evidências são fortemente sugestivas de que a erradicação viral, conferida pelos DAAs, altera a resposta imune adaptativa e inata do hospedeiro, propiciando restauração da resposta adaptativa e funcional das células NK (SZEREDAY et al., 2020), alterando bruscamente o status dessas células que, durante a infecção viral crônica, estiveram em exaustão (MONDELLI, 2015).

Uma controvérsia amplamente discutida diz respeito à possibilidade do aumento da recorrência do CHC em pacientes cirróticos tratados com DAAs. Segundo alguns autores, alterações nos receptores de células NK (GHIRINGHELLI et al., 2006) ou a redução da atividade citolítica dessas células (CHU et al., 2017) induzidas pelos DAAs seriam responsáveis pela redução da vigilância imunológica contra células cancerígenas. No entanto, é consenso que o tratamento da hepatite C é eficaz para reduzir a incidência de CHC, mas não erradicar o risco (KANWAL et al., 2017). Assim, pacientes com RVS tratados com IFNs tiveram redução do risco de CHC de 6.2 para 1.5% comparados aos não respondedores (MORGAN et al., 2013) e, mais recentemente, a redução do risco tem sido observada naqueles tratados com DAAs (KANWAL et al., 2017), a despeito da fibrose mais avançada nestes pacientes comparada à dos que foram tratados na era dos IFNs (NAHON et al., 2018).

1.7 - Justificativa

O cenário atual da disponibilidade dos DAAs, capazes de erradicar a infecção pelo HCV na maioria dos pacientes com hepatite C crônica, tem oferecido oportunidade única para analisar as modificações no sistema imune causadas pela rápida eliminação viral. Assim, o maior conhecimento da cinética temporal e qualitativa dos biomarcadores neste contexto poderá contribuir para ampliar a compreensão do processo de remodelação imunológica desencadeada pelos DAAs e servir de subsídio para novos campos de investigação clínica.

1.8 – Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. *Imunologia celular e molecular*, 8ed. **Rio de Janeiro: Elsevier**, 2015. p 10-66.

AMAN, M.J.; TAYEBI, N.; OBIRI, N.I.; et al. cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. **J. Biol. Chem.**; 271:29265–29270, 1996.

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES AND THE INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. **Hepatology**; 62:932-954, 2015.

AREND, W.P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **J Clin. Invest.**; 88:1445–145, 1991.

BARTON, B.E. IL-6: insights into novel biological activities. **Clin. Immunol. Immunopathol.**; 85:16-20, 1997.

BENJAMIN, D., KNOBLOCH, T. J., DAYTON, M. A. Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. **Blood**; 80: 1289–1298, 1992.

BENZAKEN, Adele Schwartz et al. Hepatitis C disease burden and strategies for elimination by 2030 in Brazil. A mathematical modeling approaches. **Braz J Infect Dis**; 23: 182-190. 2019.

BOLTJES, A.; MOVITA, D.; BOONSTRA, A.; et al. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. **J. Hepatol.**; 61:660-671, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – **Brasília: Ministério da Saúde**, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções – Relatório de Recomendação. **Brasília: Ministério da Saúde**; p. 89, 2015.

BRASIL, 2019. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Brasília: Ministério da Saúde**, p. 68, 2019.

BURCHILL, M.A.; ROBY, J.A.; CROCHET, N.; et al. Rapid reversal of innate immune dysregulation in blood of patients and livers of humanized mice with HCV following DAA therapy. **PLoS One**; 2017;12: e0186213, 2017.

CHILD, C.; TURCOTTE, J. Surgery and portal hypertension. **Major Probl. Clin. Surg.**, 1:1-85, 1964.

CHU, P.S.; NAKAMOTO, N.; TANIKI, N.; et al. On-treatment decrease of NKG2D correlates to early emergence of clinically evident hepatocellular carcinoma after interferon-free therapy for chronic hepatitis C. **PLoS One**;12: e0179096, 2017.

CLUTTERBUCK, E.; SHIELDS, J. G.; GORDON, J.; et al. Recombinant human interleukin 5 is an eosinophil differentiation factor but has no activity in standard human B cell growth factor assays. **Eur. J. Immunol.**; 17:1743-1750, 1987.

CONNOLLY, M. K.; BEDROSIAN, A. S.; MALLEEN, St Clair. J.; et al. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha. **J. Clin. Invest.**;119:3213-3225, 2009.

DE MAEYER E.; DE MAEYER-GUIGNARD J. Interferon-gamma. **Curr. Opin. Immunol.**; 4:321-326, 1992.

DE WAAL MALEFYT, R.; FIGDOR, C.G., HUIJBENS, R.; et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. **J. Immunol.**; 151:6370-6381, 1993.

DI BISCIGLIE, A.M.; GOODMAN, Z.D.; ISHAK, K.G. Long-term clinical and histopathological follow up of chronic post-transfusion hepatitis. **Hepatology**; 14:969-974, 1991.

DI BISCEGLIE, A.M. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. **Hepatology**; 31:1014-1018, 2000.

DUSTIN, L.B; RICE, C.M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. **Annual Rev. Immunol.**; 25: 71-99, 2007.

DUSTIN, L.B.; BARTOLINI, B.; CAPOBIANCHI, M.R.; et al. Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy. **Clin. Microbiol. Infect.**; 22:826-832, 2016.

DUSTIN, Lynn B. Innate and Adaptive Immune Responses in Chronic HCV Infection. **Curr. Drug. Targets**; 18:826-843, 2017.

FOSSIEZ, F.; DJOSSOU, O.; CHOMARAT, P.; et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **J. Exp. Med.**; 183:2593-2603, 1996.

GALLAGHER, G. Interleukin 19, an inhibitory cytokine. **Genes & Immunity**; 1:442-450, 2001.

GHIRINGHELLI, F.; MENARD, C.; MARTIN, F.; et al. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. **Immunol. Rev.**; 214:229–238, 2006.

GILEAD SCIENCES, 2019. https://www.gilead.com/-/media/files/pdfs/other/sovaldi_bula-ao-paciente.pdf?la=en&hash=F544D934162CA8211A724837DDAB72AC. Acesso em 06 de novembro de 2020.

GOWER, E.; ESTES, C.; BLACH, S.; et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **J. Hepatol.**; 61: S45-S57, 2014.

GRAKOU, A.; SHOUKRY, N.H.; WOOLLARD, D.J.; et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. **Science**; 302:659-662, 2003.

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

HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem. J.**; 265:621–636, 1990.

HENGST, J.; FALK, C.S.; SCHLAPHOFF, V.; et al. 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.**; 214:1965-1974, 2016.

HORNER, S.M.; GALE, M. Jr. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. **Nat. Med.**; 19:879-888, 2013.

JACOBSON, I.M.; MCHUTCHISON, J.G.; DUSHEIKO, G.; et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.**; 364:2405-2416, 2011.

KANWAL, F.; KRAMER, J.; ASCH, S.M.; CHAYANUPATKUL, M.; CAO, Y.; EL-SERAG, H.B. Risk of hepatocellular cancer in HCV patients treated with direct-acting antiviral agents. **Gastroenterology**; 153: 996-1005, 2017.

KEATING, G.M. Sofosbuvir: a review of its use in patients with chronic hepatitis C. **Drugs**; 74:1127-1146, 2014.

KELSO, A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? **Immunol. Today**; 16: 374-379, 1995.

KIRBY, B.J., SYMONDS, W.T.; KEARNEY, B.P.; et al. Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Drug-Interaction Profile of the Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Inhibitor Sofosbuvir. **Clin. Pharmacokinet.**; 54:677-690, 2015.

KOBAYASHI M, FITZ L, RYAN M, HEWICK RM, CLARK SC, CHAN S, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J. Exp. Med.**; 170: 827-45, 1989.

KOFF, R. S. The efficacy and safety of sofosbuvir, a novel, oral nucleotide NS 5B polymerase inhibitor, in the treatment of chronic hepatitis C virus infection. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**; 39:478-487, 2014.

LAPA, D.; GARBUGLIA, A.R.; CAPOBIANCHI, M.R.; DEL PORTO, P. Review Hepatitis C Virus Genetic Variability, Human Immune Response, and Genome Polymorphisms: Which Is the Interplay? **Cells**; 8: E305, 2019.

LAUER, G. M.; WALKER, B.D. Hepatitis virus infection. **N. Engl. J. Med.**; 345: 41-52, 2001.

LEE, Y.B.; SATOH J.; WALKER, D.G.; et al. Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. **Neuro Report.**; 7:1062–1066, 1996.

LI, H.; HUANG, M.H.; JIANG, J.D.; et al. Hepatitis C: From inflammatory pathogenesis to anti-inflammatory/hepatoprotective therapy. **World J. Gastroenterol.**; 24:5297-5311, 2018.

MENEZES, E., COELHO-DOS-REI, JG, Cardoso L; LOPES-RIBEIRO Á; JONATHAN-GONÇALVES J, PORTO GONÇALVES MT, CAMBRAIA RD, SOARES EB, SILVA LD, PERUHYPE-MAGALHÃES V, Rios M, CHANCEY C, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, TEIXEIRA R. Strategies for serum chemokine/cytokine assessment as biomarkers of therapeutic response in HCV patients as a prototype to monitor immunotherapy of infectious diseases. **Antiviral Res.** 141: 19-28, 2017.

MISSALE, G.; BERTONI, R.; LAMONACA, V.; et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. **J. Clin. Invest.**;98:706-714, 1996.

MITSUYAMA, K.; TOYONAGA, A.; SASAKI, E.; WATANABE, K.; TATEISHI, H.; NISHIYAMA, T. et al. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Clin. Exp. Immunol**; 96:432-436, 1994.

MONDELLI, M.U. Direct-Acting Antivirals Cure Innate Immunity in Chronic Hepatitis C. **Gastroenterology**;149:25-28, 2015.

MORGAN, R.L.; BAACK, B.; SMITH, B.D.; YARTEL, A.; PITSI, MM.; FALCK-YTTER, Y. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. **Ann. Intern. Med.**; 158: 329-337, 2013.

MURPHY, P.M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I.F.; et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol. Rev.**; 52:145-76, 2000.

NAHON, P.; LAYESE, R.; BOURCIER, V.; et al. Incidence of hepatocellular carcinoma after direct antiviral therapy for HCV in patients with cirrhosis included in surveillance programs. **Gastroenterology**; 155:1436-1460, 2018.

OLYSIO (simeprevir). **Janssen Products – LP**, 2013. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/205123s001lbl.pdf. Acesso em 19 out. 2019.

OPAL, S.M.; WHERRY, J.C.; GRINT, P. Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. **Clin. Infect. Dis.**; 27:1497-1507, 1998.

OPAL SM. Interleukin-1 receptor antagonist in sepsis. In: Bodmer M, Henderson W, eds. Therapeutic modulation of the cytokines. London, UK: **CRC Press.**; 196–219, 1996.

PAGGI, S.; COLLI, A.; VIGANÒ, M.; et al. A non-invasive algorithm accurately predicts advanced fibrosis in hepatitis C: a comparison using histology with internal external validation. **J. Hepatol.**; 49: 564-571, 2008.

PATIDAR, M.; YADAV, N.; DALAI, S.K. Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. **Cytokine Growth Factor Rev.**; 31: 49-59, 2016.

PELLETIER, S.; DROUIN, C.; BÉDARD, N.; et al. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. **J. Hepatol.**; 53, 805–816, 2010.

PEREIRA, G.L.; TARRAGÔ, A.M.; NEVES, W.L.L.; et al. Immunological dynamics associated with direct-acting antiviral therapies in naive and experimented HCV chronic-infected patients. **Mediators Inflamm.**; 5:1-11, 2019.

POL, S.; COROUGE, M.; VALLET-PICHARD, A. Daclatasvir-sofosbuvir combination therapy with or without ribavirin for hepatitis C virus infection: from the clinical trials to real life. **Hepat, Med.**; 8:21-26, 2016.

POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. **Lancet Gastroenterol. Hepatol.**; 2:161-176, 2017.

POORDAD, F.; MCCONE, J. Jr.; BACON, B.R.; et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. **N. Engl. J. Med.**; 364:1195-1206, 2011.

POYNARD, T.; COLOMBO, M.; BRUIX, J.; et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin: effective in patients with hepatitis C who failed interferon alfa/ribavirin therapy. **Gastroenterology**; 136:1618-28, 2009.

REHERMANN, B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. **Semin. Liver. Dis.**; 20:127-141, 2000.

SCHINAZI, R.; HALFON, P.; MARCELLIN, P.; et al. HCV direct-acting antiviral agents: the best interferon-free combinations. **Liver Int.**; 34: 69-78, 2014.

SPEARMAN, C. W.; DUSHEIKO, G.M.; HELLARD, M.; SONDERUP, MARK. Hepatitis C. **Lancet**, 394: 1451-1466, 2019.

SZEREDAY, L.; MEGGYES, M.; BERKI, T.; et al. Direct-acting antiviral treatment downregulates immune checkpoint inhibitor expression in patients with chronic hepatitis C. **Clin. Exp. Med.**; 20:219-230, 2020.

TAVERNIER, J.; DEVOS, R.; CORNELIS, S.; et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL-5) is composed of an IL-5-specific a chain and a b chain shared with the receptor for GM-CSF. **Cell**; 66: 1175-1184, 1991.

THE METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP. AN ALGORITHM FOR THE GRADING OF ACTIVITY IN CHRONIC HEPATITIS C. **Hepatology**; 24:289-293, 1996.

THIO, C. L. Host genetic factors and antiviral immune responses to HCV. **Clin. Liver. Diseases**; 12:713-727, 2008.

TONG, X., LE POGAM, S.; LI, L. et. al. *In vivo* emergence of a novel mutant L159F/L320F in the NS5B polymerase confers low-level resistance to the HCV polymerase inhibitors mericitabine and sofosbuvir. **J. Infect. Dis.**; 209:668-675, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. No authors. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. **World health organization**, 2014. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK263483>. Acesso em 06 Out 2020.

YOON, J.C.; LIM, J.B.; PARK, J.H.; et al. Cell-to-cell contact with hepatitis C virus-infected cells reduces functional capacity of natural killer cells. **J. Virol.**;85:12557-12569, 2011.

YOU, C. R.; PARK, S. H.; JEONG, S.W.; et al. Serum IP-10 Levels Correlate with the Severity of Liver Histopathology in Patients Infected with Genotype-1 HCV. **Gut Liver**; 5:506-512, 2011.

ZEREMSKI, M.; DIMOVA, R.B.; PILLARDY, J.; et al. Fibrosis Progression in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. **J. Infect. Dis.**; 214:1164-1170, 2016.

ZEUZEM, S.; ANDREONE, P.; POL, S.; et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. **N. Engl. J. Med.**; 364:2417-2428, 2011.

2. OBJETIVOS

2.1 - Geral

Analisar os perfis cinéticos séricos de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias/regulatórias e fatores de crescimento em pacientes com hepatite C crônica tratados com os agentes antivirais de ação direta combinados sofosbuvir e simeprevir ou daclatasvir.

2.2 – Específicos

- Quantificar mediadores imunológicos séricos em pacientes com hepatite C crônica antes do tratamento com DAAs;
- Analisar o efeito tempo-dependente dos mediadores imunológicos séricos em pacientes com hepatite C crônica antes, durante e após o tratamento com DAAs;
- Investigar a influência de fatores clínicos e laboratoriais na cinética de mediadores imunológicos séricos em pacientes com hepatite C crônica tratados com DAAs;

3. MÉTODOS

3.1 - Caracterização dos participantes da pesquisa

Cinquenta pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica (33 masculinos e 17 femininos), média de idade de 61 anos (DP=9,88, idade mínima de 40 e máxima de 81 anos) com indicação de tratamento da hepatite C com DAAs, foram consecutivamente incluídos em investigação longitudinal nos anos de 2016 e 2017. Os períodos analisados foram pré-tratamento (basal, n=50), durante (2-4 semanas, n=43 e 8-12 semanas, n=30) e após o tratamento (12-24 semanas, n=24). O tamanho amostral, de conveniência, teve como base estudo prévio publicado pelos autores (MENEZES et al., 2017).

Os critérios de exclusão foram coinfeção com HBV ou HIV, cirrose descompensada, CHC, concomitância de doenças autoimunes hepáticas ou sistêmicas, uso de drogas imunossupressoras ou imunobiológicos. Quinze indivíduos não infectados, doadores de sangue, (três homens e 12 mulheres), média de idade de 43 anos (23-59 anos) constituíram o grupo controle.

Para a avaliação do tempo estimado de infecção pelo HCV, considerou-se a data aproximada do fator de risco principal informado pelo paciente. Estimou-se o tempo mínimo de sete anos, máximo de 55 anos, média e mediana de 31 e 30 anos, respectivamente. Vinte e seis por cento dos pacientes não souberam informar a respeito.

Trinta e oito pacientes (76%) realizaram o primeiro tratamento da hepatite C com DAAs, enquanto 11 (22%) eram não respondedores ou recidivantes ao tratamento prévio com PEG-IFN associado à ribavirina e um (2%) foi intolerante ao esquema tríplice de PEG-IFN, ribavirina e telaprevir, razão pela qual foi suspenso antes do término do tratamento. O período entre o tratamento prévio e o retratamento com os DAAs foi mínimo de três anos.

Trinta e três pacientes (66%) foram classificados como cirróticos pela análise conjunta de dados clínicos e exames complementares disponíveis (função hepática, FIB4 \geq 3.75, ultrassonografia abdominal/endoscopia digestiva alta com evidências de hepatopatia crônica com ou sem sinais de hipertensão portal. Trinta e um pacientes haviam sido previamente submetidos a biópsia hepática (não para a finalidade do estudo) e as lâminas de biópsia foram

revistas e classificadas pelo escore METAVIR, como previamente descrito. Todos os pacientes diagnosticados com cirrose hepática foram classificados pelo escore Child-Pugh como A5 (n=24, 73%) ou A6 (n=9, 27%).

Exames laboratoriais realizados no período pré-tratamento incluídos na análise foram a alanina aminotransferase (ALT) e a contagem de plaquetas. Os valores de ALT variaram entre 19 a 263 U/L sendo que 33/50 (66%) pacientes apresentaram valores acima do limite superior de normalidade do laboratório local (69 U/L). A contagem de plaquetas variou entre 45.000 a 501.000/mm³, e 29/50 (58% dos pacientes) apresentaram contagem menor que 150.000/mm³.

Os esquemas de DAAs empregados foram as combinações de sofosbuvir e daclatasvir (n=17), sofosbuvir, daclatasvir e ribavirina (n=19) e sofosbuvir e simeprevir (n=14). A duração do tratamento foi de 12 semanas (critérios clínicos estabelecidos pelos médicos assistentes de acordo com o PCDT 2015). Não houve suspensão ou redução de dose dos esquemas terapêuticos durante o tratamento. Todos os pacientes apresentaram RVS.

As características demográficas e clínicas dos participantes da pesquisa estão sumarizadas na tabela 3.

Tabela 3 – Características clínicas e demográficas dos participantes com hepatite C crônica tratados com os agentes antivirais de ação direta sofosbuvir e daclatasvir ou simeprevir

Parâmetros clínicos e laboratoriais	n	%
Gênero (n=50)		
Masculino/feminino	33/17	66/34
Fator de risco (exposição) para transmissão do HCV (n=50)		
Transusão sanguínea	11	22
Injeções de risco	11	22
Uso de drogas ilícitas	5	10
Outros/desconhecidos	23	46
ALT*		
≤69 U/L	17	34
≥69 U/L	33	66
Plaquetas		
≤ 150.000/mm ³	29	58
≥ 150.000/mm ³	21	42
Cirrose	33	66
Biópsia hepática – escore METAVIR (n=31)		
F0/F1	1/1	3/3
F2	5	16
F3	4	13
F4	20	65
Classificação Child-Pugh (n=33)		
A5/A6	24/09	73/27
Genótipo do HCV (n=50)		
1a/1b	16/24	32/48
2/3	3/7	6/14
Esquemas de DAAs – 12 semanas (n=50)		
sofosbuvir e daclatasvir	17	34
sofosbuvir, daclatasvir e ribavirina	19	38
sofosbuvir e simeprevir	14	28

*Limite superior de ALT = 69 U/L.

3.2 - Amostras biológicas

Quatro amostras de sangue em veia periférica foram colhidas de cada participante nos seguintes períodos: pré-tratamento (intervalo máximo de 30 dias antes do início do tratamento), durante (entre 2-4 e 8-12 semanas) e após o tratamento (entre 12-24 semanas).

Para a obtenção do soro, as amostras de sangue total foram colhidas em tubos sem anticoagulante e centrifugadas (200x g a 4°C por 20 minutos). Fracionaram-se as amostras de soro em alíquotas de 1mL que foram armazenadas em microtubos a -80°C até a sua utilização.

3.3 - Locais de realização da pesquisa

A inclusão dos participantes e o processamento das amostras biológicas ocorreu no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG (AHEV/IAG/HC/UFMG) e no Laboratório de Hepatites Virais da Faculdade de Medicina da UFMG, respectivamente. Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) da Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ –Instituto René Rachou – IRR, em Belo Horizonte (MG).

3.4 - Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG e da Fundação Oswaldo Cruz (CAAE11830412.4.0000.5149 e aditivo CAAE 15732513.0.1001.5149). Todos os participantes (pacientes e voluntários não infectados) assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo CEP/UFMG.

3.5 - Procedimentos experimentais

3.5.1 - Dosagem de biomarcadores solúveis

Para determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas, alíquotas de 50 µL de soro foram adicionadas a 50 µL da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais

anti-citocinas/quimiocinas de interesse e incubadas por 90 minutos à temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz.

Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com tampão fosfato salínico (PBS), centrifugadas e o sobrenadante cuidadosamente descartado. As esferas foram, então, reincubadas na presença do coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas/quimiocinas humanas conjugados com biotina e estreptavidina-PE, por 90 minutos, à TA e ao abrigo da luz. Em seguida, as esferas foram novamente lavadas com solução tampão, centrifugadas e o sobrenadante cuidadosamente descartado. Posteriormente, as esferas foram ressuspensas em PBS e avaliadas em citômetro de fluxo (Bioplex 200, Luminex, USA).

A quantificação dos biomarcadores solúveis sistêmicos, realizada na plataforma *Luminex Bio-Plex Pro™ human cytokines 27* (Bio-Rad Laboratories, California, EUA), permitiu a pesquisa dos respectivos analitos: quimiocinas [CXCL8 (IL-8), CCL11 (eotaxina), CCL3 (Proteína 1 alfa inflamatória de macrófagos, *macrophage inflammatory protein 1 α* - MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL2 (Proteína 1 quimiotática de monócitos, *monocyte chemotactic protein 1* - MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL10 (proteína 10 induzida por interferon, *IFN-inducible protein-10* - IP-10)], fatores de crescimento [IL-7, fator de crescimento básico de fibroblastos, *basic fibroblast growth factor* - FGF-basic), fator de crescimento BB derivado de plaquetas, *platelet-derived growth factor BB* - PDGFBB), fator de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelial growth factor* - VEGF), fator estimulador de colônias granulocíticas (*granulocyte colony stimulating factor* - G-CSF) e fator estimulador de colônias granulocíticas-macrofágicas (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*- GM-CSF)], citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70, IFN- γ , IL-17A, IL-2, IL-15) e citocinas reguladoras (IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13). Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.5.2 Etapas do desenvolvimento da análise estatística e assinatura de biomarcadores

Inicialmente comparou-se o perfil de biomarcadores de pacientes com HCV no período pré-tratamento com o de participantes do grupo controle não infectados para avaliar o perfil panorâmico dos mediadores séricos.

Em seguida, comparou-se a cinética de biomarcadores de pacientes com hepatite C crônica durante e após o tratamento, utilizando-se como marcos de tratamento as semanas dois a quatro e oito a doze e, após o término do tratamento, as semanas 12 ou 24. Para esta avaliação, utilizou-se a estratégia de *baseline folds*, isto é, a dobra da linha de base, sendo calculado o valor do determinado biomarcador antes do tratamento *versus* o valor do biomarcador nos diversos tempos de tratamento e após o tratamento (MENEZES E.G. 2017).

Juntamente ao *baseline folds*, utilizou-se a estratégia de representação dos valores em escala de cores para a classificação e visualização do perfil inflamatório. Assim, valores de 0,1 até 0,99 foram representados por gradações da cor verde, valor 1 representado pelo preto e valores de 1,1 até 1,4 por gradações de vermelho. A cor verde representa valores menores do biomarcador comparado ao valor observado no pré-tratamento, a preta sinaliza que não houve diferença significativa nos distintos tempos de tratamento comparados ao pré-tratamento, e a vermelha representa valores aumentados de biomarcadores quando comparados ao pré-tratamento.

A estratégia de *baseline folds* foi também utilizada para analisar o perfil de biomarcadores em relação a valores laboratoriais, notadamente de ALT e plaquetas antes e após o tratamento, e em relação à presença ou ausência de cirrose no pré-tratamento. O valor de ALT foi subdividido abaixo e acima do valor de referência do Hospital das Clínicas da UFMG (69UL). Igual metodologia foi empregada para os valores de plaquetas (maiores ou menores que 150.000 mm³).

Procedeu-se à análise comparativa entre dois grupos pelos testes t de Student ou Mann-Whitney de acordo com a distribuição dos dados. As comparações múltiplas entre os subgrupos foram realizadas pelo ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para comparar todos os pares das colunas.

Os dados também foram compilados como perfis de mapa de calor, ou *heatmaps*, para visualização do perfil quantitativo dos biomarcadores. A análise das assinaturas dos biomarcadores e dos *heatmaps* considerou todos os pacientes com HCV, a categorização dos valores basais de ALT e plaquetas, e a presença de cirrose. Utilizou-se software GraphPad Prism (versão 8.01, San Diego, CA, EUA) para formatação, análise estatística e artes gráficas. Os mapas de calor foram obtidos pelo software Microsoft Excel (Microsoft Office 365®, EUA).

Devido à impossibilidade de se obter amostras pareadas dos mesmos pacientes em todos os tempos analisados, optou-se pela análise conjunta de soros disponíveis nos diversos tempos do estudo.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho publicado na revista Antiviral Research (fator de impacto: 4.101, Qualis A1) em 19 de abril de 2021.

Remodeling of immunological biomarkers in patients with chronic hepatitis C treated with direct-acting antiviral therapy

Isabela Gomes Ribeiro^{1,2,3#}; Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis^{3,4#}; Jordana Rodrigues Barbosa Fradico^{3#}; Ismael Artur da Costa-Rocha^{3#}; Luciana Diniz Silva^{1,2,5}; Lucy Ana dos Santos^{1,2}; Rhaissa Carvalho Said Stancioli^{1,2}, Andréa Teixeira-Carvalho³, Olindo Assis Martins-Filho^{3*} & Rosângela Teixeira^{1,2,5}

¹Pós-graduação em Ciências Aplicadas da Saúde do Adulto, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

²Ambulatório de Hepatites Virais, Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas/ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

These authors contributed equally to the work.

***Corresponding authors:**

Olindo Assis Martins Filho

Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, FIOCRUZ/Minas.

Avenida Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP 30190-002.

Email address: oamfilho@gmail.com/oassismartins@gmail.com

Rosângela Teixeira

Faculdade de Medicina da UFMG

Avenida Alfredo Balena, 190/257

30.130-100 – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Email address: teixeira@medicina.ufmg.br/teixeira.ufmg@gmail.com

Abstract

The HCV treatment with DAAs has offered a unique opportunity to analyze the changes in the immune system caused by the rapid inhibition of viral replication. We sought to analyze the kinetics profiles of serum biomarkers (Luminex™) in fifty patients with chronic hepatitis C enrolled in a longitudinal investigation carried out before (baseline), during (W2-4 and W8-12 weeks) and post-treatment (W12-24 weeks) with sofosbuvir plus daclatasvir or simeprevir. The results demonstrated a clear biomarker storm in HCV patients at baseline. The kinetics timeline of baseline fold changes upon DAAs treatment revealed an early decline of CXCL8, CCL4, IL-6, IL-15, IL-17, IL-9, GM-CSF and IL-7 at W8-12 and a late remodeling of CCL3, CCL2, CCL5, IL1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL1-Ra, IL-4, IL-10, IL-13, PDGF, VEGF, G-CSF at W12-24. Our data demonstrated that HCV treatment with DAAs resulted in a clear remodeling of the serum biomarker storm, hallmark of untreated HCV patients. High ALT (>69U/L), low platelet (<150,000/mm³) and cirrhosis status at baseline were factors related to delayed immune response remodeling, as well as, in the kinetics of baseline fold changes in serum biomarkers. These findings added novel evidence for the immunological remodeling process triggered by DAAs.

Keywords: HCV; Hepatitis C; Luminex; treatment; DAAs; biomarker storm

Introduction

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is the leading factor for end-stage liver disease and liver cancer [1]. It is estimated 71million people worldwide with chronic hepatitis C, which represents a serious public health problem [2]. The World Health Organization (WHO) initiated a global agenda to eliminate HCV infection until 2030, however few countries have been able to implement the actions required for HCV eradication within the following ten years [2, 3].

The HCV is a hepatotropic, non-cytopathic virus, consisting of structural proteins (core protein and envelope proteins 1 and 2), non-structural proteins (NS2 to NS5), and a protein of unknown function (p7) [4, 5]. As opposed to other hepatotropic virus such as hepatitis B virus (HBV), HCV remains with poor prophylactic strategy as it still lacks an efficacious vaccine [6].

HCV therapy has changed fundamentally since 2013. Interferon (IFN)-free direct-acting antiviral therapies (DAAs) result in rapid HCV clearance in infected patients. The sustained virologic response (SVR), the measure of DAAs efficacy, occurs in almost hundred per cent of treated patients with these drugs. There are three different classes of DAAs based on the specific viral protein they target: NS3/4A protease inhibitors (simeprevir, paritaprevir, grazoprevir, voxilaprevir and glecaprevir), NS5A inhibitors (daclatasvir, ledipasvir, ombitasvir, elbasvir, velpatasvir, and pibrentasvir) and NS5B polymerase inhibitors (sofosbuvir and dasabuvir), which block replication of viral RNA [7].

The HCV treatment with DAAs has offered a unique opportunity to analyze the changes in the immune system of the host caused by the rapid inhibition of viral replication. As abrupt changes in the immune system may occur, important issues related to post-treatment has raised recently as the hepatitis B reactivation [8] and the increased risk of recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) [9].

The knowledge of timing and quality of immune response remodeling upon DAAs can provide relevant evidence to support novel fields of clinical investigation. Hence, we sought to analyze the kinetics profiles of serum chemokines, pro-inflammatory/regulatory cytokines, and growth factors in patients with chronic hepatitis C upon DAAs treatment.

Results

Serum biomarker levels in patients with chronic Hepatitis C before DAAs treatment.

The overall profile of serum chemokines, pro-inflammatory and regulatory cytokines along with growth factors in chronic hepatitis C patients before DAAs treatment (HCV) are shown beside non-infected healthy controls (NI) in Figure 1. Distinct profiles were identified for clusters of biomarkers as they displayed decreased, increased or unaltered levels in HCV patients as compared to NI. Data analysis demonstrated a conspicuous and robust storm of serum biomarkers, characterized by a massive and significant increase in chemokines (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL2, CXCL10), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-17) and growth factors (FGF-basic, PDGF, GM-CSF, IL-7) with a small increase in regulatory cytokines (IL-9, IL-13) compared to non-infected healthy controls.

Timeline kinetics of serum biomarkers in patients with chronic Hepatitis C upon DAAs treatment

The time-dependent effect of DAAs treatment on serum biomarkers of patients with chronic Hepatitis C is reported as baseline fold changes in Figure 2. Distinct patterns were identified for clusters of biomarkers as they displayed kinetic curves with early decrease during DAAs treatment (W8-12), late decrease at 12-24 weeks post-treatment (POST) or unaltered levels throughout treatment timeline. In details, early decline in CXCL8, CCL4, IL-6, IL-15, IL-17, IL-9, GM-CSF and IL-7 levels was observed W8-12, while downward remodeling of CCL3, CCL2, CCL5, IL-1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL1-Ra, IL-4, IL-10, IL-13, PDGF, VEGF, G-CSF was reached later at 12-24 weeks post-treatment. Unaltered levels of CCL11, CXCL10, IL-5, FGF-basic and IL-2 were observed throughout the timeline kinetics (Figure 2).

Kinetics of serum biomarker signatures in patients with chronic Hepatitis C upon DAAs treatment

The biomarker signatures assembled as ascendant median values of baseline fold changes at distinct time-points upon DAAs treatment (2-4 and 8-12 weeks during DAAs treatment as well as at 12-24

weeks post DAAs treatment) are shown in Figure 3. Biomarkers were clustered at each time-point as they presented decreased, unaltered or increased baseline fold changes upon DAAs treatment. The results demonstrated a progressive shift towards decreased baseline fold change values from W2-4 to POST (Figure 3A). Heatmap profiles further illustrate these findings (Figure 3B). The combined analysis of biomarkers with unaltered or increased baseline fold changes along timeline kinetics is underscored in Figure 3B. Data revealed that while several biomarkers still remain unaltered/increased (TNF- α , IL-15, CCL2, IL-13, IL-1Ra, FGF-basic, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, CCL11, IL-12, IL-6, PDGF, VEGF) at W2-4, a small number of biomarkers displayed unaltered/increased profiles at W8-12 (VEGF, TNF- α , IL-5, IL-4, PDGF, CCL11) and POST (IL-5, CCL11).

Association of ALT levels and platelet counts at pre-treatment baseline with the timeline kinetics of serum biomarkers in patients with chronic hepatitis C upon DAAs treatment

Further analysis was carried out to verify whether the pre-treatment laboratorial records (ALT levels and platelet counts) was associated with the immunological remodeling of serum biomarkers in patients with chronic hepatitis C upon DAAs treatment. For this purpose, HCV patients were categorized into subgroups, referred as: ALT < 69 U/L vs ALT > 69 U/L and platelet counts < 150,000/mm³ vs platelet counts > 150,000/mm³. Biomarkers were clustered at each time-point as they displayed decreased, unaltered or increased baseline fold changes along the timeline kinetics.

The results demonstrated that elevated ALT levels at pre-treatment (>69 U/L) have a clear association with the biomarker signatures of HCV patients upon DAAs treatment. Noteworthy was that, HCV patients with lower ALT levels at baseline (< 69 U/L) presented an early and progressive decrease in the baseline fold changes of several biomarkers. While unaltered/increased biomarker profile composed of IL-12, CCL2, IL-1Ra, IL-4, IL-5, CCL11, IL-6, TNF- α , IFN- γ and PDGF was observed at W2-4, a reduced number of biomarkers displayed unaltered/increased profiles at W8-12 (TNF- α , IL-5, CCL11, IL-4, PDGF, CCL5) with total remission of unaltered/increased biomarkers at 12-24 weeks post-treatment (POST) (Figure 4B). Conversely, those patients with elevated ALT levels at baseline (> 69

U/L) exhibited higher number of unaltered/increased biomarkers at W2-4 and at W8-12, of which IL-5 and CCL11 profiles still remained unaltered even at 12-24 weeks post-treatment (Figure 4B).

As opposed to the association observed for ALT, low platelet count at pre-treatment baseline ($< 150,000/\text{mm}^3$) was associated with late shift on the pro-inflammatory profile towards baseline fold changes < 1 (Figure 5A). Indeed, those patients with platelet count $< 150,000/\text{mm}^3$ presented at W2-4 unaltered/increased biomarker profile comprised of TNF- α , GM-CSF, CCL3, IL-10, CCL2, IL-1Ra, IL-5, FGF-basic, IL-4, IL-15, CCL11, IFN- γ , IL-1 β , IL-12, IL-6, PDGF and VEGF. A late shift was observed at W8-12 and at 12-24 weeks post-treatment (Figure 5B). On the other hand, those patients with higher platelet count at baseline ($> 150,000/\text{mm}^3$) exhibited lower number of unaltered/increased biomarkers yet at W2-4 (Figure 5B).

Association of cirrhosis status at baseline with the timeline kinetics of serum biomarkers in patients with chronic hepatitis C upon DAAs treatment

To verify whether the cirrhosis status at pre-treatment baseline was associated with the immunological recovery of serum biomarkers in patients with chronic hepatitis C upon DAAs treatment, HCV patients were categorized into subgroups, referred as: non-cirrhosis and cirrhosis. The pre-treatment cirrhosis status was based on the conjunction of clinical evaluation and non-invasive complementary exams described in Methods.

Data analysis demonstrated that cirrhotic patients have a distinct biomarker signature upon DAAs treatment as compared to non-cirrhotic. While non-cirrhotic patients showed an early change in the pro-inflammatory profile towards baseline fold changes < 1 , the cirrhotic patients displayed a late shift of pre-treatment serum pro-inflammatory microenvironment (Figure 6).

Overall profile of unaltered or increased serum biomarkers according to the pre-treatment laboratorial and clinical records of patients with chronic hepatitis C at W2-4 upon DAAs treatment

Aiming at identifying the impact of baseline laboratorial and clinical records on serum biomarkers observed at W2-4 upon DAAs treatment, Venn diagrams were assembled to select sets of

unaltered/increased attributes and data are presented in Figure 7. For this purpose, HCV patients were categorized into subgroups, considering the baseline ALT levels (< 69 U/L vs > 69 U/L); platelet counts ($< 150,000/\text{mm}^3$ vs $> 150,000/\text{mm}^3$) and the cirrhosis status (non-cirrhosis vs cirrhosis). Common and selective biomarkers were identified by overlapping analysis. In general, patients with ALT < 69 U/L, platelet counts $> 150,000/\text{mm}^3$ and non-cirrhotic presented lower number of unaltered/increased biomarkers at W2-4 upon DAAs treatment. Conversely, patients with ALT > 69 U/L, platelet counts $< 150,000/\text{mm}^3$ and cirrhotic displayed a larger set of unaltered/increased biomarkers at W2-4 upon DAAs treatment, with several pro-inflammatory biomarkers such as IL-1 β and IL-15 (Figure 7). The intersection of common biomarkers observed in patients with ALT > 69 U/L, platelet counts $< 150,000/\text{mm}^3$ and cirrhosis demonstrate that a better laboratorial records at baseline are associated with early remodeling of serum biomarkers at W2-4 upon DAAs treatment. Moreover, data from patients with ALT > 69 U/L, platelet counts $< 150,000/\text{mm}^3$ and cirrhosis status further corroborate the hypothesis that as worse as the laboratorial prognosis parameters at baseline are, the broader is the set of unaltered/increased biomarkers observed at W2-4 upon DAAs treatment (Figure 7).

Discussion

Chronic HCV infection has remained as a disease with cost and time-consuming clinical management. The HCV therapeutic interventions, nonetheless, have advanced recently and the direct acting agents (DAAs) composed by inhibitors of structural and functional viral proteins such as the protease, the polymerase and nonstructural NS5 give hopes to eliminate global HCV infection [11, 12, 13].

As opposed to previous IFN-type I-based therapy, DAAs therapy achieves full sustained virologic response (SVR), which indicates the elimination of the circulating genomic HCV-RNA from blood. However, despite under debate, unpredicted increased incidence of early as well as recrudescence tumorigenic events in HCV patients undergoing DAAs were reported [14, 15, 16], which may suggest that DAA therapy may impose weakening of tumor surveillance immunity [15]. Therefore, the knowledge about the timing of the remodeling of the immune response in HCV patients upon DAAs,

including the soluble growth factors, chemokines, proinflammatory and regulatory cytokines, can provide relevant evidence to support novel fields of clinical investigation.

In the present study, we performed a comprehensive analysis of serum biomarkers during and after DAA therapy in Brazilian patients with chronic HCV infection. The use of overly sensitive high-throughput assays that quantified 27 serum molecules from each participant allowed accurate comparison and correlation of data obtained during the time course of the study. In addition, stratification of patients by ALT levels, platelet counts as well as cirrhosis status allowed a better understanding and identification of universal as well particular biomarkers of DAA therapy.

The results confirmed robust proinflammatory responses in HCV patients, which agrees with previous studies [17, 18, 19, 20, 21]. Beside this prominent proinflammatory response, the production of canonic cytokines such as TNF, IL-6 and IFN, the fibrogenic growth factor, such as FGF-basic, was abundant in HCV patients before treatment and did not alter across treatment. To our knowledge, this is the first report and characterization of the production of this soluble factor before, during and after treatment of HCV patients with DAAs.

Conversely, the Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) as well as Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), which were increased before treatment, decreased over time of DAA therapy. G-CSF is a glycoprotein, sharing some common effects with GM-CSF, such as the fact that both are mainly produced by fibroblasts and endothelial cells from bone marrow stroma and by monocytic cells [22]. According to previous findings, GM-CSF is increased in patients with liver diseases, and, as such, this cytokine may play a significant role in host defense and disease [23]. GM-CSF and G-CSF have been used as a therapeutic strategy to improve neutrophil production to counteract neutrophilia caused by chemotherapy in cancer patients [24, 25, 26]. Neutrophils and monocytes are immune cellular subsets, which rely on GM-CSF and G-CSF to expand and are responsible for patrolling several tissues including liver. These cells have been implicated in anti-tumor immune responses, therefore, decreased G-CSF production induced by DAAs may dampen such responses.

Thus, the significant drop in those growth factors may implicate in decline of neutrophil/monocyte-derived surveillance of hepatic tissues for other harmful threats such as carcinogenic cell units.

To understand the immunological biomarkers, an initial stratification of HCV patients according to alanine aminotransferase (ALT) levels was performed. ALT is found mainly in the liver, which is an important clinical finding to advise for hepatic damage. We classified patients (according to local laboratory normal level) as with higher ($>69\text{mg/dL UNL}$) or lower ($<69\text{mg/dL UNL}$) ALT. While patients with lower ALT were high producers of TNF and IFN- γ , higher ALT patients stood out as high producers of IL-1 β , IL-15, IL-9, IL-13, FGF-basic, VEGF, IL-2 and IL-7. Interestingly, high production of IFN- γ was a “late-comer” response of higher ALT profile patients during DAAs treatment. Putting together, our results strongly suggest that higher ALT levels in the pre-treatment with DAAs are related to delayed immune response as compared to the rapid immune remodeling observed in patients with lower ALT.

Furthermore, we assessed the profile of the biomarkers, according to the platelet values before treatment (platelet count less or high than $150,000\text{ mm}^3$) as this cut off is hallmark of advanced liver fibrosis. We observed that platelet-derived growth factor (PDGF) was a hallmark in HCV patients with platelets $\leq 150,000\text{ mm}^3$ before and during DAA treatment, which suggest the feedback response attempting to compensate the low platelet count.

To investigate whether the stage of liver fibrosis would impact the systemic immunological response during HCV treatment, patients were further classified as cirrhotic and non-cirrhotic. Our results identified significant patterns of serum biomarkers at early, late, and post-treatment with DAAs. For this analysis, the balance between proinflammatory and antiviral effects of soluble factors matters as proinflammatory cytokines can induce cell apoptosis and viral elimination, while the excessive production of several molecules, such as TNF and IFN- γ , in a specific immunological milieu, can cause tissue necrosis. In this perspective, IFN-induced responses, as TNF-Receptor Associated Factor 3 (TRAF3) and Stimulator of Interferon-related Genes, upregulated during HCV NS3/4A protease inhibition, might indicate that rescuing innate immunity is important for HCV-targeted immune control

[27]. Conversely, as the treatment progresses, these mediators are down-modulated, which means that the proinflammatory cytokines are decreased in a virus-dependent manner.

As observed for all strata, IL-5 and CCL11 continued as an independent hallmark of post-treatment and might be considered as universal treatment biomarker of DAAs. This finding was very noteworthy and should be addressed if these two mediators could bring insights to the follow up for cases of recurrence of HCV infection or even HCC in treated patients.

Recent investigations on the role of chemokines in fibrogenesis and in the chemoattraction of inflammatory cells to the liver during injury have shown that CCL11, also called eotaxin, is up-regulated in senescent human hepatic stellate cells and correlated with hepatic necroinflammation and fibrosis, and suggested unfavorable prognosis after 6-year of follow-up [28]. Putting together, these results may indicate that CCL11 is a remaining immunological fingerprint of the strong HCV-induced hepatic tissue damage, which may not be fully overwritten in a short term by DAA treatment. In agreement, it has been proposed that, in addition to producing a proinflammatory cytokine storm, the HCV chronic infection is closely related to development of an anti-inflammatory and pro-fibrogenic chemokine/cytokine profile that is observed from the onset throughout viral infection [29, 18, 30].

Our investigation confirmed these previous reports showing that HCV patients with cirrhosis display a mixed proinflammatory profile, featured by GM-CSF, IL-15, TNF and IFN- γ , as well as regulatory cytokines, such as IL-4 and IL-10. However, regardless of cirrhosis status, IL-5 and CCL11 remained as a hallmark of post-treatment with DAAs.

In conclusion, HCV treatment with DAAs resulted in a conspicuous remodeling of the serum biomarker storm, hallmark of untreated HCV patients. Regardless the SVR response observed in all patients, the kinetics of serum biomarkers during and after DAAs treatment was associated with the pre-treatment high ALT and cirrhosis status. These findings added novel evidence for the immunological remodeling process triggered by DAAs.

Material and Methods

Study population

Fifty HCV patients, 33 males and 17 females, mean age of 61 years (40-81 years) with indication of HCV treatment with DAAs, were consecutively enrolled in a longitudinal investigation carried out before (baseline, n=50), during (2-4 weeks, n=43 and 8-12 weeks, n=30) and post-treatment (12-24 weeks, n=24) with sofosbuvir and daclatasvir (\pm ribavirin) or simeprevir, according to physician discretion. Exclusion criteria were co-infection with HBV or Human Immunodeficiency Virus (HIV), decompensated cirrhosis, concomitant hepatocellular carcinoma, hepatic or systemic autoimmune diseases, use of immunosuppressants or immunobiological drugs. Fifteen non-infected subjects were enrolled as a healthy control group (NI), 03 males and 12 females, mean age of 43 years (23-59 years).

Among HCV patients, 33/50 (66%) patients were categorized as cirrhotic by the conjunction of clinical evaluation and non-invasive complementary exams (liver profile laboratory exams, FIB4 above 3.75 and/or upper abdominal ultrasound/endoscopy suggesting advanced liver fibrosis and/or evidence of portal hypertension). In addition, previous liver biopsies (n=31) were reviewed and classified by METAVIR. All cirrhotic patients had compensated liver disease and were classified as Child-Pugh A5 (n=24; 73%) or A6 (n=9; 27%).

The pre-treatment baseline laboratorial records included in the analysis were alanine aminotransferase (ALT), platelet counts and albumin measurements. The ALT levels ranged from 19 to 263 U/L, with 33/50 (66%) patients presented ALT levels above the upper limit of reference (69 U/L). The platelet counts ranged from 45,000 to 501,000/mm³, with 29/50 (58%) patients displaying values below 150,000/mm³. The albumin levels ranged from 2.5 to 4.9 g/dL, with a median and average values of 3.9 g/dL, with 9/50 (18%) patients presenting albumin levels below 3.5mg/dL.

The HCV treatment followed the protocols determined by the Therapeutic Guidelines Program of the Brazilian Ministry of Health [10], using the following schemes: sofosbuvir, daclatasvir and ribavirin (n=19; 38%), sofosbuvir and daclatasvir (n=17; 34%) and sofosbuvir plus simeprevir (n=14; 28%). All

patients completed 12 weeks of treatment and had SVR. Demographic and clinical records of HCV patients are summarized in Table 1.

Ethics statement

The study protocol was approved by the Ethic Committee boards of the Universidade Federal de Minas Gerais and FIOCRUZ-Minas (CAAE11830412.4.0000.5149 and CAAE 15732513.0.1001.5149). All participants (HCV patients and healthy controls) provided written informed consent.

Quantitation of serum chemokines, cytokines and growth factors

A high-throughput assay employing a 27-plex Luminex assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used for quantification of a range of serum biomarkers, including: chemokines (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17), regulatory cytokines (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) and growth factors (FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 and IL-2). Measurements were performed on a Bio-Plex 200 instrument (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Standard curves for each molecule were run in each batch or plate of the experiments. The levels of each serum biomarker are expressed in pg/mL and the lower limits of detection were: CXCL8=1.13; CCL11=0.10; CCL3=0.04; CCL4=0.42; CCL2=0.45; CCL5=3.17; CXCL10=2.98; IL-1 β =0.06; IL-6=0.50; TNF- α =3.25; IL-12= 1.22; IFN- γ =0.44; IL-15=8.65; IL-17A=1.68; IL-1Ra=4.69; IL-4=0.09; IL-5=3.72; IL-9=2.45; IL-10=1.65; IL-13=0.30; FGF-basic=3.85; PDGF-BB=4.10; VEGF=10.87; G-CSF=6.66; GM-CSF=0.41; IL-2=1.14 and IL-7=2.29 pg/mL.

Statistical analysis and biomarker signature

Conventional statistical analysis was carried out using GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA) for comparative analysis between two groups, carried out by Student t test or Mann-Whitney test, according to the data distribution. Multiple comparisons amongst sub-groups were carried out by ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test to compare all pairs of columns. The differences were considered significant if $p < 0.05$.

The biomarker signature analysis was carried out to assess the panoramic profile of serum mediators. For this purpose, the fold changes observed upon DAAs treatment were calculated, considering the measurements performed at baseline (before) and at distinct times upon DAAs treatment, including: [2 to 4 weeks (W2-4), 8 to 12 weeks (W8-12)] as well as at 12 weeks after treatment (POST). The median values of baseline fold changes (W2-4/before; W8-12/before and POST/before) were assembled as ascendant curves to underscore the different patterns observed, classified as: unaltered, decreased or increased values along the timeline kinetics of DAAs treatment. Data was also compiled as heatmap profiles for visualization of unaltered or increased biomarkers upon DAAs treatment. The biomarker signatures and heatmap analysis were assessed considering all HCV patients together and upon categorization of HCV patients based on the baseline profile of ALT levels, platelet counts and cirrhosis status. Data mining for statistical analysis and graphical arts were performed using the GraphPad Prism software (version 8.01, San Diego, CA, USA). The heatmaps were assembled using Microsoft Excel software (Microsoft Office 365®, USA).

Acknowledgments and financial disclosure

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). The authors thank the program for technological development in tools for health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities. ATC and OAMF thank the CNPq for the PQ fellowships program. OAMF is a research fellow from FAPEAM (PVN-II, PRÓ-ESTADO Program #005/2019).

Author's Contributions

Designing research study: OAMF, RT.

Sample collection and experiments: IGR, JGACR, JRBF, IACR.

Medical records and data acquisition: LDS, LAS, RCSS, RT.

Analyzing data: IGR, JGACR, JRBF, IACR, ATC, OAMF, RT.

Advisory medical committee: LAS, RCSS, RT.

Writing the manuscript: IGR, JGACR, OAMF, RT.

Conflict of interest statement:

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Perz J.F., Armstrong G.L., Farrington L.A., Hutin Y.J., Bell B.P. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol.* **45**(4), 529-538; <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.05.013>. (2006).
- [2] World Health Organization. Global Hepatitis Report 2017; World Health Organization: Geneva, Switzerland, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf;jsessionid=2DE63529824E8E2599774B6EB805A2DC?sequence=1>. [Accessed 1 July 2020]. (2017).
- [3] Hatzakis A., Lazarus J.V., Cholongitas E., Baptista-Leite R., Boucher C., Busoi C.S., et al. Securing sustainable funding for viral hepatitis elimination plans. *Liver Int.* **40**, 260-270; <https://doi.org/10.1111/liv.14282>. (2020).
- [4] Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med.* **345**, 41-52; <https://doi.org/10.1056/nejm200107053450107>. (2001).
- [5] Simmonds P. The Origin of Hepatitis C Virus. In: Bartenschlager R. (eds) Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **369**. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_1. (2013).
- [6] Zingaretti C., De Francesco R., Abrignani S. Why is it so difficult to develop a hepatitis C virus preventive vaccine? *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, Supplement 5,103-109. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12493>. (2014).
- [7] Jakobsen J.C., Nielsen E.E., Feinberg J., Katakam K.K., Fobian K., Hauser G., et al. Direct-acting antivirals for chronic hepatitis C. *Cochrane Database Syst. Rev.* **6**, CD012143. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012143.pub2>. (2017).

- [8] Aggeletopoulou I., Konstantakis C., Manolakopoulos S., Triantos C.. Risk of hepatitis B reactivation in patients treated with direct-acting antivirals for hepatitis C. *World J. Gastroenterol.* **23**(24), 4317-4323. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i24.4317>. (2017).
- [9] Debes J.D., de Knegt R.J., Boonstra A. The path to cancer and back: immune modulation during hepatitis C virus infection, progression to fibrosis and cancer, and unexpected roles of new antivirals. *Transplantation.* **101**(5), 910-915. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001623>. (2017).
- [10] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. – Brasília: Ministério da Saúde, **68** p.: il. Available at: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-c-e-coinfecoes>. [Accessed 15 July 2020]. (2019).
- [11] Sogni P., Gilbert C., Lacombe K., Piroth L., Rosenthal E., Miaillhes P., et al. All-oral Direct-acting Antiviral Regimens in HIV/Hepatitis C Virus-coinfected Patients with Cirrhosis Are Efficient and Safe: Real-life Results from the Prospective ANRS CO13-HEPAVIH Cohort. *Clin. Infect. Dis.* **63**(6),763-770. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw379>. (2016).
- [12] Imajo K., Kessoku T., Honda Y., Tomeno W., Ogawa Y., Mawatari H., et al. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. *Gastroenterology.* **150**(3),626-637, e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.11.048>. (2016).
- [13] Nitta S., Asahina Y., Matsuda M., Yamada N., Sugiyama R., Masaki T., et al. Effects of Resistance-Associated NS5A Mutations in Hepatitis C Virus on Viral Production and Susceptibility to Antiviral Reagents. *Sci Rep.* **6**, 34652. <https://doi.org/10.1038/srep34652>. (2016).
- [14] Conti F., Buonfiglioli F., Scuteri A., Crespi C., Bolondi L., Caraceni P., et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *J. Hepatol.* **65**(4),727-733. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.06.015>. (2016).

- [15] **Reig M., Mariño Z.**, Perelló C., Iñarrairaegui M., Ribeiro A., Lens S., et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J. Hepatol.* **65**(4), 719-726. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.008>. (2016).
- [16] Sasaki R., Kanda T., Kato N., Yokosuka O., Moriyama M. Hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma after sustained virologic response. *World J. Hepatol.* **10**(12),898-906. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i12.898>. (2018).
- [17] Menezes E.G., Coelho-Dos-Reis J.G., Cardoso L.M., Lopes-Ribeiro Á., Jonathan-Gonçalves J., Porto Gonçalves M.T., et al. Strategies for serum chemokine/cytokine assessment as biomarkers of therapeutic response in HCV patients as a prototype to monitor immunotherapy of infectious diseases. *Antiviral Res.* **141**,19-28. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.02.001>. (2017).
- [18] de Souza-Cruz S., Victória M.B., Tarragô A.M., da Costa A.G., Pimentel J.P., Pires E.F., et al. Liver and blood cytokine microenvironment in HCV patients is associated to liver fibrosis score: a proinflammatory cytokine ensemble orchestrated by TNF and tuned by IL-10. *BMC Microbiol.* **16**:3. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0610-6>. (2016).
- [19] Tarragô A.M., da Costa A.G., Pimentel J.P., Gomes S.T., Freitas F.B., Lalwani P., et al. Combined impact of hepatitis C virus genotype 1 and interleukin-6 and tumor necrosis factor- α polymorphisms on serum levels of pro-inflammatory cytokines in Brazilian HCV-infected patients. *Hum. Immunol.* **75**(11),1075-1083. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.08.198>. (2014).
- [20] Araújo A.R., Peruhype-Magalhães V., Coelho-dos-Reis J.G., Chaves L.P., de Lima T.A., Pimentel J.P., et al. Dual role of IL-12 in the therapeutic efficacy or failure during combined PEG-Interferon- α 2A and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Immunol Lett.* **154**(1-2),61-69. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.07.010>. (2013).
- [21] Maia L.P., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Speziali E., Vermhren R., Lira E.F., et al. Hepatitis C virus screening and clinical monitoring of biomarkers in patients undergoing hemodialysis. *J. Med. Virol.* **81**(7),1220-1231. <https://doi.org/10.1002/jmv.21521>. (2009).

- [22] Cetean S., Căinap C., Constantin A.M., Căinap S., Gherman A., Oprean L., et al. The importance of the granulocyte-colony stimulating factor in oncology. *Clujul. Med.* **88**(4),468-472. <https://doi.org/10.15386/cjmed-531>. (2015).
- [23] Al-Wabel A., Al-Knawy B., Raziuddin S. Interleukin-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion in hepatocellular carcinoma and viral chronic active hepatitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **74**(3),231-235. <https://doi.org/10.1006/clin.1995.1034>. (1995).
- [24] Mastrangelo M.J., Maguire H.C. Jr, Eisenlohr L.C., Laughlin C.E., Monken C.E., McCue P.A., et al. Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther.* **6**(5),409-422. <https://doi.org/doi:10.1038/sj.cgt.7700066>. (1999).
- [25] Greten T.F., Duffy A.G. and Korangy F. Hepatocellular Carcinoma from an Immunologic Perspective. *Clin. Cancer Res.* **19**(24),6678-6685. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1721>. (2013).
- [26] Danova M., Pronzato P., Ingrasciotta Y., Antonuzzo A., Trama U., Tondini C., et al. Recent advances in the management of chemotherapy-induced neutropenia: biosimilar granulocyte colony-stimulating factor use in Italy. *Future Med.* **16**(14),891-897. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-0167>. (2020).
- [27] Jittavisutthikul S., Seesuy W., Thanongsaksrikul J., Thueng-in K., Sriramanote P., Werner R.G., et al. Human Transbodies to HCV NS3/4A Protease Inhibit Viral Replication and Restore Host Innate Immunity. *Front. Immunol.* **7**,318. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00318>. (2016).
- [28] Tacke F., Trautwein C., Yagmur E., Hellerbrand C., Wiest R., Brenner D.A., et al. Up regulated eotaxin plasma levels in chronic liver disease patients indicate hepatic inflammation, advanced fibrosis and adverse clinical course. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**(8),1256-1264. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04621.x>. (2007).

[29] Osburn W.O., Levine J.S., Chattergoon M.A., Thomas D.L., Cox A.L. Anti-inflammatory cytokines, pro-fibrogenic chemokines and persistence of acute HCV infection. *J. Viral. Hepat.* **20**(6),404-413. <https://doi.org/10.1111/jvh.12052>. (2013).

[30] Pereira G.L., Tarragô A.M., Neves W.L.L., da Silva Neto P.V., de Souza P.S., dos Santos Affonso J., et al. Immunological Dynamics Associated with Direct-Acting Antiviral Therapies in Naive and Experimented HCV Chronic-Infected Patients. *Mediators Inflamm.* **2019**, Article ID 4738237, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/4738237>. (2019).

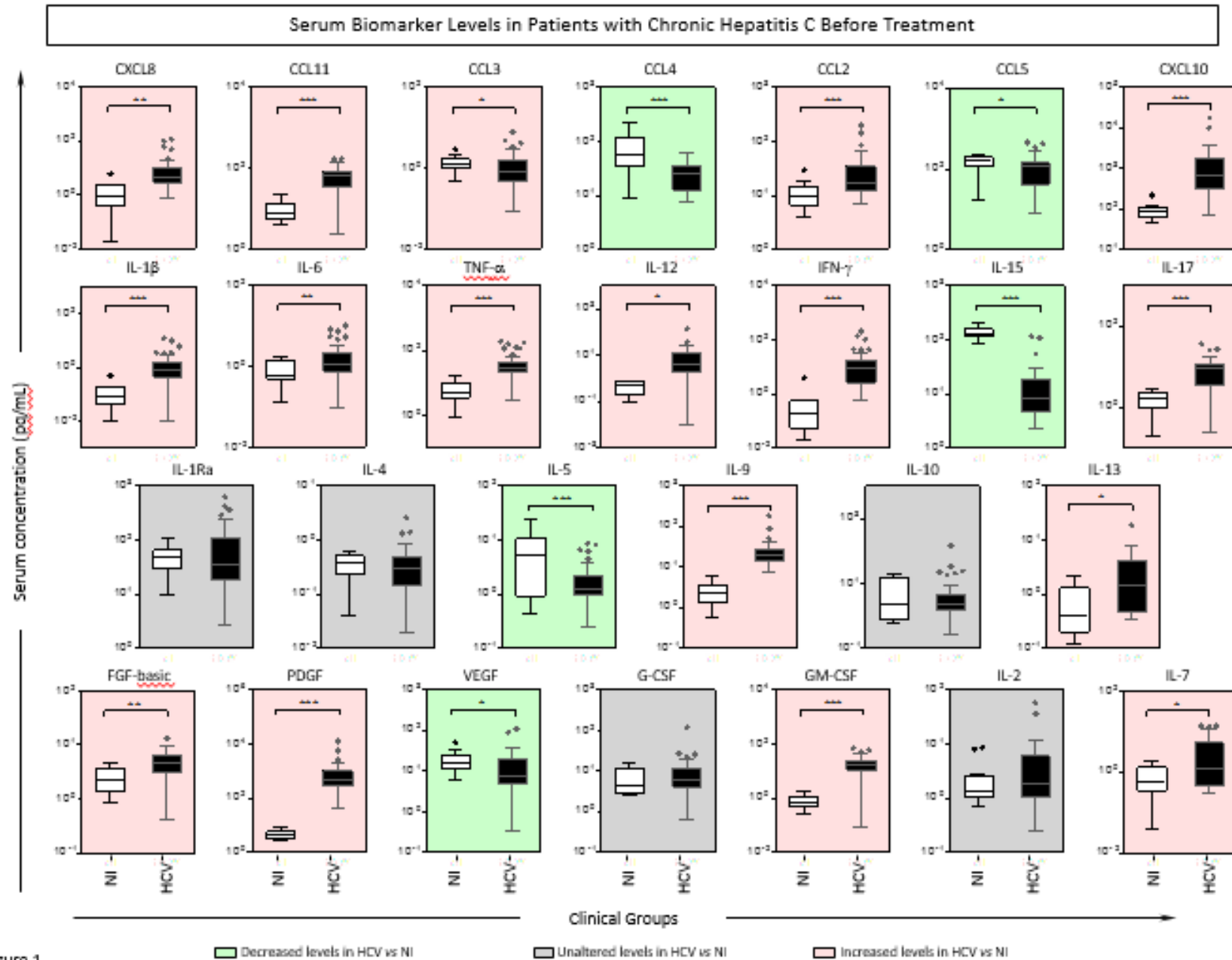


Figure 1

Figure 1 – Serum biomarker levels in patients with chronic Hepatitis C before DAAs treatment. Serum levels of chemokines (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17), regulatory cytokines (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) and growth factors (FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7) were measured in patients with chronic hepatitis C (HCV = ■, n=50) and non-infected healthy controls (NI = □, n=15) by multiplex set Luminex assay as described in Material and Methods. Data are expressed in pg/mL and displayed in box plots format, with outliers identified by dots. Comparative analysis between NI vs HCV were performed by Student t test or Mann-Whitney test and significant differences are underscored by connecting lines and asterisks for p<0.001 (***), p<0.01 (**) and p<0.05 (*). Color backgrounds underscore decreased (■), increased (■) or unaltered (■) levels of serum biomarkers in HCV as compared to NI.

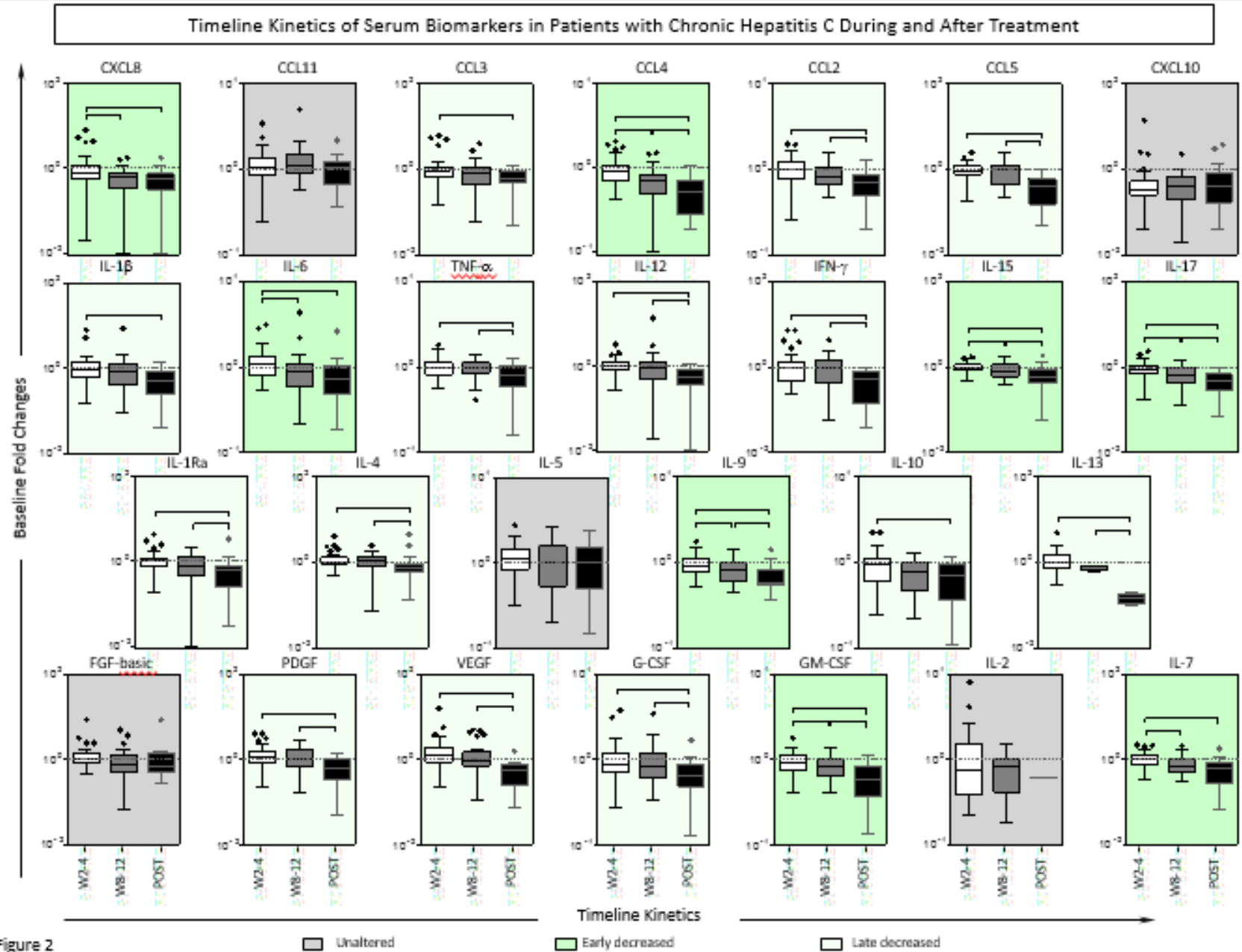








Figure 2

Figure 2 – Timeline kinetics of serum biomarkers in patients with chronic Hepatitis C upon DAAs treatment. Cross-sectional follow-up analysis of chemokines (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10); pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17); regulatory cytokines (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) and growth factors (FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7) was carried out in serum samples from HCV-infected patients along the timeline kinetics of DAAs treatment. Measurements were performed at baseline (before) and at distinct times upon DAAs treatment (2-4 and 8-12 weeks during DAAs treatment as well as at 12-24 weeks post DAAs treatment). Data are expressed as baseline fold changes [(W2-4 = , n=11), (W8-12 = , n=11) as well as at 12 weeks after treatment (POST = , n=13)] and displayed in box plots format with outliers identified by dots. Multiple comparisons along timeline kinetics were performed by ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test to compare all pairs of columns. Significant differences at $p < 0.05$ are underscored by connecting lines and asterisks for and $p < 0.05$ (*). Color backgrounds underscore early decreased (, late decreased () or unaltered () baseline fold changes in serum biomarkers along the timeline kinetics of DAAs treatment.

Timeline Kinetics of Overall Serum Biomarker Signatures in Patients with Chronic Hepatitis C upon DAAs Treatment

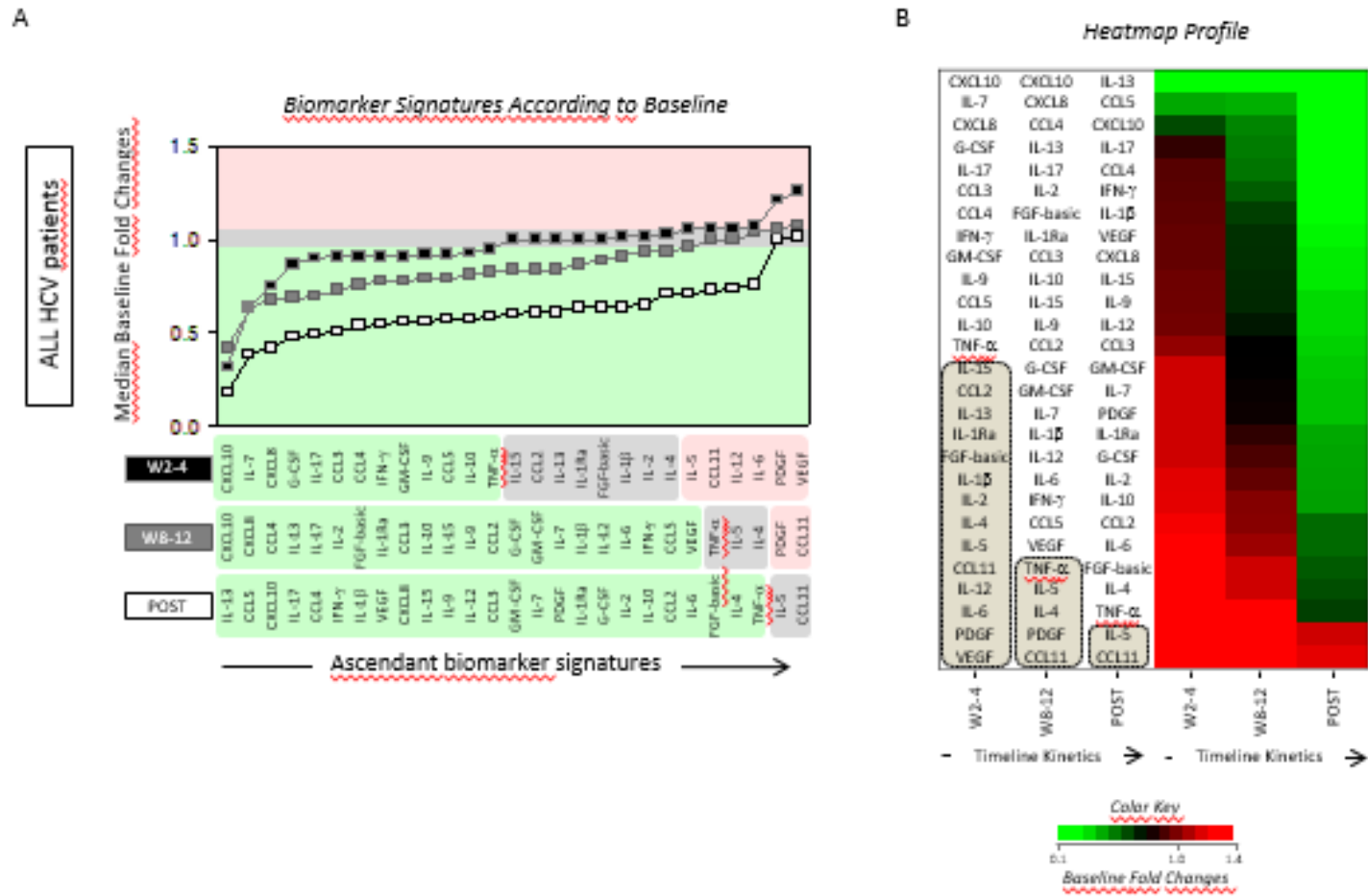


Figure 3

Figure 3 – Kinetics of serum biomarker signatures in patients with chronic hepatitis C upon DAAs treatment. The biomarker signatures were constructed based on the median values of fold changes observed, considering the measurements performed at baseline (before) and at distinct times upon DAAs treatment (2-4 and 8-12 weeks during DAAs treatment as well as at 12-24 weeks post DAAs treatment). Data are displayed as ascendant curves of baseline fold changes [(W2-4 = ■, n=43) , (W8-12 = ■, n=30) as well as at 12 weeks after treatment (POST = □, n=24)]. The ascendant curves allowed the identification of distinct patterns of baseline fold changes underscored as: decreased (◻), unaltered (◻) and increased (◻) levels along the timeline kinetics of DAAs treatment. Data was also compiled as heatmap profiles for visualization of unaltered or increased (◻) biomarkers upon DAAs treatment. The color key for heatmaps is provided in the figure.

Association of ALT Levels at Baseline with the Timeline Kinetics of Serum Biomarkers in Patients with Chronic Hepatitis C upon DAAs Treatment

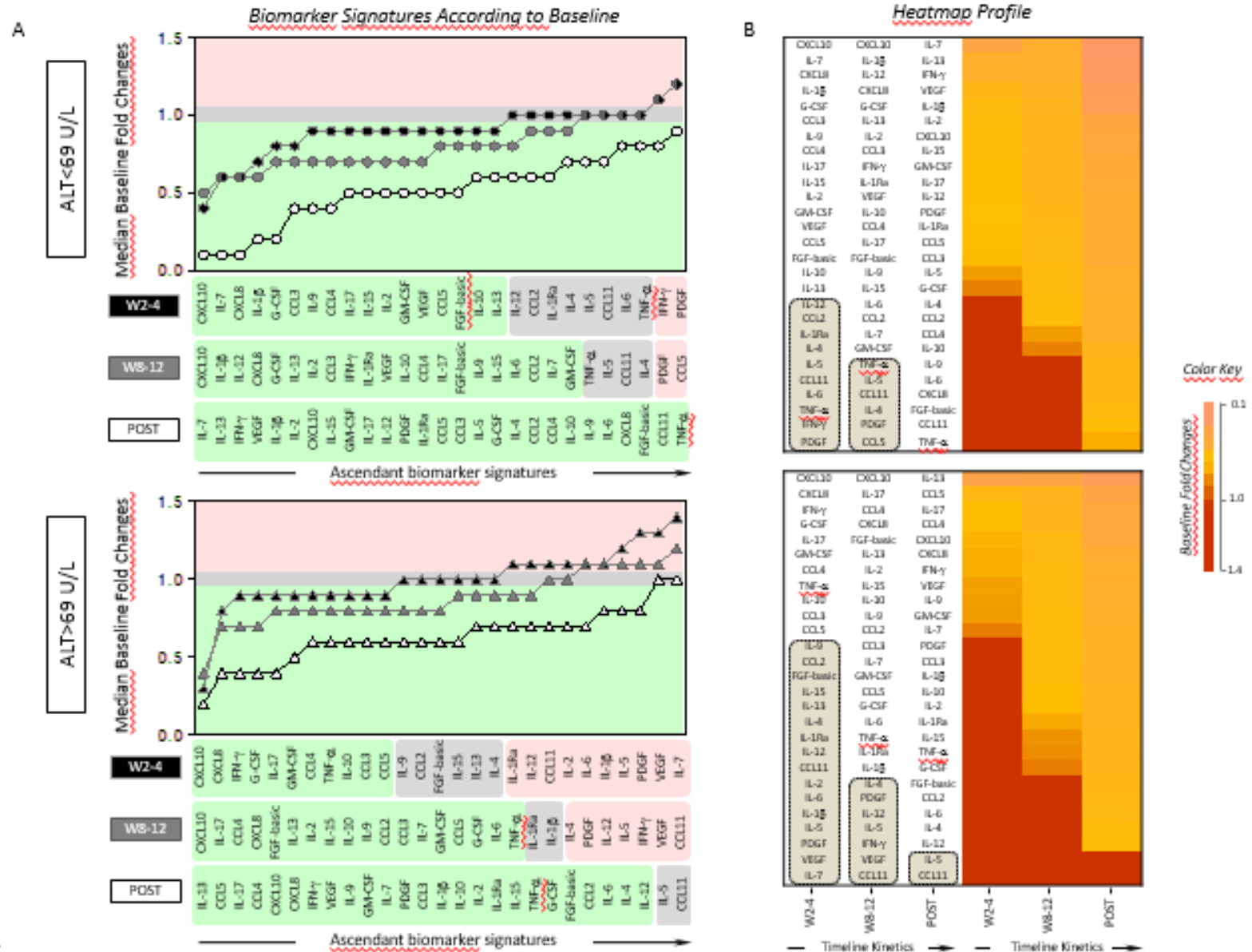


Figure 4 – Association of ALT levels at baseline with the timeline kinetics of serum biomarkers in patients with chronic hepatitis C upon DAAs treatment. The biomarker signatures were constructed based on the median values of fold changes observed, considering the measurements performed at baseline (before) and at distinct times upon DAAs treatment (2-4 and 8-12 weeks during DAAs treatment as well as at 12-24 weeks post DAAs treatment). Data are displayed as ascendant curves of baseline fold changes for HCV patients categorized into subgroups, referred as: ALT < 69 U/L and ALT > 69 U/L. Biomarker signatures along the timeline kinetics were assembled for both subgroups [(W2-4 = ●, n=15; ▲, n=28), (W8-12 = ●, n=9; ▲, n=21) as well as at 12 weeks after treatment (POST = ○, n=6; △, n=18)]. Half-marked symbols represent overlapping values. The ascendant curves allowed the identification of distinct patterns of baseline fold changes underscored as: decreased (◻), unaltered (◻) or increased (◻) levels along the timeline kinetics of DAAs treatment. Data was also compiled as heatmap profiles for visualization of unaltered or increased (◻) biomarkers upon DAAs treatment. The color key for heatmaps is provided in the figure.

Association of Platelets Counts at Baseline with the Timeline Kinetics of Serum Biomarkers in Patients with Chronic Hepatitis C upon DAAs Treatment

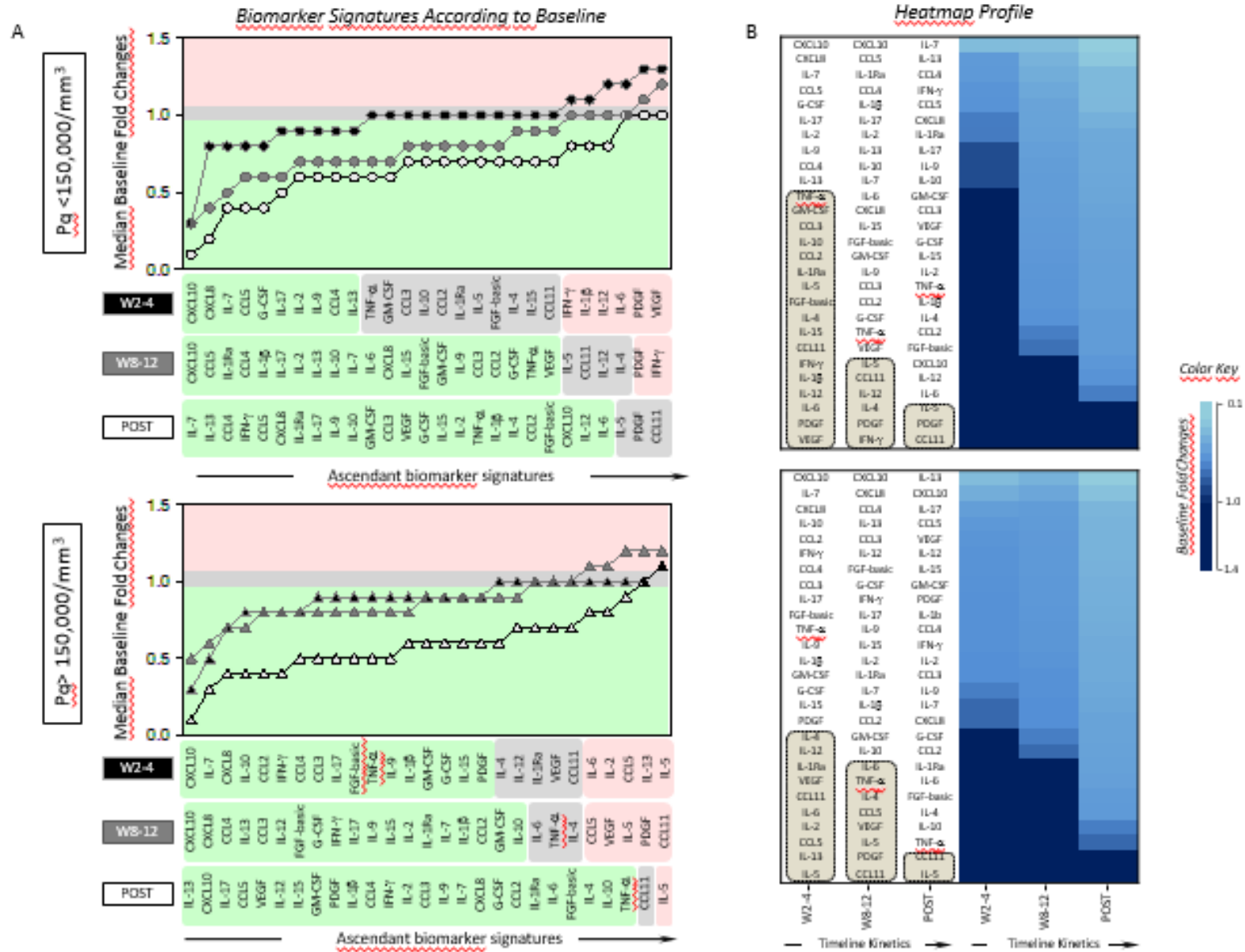


Figure 5

Figure 5 – Association of platelet counts at baseline with the timeline kinetics of serum biomarkers in patients with chronic hepatitis C upon DAAs treatment. The biomarker signatures were constructed based on the median values of fold changes observed, considering the measurements performed at baseline (before) and at distinct times upon DAAs treatment (2-4 and 8-12 weeks during DAAs treatment as well as at 12-24 weeks post DAAs treatment). Data are displayed as ascendant curves of baseline fold changes for HCV patients categorized into subgroups, referred as: platelet counts < 150,000/mm³ and platelet counts > 150,000/mm³. Biomarker signatures along the timeline kinetics were assembled for subgroups [(W2-4 = ●, n=25; ▲, n=18) , (W8-12 = ●, n=16; ▲, n=14) as well as at 12 weeks after treatment (POST = ○, n=13; △, n=11)]. Half-marked symbols represent overlapping values. The ascendant curves allowed the identification of distinct patterns of baseline fold changes underscored as: decreased (■), unaltered (□) or increased (▤) levels along the timeline kinetics of DAAs treatment. Data was also compiled as heatmap profiles for visualization of unaltered or increased (▤) biomarkers upon DAAs treatment. The color key for heatmaps is provided in the figure.

Association of Cirrhosis Status at Baseline with the Timeline Kinetics of Serum Biomarkers in Patients with Chronic Hepatitis C upon DAAs Treatment

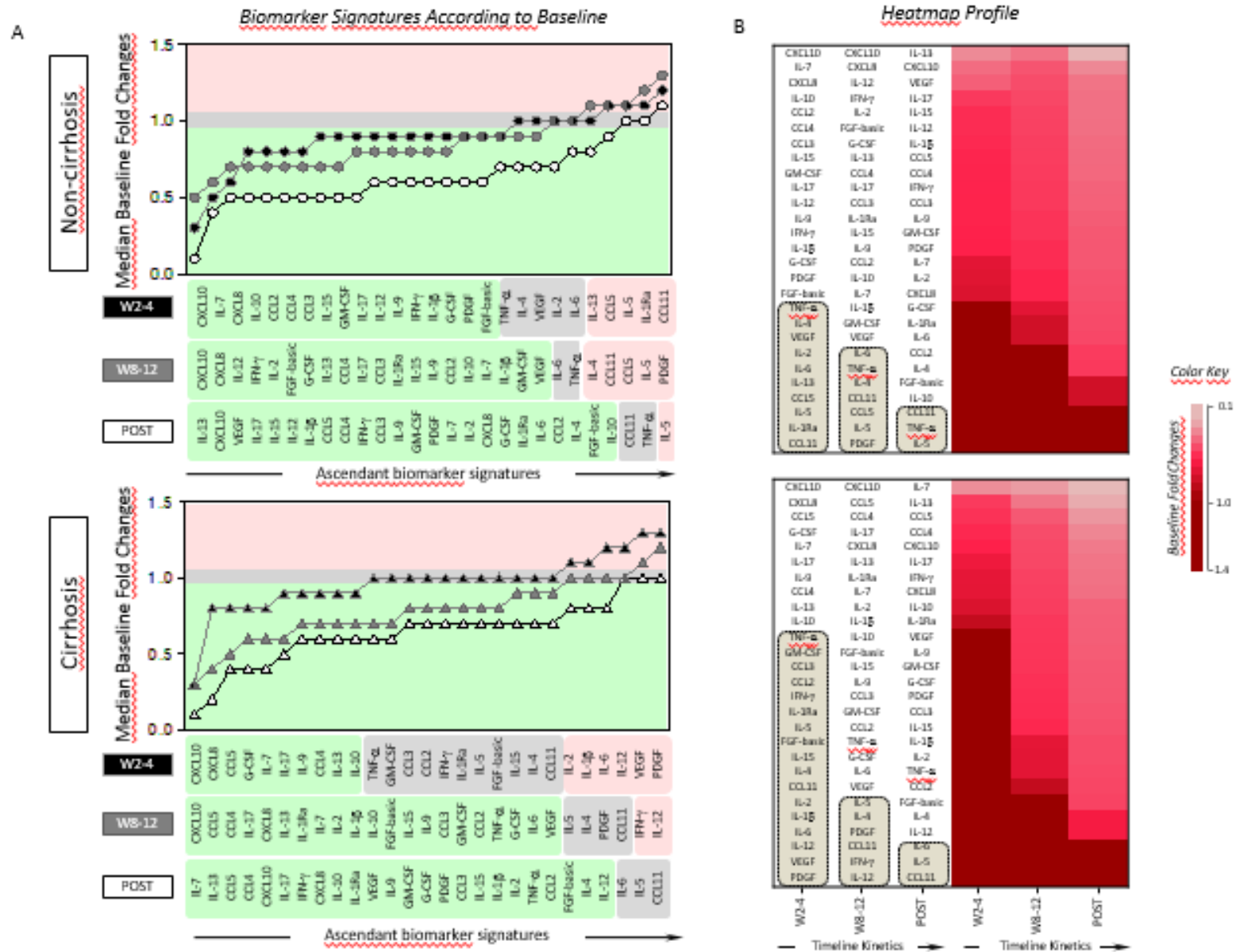


Figure 6

Figure 6 – Association of cirrhosis status at baseline with the timeline kinetics of serum biomarkers in patients with chronic hepatitis C upon DAAs treatment. The biomarker signatures were constructed based on the median values of fold changes observed, considering the measurements performed at baseline (before) and at distinct times upon DAAs treatment (2-4 and 8-12 weeks during DAAs treatment as well as at 12-24 weeks post DAAs treatment). Data are displayed as ascendant curves of baseline fold changes for HCV patients categorized into subgroups, referred as: Non-cirrhosis and Cirrhosis. Biomarker signatures along the timeline kinetics were assembled for subgroups [(W2-4 = ●, n=14; ▲, n=29), (W8-12 = ○, n=11; ▲, n=19) as well as at 12 weeks after treatment (POST = ○, n=9; △, n=15)]. Half-marked symbols represent overlapping values. The ascendant curves allowed the identification of distinct patterns of baseline fold changes underscored as: decreased (◻), unaltered (◻) or increased (◻) levels along the timeline kinetics of DAAs treatment. Data was also compiled as heatmap profiles for visualization of unaltered or increased (◻) biomarkers upon DAAs treatment. The color key for heatmaps is provided in the figure.

Overall Profile of Unaltered or Increased Serum Biomarkers According to the Pre-treatment Laboratorial and Clinical Records of Patients with Chronic Hepatitis C at W2-8 upon DAAs Treatment

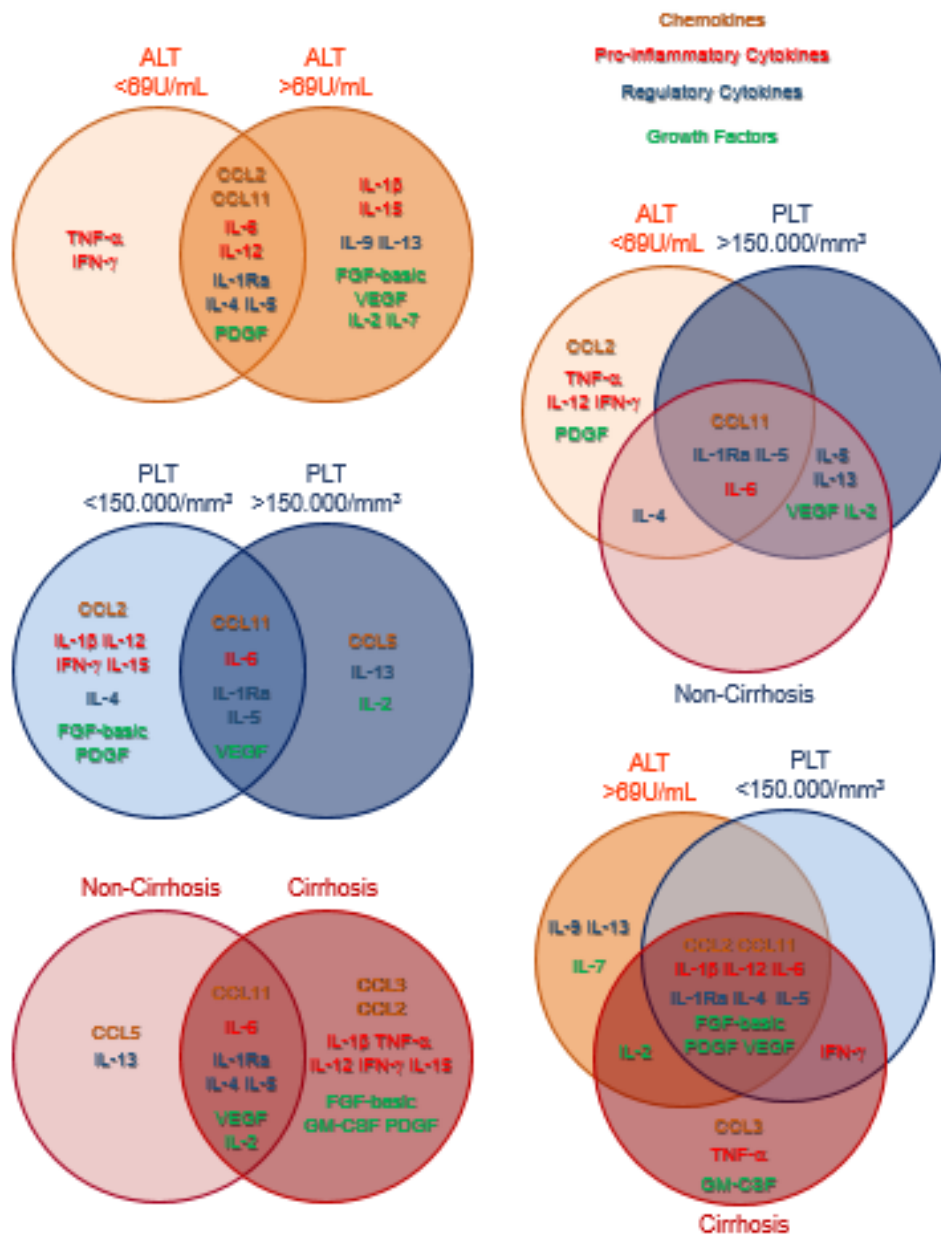


Figure 7

Figure 7 – Overall profile of unaltered or increased serum biomarkers according to the pre-treatment laboratorial and clinical records of patients with chronic hepatitis C at W2-4 upon DAAs treatment. Venn diagrams were assembled to identify common and selective attributes amongst those unaltered or increased biomarkers observed in patients with chronic Hepatitis C at W2-4 upon DAAs treatment, clustered according to laboratorial and clinical records assessed at baseline. Data are displayed for HCV patients categorized into subgroups, referred as: ALT < 69 U/L vs ALT > 69 U/L (🟡); platelet counts < 150,000/mm³ vs platelet counts > 150,000/mm³ (🟢) and Non-cirrhosis vs Cirrhosis (🔴). Common and selective biomarkers were identified by overlapping analysis of ALT < 69 U/L vs platelet counts > 150,000/mm³ vs Non-cirrhosis (🟡🟢); and ALT > 69 U/L vs platelet counts < 150,000/mm³ vs Cirrhosis (🔴🟢). The color key for chemokines, proinflammatory and regulatory cytokines as well as growth factors is provided in the figure.

Table 1 – Demographic and clinical features of hepatitis C patients

Parameters	n	%
Gender (n=50)		
Male/Female	33/17	66/34
Exposures of HCV transmission (n=50)		
Blood transfusion	11	22
Unsafe injections	11	22
Use of illicit drugs	5	10
Other/unknown	23	46
ALT*		
<69 U/L	17	34
> 69 U/L	33	66
Albumin		
< 3.5 mg/dL	9	18
> 3.5 mg/dL	41	82
Platelets		
< 150.000/mm ³	29	58
> 150.000/mm ³	21	42
Cirrhosis		
No	17	34
Yes	33	66
Liver biopsy – METAVIR score (n=31)		
F0	1	3
F1	1	3
F2	5	16
F3	4	13
F4	20	65
Child-Pugh score (n=33)		
A5	24	73
A6	09	27
HCV genotype (n=40)		
1a/1b	16/24	32/48
2	3	14
3	7	14
DAA's treatment - 12 weeks (n=50)		

Soosbuvir and Daclatasvir	17	34
Sofosbuvir, Daclatasvir and Ribavirin	19	38
Sofosbuvir and Simeprevir	14	28

*Local laboratory upper limit of reference for alanine aminotransferase (ALT) = 69 U/L.

DAA = direct-acting antiviral therapy.

5. ANÁLISE COMPLEMENTAR

Realizou-se análise complementar visando comparar os grupos não infectado (NI) e HCV no período pós tratamento. Os resultados revelaram que, após o curto período analisado (12 ou 24 semanas pós-tratamento), os pacientes curados da infecção pelo HCV pelo tratamento com DAAs apresentaram como principal característica a maioria dos valores de mediadores séricos imunes inferior ao observado no grupo NI, sugerindo processo de desinflamação vigoroso associado à erradicação viral. Este resultado reitera a importância de se reavaliar esses mediadores a longo prazo visando determinar com maior precisão a cinética temporal da remodelação desses imunomediadores.

Perfil de biomarcadores NI versus HCV pós tratamento



Figura 8

Figura 8 - Níveis de biomarcadores séricos em pacientes com hepatite C crônica após o tratamento com DAAs. Níveis séricos de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17), citocinas regulatórias (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7) foram quantificados em pacientes com hepatite C crônica (HCV =, n = 50) e controles saudáveis não infectados (NI =, n = 15) por ensaio Luminex Bio-Plex Pro™., conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos em pg/mL e exibidos em formato de boxplots, com outliers identificados por pontos. A análise comparativa entre NI vs HCV foi realizada pelo teste t de Student ou teste de Mann-Whitney e diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e asteriscos para $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*). Cores distintas representando citocinas proinflamatórias e reguladoras, quimiocinas e fatores de crescimento estão apresentadas na figura.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 – Discussão

Notável avanço na medicina foi observado nos últimos anos quando o tratamento da hepatite C com os agentes antivirais de ação direta, seguros e altamente eficazes, representaram o fim da era do tratamento desse agravo com os interferons. O acesso a esses novos tratamentos de excelente tolerância e eficácia tem permitido curar a infecção viral da maioria dos pacientes com hepatite C crônica, independentemente do genótipo viral e estágio da doença hepática. Trata-se, portanto, do instrumento essencial para o controle e a eliminação global desse agravo na próxima década, conforme objetivo a ser alcançado pelos países em acordo com a Organização Mundial de Saúde nos quais o Brasil se inclui (BRASIL, 2015).¹

Diferentemente do tratamento prévio da hepatite C crônica com interferons, os DAAs eliminam rapidamente o RNA genômico circulante do HCV e conferem taxas de cura da infecção acima de 90% com esquemas terapêuticos mais curtos e altamente eficazes. No entanto, a despeito do debate sobre o assunto, alguns autores relataram aumento da recorrência de eventos

¹BRASIL. Ministério da saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções – Relatório de Recomendação. **Brasília: Ministério da Saúde**; p. 89, 2015.

tumorigênicos, como o CHC, em pacientes cirróticos que curaram a infecção com a terapia com DAAs (CONTI et al., 2016; REIG et al., 2016; SASAKI et al., 2018).² Este fato, embora especulativo, suscitou hipóteses, como o enfraquecimento da vigilância imunológica antitumoral em razão de mudanças muito rápidas no sistema imune comprometido por décadas de infecção pelo HCV (REIG et al., 2016).³ Assim, o tratamento da hepatite C crônica com DAAs tornou-se oportunidade única para o estudo do remodelamento da resposta imune em pacientes com hepatite C crônica. Portanto, nossa investigação consistiu na análise da cinética dos fatores de crescimento solúveis quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, regulatórias e fatores de crescimento em pacientes tratados com essas drogas. Esse conhecimento poderá ser relevante para subsidiar novos campos de investigação clínica.

A proposta da nossa investigação foi realizar uma análise abrangente dos biomarcadores séricos pré, durante e após o tratamento da hepatite C com os DAAs, através de ensaios de alto rendimento e sensibilidade capazes de quantificar 27 biomarcadores e permitir a comparação e a correlação dos dados obtidos durante fases específicas do tratamento. Além disso, buscou-se categorizar os pacientes por níveis de ALT, contagem de plaquetas e estágio de fibrose visando identificar biomarcadores imunológicos em pacientes com condições variáveis da hepatite C crônica.

Os resultados confirmaram respostas pró-inflamatórias robustas em pacientes com hepatite C crônica, o que está de acordo com estudos anteriores (ARAÚJO et al., 2013; DE SOUZA-CRUZ et al., 2016; MAIA et al., 2009; MENEZES et al., 2017; TARRAGÔ et al., 2014).⁴ Ao lado dessa

²CONTI, F.; BUONFIGLIOLI, F.; SCUTERI, A.; et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. **J. Hepatol.**; 65(4):727-733, 2016.

REIG, M., MARIÑO, Z.; PERELLÓ, C.; et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. **J. Hepatol.**; 65(4):719-726, 2016.

SASAKI, R.; KANDA, T.; KATO, N.; et al. Hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma after sustained virologic response. **World J. Hepatol.**; 10(12):898-906, 2018.

³REIG, M., MARIÑO, Z.; PERELLÓ, C.; et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. **J. Hepatol.**; 65(4):719-726, 2016.

⁴ARAÚJO, A.R.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; COELHO-DOS-REIS, J.G.; et al. Dual role of IL-12 in the therapeutic efficacy or failure during combined PEG-Interferon- α 2A and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. **Immunol. Lett.**; 154(1-2):61-69, 2013.

resposta pró-inflamatória proeminente, a produção de citocinas, como TNF, IL-6, IFN e o fator de crescimento fibrogênico, como FGF-basic, foi abundante antes do tratamento e apresentou queda durante e após o tratamento. Por outro lado, os fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF) e de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), aumentados antes do tratamento, diminuíram ao longo do tempo.

O G-CSF é uma glicoproteína que compartilha alguns efeitos comuns com o GM-CSF, como o fato de ambos serem produzidos principalmente por fibroblastos e células endoteliais do estroma da medula óssea e por células monocíticas (CETEAN et al., 2015).⁵ De acordo com relatos prévios, o GM-CSF está aumentado em pacientes com doenças hepáticas e, portanto, essa citocina pode estar associada à patogênese da hepatite C crônica (AL-WABEL et al., 1995).⁶ Tanto GM-CSF e G-CSF têm sido usados como estratégia terapêutica para melhorar a produção de neutrófilos nos casos de neutropenia associada a quimioterapia oncológica (DANOVA et al., 2020; GRETEN et al., 2013; MASTRANGELO et al., 1999).⁷ Neutrófilos e monócitos são

DE SOUZA-CRUZ, S.; VICTÓRIA, M.B.; TARRAGÔ, A.M.; et al. Liver and blood cytokine microenvironment in HCV patients is associated to liver fibrosis score: a proinflammatory cytokine ensemble orchestrated by TNF and tuned by IL-10. **BMC Microbiol.**; 16:3, 2016.

MAIA, L.P.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; et al. Hepatitis C virus screening and clinical monitoring of biomarkers in patients undergoing hemodialysis. **J. Med. Virol.**; 81(7):1220-1231, 2009.

MENEZES, E.G.; COELHO-DOS-REIS, J.G.; CARDOSO.L.M.; et al. Strategies for serum chemokine/cytokine assessment as biomarkers of therapeutic response in HCV patients as a prototype to monitor immunotherapy of infectious diseases. **Antiviral Res.**; 141:19-28, 2017.

⁵CETEAN, S.; CĂINAP, C.; CONSTANTIN, A.M.; et al. The importance of the granulocyte-colony stimulating factor in oncology. **Clujul. Med.**; 88(4):468-472, 2015.

⁶AL-WABEL, A.; AL-KNAWY, B.; RAZIUDDIN, S. Interleukin-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion in hepatocellular carcinoma and viral chronic active hepatitis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**; 74(3):231-235, 1995.

⁷DANOVA, M.; PRONZATO, P.; INGRASCIOTTA, Y.; et al. Recent advances in the management of chemotherapy-induced neutropenia: biosimilar granulocyte colony-stimulating factor use in Italy. **Future Med.**; 16(14):891-897, 2020.

GRETEN, T.F.; DUFFY, A.G.; KORANGY, F. Hepatocellular Carcinoma from an Immunologic Perspective. **Clin. Cancer Res.**; (19)(24)6678-6685, 2013.

MASTRANGELO, M.J.; MAGUIRE, H.C.Jr.; EISENLOHR, L.C.; et al. Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. **Cancer Gene Ther.**; 6(5):409-422, 1999.

subconjuntos de células imunológicas que dependem desses fatores de crescimento e são responsáveis pela defesa de diversos órgãos, incluindo o fígado.

Uma vez que estas células são também implicadas em respostas imunes antitumorais, pode-se supor que a diminuição da produção de G-CSF induzida por DAAs poderá atenuar tais respostas. Assim, a queda significativa desses fatores de crescimento poderia estar implicada no declínio da vigilância antitumoral, derivada de neutrófilos/monócitos, do parênquima hepático, contra unidades de células carcinogênicas.

Um aspecto relevante dessa investigação foi verificar a influência de características clínicas e laboratoriais relacionadas ao estadiamento da hepatopatia no perfil dos biomarcadores imunológicos. Em relação à ALT, os pacientes foram classificados no pré-tratamento como acima ($> 69\text{U/L}$) ou abaixo ($<69\text{U/L}$) do limite superior de normalidade local (LSN). Enquanto pacientes com ALT abaixo do LSN foram altos produtores de TNF e $\text{IFN-}\gamma$, aqueles com ALT acima do LSN se revelaram como produtores de IL-1 β , IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 e FGF-básico. Curiosamente, a alta produção de $\text{IFN-}\gamma$ foi uma resposta tardia dos pacientes com ALT mais alto durante o tratamento com DAAs.

Em conjunto, os resultados sugerem fortemente que níveis mais elevados de ALT no pré-tratamento com DAAs estão relacionados ao retardo da resposta imunológica em comparação à rápida remodelação observada naqueles com ALT mais baixa.

Outra análise consistiu na verificação do perfil dos biomarcadores conforme os valores de plaquetas antes do tratamento (inferior ou superior a 150.000 mm^3), pois esse corte é indicativo de fibrose hepática avançada. Observou-se que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) foi marcante em pacientes com plaquetas $\leq 150.000\text{ mm}^3$ antes e durante o tratamento com DAAs, sugerindo uma resposta de *feedback* desse fator na tentativa de compensar a baixa contagem de plaquetas.

Para investigar se o estágio da fibrose hepática teria impacto na resposta imunológica sistêmica durante o tratamento do HCV, os pacientes foram classificados como cirróticos e não cirróticos com base em critérios clínicos e laboratoriais previamente estabelecidos. Nossos resultados

identificaram padrões significativos de biomarcadores séricos no início, durante e após o tratamento com DAAs.

Para esta análise, é relevante considerar o balanço entre efeitos de fatores pró-inflamatórios e antivirais, uma vez que citocinas pró-inflamatórias podem induzir apoptose celular e eliminação viral, enquanto a produção excessiva de várias moléculas, como TNF e IFN- γ , em um meio imunológico específico, pode causar necrose tecidual. Nesta perspectiva, as respostas induzidas por IFN, como fator 3 associado ao receptor de TNF (TRAF3) e os genes estimuladores de interferon supra regulados durante a inibição da protease NS3/4A do HCV, podem indicar que o resgate da imunidade inata é importante para a defesa imunológica antiviral (JITTAVISUTTHIKUL et al., 2016).⁸ Por outro lado, à medida que o tratamento progride, esses mediadores são modulados para baixo, indicando que a redução das citocinas pró-inflamatórias tem relação com a queda da viremia.

Em razão da persistência de altos níveis de IL-5 e CCL11 no pós-tratamento, pode-se considerar esses dois fatores como biomarcadores de resposta aos DAAs. Portanto, aventamos a possibilidade de que esses dois mediadores poderão contribuir para esclarecer eventual ausência de resposta ou recorrência da infecção pelo HCV ou mesmo a recorrência do CHC em pacientes tratados com DAAs.

Investigação recente sobre o papel das quimiocinas na fibrogênese e na quimioatração de células inflamatórias para o fígado revelou também que a CCL11, também conhecida como eotaxina, é supra regulada em células hepáticas estreladas senescentes e correlaciona com a necroinflamação e a fibrose hepática e que, por esta razão, poderia ser marcador de prognóstico desfavorável após seis anos de acompanhamento (TACKE et al., 2007).⁹

⁸JITTAVISUTTHIKUL, S.; SEESUAY, W.; THANONGSAKSRIKUL, J.; et al. Human Transbodies to HCV NS3/4A Protease Inhibit Viral Replication and Restore Host Innate Immunity. **Front. Immunol.**; 7:318, 2016.

⁹TACKE, F.; TRAUTWEIN, C.; YAGMUR, E.; et al. Up-regulated eotaxin plasma levels in chronic liver disease patients indicate hepatic inflammation, advanced fibrosis and adverse clinical course. **J. Gastroenterol. Hepatol.**; 22(8):1256-1264, 2007.

Juntos, esses resultados parecem indicar que CCL11 é uma assinatura imunológica remanescente do forte dano ao parênquima hepático induzido pelo HCV, que pode não ser totalmente suprimida em curto prazo pelo tratamento com DAAs. Em concordância, foi proposto que, além de produzir remodelamento de citocinas pró-inflamatórias, a infecção crônica por HCV está intimamente relacionada ao desenvolvimento de um perfil de quimiocinas/citocinas anti-inflamatórias e pró-fibrogênicas observado desde o início da infecção viral (PEREIRA et al., 2019; OSBURN et al., 2013; TARRAGÔ et al., 2014).¹⁰

Nossa investigação confirmou esses relatos anteriores e reitera que pacientes com cirrose hepática pelo HCV apresentam um perfil pró-inflamatório misto, caracterizado por GM-CSF, IL-15, TNF e IFN- γ , além de citocinas regulatórias, como IL-4 e IL-10. No entanto, independentemente do status da cirrose, IL-5 e CCL11 permaneceram como biomarcadores do pós-tratamento com DAAs.

Em síntese, o tratamento do HCV com DAAs resultou em notável remodelamento de biomarcadores séricos, característica dos pacientes com hepatite C crônica. Independentemente da RVS observada em todos os pacientes, a cinética dos biomarcadores séricos durante e após o tratamento com DAAs foi associada à ALT alta no pré-tratamento, à plaquetopenia e à presença de cirrose. Portanto, este estudo acrescenta novas evidências para a compreensão do processo de remodelação imunológica desencadeado por DAAs.

¹⁰PEREIRA, G.L.; TARRAGÔ, A.M.; NEVES, W.L.L.; et al. Immunological Dynamics Associated with Direct-Acting Antiviral Therapies in Naive and Experimented HCV Chronic-Infected Patients. **Mediators Inflamm.**; Article ID 4738237, 11 pages, 2019.

OSBURN, W.O.; LEVINE, J.S.; CHATTERGOON, M.A.; et al. Anti-inflammatory cytokines, pro-fibrogenic chemokines and persistence of acute HCV infection. **J. Viral. Hepat.**; 20(6):404-413, 2013.

TARRAGÔ, A.M.; DACOSTA, A.G.; PIMENTEL, J.P.; et al. Combined impact of hepatitis C virus genotype 1 and interleukin-6 and tumor necrosis factor- α polymorphisms on serum levels of pro-inflammatory cytokines in Brazilian HCV-infected patients. **Hum. Immunol.**; 75(11):1075-1083, 2014.

6.2 - Limitações

Não foi possível comparar os pacientes de forma pareada no decorrer do estudo em razão das limitações próprias de pesquisas envolvendo pacientes.

O curto tempo de seguimento pós tratamento poderá ter revelado o impacto precoce do tratamento na remodelação imunológica. Portanto, são necessários estudos que avaliem os desfechos da remodelação inicial observada com maior tempo de seguimento após a cura da infecção pelo HCV.

O kit utilizado não contempla a quantificação de fatores que poderiam contribuir para informações adicionais, como o IFN- α e o IFN tipo III (IL-28).

5.3 - Novas perspectivas

Investigar o perfil de marcadores no pós-tratamento tardio da hepatite C crônica (1 a 3 anos);

Incluir a análise da imunidade celular nos estudos de resposta imune em pacientes curados da infecção pelo HCV a médio a longo prazo;

Investigar o perfil de biomarcadores em pacientes curados da infecção pelo HCV que desenvolvem carcinoma hepatocelular.

7. APÊNDICE

1 - Termo de consentimento livre e esclarecido pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: “Fisiopatologia da Infecção crônica pelo Vírus da Hepatite C: análise do impacto da interação do vírus HCV com componentes do sangue periférico e de biomarcadores imunológicos da resposta terapêutica”.

Protocolos CAAE11830412.4.0000.5149 e aditivo CAAE 15732513.0.1001.5149

Prezado(a) Sr(a). _____

O(A) Sr(a). está sendo convidado para participar de um estudo denominado “*Aspectos fisiopatológicos da hepatite C crônica: análise do impacto da interação do vírus HCV com componentes do sangue periférico e de biomarcadores imunológicos da resposta terapêutica*”.

Antes que o(a) Sr(a). decida participar, é importante que saiba por que o estudo está sendo feito e o que ele significará para o(a) Sr(a). O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais revisou os objetivos e a proposta deste estudo e forneceu um parecer favorável para a sua realização.

Este documento tem a finalidade de fornecer todas as informações que o(a) Sr(a). precisa saber. Tome o tempo que precisar para ler este documento com atenção. O(a) Sr(a). poderá fazer as perguntas que desejar a fim de compreender totalmente os objetivos e os métodos deste estudo antes de decidir se deseja ou não participar.

QUAL É A FINALIDADE DO ESTUDO?

A finalidade deste estudo é obter um melhor entendimento da associação do vírus causador da hepatite C com o sangue e seus componentes, ou seja, suas células, como as hemácias e as plaquetas, e investigar e implantar um método de monitoração de carga viral mais sensível que o método convencional utilizado. Entender o impacto dessa interação na doença dos pacientes

HCV positivos antes, durante e após o tratamento será muito importante para orientar os médicos sobre como tratar melhor os pacientes no futuro.

O estudo será realizado a partir de amostras de sangue oriundas do(a) Sr(a) em momentos distintos do tratamento da hepatite C (pré-tratamento, durante e ao término do tratamento) realizado conforme o protocolo do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG (AHEV/IAG/HC/UFMG). E, a partir destas amostras, serão realizados testes que nos permitam entender a interação do vírus com o sangue e a importância disto no tratamento proposto por seu médico. Estes testes serão realizados na Fundação Osvaldo Cruz, Laboratório de Biomarcadores, em Belo Horizonte, coordenado pelo Dr. Olindo Assis Martins Filho que é o coordenador geral deste projeto, juntamente com a subcoordenadora Prof. Rosângela Teixeira, que também coordena o Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

Espera-se que o estudo comece em 2013 e continue até 2015. Se o(a) Sr(a). atender às exigências para entrar no estudo e concordar em participar, a duração da sua participação esperada será de aproximadamente 18 meses, dependendo do início e da duração do tratamento determinado para o seu caso estabelecido pelo seu médico. Portanto, este estudo não irá modificar em nada o tratamento da hepatite C que está sendo proposto para o(a) Sr(a). pelo seu médico.

EU PRECISO PARTICIPAR?

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. O seu tratamento e a sua relação com seu médico não serão afetados caso o(a) Sr(a). opte por não participar dele.

Se o(a) Sr(a). optar por participar, precisará assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para confirmar que a finalidade, duração e efeitos previsíveis do estudo foram explicados e que o(a) Sr(a). concordou em participar.

Com o consentimento, o(a) Sr(a). dará a sua permissão para que amostras de sangue sejam coletadas e que informações específicas contidas no seu prontuário médico sejam extraídas. Estas informações serão confidenciais e anotadas pela pesquisadora principal do estudo e serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes visando o melhor entendimento dos fatores

envolvidos na pesquisa. É importante que o(a) Sr(a). saiba que a sua identidade será preservada e que as anotações não serão identificadas com o seu nome.

O(a) Sr(a). poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem afetar de maneira alguma a sua assistência médica futura. Para se retirar deste estudo, notifique à pesquisadora principal do estudo ou o coordenador de pesquisas do grupo de hepatites (veja as informações para contato abaixo).

O pesquisador responsável ou autoridades regulatórias podem encerrar o estudo ou a sua participação no estudo, a qualquer momento, sem o seu consentimento. Contudo, o seu tratamento não será jamais interrompido por este motivo e o(a) Sr(a). continuará com a mesma assistência médica inicial. Portanto, a interrupção do tratamento só acontecerá por motivos médicos, conforme decisão do seu médico, e não por causa dessa pesquisa.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU PARTICIPAR?

Se o(a) Sr(a). concordar em participar deste estudo, amostras de sangue oriundas do(a) Sr(a) em momentos distintos do tratamento da hepatite C (pré-tratamento, durante e ao término do tratamento) serão coletadas e o seu médico preencherá um questionário com informações sobre o(a) Sr(a)., a sua doença. O questionário coletará informações sobre o(a) Sr(a)., como idade, sexo e histórico médico relevante. Coleta também informações sobre a hepatite C, o tratamento indicado para a hepatite C e outros tratamentos que forem indicados para o seu caso.

É importante que saiba que para que o(a) Sr(a). participe do estudo não será necessário comparecer a nenhuma consulta extra, tomar qualquer outro medicamento experimental ou outro medicamento que não seja os que seu médico lhe receitou. O(A) Sr(a). também não será submetido(a) a nenhum exame adicional para que participe deste estudo. Somente será feito o procedimento de coleta do sangue no ambulatório do Hospital das Clínicas para posterior análise no laboratório. É importante esclarecer que estas coletas não afetarão em nada o seu tratamento proposto.

A sua participação neste estudo não terá impacto sobre as decisões de tratamento feitas pelo seu médico.

O(A) Sr(a). será solicitado(a) a continuar participando do estudo após a sua entrada até a

conclusão do seu tratamento ou então até que o(a) Sr(a). decida sair do estudo ou que ele seja encerrado. Pediremos que informe ao seu médico caso mude de residência e ainda que nos forneça informações sobre uma pessoa para contato alternativo (família ou amigo) que estará autorizada a informar o seu último endereço conhecido e o número de telefone, caso o seu médico e equipe não sejam capazes de contatá-lo.

QUAIS SÃO OS RISCOS DO ESTUDO?

Conforme dito acima, este estudo não requer que o(a) Sr(a). tome qualquer medicamento fora do tratamento proposto pelo médico(a) que o assiste na rotina. Este estudo também não irá modificar nada no tratamento proposto que seguirá o protocolo do serviço. Portanto, a sua participação no estudo não irá trazer riscos adicionais àqueles que são do próprio tratamento da hepatite C e que lhe serão explicados pelo seu médico e equipe do ambulatório antes que inicie o tratamento.

As quatro coletas de sangue (antes, durante e após o término do tratamento) que serão realizadas para esta pesquisa deverão retirar uma pequena quantidade de sangue (0,5 mililitros) na veia do braço. Este procedimento é semelhante ao que o(a) Sr(a). realiza nos laboratórios de rotina. Contudo, toda punção venosa tem um risco de pequeno desconforto e dor local e raramente podem ocorrer manchas vermelhas (ou hematomas) no local da punção. Contudo, estes riscos são minimizados quando a punção é realizada por técnico treinado e capacitado, como ocorre no nosso serviço.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS OBTIDOS COM A PARTICIPAÇÃO DO SR(A) NO ESTUDO?

Embora não exista nenhum benefício direto para o(a) Sr(a). com a sua participação, os dados coletados de cada paciente e examinados em conjunto ajudarão a conhecer e compreender melhor a interação do vírus causador da hepatite C com o sangue e o tratamento de pacientes com hepatite C e poderão beneficiar outras pessoas que serão tratadas no futuro. Mas é muito importante o(a) Sr(a). saber que o seu tratamento não será modificado em nenhuma hipótese com a sua participação. Portanto, as suas chances de resposta ao tratamento não serão aumentadas nem diminuídas com a sua participação.

E QUANTO À CONFIDENCIALIDADE?

Para os propósitos da sua participação neste estudo e para a proteção da sua identidade, o seu médico irá atribuir para o(a) Sr(a). um código único, tal como uma série de números e/ou letras. O médico do estudo registrará os dados do estudo coletados em um formulário que usa o código que lhe foi atribuído e não o seu nome. Isto tem a intenção de proteger os seus dados do estudo, tornando-os anônimos para a maioria dos propósitos do estudo.

Os dados que são registrados com o código atribuído ao invés de seu nome, são chamados “**dados codificados**”. Os dados codificados serão inseridos na base de dados do estudo, no computador. O seu médico do estudo manterá uma lista confidencial ligando o seu nome ao seu código e apenas pessoas autorizadas terão acesso a esta lista. Os seus dados codificados podem ser compartilhados e utilizados apenas pela equipe do projeto de pesquisa e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG). Os seus dados codificados serão utilizados neste estudo e podem ser:

- Utilizados para outras pesquisas atuais ou futuras envolvendo o tratamento e controle da hepatite C, condições de saúde relacionadas, ou para outra pesquisa relevante de saúde;
- Utilizados em publicações sobre este estudo, mas eles permanecerão codificados. A sua identidade não será revelada em qualquer compilação, relatório de estudo ou publicação a qualquer momento.

O(a) Sr(a). terá o direito de inspecionar os dados que estão sendo compilados, solicitar a correção de dados incorretos, e se opor ao processamento dos seus dados pessoais, a qualquer momento.

E QUANTO AOS CUSTOS?

O(a) Sr(a). não receberá qualquer compensação pela sua participação no estudo, e este também não lhe acarretará custos.

O(a) Sr(a). não receberá qualquer tratamento grátis para a hepatite C pela sua participação neste estudo.

CONTATO PARA OUTRAS INFORMAÇÕES

O(a) Sr(a). receberá uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado. Se tiver dúvidas sobre qualquer aspecto deste estudo, pode solicitar outras informações, a qualquer momento durante o estudo à **Dra. Rosângela Teixeira no telefone (fax) (031) 3409 9748. Se o(a) Sr(a). ou seu representante tiver qualquer dúvida sobre os seus direitos como paciente,**

relacionadas a este estudo que não forem solucionados pela coordenadora do estudo, poderá também contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG que é o órgão que regulamenta a realização de pesquisas na UFMG, no endereço Av. Pres. Antônio Carlos, 6627- Unidade administrativa II – 2º andar – sala 2005. CEP: 31270-901 – BH-MG telefax (031) 3409-4592 - email:coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Li o termo de consentimento livre e esclarecido para este estudo “Fisiopatologia da Infecção pelo Vírus da Hepatite”.
2. Recebi explicações sobre a finalidade, duração e possível benefício do estudo e sobre o que é esperado que eu faça.
Minhas perguntas foram respondidas de maneira satisfatória.
3. Concordo livremente em participar deste estudo.
4. Entendo que a minha participação no estudo é voluntária e que sou livre para me retirar a qualquer momento, sem dar qualquer razão, sem que minha assistência médica ou os meus direitos legais sejam afetados.
5. Monitores e coordenadores de pesquisa, Comitê de Ética em Pesquisa ou autoridades regulatórias podem querer examinar os meus prontuários médicos para verificar as informações coletadas.
6. Ao assinar este documento, dou permissão para coleta de amostras de sangue e análise dos meus dados no prontuário médico do Hospital das Clínicas da UFMG.
7. Dou o meu consentimento para o uso, armazenamento e retenção dos meus dados pessoais para as finalidades do estudo descrito neste documento.

Nome do paciente
Data

Assinatura

Nome do representante (se aplicável)
Data

Assinatura

Médico ou pessoa que conduziu a discussão sobre o consentimento livre e esclarecido

Confirmo que expliquei pessoalmente a natureza, finalidade e duração do estudo ao sujeito supracitado.

_____	_____
Nome do médico	Assinatura
Data (deve ser a mesma data)	

Testemunha imparcial

As informações deste documento e quaisquer outras informações por escrito foram claramente explicadas e aparentemente compreendidas, e o consentimento foi concedido livremente pelo paciente.

_____	_____
Nome da testemunha*	Assinatura*
Data	

*Testemunha imparcial: Se o paciente não souber ler, será necessária a assinatura de uma testemunha imparcial. Uma testemunha imparcial é uma pessoa independente do estudo que não pode estar sob a influência de pessoas ligadas à pesquisa clínica, e que se encontra presente durante o processo de consentimento e lê o TCLE e qualquer outra informação por escrito dada ao paciente.

2 - Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos saudáveis

Título do estudo: “Fisiopatologia da Infecção crônica pelo Vírus da Hepatite C: análise do impacto da interação do vírus HCV com componentes do sangue periférico e de biomarcadores imunológicos da resposta terapêutica”.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO “*Avaliação do estado nutricional, da massa óssea, de mediadores inflamatórios, da resiliência e da qualidade de vida relacionada à saúde em pacientes com hepatite B ou C crônica (tratados e não tratados com terapia antiviral)*”. (Indivíduos saudáveis)

O (a) Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa “*Avaliação do estado nutricional, da massa óssea, de mediadores inflamatórios, da resiliência e da qualidade de vida relacionada à saúde em pacientes com hepatite B ou C crônica (tratados e não tratados com terapia antiviral)*”. Esse projeto tem como objetivo avaliar alguns fatores que podem alterar a qualidade de vida de pacientes com hepatite B ou C crônica, que são atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG. Esses fatores são os seguintes: condição nutricional (obesidade, magreza, peso normal, estado de saúde do músculo) e alimentação; uso de álcool e tabaco; condições socioeconômicas; condição clínica; capacidade de exercer atividade física; resiliência. Essa última, isto é, resiliência pode ser definida como características que as pessoas têm que permitem a elas adaptarem e enfrentarem de forma melhor as situações difíceis de suas vidas. Contudo, precisamos de sua colaboração, pois a coleta de sangue de pessoas com boa saúde é muito importante para esse estudo. É com essa avaliação que poderemos saber sobre as diferenças na produção dessas substâncias. Isto é, comparar as substâncias das pessoas que carregam o vírus (pessoas com infecção) e pessoas com boa saúde. Ao participar da nossa pesquisa, serão feitas as seguintes etapas: a). Avaliação nutricional: coletaremos dados como peso, altura, medidas corporais [medidas das pregas cutâneas (da pele), circunferências da cintura e da panturrilha,

bioimpedância (avaliar músculo e gordura do seu organismo), dinamometria (avaliar a saúde do músculo)] e hábitos alimentares (como é constituídaa sua alimentação); b). Avaliação dos ossos e dos músculos pelo exame de densitometria óssea/composição corporal, o qual avalia ao mesmo tempo a saúde dos ossos e dos músculos ea quantidade de gordura do seu corpo. A única contraindicação para esse exame é a gravidez devido ao uso de radiação ionizante durante o exame. A dose de radiação usada é 200 vezes menor que a radiação usada para uma radiografia de tórax convencional; c) Responder ao questionário que avalia o risco da perda de músculos do corpo (triagem da perda de músculos);

d) Responder aos questionários que avaliam a resiliência. Ainda, serão coletados 10 ml de sangue

para estudo das defesas do seu organismo e o único incômodo será o da punção venosa. A única finalidade desse exame é a coleta de dados para essa pesquisa, a amostra de seu sangue será descartada após realizarmos os procedimentos não sendo aproveitada para outros experimentos de qualquer natureza. Seu nome e quaisquer outras informações que possam lhe identificar não aparecerão em nenhuma apresentação ou publicação resultantes desse estudo. A participação é voluntária e este consentimento poderá ser retirado a qualquer tempo, sendo garantida a continuidade do tratamento, mesmo não aceitando a participar da pesquisa. Se você tiver alguma dúvida poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa pelo telefone (31) 99903-6988 e pelos e-mails lucianadinizsilva@gmail.com/martapaula01@hotmail.com ou

com o Comitê de Ética em Pesquisa para esclarecimento das questões éticas relacionadas à pesquisa, pelo e-mail coep@prpq.ufmg.br e pelo endereço Av. Antônio Carlos, 6627-
Unidade

Administrativa II- 2º andar- Sala 2005- Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG- Brasil.
CEP:31270-091 ou pelo telefone 31 3409-4592.

O participante e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com o participante e outra com o pesquisador.

Pesquisadores Responsáveis: Marta Paula Pereira Coelho; Dra. Luciana Diniz Silva;

Instituição a que pertence os Pesquisadores Responsáveis: Universidade Federal de Minas Gerais.

Telefones para contato: (31)99903-6988; (31) 3409- 9933-9784

Assino este termo de consentimento em concordância para participar deste estudo. Belo Horizonte, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do paciente: _____

Assinatura do pesquisador: _____

3 – Aprovações COEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE –15732513.0.1001.5149

Interessado(a): **Profa. Rosângela Telxêira**
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 11 de junho de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "Fisiopatologia da Infecção crônica pelo Vírus da Hepatite C: análise do impacto da interação do vírus HCV com componentes do sangue periférico e de biomarcadores imunológicos da resposta terapêutica" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE -15732513.0.1001.5149

Interessado(a): Profa. Rosângela Teixeira
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 28 de julho de 2015, a emenda, abaixo relacionada, do projeto de pesquisa intitulado "**Fisiopatologia da Infecção crônica pelo Vírus da Hepatite C; análise do impacto da interação do vírus HCV com componentes do sangue periférico e de biomarcadores imunológicos da resposta terapêutica**".

- Prorrogação de prazo para inclusão de pacientes para o ano de 2016;
- Aprovação do TCLE Projeto HCV datado de 18 de junho de 2015;

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


Profa. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG