

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

Lucy Ana Santos Fonseca

**BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS E SUA REDE DE CONEXÕES EM**  
**PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR E CIRROSE HEPÁTICA**  
**ASSOCIADA AO VÍRUS DA HEPATITE C**

Belo Horizonte  
2023

Lucy Ana Santos Fonseca

BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS E SUA REDE DE CONEXÕES EM PACIENTES  
COM CARCINOMA HEPATOCELULAR E CIRROSE HEPÁTICA ASSOCIADA AO  
VÍRUS DA HEPATITE C

Dissertação apresentada ao curso de Pós- Graduação  
da Faculdade de Medicina da Universidade Federal  
de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Ciências Aplicadas à  
Saúde do Adulto

Orientadora: Prof. Dra. Rosângela Teixeira

Coorientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Belo Horizonte  
2023

F676b Fonseca, Lucy Ana Santos.  
Biomarcadores imunológicos e sua rede de conexões em pacientes com Carcinoma Hepatocelular e Cirrose Hepática associada ao vírus da Hepatite C [recursos eletrônicos]. / Lucy Ana Santos Fonseca. -- Belo Horizonte: 2023.  
58f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Rosangela Teixeira.  
Coorientador (a): Olindo Assis Martins Filho.  
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Carcinoma Hepatocelular. 2. Hepatite C. 3. Cirrose Hepática. 4. Biomarcadores. 5. Citocinas. 6. Dissertação Acadêmica. I. Teixeira, Rosangela. II. Martins Filho, Olindo Assis. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WI 735

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



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

### FOLHA DE APROVAÇÃO

#### BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS E SUA REDE DE CONEXÕES EM PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR E CIRROSE HEPÁTICA ASSOCIADA AO VÍRUS DA HEPATITE C

LUCY ANA SANTOS FONSECA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia vinte e três de agosto de dois mil e vinte e três, 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

Cássia Regina Guedes Leal  
Huap-UFF

Luara Isabela dos Santos  
FCMMG

Belo Horizonte, 23 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Luara Isabela dos Santos, Usuário Externo**, em 24/08/2023, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rosângela Teixeira, Cidadã**, em 25/08/2023, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Olindo Assis Martins Filho, Usuário Externo**, em 25/08/2023, às 11:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **cassia regina guedes leal, Usuária Externa**, em 30/10/2023, às 12:50, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2545512** e o código CRC **BCCC13A4**.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Rosângela, exemplo de médica e líder, que me inspirou desde minha época de residência e ao Dr. Olindo, pesquisador ímpar e genial, sempre muito cuidadoso e impecável.

Ao Gerado e à Luiza, casal maravilhoso, que me auxiliaram de todas as formas possíveis e à Raquelzinha (in *memoriam*), exemplo de ser humano. Sem esses três o trabalho não teria início, meio e fim.

À Rhaissa e à Isabela, colegas de caminhada no mestrado.

Aos meus pais, Lucy e João, meus amores, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todas as escolhas de vida.

Ao Marcelo, meu marido, parceiro de vida, que me ajudou imensamente na realização deste projeto e de tantos outros!

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** o carcinoma hepatocelular (CHC) está associado ao desequilíbrio da resposta imune mediado pelo tumor e hospedeiro. A resposta virológica sustentada (RVS) reduz, mas não elimina o risco de CHC. Este estudo analisou biomarcadores solúveis periféricos, em pacientes com CHC com vírus da hepatite C (HCV) e com RVS.

**MÉTODOS:** 62 adultos cirróticos com CHC foram distribuídos em dois grupos: virêmicos (CHC-HCV, n=30) ou com RVS (CHC-RVS, n=32). 32 Participantes saudáveis foram controles (CT). Parâmetros qualitativos e quantitativos (Luminex Bio-Plex) comparativos, correlações (Spearman), interações (software Cytoscape Consortium 2.8), *heat maps* e diagramas visuais de tipologia de mediadores solúveis periféricos (citocinas pró-inflamatórias, regulatórias, quimiocinas e fatores de crescimento) foram analisados por métodos estatísticos apropriados e área sob a curva ROC (AUC-ROC).

**RESULTADOS:** aumento significativo dos mediadores solúveis foi observado nos grupos CHC comparados ao CT. Houve menor quantificação de CCL3, CXCL10, IFN-g, IL-1Ra, IL-10 e VEGF no grupo CHC-RVS comparado ao CHC-HCV. CXCL10 e CCL3 apresentaram maior acurácia para discriminar os grupos CHC (AUC-ROC: 0,77 e 0,73, respectivamente). Valores de CXCL10 e CCL3 menores que 38,6pg/mL e 1,3pg/mL (razão de verossimilhança de 3 e 15), respectivamente, qualificaram o grupo HCV-RVS. Correlações intensas da rede integrativa de mediadores foram observadas no CT, com significativa perda de conectividade no grupo CHC-HCV, com eixo no polo entre quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, e recuperação discreta da conectividade no grupo CHC-RVS, com eixo desviado para citocinas reguladoras e fatores de crescimento.

**CONCLUSÕES:** CXCL10 e CCL3 apresentaram maior desempenho para caracterizar os grupos CHC. As redes integrativas de conexões entre mediadores solúveis apresentaram perfis muito distintos entre os grupos CHC virêmico (CHC-HCV) e com RVS (CHC-RVS). A maior rede de conexões no grupo CHC-RVS sugere o impacto da cura da infecção pelo HCV na reconstituição imune, a despeito de permanecer menos robusta do que a observada no grupo CT. Estes resultados somam conhecimento a respeito dos distintos perfis de resposta imune em pacientes com CHC virêmicos ou com RVS, o que poderá ter implicações oncogênicas de importância clínica.

**PALAVRAS CHAVES:** Carcinoma hepatocelular; hepatite C; cirrose hepática; biomarcadores; citocinas.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is associated with tumor- and host-mediated immune response imbalance. Sustained virological response (SVR) reduces but does not eliminate the risk of HCC. This study analyzed peripheral soluble biomarkers in patients with HCC with hepatitis C virus (HCV) and with SVR.

**METHODS:** 62 cirrhotic adults with HCC were categorized into two groups: viremic (HCC-HCV, n=30) or with SVR (HCC-SVR, n=32). 32 Healthy participants were controls (CT). Comparative qualitative and quantitative parameters (Luminex Bio-Plex), correlations (Spearman), interactions (Cytoscape Consortium 2.8 software), heat maps and visual typology diagrams of peripheral soluble mediators (pro-inflammatory and regulatory cytokines, chemokines, and growth factors) were analyzed by appropriate statistical methods and area under the ROC curve (AUC-ROC).

**RESULTS:** A significant increase in soluble mediators was observed in the CHC groups compared to the CT group. There was less quantification of CCL3, CXCL10, IFN-g, IL-1Ra, IL-10 and VEGF in the CHC-RVS group compared to CHC-HCV. CXCL10 and CCL3 were more accurate in discriminating HCC groups (AUC-ROC: 0.77 and 0.73, respectively). CXCL10 and CCL3 values lower than 38.6pg/mL and 1.3pg/mL (likelihood ratio of 3 and 15), respectively, qualified the HCV-SVR group. Strong correlations of the integrative network of mediators were observed in the CT, with a significant loss of connectivity in the HCC-HCV group, with an axis between chemokines and pro-inflammatory cytokines, and a slight recovery of connectivity in the HCC-SVR group, with an axis shifted to regulatory cytokines and growth factors.

**CONCLUSIONS:** CXCL10 and CCL3 performed better to characterize HCC groups. The integrative networks of connections between soluble mediators showed distinct profiles between viremic HCC (HCC-HCV) and with SVR (HCC-SVR) participants. The greater network of connections in the CHC-SVR group suggests the impact of HCV eradication on immune reconstitution, despite remaining less robust than that observed in the CT group. These results add knowledge about the distinct immune response profiles in patients with viremic HCC or with SVR, which may have clinically significant oncogenic implication.

**KEYWORDS:** Hepatocellular carcinoma; hepatitis C; cirrhosis; biomarkers; cytokines.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFL	Alfa-fetoproteína
ALT	Alanino Aminotransferase
APRI	Relação aspartato-Amino-Transferase/Plaquetas
AST	Aspartato Aminotransferase
AUC	<i>Area under curve</i> – área sob a curva
CHC	Carcinoma hepatocelular
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
DAAs	Antivirais de Ação Direta
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
FA	Fosfatase alcalina
FIB-4	<i>Fibrose escore-4</i> – escore de fibrose 4
HCV	Hepatitis C virus (vírus da hepatite C)
GGT	Gama Glutamil Transferase
IFN	Interferon
IIQ	Intervalo interquartilico
LI-RADS	<i>Liver Imaging Reporting and Data System</i>
MELD	<i>Model of end stage liver disease</i>
Na	Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PS	<i>Performance Status</i>
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido ribonucléico
RNI	Relação Normatizada Internacional
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i> (curva ROC)
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
US	Ultrassonografia
TC	Tomografia computadorizada

## SUMÁRIO

<b>I - INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA</b>	<b>9</b>
<b>II - ANTECEDENTES CIENTÍFICOS</b>	<b>9</b>
Carcinoma hepatocelular: aspectos clínicos e epidemiológicos	9
Diagnóstico e estadiamento do carcinoma hepatocelular	11
Hepatite C crônica e sua relação com o carcinoma hepatocelular	12
O impacto do tratamento da hepatite C na ocorrência e recorrência do CHC	12
Aspectos fisiopatológicos da carcinogênese do carcinoma hepatocelular associado à hepatite C crônica	13
Aspectos da imunologia da associação entre a hepatite C crônica e o carcinoma hepatocelular	14
<b>III - OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
Primário	16
Secundários	16
<b>IV - METODOLOGIA</b>	<b>17</b>
Desenho do estudo	17
Seleção dos participantes	17
Critérios de inclusão	17
Critérios de exclusão ou de não inclusão	18
Locais de realização da pesquisa	18
Coleta de material biológico	18
Metodologia de execução dos experimentos imunes	19
Análise estatística	20
Aspectos éticos	21
<b>V - RESULTADOS</b>	<b>22</b>
<b>VI - DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
<b>VII - CONCLUSÕES</b>	<b>36</b>
<b>VIII - REFERÊNCIAS</b>	<b>38</b>
<b>IX - ANEXOS</b>	<b>43</b>
Tabelas	43
Gráficos	45
Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	49
Parecer COEP	54

## I – INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um sério problema de saúde pública mundial, com aumento crescente de incidência. Trata-se de tumor associado à cirrose hepática em cerca de 90% dos casos cuja evolução clínica e prognóstico são, ainda, muito reservados, caracterizando-o como agravo de alta mortalidade.<sup>1</sup>

Os tratamentos atuais da hepatite C com os novos antivirais de ação direta, ou DAAs (*direct-acting antiviral agents*), são altamente eficazes, com taxas de resposta virológica sustentada (RVS) superiores a 95%.<sup>2</sup> No entanto, apesar desse notável avanço, a cirrose associada ao vírus de hepatite C (*hepatitis C virus* - HCV) continua a principal causa de CHC no mundo ocidental, a despeito da redução de incidência com a cura da infecção viral.<sup>2</sup>

Estudos têm revelado que a RVS está associada à redução significativa no risco de desenvolver CHC, de cerca de 70%, independentemente do estágio da fibrose hepática inicial. No entanto, a RVS não elimina o risco de desenvolvimento de CHC, sobretudo em pacientes com fibrose avançada e cirrose.<sup>3;4</sup>

As evidências científicas revelam que a inflamação hepática contínua e duradora está associada ao desenvolvimento do CHC. Por sua vez, este tumor é altamente imunogênico, caracterizado por extensa infiltração de células imunes.<sup>5;6</sup> Portanto, estudos que visam analisar a interação dos processos imunes associados às hepatopatias crônicas são importantes para a maior compreensão da fisiopatologia tumoral. Assim, este estudo visa analisar aspectos da imunologia de pacientes com CHC associado à cirrose secundária à hepatite C crônica, através da análise de biomarcadores imunes, com foco em citocinas e sua rede de interações.

## II - ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

### *Carcinoma hepatocelular: aspectos clínicos e epidemiológicos*

O câncer primário de fígado compreende um grupo heterogêneo de tumores com diferentes características histológicas, sendo que o carcinoma hepatocelular (CHC) contabiliza a maior parte desses tumores, cerca de 90%, seguido pelo colangiocarcinoma intra-hepático e outros mais raros, como o carcinoma fibrolamelar e o hepatoblastoma.<sup>7</sup>

O CHC ocupa, atualmente, a posição de quinto câncer mais comum e de terceira causa mais frequente de morte relacionada ao câncer em todo o mundo.<sup>8</sup> Estimativas do GLOBOCAN são de que as mortes por câncer de fígado devem aumentar em cerca de 55% até 2040, caso não sejam adotadas medidas preventivas. Deve haver, ainda, registro de 1,4 milhão de novos

diagnósticos e 1,3 milhão de óbitos. Assim, estima-se a taxa anual mundial de meio milhão de novos casos ou mortes.<sup>8</sup>

Fato notável no CHC é a sua alta mortalidade, com taxa de sobrevida de 18% em cinco anos.<sup>9</sup> Em muitos casos, o diagnóstico é tardio, já em estádios avançados, sem possibilidade de terapia curativa, o que implica em sobrevida mediana de seis a 12 meses após o diagnóstico.<sup>10</sup>

No Brasil, os dados sobre a incidência de CHC são, ainda, limitados. Em estudo observacional retrospectivo com informações disponíveis no DATASUS, foram identificados 28.822 casos entre julho de 2011 e junho de 2016, compreendendo 0,7% dos diagnósticos de neoplasias no país. Cerca de 76% dos diagnósticos foram em estágio avançado.<sup>11</sup>

Aproximadamente 90% dos tumores estão associados a uma ou mais etiologias subjacentes conhecidas.<sup>1</sup> Apesar da incidência global muito variável, atribuída à prevalência heterogênea dos fatores de risco nos diversos países, a hepatite C crônica e o alcoolismo permanecem como os principais fatores.<sup>12</sup> Assim, cerca de 31% dos casos são atribuídos à infecção pelo HCV em todo o mundo.<sup>1</sup> Deve-se salientar que a implementação da vacinação universal contra a hepatite B e o tratamento da hepatite C com os novos antivirais de ação direta, os DAAs, estão mudando esse panorama<sup>5</sup>, somados à emergência de casos de CHC associado à doença hepática gordurosa não alcoólica, sobretudo em países desenvolvidos.<sup>12</sup>

Cerca de um terço dos pacientes com cirrose desenvolverão CHC, com taxa anual de 1-8% ao ano.<sup>1; 12</sup> Tem-se reconhecido que o envelhecimento, sobretudo acima de 70 anos, o sexo masculino (proporção de homens para mulheres acometidos na razão de 2,3:1) e a presença de hipertensão portal clinicamente significativa são importantes fatores de risco.<sup>13</sup> Estudos revelam que a incidência de CHC aumenta paralelamente ao aumento da pressão portal.<sup>9</sup>

A hipertensão portal é uma das principais consequências da cirrose, responsável por complicações graves, como a ascite, o sangramento varicoso e a encefalopatia hepática.<sup>14</sup> A presença de varizes esofagogástricas visualizadas em métodos de imagem ou por endoscopia digestiva alta confirma o diagnóstico.<sup>15</sup>

### ***Diagnóstico e estadiamento do carcinoma hepatocelular***

Em pacientes com cirrose hepática de qualquer etiologia, o rastreamento do CHC visa detectar o tumor em fases precoces e possibilitar tratamentos curativos que reduzem a mortalidade.<sup>12; 16</sup> Portanto, recomenda-se o rastreamento semestral do tumor através da ultrassonografia abdominal, realizada por profissional experiente, com ou sem a dosagem da alfa-fetoproteína (AFP).<sup>17</sup> A combinação da ultrassonografia com AFP aumenta a sensibilidade

de detecção do CHC precoce de 53 para 63%, mantendo-se uma estratégia de bom custo-benefício.<sup>18</sup>

Uma vez que um nódulo hepático suspeito é identificado, principalmente igual ou maior que um centímetro, o diagnóstico de CHC precisa ser confirmado ou afastado através de exames de imagem mais precisos.

Os métodos de imagem contrastados trifásicos, como a tomografia computadorizada (TC) ou a ressonância magnética (RM), são essenciais para a análise de nódulos suspeitos uma vez que, diferentemente dos demais cânceres sólidos, o diagnóstico do CHC, no contexto de fígado cirrótico ou nos casos de hepatite B crônica, é estabelecido com base nesses métodos de imagem sem necessidade de confirmação por biópsia.<sup>1;19</sup>

A assertividade do diagnóstico do CHC por métodos de imagem parte do entendimento do desarranjo vascular peculiar que ocorre na carcinogênese hepática e da alta probabilidade pré-teste de CHC no cenário de cirrose.<sup>1</sup> Para TC e RM multifásicas, os principais recursos de imagem incluem tamanho igual ou maior que um centímetro, hiperrealce do tumor na fase arterial e, dependendo do tamanho exato, uma combinação de *washout*, crescimento do tumor e aparência da cápsula.<sup>16;19</sup>

De acordo com a classificação LI-RADS (*Livre Imaging Reporting and Data System*),<sup>20</sup> amplamente utilizada em todo o mundo, os nódulos hepáticos são classificados em:

- LI-RADS 1 e LI-RADS 2 - indicam nódulo definitivamente e provavelmente benigno, respectivamente;
- LI-RADS 3 - indica baixa probabilidade de CHC;
- LI-RADS 4 - indica provável CHC;
- LI-RADS 5 - confirma o diagnóstico de CHC.

### ***Hepatite C crônica e sua relação com o carcinoma hepatocelular***

A hepatite C crônica é um importante problema de saúde pública mundial. Estimativas atuais apontam para cerca de 58 milhões de pessoas vivendo com o HCV no mundo e cerca de 1,5 milhão de novas infecções ao ano.<sup>21</sup> Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2019 ocorreram cerca de 290.000 óbitos por complicações da hepatite C crônica, como cirrose descompensada e CHC.<sup>21</sup> No Brasil, de 1999 a 2017, foram notificados 331.855 casos e a prevalência atual estimada de pessoas soro-reagentes (anti-HCV positivo) é de cerca de 0,7%.<sup>22</sup> De 2000 a 2021, 279.872 casos foram diagnosticados, com 62.611 óbitos.<sup>23</sup>

A progressão da hepatite C crônica caracteriza-se por inflamação hepática persistente e formação de cicatrizes fibróticas progressivas que resultam em cirrose em 10-20% dos pacientes em 20-30 anos de infecção.<sup>24</sup> Assim, a lesão hepática pode variar, em duas décadas, de alterações histológicas mínimas, em cerca de 30% dos que adquirem a infecção, a fibrose extensa, cirrose e surgimento de CHC.<sup>25</sup> Como a progressão da fibrose não é linear, é difícil estimar o prognóstico e as futuras complicações.<sup>5</sup> Dado o curso muitas vezes indolente e silencioso da hepatite C crônica, não é incomum o diagnóstico somente quando surgem as complicações da doença hepática avançada.<sup>2</sup>

Uma vez que a doença hepática crônica é estabelecida, é importante estadiar a doença. Os escores de *Child-Pugh*, *Model for End-Stage Liver* (MELD) e MELD-Na (MELD-sódio) têm sido amplamente utilizados para classificar a cirrose e prever o risco de mortalidade, respectivamente.<sup>26</sup> Pacientes com cirrose que preenchem os critérios da classe A são ditos compensados, enquanto os categorizados como B ou C apresentam cirrose descompensada.<sup>15</sup>

### ***O impacto do tratamento da hepatite C na ocorrência e recorrência do CHC***

O tratamento da hepatite C crônica iniciou na década de 80 com regimes terapêuticos baseados em interferons, com ou sem ribavirina, com baixas taxas de resposta virológica sustentada (RVS), da ordem de 50%, muitos efeitos colaterais, uso prolongado e limitações importantes de seu uso, como em pacientes cirróticos.<sup>27</sup> Por volta de 2011, surgiram os primeiros antivirais de ação direta, inicialmente associados aos interferons mais ribavirina, até que, a partir de 2017, foram apresentados os estudos de fase 3 com os tratamentos antivirais orais, de curta duração, bem tolerados, com mínimas restrições de uso e com chances de resposta virológica sustentada acima de 97%.<sup>2,28</sup> Trata-se, portanto, de um notório acontecimento na história da Medicina, onde a hepatite C crônica tornou-se a primeira infecção viral crônica curável.<sup>27</sup>

O objetivo principal do tratamento, independentemente do esquema terapêutico, é a resposta virológica sustentada (RVS), definida por RNA do HCV indetectável no soro ou plasma 12 ou 24 semanas após o término do tratamento, avaliada por método de biologia molecular com limite inferior de detecção  $\leq 15$  UI/ml RNA de HCV.<sup>2</sup> A RVS está associada à normalização das enzimas hepáticas, denotando melhora da necroinflamação e, progressivamente, da fibrose hepática.<sup>2</sup>

Na era dos interferons, vários estudos demonstraram redução na incidência do CHC a longo prazo após a cura da infecção, embora o risco fosse mantido em pacientes com fibrose

hepática avançada ou cirrose.<sup>29,30</sup> Em seguida, outros estudos com seguimento de longo prazo, como o HALT-C<sup>31</sup> (*Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment against Cirrhosis*), confirmaram menor incidência da CHC em pacientes com RVS comparados aos não respondedores. No entanto, pacientes com mais de 65 anos e com fibrose hepática avançada ou cirrose mantinham risco de CHC, especialmente os com comorbidades, como diabetes.<sup>31; 32</sup>

Aguardava-se que a cura da infecção pelo HCV com os DAAs resultasse em redução dramática na incidência de CHC. Todavia, estudos observacionais iniciais relataram aumento inesperado tanto na ocorrência quanto na recorrência do CHC em pacientes com RVS tratados com essas drogas, sugerindo que o tratamento com DAAs poderia estar relacionado à recorrência do CHC com base em alteração da vigilância imunológica após a erradicação do HCV.<sup>33; 34</sup> Grande parte desses estudos foi criticada por falhas metodológicas, como amostras pequenas, ausência de grupo controle, tempo de seguimento curto, viés de seleção ou potenciais fatores de confusão.

A despeito de os dados iniciais terem alertado para o risco, estudos subsequentes não mostraram maior ocorrência ou recorrência do CHC<sup>3,35</sup> em pacientes tratados com DAAs ou IFN, incluindo uma metanálise que revisou 41 estudos e analisou mais de 13.000 pacientes tratados com DAA ou IFN.<sup>36</sup>

Atualmente, acredita-se que, não obstante o tratamento com DAAs reduzir o risco de CHC, particularmente em pacientes com cirrose hepática, o risco permanece e, portanto, deve-se manter o rastreamento de CHC nesses pacientes por tempo indeterminado.<sup>1; 2</sup> A presença de cofatores associados à hepatopatia pelo HCV, como o consumo de álcool, a síndrome metabólica associada à obesidade e/ou diabetes mellitus tipo 2, aumentam as chances de CHC após a cura da infecção.<sup>9</sup>

### ***Aspectos fisiopatológicos da carcinogênese do carcinoma hepatocelular associado à hepatite C crônica***

A história natural do CHC pode ser dividida em três fases: 1) fase molecular, que inclui as alterações genômicas sequenciais levando à transformação celular; 2) fase pré-clínica, período inicial no qual o tumor é ainda pequeno para ser detectado pelas técnicas de imagem, e em um segundo período, fase de diagnóstico pré-clínico, durante o qual o tumor é detectável, mas ainda assintomático; e 3) fase clínica ou com sintomas relacionados à doença tumoral.<sup>37</sup>

Os mecanismos da carcinogênese hepática são diversos e variam entre pacientes com ou sem cirrose e com os distintos fatores etiológicos.<sup>38</sup> Nas últimas décadas, tem sido

amplamente investigada a associação entre o CHC e a inflamação, que é a primeira resposta à agressão hepática. Trata-se de um processo complexo - uma tentativa, por parte do organismo, de remover estímulos lesivos e iniciar o processo de cicatrização tecidual.<sup>39</sup>

A interação de vários fatores está na origem dos primeiros passos da transformação maligna dos hepatócitos e do desenvolvimento do CHC. Esses fatores incluem predisposição genética, interações entre fatores virais e não virais, o microambiente celular e várias células imunes, e o estadiamento da doença hepática crônica subjacente.<sup>6; 9</sup> O desenvolvimento do CHC, em sua maioria, requer inflamação persistente, incluindo necrose e regeneração de hepatócitos com consequente fibrose cicatricial. O risco aumenta após o estabelecimento da cirrose e, paralelamente, ao comprometimento progressivo da função hepática.<sup>12</sup>

Diferentemente do DNA do vírus B, o RNA do HCV não integra ao genoma do hospedeiro e, portanto, o risco de CHC é limitado somente àqueles que desenvolvem cirrose ou fibrose avançada.<sup>9</sup>

Três mecanismos principais estão envolvidos no surgimento do CHC relacionado ao vírus C, como inflamação crônica, desregulação da resposta imune e função alterada das células apresentadoras de antígenos.<sup>4</sup> Após a entrada nos hepatócitos, há replicação viral com diferentes tipos de alterações celulares e alterações imunomediadas. Simultaneamente, a inflamação crônica associada ao estresse oxidativo e danos no DNA celular resultam em alterações epigenéticas em hepatócitos infectados podendo levar ao desenvolvimento do CHC.<sup>40</sup>

### ***Aspectos da imunologia da associação entre a hepatite C crônica e o carcinoma hepatocelular***

O microambiente hepático, constituído por hepatócitos, células imunes, receptores, citocinas, matriz extracelular e outros elementos, é regulado para manter o equilíbrio dinâmico entre tolerância e imunidade.<sup>6</sup>

O fígado possui grande capacidade de reparação após danos agudos. Hepatócitos diferenciados são capazes de reentrar no ciclo celular e servir como sua própria fonte principal de substituição.<sup>41</sup> No entanto, no contexto de inflamação crônica, como no caso da cirrose hepática pelo HCV, as alterações na resposta imune e a desregulação dessa rede rigidamente controlada podem resultar no desenvolvimento da fibrose hepática e da carcinogênese.<sup>6; 41</sup>

O sistema imune é composto por grande variedade de células e mediadores que interagem em rede complexa e dinâmica, cuja função é proteger o hospedeiro contra patógenos

estranhos e, simultaneamente, manter a tolerância em relação aos seus próprios antígenos.<sup>42</sup> Esse sistema compreende a imunidade inata e adaptativa e ambas constituem os principais participantes da geração das respostas inflamatórias aguda e crônica. Estão incluídos nesse sistema os diferentes tipos citocinas.<sup>43</sup>

As citocinas compreendem uma categoria de moléculas de glicoproteínas sinalizadoras, produzidas por ampla gama de células imunes e não imunes, que se ligam a receptores e promovem a transdução de sinal dentro da célula alvo. As citocinas incluem as quimiocinas, interferons, interleucinas, linfocinas e o fator de necrose tumoral.<sup>44</sup> Os sinais ativam genes responsáveis pela divisão celular, crescimento e diferenciação, migração ou mesmo apoptose. Além disso, as citocinas desempenham papel crítico na modulação dos sistemas imunes inato e adaptativo.<sup>43; 45</sup> Forma-se, portanto, uma rede de citocinas que participam de diversos processos celulares em interações complexas e inter-relacionadas. Uma única citocina pode ser secretada por diferentes tipos de células e pode atuar em vários tipos celulares.<sup>43; 44</sup>

As citocinas são classificadas em várias categorias, dentre as quais: pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , anti-inflamatórias, como IL-4 e IL10, além de outras com papéis pleiotrópicos, como o TGF- $\beta$ 1.<sup>43; 45</sup> No ambiente hepático, há um equilíbrio geral entre essas citocinas visando manter a homeostase. As doenças hepáticas crônicas, como a cirrose pelo HCV e CHC, levam a uma regulação positiva dos sinais inflamatórios e causam desequilíbrio homeostático associado à necroinflamação.<sup>46</sup>

Tanto as citocinas quanto seus receptores correspondentes participam da resposta inflamatória e são importantes na fisiopatologia do CHC visto que atuam na proliferação de células cancerígenas, no microambiente inflamatório do tumor e na evasão da resposta imune.<sup>47;</sup><sup>48</sup> Assim, este pode ser o primeiro passo para a carcinogênese resultante da inflamação. Além disso, as citocinas podem, por si, desencadear carcinogênese hepática através da sinalização de crescimento, angiogênese e metástase.<sup>48</sup>

A inflamação persistente ou desregulada, através do ciclo de morte celular e regeneração, leva à sobrevivência e proliferação celular e à formação de nódulos regenerativos, displasia e câncer.<sup>6; 39</sup> Sabe-se, também, que os tumores participam de respostas imunes, levando à indução de ambiente imunossupressor local e/ou sistêmico favorável ao seu desenvolvimento.<sup>49; 50</sup> Assim, o CHC depende de uma rede imunossupressora complexa para modificar o sistema imunológico do hospedeiro para evitar a sua destruição e favorecer o seu crescimento.<sup>50</sup>

Com base nestas premissas, formulou-se a hipótese de que há distintos parâmetros de mediadores solúveis periféricos, analisados por quantificação de citocinas e suas redes de

interações, em pacientes que desenvolveram CHC com hepatite C não tratada (virêmicos) ou após curados da infecção viral (RVS), visto que possivelmente ocorrem fenômenos imunes distintos nestas duas condições.

### **III – OBJETIVOS**

#### ***Primário***

Analisar os biomarcadores imunes e suas redes integrativas em pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose associada à infecção crônica pelo vírus C em pacientes virêmicos ou curados da infecção.

#### ***Secundários***

- Descrever as características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais de pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose associada à infecção crônica pelo vírus C categorizados como virêmicos ou curados da infecção;
- Analisar o perfil panorâmico quantitativo e as redes integrativas de mediadores solúveis (quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, citocinas regulatórias e fatores de crescimento) em amostras de soro de pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose associada à infecção crônica pelo vírus C categorizados como virêmicos ou curados da infecção e compará-los aos de indivíduos saudáveis;
- Verificar se os níveis de mediadores solúveis poderão diferenciar os grupos de pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose associada à infecção crônica pelo vírus C categorizados como virêmicos ou curados da infecção;
- Determinar a acurácia e selecionar os biomarcadores com melhor performance para discriminar os grupos de pacientes com cirrose associada à infecção crônica pelo vírus C categorizados como virêmicos ou curados da infecção.

## IV – METODOLOGIA

### *Desenho do estudo*

Estudo transversal, de amostra de conveniência, com inclusão prospectiva no período de março de 2018 a junho de 2022.

### *Seleção dos participantes*

Foram selecionados consecutivamente 92 pacientes com diagnóstico confirmado de carcinoma hepatocelular confirmado por critérios pré-estabelecidos (TC ou RM com classificação LI-RADS 5) com história atual ou prévia de infecção crônica pelo vírus C. Desses, 30 (36,6%) foram excluídos em razão de tratamento prévio do tumor (quimioembolização, radiofrequência, cirurgia, uso de sorafenibe). Sessenta e dois pacientes foram, portanto, selecionados para participar do estudo, tendo sido classificados em dois grupos:

- Grupo CHC-HCV: 30 participantes com diagnóstico confirmado de CHC e HCV RNA detectável em amostra de sangue periférico (viremia positiva);
- Grupo CHC-RVS: 32 participantes com diagnóstico confirmado de CHC e hepatite C crônica tratados previamente da hepatite C com RVS (31 participantes tratados com DAAs e um com interferon).

Para estabelecimento dos valores de referência dos parâmetros imunes, selecionou-se como controles (N=32) participantes saudáveis profissionais de área de saúde, recrutados no Hospital da Baleia que aceitaram participar das pesquisas em biomarcadores de doenças infecciosas da Fundação Oswaldo Cruz. Este grupo foi nomeado como CT (de *control group*).

### *Critérios de inclusão*

Pacientes com idade maior ou igual a 18 anos, com diagnóstico confirmado de CHC e hepatite C crônica, tratada ou não, que aceitaram o convite para participar do estudo após esclarecimentos de seus objetivos e métodos e assinatura do TCLE pelo paciente ou seu representante legal.

### ***Crêterios de exclusão ou de não inclusão***

- Impossibilidade de participa o em razão de condi es clínicas desfavoráveis (comprometimento cognitivo ou não compreensão dos objetivos do estudo);
- Pacientes com CHC submetidos a tratamento tumoral prévio, como quimioemboliza o, radiofrequência e drogas antitumorais;
- Pacientes sabidamente portadores de doenças sist micas descompensadas (ex.: insuficiência cardíaca grave, diabetes mellitus descompensado), doenças autoimunes (ex.: lúpus, artrite reumato ide), uso de drogas imunossupressoras, coinfe o com o vírus da hepatite B (HBV) ou da imunodeficiência humana (HIV) e transplantados de órgãos sólidos;
- Pacientes com sintomas respiratórios ou com histórico de infec o confirmada de COVID-19 nos 30 dias que antecederam o convite para a participa o.

### ***Locais de realiza o da pesquisa***

Os participantes foram recrutados no Ambulatório de Doenças Hepáticas Crônicas e no Ambulatório de Nódulos Hepáticos do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

O processamento e armazenamento das amostras biológicas ocorreu no Laboratório de Hepatites Virais da Faculdade de Medicina da UFMG.

Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) da Funda o Oswaldo Cruz- FIOCRUZ –Instituto René Rachou – IRR, em Belo Horizonte (MG).

As informa es clínicas de interesse para a pesquisa foram coletadas de prontuários hospitalares ou diretamente com os participantes nos serviços citados (anexo) e serão apresentadas na Tabela 1.

### ***Coleta de material biológico***

No dia da inclusão, após o aceite em participar do projeto, esclarecimentos e assinatura do TCLE, realizou-se a coleta de 10mL em veia periférica dos participantes (procedimento realizado por profissionais capacitados). Em seguida, processou-se o material biológico no

Laboratório de Hepatites Virais da Faculdade de Medicina da UFMG (sala 257), que foi imediatamente armazenado em alíquotas em freezer a -80°C.

Para a obtenção do soro, foram utilizados 5 mL de sangue total sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 200xg, 4°C por 20 minutos. Após centrifugação, o soro foi fracionado em alíquotas de 1mL em microtubos de 1,5 mL que, em seguida, foram armazenados a -80°C até a sua utilização.

### ***Metodologia de execução dos experimentos imunes***

Os ensaios se basearam nos princípios da citometria de fluxo. Especificamente, microesferas magnéticas e anticorpos específicos para cada um dos analitos foram analisados individualmente na amostra. Resumidamente, em placas de 96 poços, específicas para a plataforma Luminex, foram adicionados microesferas, padrões e controles (fornecidos pelo kit) e as amostras de soro dos participantes. Após incubação sob resfriamento e agitação *overnight*, adicionou-se, em cada poço, uma mistura de anticorpos biotinizados de detecção para cada microesfera. Após 30 minutos de incubação, adicionou-se uma solução de estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE) em cada poço e uma segunda incubação de 30 minutos foi realizada. Posteriormente as placas foram lavadas para leitura.

Os ensaios foram adquiridos utilizando-se o equipamento Luminex 200 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e o *software* Exponent (BioRad, Hercules, Califórnia, EUA). Para a análise da aquisição utilizou-se o *software* Bio Plex Manager (BioRad, Hercules, Califórnia, EUA). A concentração final de cada biomarcador sérico foi estimada por regressão logística de cinco parâmetros de acordo com a curva padrão inserida em cada lote experimental e os resultados expressos em pg/mL.

Foram incluídos na análise os seguintes analitos: quimiocinas CXCL8 (IL-8), CCL11 (eotaxina), CCL3 (proteína 1 alfa inflamatória de macrófagos, *macrophage inflammatory protein 1 alpha* - MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), 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 colonystimulating factor* - G-CSF]

e fator estimulador de colônias granulocíticas-macrofágicas [*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - GM-CSF]), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-2, IL-15) e citocinas reguladoras (IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13).

### **Análise estatística**

Para as análises dos dados demográficos e laboratoriais, utilizou-se o teste T de Student para comparar variáveis normais. As variáveis não normais foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. As variáveis qualitativas foram comparadas pelo teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, conforme apropriado. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

Os resultados obtidos pela plataforma *Luminex Bio-Plex Pro*<sup>TM</sup> foram analisados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Os dados foram analisados após a conversão dos valores de concentração sérica (pg/mL).

Inicialmente realizou-se a análise quantitativa dos mediadores séricos solúveis dos grupos (CHC-RVS, CHC-HCV e CT) cujos valores foram expressos em mediana com intervalo interquartil (IIQ). Em seguida, realizou-se a análise comparativa entre os grupos empregando-se o teste T de Student para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os não paramétricos. Em todos os casos, a diferença significativa foi considerada em  $p \leq 0,05$ . Os dados então foram convertidos e expressos em dados categóricos (proporção de indivíduos acima do ponto de corte de cada mediador calculado como a mediana global dos valores em cada grupo).

Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foram construídas para verificar a área sob a curva (AUC) indicadora da acurácia global de cada parâmetro para discriminar os dois grupos de participantes (CHC-RVS e CHC-HCV). Resultados da AUC maiores 0.7 foram considerados com acurácia moderada e selecionados para análise descritiva complementar.

As correlações analisadas entre os parâmetros avaliados foram realizadas através do teste de correlação de Spearman (r) e as redes de conexões dos biomarcadores foram representadas visualmente através de diagramas de topologia. Uma correlação positiva foi indicativa do aumento de duas citocinas. Foram representadas somente as correlações moderadas e fortes.

Também foi construído o *Heat map* para representação gráfica de dados no qual os

valores individuais foram representados com cores, utilizando-se de cores “quentes” (tons em vermelho) e “frias” (tons em verdes) para demonstrar dados/ correlações mais ou menos presentes/intensas.

As análises de rede de interações foram realizadas por meio do *software Cytoscape 2.8 (Cytoscape Consortium)*. Em todos os casos, as diferenças estatisticamente significativas foram consideradas com o valor de  $p$  menor que 0,05.

### ***Aspectos éticos***

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG: CAAE 1830412.4.0000.5149 e aditivo CAAE 15732513.0.1001.5149. Os participantes que aceitaram voluntariamente participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido após esclarecidas as suas dúvidas ou de seus responsáveis.

Os pesquisadores se comprometeram a realizar os procedimentos respeitando os princípios éticos que norteiam a boa prática em pesquisa e cumpriram as normas éticas da Resolução 466/12.

## V – RESULTADOS

### *Características clínicas, epidemiológicas e parâmetros laboratoriais de participantes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS)*

A análise das características demográficas e clínicas revelou que os grupos CHC-RVS e CHC-HCV não diferiram em relação à distribuição de sexo (predomínio do sexo masculino), à idade acima de 60 anos e ao índice de massa corporal que foi observado nos limites entre peso normal e sobrepeso.

Quanto à presença de comorbidades, também houve distribuição semelhante entre os grupos em relação à prevalência de hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e ingestão de bebidas alcoólicas.

Notável foi a prevalência em ambos os grupos de hipertensão portal (acima de 80%) e de varizes de esôfago (acima de 60%). Os grupos se diferiram em relação ao histórico de ascite, mais presente no grupo CHC-HCV (12,5% x 55,2%,  $p < 0,001$ ).

A distribuição da classificação da cirrose hepática foi heterogênea, tendo o grupo CHC-HCV apresentado maior prevalência de cirrose descompensada ( $p = 0,04$ ).

Em relação aos resultados laboratoriais, pôde-se observar diferenças significativas na maioria dos parâmetros entre os grupos CHC-RVS e CHC-HCV. Com exceção dos valores de plaquetas, RNI e creatinina, houve diferenças significativas entre todos os demais parâmetros de função hepática analisados, revelando maior comprometimento da função hepática no grupo CHC-HCV. Notou-se, também, maior elevação da alfa fetoproteína nesse grupo ( $p = 0,04$ ).

O tempo médio e mediano do surgimento do CHC após a RVS ( $n = 32$ ) foi de  $36.9 \pm 29$  e 35.0 (14.8 – 51.5) meses, respectivamente.

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos participantes estão detalhadas nas Tabelas 3 e 4 (anexos).

***Análise quantitativa dos biomarcadores imunológicos de participantes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS)***

Conforme demonstrado na Tabela 1 (gráficos detalhados nas figuras 4 a 7 nos anexos), pode-se observar os seguintes resultados da análise quantitativa comparativa dos biomarcadores imunológicos:

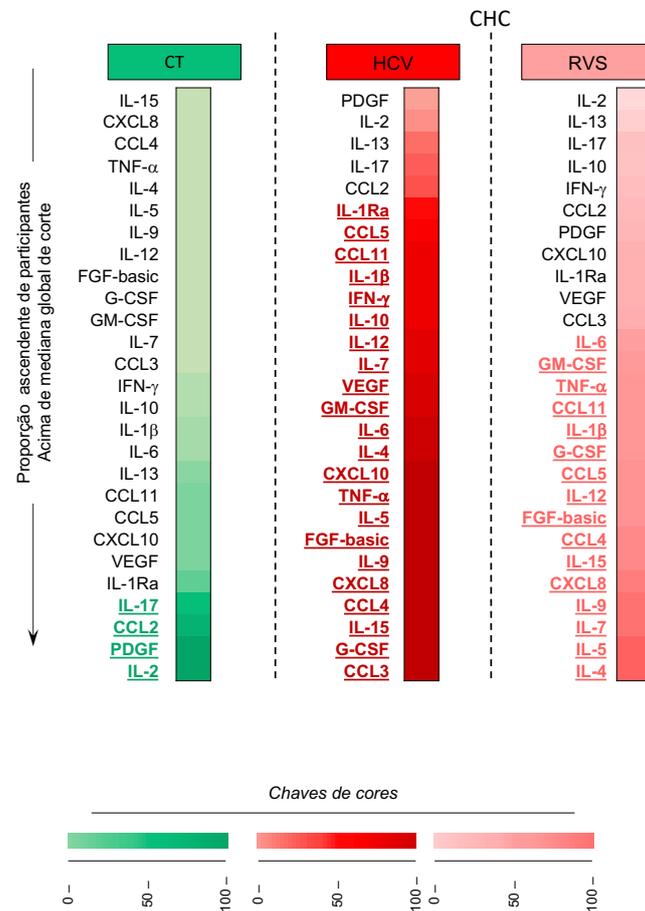
- Grupo CHC-HCV comparado a CT – elevação dos níveis séricos da maioria das quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-15), com queda nos níveis de CCL2, mantendo-se inalterado o nível de IL-17.
- Grupo CHC-HCV comparado a CT - elevação dos níveis séricos da maioria citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-10) e dos fatores de crescimento (FGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF e IL-7), com queda nos níveis de PDGF e IL-2 e nível inalterado de IL-13.
- Grupo CHC-RVS comparado a CHC-HCV - queda de quimiocinas (CXCL8, CCL3, CCL4 e CXCL10) e citocinas pró-inflamatórias (TNF-  $\alpha$ , e IL-15) e níveis elevados de CCL11, CCL5, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  comparados ao CT. Exceções foram notadas para os níveis reduzido de CCL2 em ambos os grupos e sem alteração em IL-17 com relação ao CT.
- Grupo CHC-RVS comparado a CHC-HCV - menores valores de citocinas reguladoras (IL-5 e IL-10) e fatores de crescimento (FGF-*basic*, G-CSF, GM-CSF) e maior valor de PDGF. Houve e maiores níveis de IL-1Ra, IL-4, IL-9, VEGF e IL-7 comparados ao CT. Nenhuma alteração foi observada para IL-13.

**Tabela 1** – Distribuição quantitativa de mediadores solúveis em participantes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS) comparados ao grupo controle (CT)

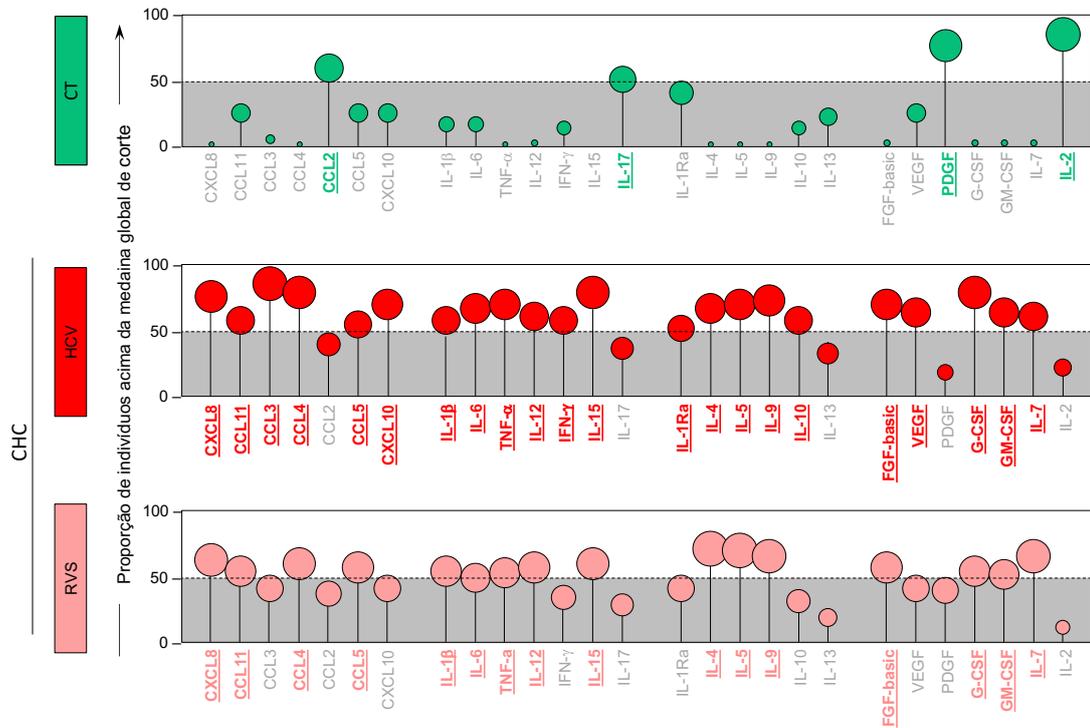
Biomarcador (pg/mL)	Carcinoma hepatocelular (N=62)		CT n=32
	HCV n=30	RVS n=32	
<b>CXCL8</b>	<u>10.8 (6.5-24.3) *</u>	<u>9.1 (4.0-14.7)*#</u>	<u>1.1 (0.9-1.5)</u>
<b>CCL11</b>	<u>11.2 (6.2-15.2) *</u>	<u>12.1 (7.7-14.6) *</u>	<u>7.5 (3.8-11.7)</u>
<b>CCL3</b>	<u>2.2 (1.6-3.3) *</u>	<u>1.2 (0.9-2.4) *#</u>	<u>0.3 (0.2-0.4)</u>
<b>CCL4</b>	<u>13.3 (10.7-16.5) *</u>	<u>10.1 (7.7-13.8) *#</u>	<u>4.1 (3.1-5.1)</u>
<b>CCL2</b>	<u>3.2 (1.5-5.6) *</u>	<u>2.8 (1.2-6.8) *</u>	<u>6.1 (3.2-11.8)</u>
<b>CCL5</b>	<u>343.4 (221.5-438.4) *</u>	<u>339.1 (261.4-434.8) *</u>	<u>224.7 (152.9-303.7)</u>
<b>CXCL10</b>	<u>56.4 (28.5-85.5) *</u>	<u>26.6 (19.7-36.0) *#</u>	<u>21.9 (16.2-27.5)</u>
<b>IL-1b</b>	<u>0.1 (0.1-0.2) *</u>	<u>0.1 (0.1-0.2) *</u>	<u>0.1 (0.1-0.1)</u>
<b>IL-6</b>	<u>0.5 (0.2-1.2) *</u>	<u>0.3 (0.1-0.6) *</u>	<u>0.1 (0.1-0.2)</u>
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	<u>4.9 (3.5-6.1) *</u>	<u>3.7 (2.4-5.5) *#</u>	<u>1.2 (1.0-1.4)</u>
<b>IL-12</b>	<u>2.3 (1.4-6.1) *</u>	<u>2.3 (1.4-3.3) *</u>	<u>0.6 (0.5-0.6)</u>
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	<u>0.3 (0.3-0.4) *</u>	<u>0.3 (0.2-0.4) *</u>	<u>0.2 (0.1-0.2)</u>
<b>IL-15</b>	<u>54.3 (46.5-63.1) *</u>	<u>46.5 (37.7-54.3) *#</u>	<u>23.8 (21.7-60.2)</u>
<b>IL-17</b>	<u>0.7 (0.4-1.1)</u>	<u>0.7 (0.4-1.3)</u>	<u>0.7 (0.5-0.9)</u>
<b>IL-1Ra</b>	<u>38.4 (22.0-54.6) *</u>	<u>32.9 (23.4-64.0) *</u>	<u>31.6 (23.4-37.6)</u>
<b>IL-4</b>	<u>0.9 (0.5-1.1) *</u>	<u>0.8 (0.6-0.9) *</u>	<u>0.2 (0.1-0.3)</u>
<b>IL-5</b>	<u>11.4 (8.8-14.2) *</u>	<u>6.2 (5.5-9.1) *#</u>	<u>0.6 (0.3-0.7)</u>
<b>IL-9</b>	<u>56.4 (45.4-68.5) *</u>	<u>50.1 (38.3-59.0) *</u>	<u>1.7 (1.5-2.0)</u>
<b>IL-10</b>	<u>0.8 (0.5-1.6) *</u>	<u>0.5 (0.4-0.9) *#</u>	<u>0.3 (0.2-0.3)</u>
<b>IL-13</b>	<u>0.2 (0.2-0.3)</u>	<u>0.2 (0.1-0.2)</u>	<u>0.2 (0.2-0.2)</u>
<b>FGF-basic</b>	<u>2.2 (2.0-2.4) *</u>	<u>2.1 (2.0-2.2) *#</u>	<u>1.4 (1.2-1.5)</u>
<b>VEGF</b>	<u>7.3 (4.9-10.8) *</u>	<u>5.3 (4.2-7.2) *#</u>	<u>4.0 (2.7-5.5)</u>
<b>PDGF</b>	<u>31.5 (15.7-66.7) *</u>	<u>63.6 (32.0-101.9) *#</u>	<u>202.3 (100.4-349.7)</u>
<b>G-CSF</b>	<u>12.4 (8.9-22.7) *</u>	<u>7.9 (6.2-15.2) *#</u>	<u>1.2 (1.0-1.4)</u>
<b>GM-CSF</b>	<u>0.5 (0.3-0.6) *</u>	<u>0.4 (0.2-0.5) *#</u>	<u>0.2 (0.2-0.2)</u>
<b>IL-7</b>	<u>2.7 (1.7-3.3) *</u>	<u>2.4 (1.8-3.5) *</u>	<u>0.6 (0.5-0.9)</u>
<b>IL-2</b>	<u>0.3 (0.1-0.5) *</u>	<u>0.1 (0.1-0.3) *</u>	<u>0.7 (0.6-0.7)</u>

As comparações entre CT vs CHC foram destacadas pelo símbolo \* e entre o os grupos (CHC/HCV vs CHC/RVS) pelo símbolo #

As Figuras 1 e 2 ilustram os resultados da Tabela 1 revelando o perfil panorâmico e a análise descritiva do perfil de mediadores solúveis (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento) dos grupos CHC-RVS e CHC-HCV comparados ao controle. Pode-se observar que diversos mediadores se apresentam elevados nos dois grupos de participantes com CHC comparados ao CT. No entanto, os resultados revelaram também queda de alguns mediadores solúveis, como de CCL3, CXCL10, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, IL-10 e VEGF no grupo CHC-RVS comparado ao grupo CHC-HCV.



**Figura 1** – Análise descritiva do perfil de mediadores solúveis (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento) em amostras de soro pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS) comparados ao grupo controle (CT)



**Figura 2** – Perfil panorâmico e análise descritiva do perfil de mediadores solúveis (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento) em amostras de soro pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS) comparados ao grupo controle (CT)

***Análise do desempenho dos mediadores solúveis para discriminar os grupos de participantes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS) comparados ao grupo controle (CT)***

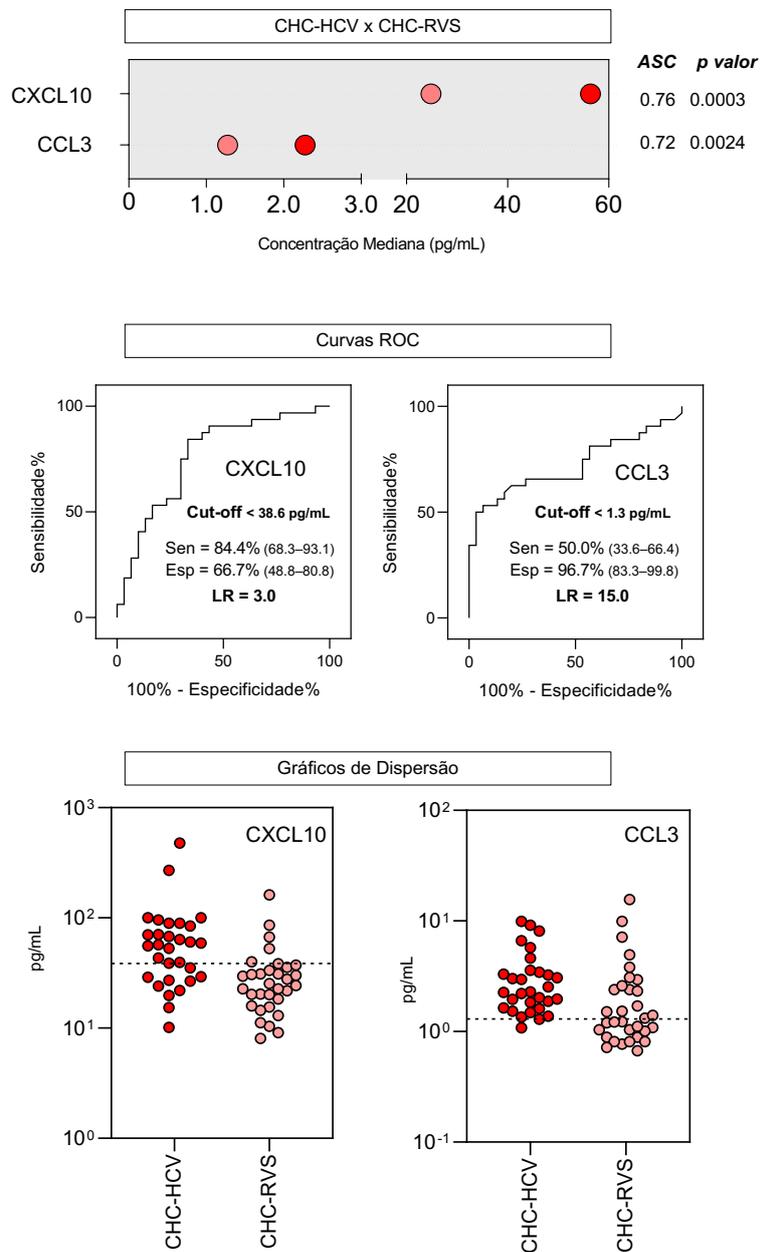
Os resultados da análise do desempenho dos mediadores solúveis, através da curva ROC, revelaram que, entre os mediadores avaliados, CXCL10 e CCL3 apresentaram desempenho significativo para discriminar os dois grupos de participantes com CHC (Tabela 4).

Conforme detalhado na Figura 3, valores de CXCL10 menores que 38,6pg/mL e de CCL3 menores que 1,3pg/mL foram observados preferencialmente no grupo CHC-RVS. Pela análise da razão de verossimilhança, CCL3 foi a que apresentou desempenho mais robusto visto que níveis menores que 1,3pg/mL praticamente excluíram participantes do grupo HCV-RVS (LR =15), confirmando, portanto, que valores da razão de probabilidades (*likelihood ratio* – LR) maiores que 10 praticamente confirmaram a classificação correta de grupos.

**Tabela 2** - Desempenho global dos mediadores solúveis séricos para classificar dois grupos de participantes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS) comparados ao grupo controle (CT)

<b>Biomarcador (pg/mL)</b>	<b>AUC</b>	<b>Cut-off</b>	<b>Se (%)</b>	<b>Sp (%)</b>
<b>CXCL10</b>	<b>0.77 (0.64–0.59) **</b>	<b>&lt; 38.6</b>	<b>84.4 (68.3–93.1)</b>	<b>66.7 (48.8–80.8)</b>
<b>CCL3</b>	<b>0.73 (0.60–0.86) **</b>	<b>&lt; 1.3</b>	<b>50.0 (33.6–66.4)</b>	<b>96.7 (83.3–99.8)</b>
CCL4	0.68 (0.55–0.82)	> 10.5	59.4 (42.3–74.5)	76.7 (59.1–88.2)
G-CSF	0.67 (0.54–0.81)	< 8.2	53,1 (36.5–69.1)	86.7 (70.3–94.7)
TNF- $\alpha$	0.66 (0.52–0.80)	< 4.2	67.7 (50.1–81.4)	66.7 (48.8–80.8)
VEGF	0.65 (0.51–0.79)	< 6.2	62.5 (45.3–77.1)	66.7 (48.8–80.8)
IL-15	0.64 (0.51–0.78)	> 48.5	56.3 (39.3–71.8)	66.7 (48.8–80.8)
PDGF	0.64 (0.50–0.78)	> 36.7	66.7 (48.8–80.8)	63.3 (45.5–78.1)
IL-10	0.63 (0.49–0.77)	< 0.6	65.6 (48.3–79.6)	63.3 (45.5–78.1)
CXCL8	0.63 (0.49–0.77)	< 5.0	31.3 (18.0–48.6)	93.3 (76.7–98.8)
IL-2	0.63 (0.47–0.79)	< 0.3	79.2 (59.5–90.8)	48.0 (30.0–66.5)
IL-5	0.62 (0.47–0.77)	> 10.6	80.0 (62.7–90.5)	50.0 (33.2–66.6)
IL-13	0.62 (0.47–0.76)	< 0.1	41.4 (25.5–59.3)	78.6 (60.5–89.8)
FGF-basic	0.61 (0.47–0.76)	< 2.4	90.6 (75.8–96.8)	36.7 (21.9–54.5)
IL-6	0.61 (0.45–0.76)	> 0.5	76.9 (58.0–89.0)	53.3 (36.1–69.8)
GM-CSF	0.60 (0.45–0.74)	< 0.4	70.0 (52.1–83.3)	56.7 (39.2–72.6)
IFN- $\gamma$	0.58 (0.43–0.72)	> 0.3	62.5 (45.3–77.1)	63.6 (45.5–78.1)
IL-9	0.58 (0.43–0.72)	< 55.9	68.8 (51.4–82.1)	53.3 (36.1–69.8)
IL-4	0.55 (0.40–0.70)	< 0.9	68.8 (51.4–82.1)	53.3 (36.1–69.8)
IL-7	0.54 (0.39–0.68)	< 4.9	12.5 (4.97–28.1)	100.0 (88.7–100)
IL-12	0.54 (0.39–0.68)	> 5.6	87.5 (71.9–95.0)	26.7 (14.2–44.5)
IL-1b	0.53 (0.39–0.69)	> 0.2	87.5 (71.9–95.0)	23.3 (11.8–40.9)
CCL5	0.53 (0.38–0.68)	> 237.4	90.6 (75.6–96.8)	33.3 (19.2–51.2)
IL-17	0.51 (0.37–0.66)	> 2.2	12.5 (4.97–28.1)	100.0 (88.7–100)
IL-1Ra	0.51 (0.36–0.65)	> 36.2	59.4 (42.3–74.5)	53.3 (36.1–69.8)
CCL11	0.51 (0.36–0.66)	< 17.0	90.6 (75.8–96.8)	33.3 (19.2–51.2)
CCL2	0.50 (0.35–0.65)	> 2.5	50.0 (33.6–66.4)	66.7 (48.8–80.8)

AUC: área sob a curva ROC. Se: sensibilidade; Sp: especificidade  
Diferenças significativas ( $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ ) são indicadas por \* ou \*\*.

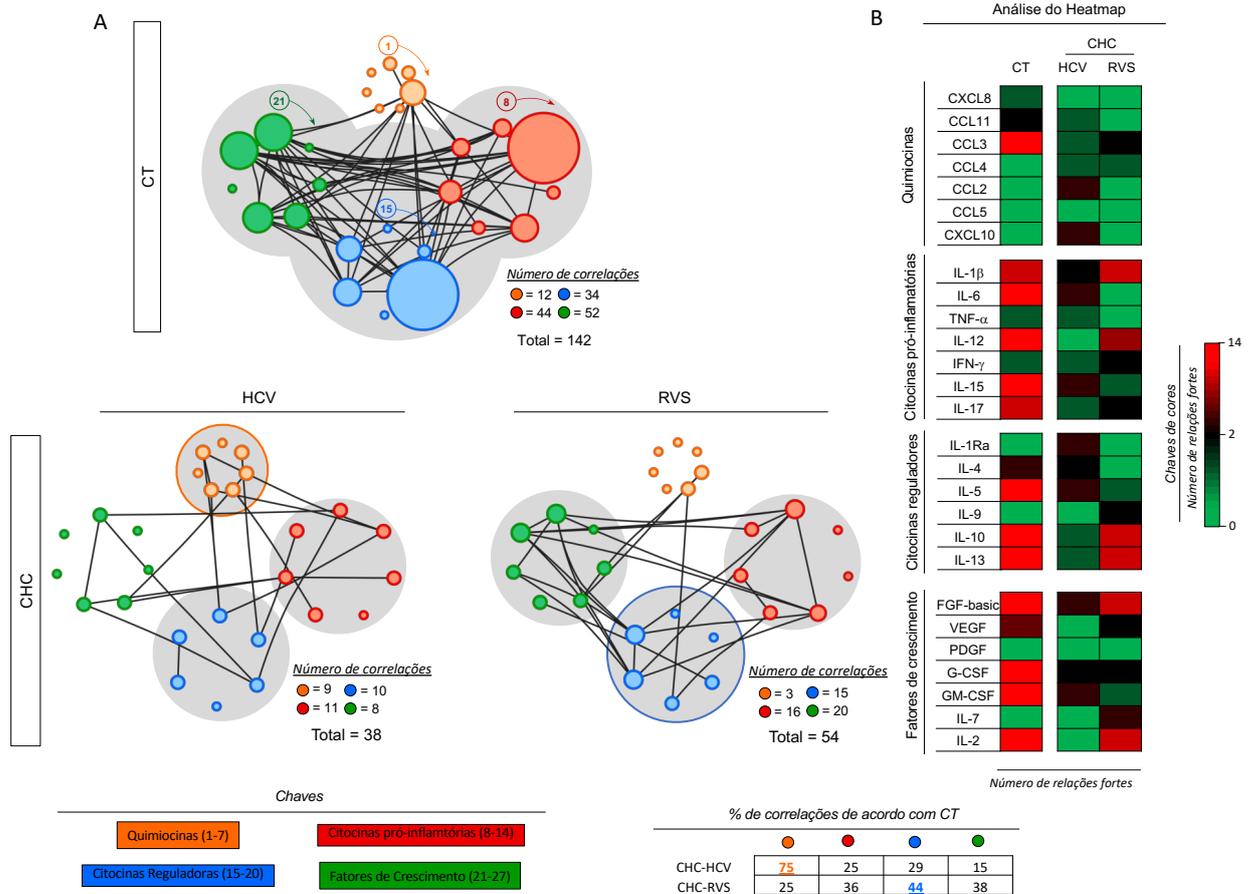


**Figura 3** - Análise dos mediadores solúveis (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento), através da curva ROC, para determinar o desempenho dos mediadores e discriminar os dois grupos de participantes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS) comparados ao grupo controle (CT)

*Análise das redes integrativas dos mediadores solúveis para discriminar os grupos de participantes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS) comparados ao grupo controle (CT)*

Conforme pode-se observar na Figura 4, a análise das redes integrativas dos grupos CHC-RVS, CHC-HCV e controle revelou os seguintes resultados:

- Rede integrativa mais robusta observada no grupo controle, com correlações intensas entre mediadores solúveis (principalmente citocinas pro-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento), destacados em fundo cinza.
- Perda de conectividade nas correlações entre os mediadores solúveis no grupo CHC-HCV, revelada pela perda de correlações particularmente no eixo dos fatores de crescimento.
- Elevação discreta na conectividade entre os mediadores solúveis no grupo CHC-RVS, sendo a conectividade mais presente em citocinas pró-inflamatórias e reguladoras e notou-se como destaque o aumento de conectividades entre os fatores de crescimento.



**Figura 4** - Perfil das redes integrativas de mediadores solúveis (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento) em amostras de soro dos três grupos de participantes: carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS) comparados ao grupo controle (CT)

## VI – DISCUSSÃO

Os últimos anos são testemunho do grande avanço da medicina onde a cura da infecção pelo HCV, independentemente do estágio da hepatite C crônica, pode ser obtida com os novos antivirais de ação direta, os DAAs, de alta eficácia e excelente tolerância.<sup>2; 28</sup> No entanto, a experiência tem revelado que a RVS reduz, mas não elimina o risco de CHC, este agravo de alta morbidade e mortalidade compreendidas pelo desequilíbrio da resposta imune mediado pelo tumor e hospedeiro.<sup>4; 40</sup> Portanto, este estudo analisou aspectos da resposta imune, com foco em biomarcadores solúveis periféricos, em pacientes adultos com diagnóstico confirmado de CHC associado à hepatite C crônica (N= 62) virêmicos (n=30) ou com RVS (n=32).

As principais características clínicas foram semelhantes entre os grupos com CHC. Os participantes foram, majoritariamente, classificados como Child-Pugh A. No entanto, no grupo CHC-HCV os pacientes encontraram-se em estágio mais avançado, Child-Pugh B ou C, o que indica maior gravidade da hepatopatia. Houve também maior elevação de AFP (p=0,04) e maior prevalência de descompensação hepática nesse grupo (p=0,04). A presença de hipertensão portal clinicamente significativa foi semelhante nos dois grupos, o que indica severidade da hepatopatia e presença de fator predisponente para o desenvolvimento de CHC.

Estes parâmetros iniciais revelam a seleção adequada dos grupos de pesquisa visto que a RVS está associada à melhora da disfunção hepática, reiterando a importância da cura da hepatite C crônica.<sup>4</sup> No entanto, a despeito da cura virológica, os pacientes cirróticos mantêm risco persistente de desenvolver CHC (>2% ao ano) e devem permanecer em programa de rastreamento de CHC com exames semestrais de imagem.<sup>16</sup>

Conforme demonstrado na análise quantitativa das citocinas e em sua rede de conexões, houve diferenças notáveis entre os grupos com CHC, tendo-se observado perfil inflamatório mais evidente no grupo CHC-HCV e uma tendência ao restabelecimento do eixo regulatório no grupo CHC-RVS.

Em estudo prévio realizado por Ribeiro e colaboradores (2021) que avaliou a cinética dos biomarcadores solúveis em pacientes com hepatite C crônica nos períodos pré- e pós-tratamento com DAAs, os autores demonstraram que pacientes cirróticos apresentaram perfil imune muito distinto de indivíduos saudáveis. Além disso, a cura da hepatite C resultou em notável e contínua remodelação imune comparada ao período pré-tratamento, sugerindo processo progressivo de remodelação associada à redução da inflamação secundária à cura da infecção pelo HCV.<sup>51</sup>

No presente estudo, um fato que pode estar associado aos distintos perfis de mediadores solúveis entre os grupos com CHC, notadamente a maior atividade inflamatória no grupo HCV, é o aumento significativo das aminotransferases observado neste grupo. Assim, pode-se inferir que a atividade inflamatória associada à persistência da infecção viral contribuiu para as diferenças quantitativas dos biomarcadores analisados. Igualmente, o menor valor de albumina observado nesse grupo poderia se somar aos fatores associados ao perfil distinto dos mediadores solúveis entre os grupos. Além disso, o maior número de conexões no eixo de citocinas reguladoras no grupo RVS pode indicar o “esforço” para o restabelecimento da resposta imune após supressão viral. No entanto, uma vez que os grupos com CHC também são distintos do controle, pode-se inferir que houve influência do tumor hepático na resposta imune inflamatória independentemente da cura da infecção pelo HCV.

Outro aspecto importante da investigação foi a análise do desempenho dos mediadores solúveis para discriminar os grupos utilizando-se a curva ROC. Entre os mediadores avaliados, tanto CXCL10 quanto CCL3 apresentaram melhor performance para discriminar os dois grupos com CHC. Assim, valores de CXCL10 menores que 38,6pg/mL e de CCL3 menores que 1,3pg/mL foram observados preferencialmente no grupo CHC-RVS. Em seguida, a análise da razão de verossimilhança confirmou que a CCL3 apresentou desempenho mais robusto visto que níveis menores que 1,3pg/mL praticamente excluíram participantes do grupo CHC-HCV.

Tem sido relatada a importância da CCL3 no contexto das doenças neoplásicas. Trata-se de uma proteína inflamatória derivada de macrófagos-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), considerada uma quimiocina relacionada à vigilância e tolerância imunológicas secretada por células imunes, epiteliais e fibroblastos que tem sido investigada como um biomarcador prognóstico em malignidades sólidas e hematológicas, com comportamento tanto antitumoral como pró-tumoral, a depender do contexto da cascata de sinalização.<sup>52</sup> Por outro lado, a CXCL10, quimiocina também conhecida por proteína 10 induzida por interferon (*IFN-inducible protein-10* - IP-10), produzida por células apresentadoras de antígenos e por células tumorais, participa da infiltração de células T efectoras e contribui para a orquestração do microambiente tumoral.

53

De forma notável, um estudo experimental revelou que a quimiocina CXCL10 pode alterar o microambiente hepático durante a carcinogênese hepática e que a sua deleção favorece a infiltração de células imunes citotóxicas induzindo um microambiente antitumoral.<sup>54</sup> Outro estudo demonstrou que a supra regulação da CXCL10 foi associada a mau prognóstico em pacientes com CHC.<sup>55</sup> Já em relação à CCL3 e seu receptor CCR1, um estudo constatou seu

aumento aberrante no CHC <sup>56</sup>, enquanto outro sugeriu seu envolvimento na progressão tumoral.  
57

No presente estudo, a despeito das análises quantitativas dos mediadores solúveis terem sido importantes para revelar distintos perfis imunes nos grupos CHC comparados ao controle, foram as análises das redes integrativas desses mediadores que configuraram essas diferenças. Assim, enquanto observou-se uma rede integrativa robusta com correlações intensas entre os mediadores solúveis no grupo controle, particularmente de citocinas pró-inflamatórias, reguladoras e fatores de crescimento, houve grande perda comparativa de conectividade no grupo CHC-HCV, com eixo mais focado entre quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Muito embora o grupo CHC-RVS tenha apresentado elevação discreta na conectividade entre os mediadores solúveis avaliados, observou-se conectividade mais focada no eixo de citocinas reguladoras e fatores de crescimento e, ainda que mais restabelecido, foi distinto do perfil observado no grupo controle.

Com base nos resultados apresentados, pode-se ressaltar que, a despeito de o estudo não ter revelado mediadores ou painel de mediadores específicos para individualizar os grupos, foi notória a importância da análise da rede integrativa de mediadores solúveis para distinguir os perfis imunes de pacientes com CHC e cirrose associada à infecção crônica pelo HCV com viremia persistente ou cura da infecção.

Em síntese, os resultados acima sugerem que a cura da infecção pelo HCV, atestada pela RVS, promoveu elevação discreta da conectividade de mediadores solúveis no grupo CHC-RVS comparado ao grupo CHC-HCV, onde se observou desvio da conectividade para o eixo das citocinas reguladoras, podendo-se, portanto, inferir seu impacto no perfil imunológico dos pacientes com desvio para o eixo anti-inflamatório. É possível que, em última instância, esse desvio de eixo anti-inflamatório poderia resultar em menor capacidade de estabelecimento de resposta imune inflamatória antitumoral. Esta ocorrência poderia explicar, juntamente com a cirrose hepática, sabidamente fator oncogênico, porque os pacientes com RVS ainda apresentam risco aumentado de CHC, conforme amplamente debatido recentemente.<sup>11,63</sup>. Portanto, os resultados apresentados aqui somam conhecimento a respeito das diferenças da resposta imune nesses pacientes, o que poderá, eventualmente, ter implicações oncogênicas de importância na prática clínica.

## VIII – CONCLUSÕES

- Parâmetros clínicos e laboratoriais revelaram maior gravidade da hepatopatia em participantes virêmicos, conferindo confiabilidade na seleção dos grupos de participantes e, por conseguinte, nos resultados encontrados.
- Diferenças quantitativas significativas entre biomarcadores solúveis foram observadas na comparação entre pacientes com cirrose hepática virêmicos e com RVS, tendo-se observado um perfil inflamatório mais evidente no grupo virêmico.
- Tanto CXCL10 quanto CCL3 apresentam melhor acurácia para caracterizar os dois grupos com CHC, sendo que pacientes curados da infecção apresentaram valores de CXCL10 menores que 38,6pg/mL e de CCL3 menores que 1,3pg/mL.
- As análises comparativas dos biomarcadores, através da formação das redes de interações, configuraram perfis de conexões muito distintos entre pacientes com cirrose hepática pelo vírus C com viremia ou com RVS.
- Apesar de o estudo não ter revelado mediadores ou painel de mediadores específicos para individualizar os grupos, demonstrou-se comparativamente a grande perda de conectividade no grupo virêmico, com eixo no polo entre quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, enquanto pacientes com RVS apresentaram eixo polarizado para citocinas reguladoras e fatores de crescimento.
- Embora a cura da infecção tenha promovido discreta elevação da conectividade entre mediadores solúveis, sugerindo esboço de restabelecimento do eixo regulatório após RVS, com desvio para o eixo anti-inflamatório, não se configurou conectividade comparável à de controles saudáveis.
- Especula-se que o desvio para o eixo anti-inflamatório dos pacientes curados da infecção, juntamente com a cirrose hepática, sabidamente oncogênica, possa aumentar o risco de CHC através da menor vigilância imune tumoral nessa condição.

O trabalho limitou-se pela amostra de conveniência e o pequeno número de participantes. O desenho transversal impossibilitou inferências definitivas sobre causa e efeito. Também não

foi possível correlacionar tempo de RVS com a resposta imune em razão da população restrita. No entanto, a despeito das limitações, nosso estudo contribuiu para novos conhecimentos a respeito de mediadores solúveis periféricos e suas redes de conexões associados ao carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite C crônica. Novos estudos, principalmente de cohort prospectiva e de outras hepatopatias emergentes, como a doença hepática gordurosa metabólica, serão de grande valor no contexto das investigações de biomarcadores.

**VIII – REFERÊNCIAS**

- <sup>1</sup> EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 69, n. 1, p. 182-236, Jul 2018. ISSN 0168-8278.
- <sup>2</sup> EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. **J Hepatol**, v. 69, n. 2, p. 461-511, Aug 2018. ISSN 0168-8278.
- <sup>3</sup> SINGAL, A. G.; LIM, J. K.; KANWAL, F. AGA Clinical Practice Update on Interaction Between Oral Direct-Acting Antivirals for Chronic Hepatitis C Infection and Hepatocellular Carcinoma: Expert Review. **Gastroenterology**, v. 156, n. 8, p. 2149-2157, Jun 2019. ISSN 0016-5085
- <sup>4</sup> RUSSO, F. P. et al. Hepatocellular Carcinoma in Chronic Viral Hepatitis: Where Do We Stand? **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 1, Jan 2 2022. ISSN 1422-0067.
- <sup>5</sup> RINGELHAN, M.; MCKEATING, J. A.; PROTZER, U. Viral hepatitis and liver cancer. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 372, n. 1732, Oct 19 2017. ISSN 0962-8436
- <sup>6</sup> RINGELHAN, M. et al. The immunology of hepatocellular carcinoma. **Nat Immunol**, v. 19, n. 3, p. 222-232, Mar 2018. ISSN 1529-2908.
- <sup>7</sup> SIA, D. et al. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. **Gastroenterology**, v. 152, n. 4, p. 745-761, Mar 2017. ISSN 0016-5085.
- <sup>8</sup> RUMGAY, H. et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. **J Hepatol**, v. 77, n. 6, p. 1598-1606, Dec 2022. ISSN 0168-8278
- <sup>9</sup> LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 7, n. 1, p. 6, Jan 21 2021. ISSN 2056-676x.
- <sup>10</sup> ALQAHTANI, A. et al. Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies. **Medicina (Kaunas)**, v. 55, n. 9, Aug 23 2019. ISSN 1010-660X
- <sup>11</sup> FERNANDES, G. D. S. et al. Epidemiological and Clinical Patterns of Newly Diagnosed Hepatocellular Carcinoma in Brazil: the Need for Liver Disease Screening Programs Based on Real-World Data. **J Gastrointest Cancer**, v. 52, n. 3, p. 952-958, Sep 2021. ISSN 1941-6628
- <sup>12</sup> FORNER, A.; REIG, M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 391, n. 10127, p. 1301-1314, Mar 31 2018. ISSN 0140-6736.
- <sup>13</sup> REIG, M. et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. **J Hepatol**, v. 76, n. 3, p. 681-693, Mar 2022. ISSN 0168-8278

- 14 DE FRANCHIS, R. et al. Baveno VII - Renewing consensus in portal hypertension. **J Hepatol**, v. 76, n. 4, p. 959-974, Apr 2022. ISSN 0168-8278.
- 15 GARCIA-TSAO, G. et al. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: Risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases. **Hepatology**, v. 65, n. 1, p. 310-335, Jan 2017. ISSN 0270-9139.
- 16 VOGEL, A. et al. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 400, n. 10360, p. 1345-1362, Oct 15 2022. ISSN 0140-6736.
- 17 LEE, Y. T. et al. Risk stratification and early detection biomarkers for precision HCC screening. **Hepatology**, v. 78, n. 1, p. 319-362, Jul 1 2023. ISSN 0270-9139
- 18 SINGAL, A. G. et al. AASLD practice guidance on prevention, diagnosis, and treatment of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, May 22 2023. ISSN 0270-9139.
- 19 MARRERO, J. A. et al. Diagnosis, staging and management of hepatocellular carcinoma: 2018 practice guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, 2018. ISSN 0270-9139.
- 20 CHERNYAK, V. et al. Liver Imaging Reporting and Data System (LI-RADS) Version 2018: Imaging of Hepatocellular Carcinoma in At-Risk Patients. **Radiology**, v. 289, n. 3, p. 816-830, Dec 2018. ISSN 0033-8419
- 21 WHO. Hepatitis C. 24 June 2022. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> >. Acesso em: 30 May 2023.
- 22 BRASIL. **Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for Hepatitis C and Coinfections**. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA, P. E. C. e DAS INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS, D. H. A. E. D. H. V. [www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs) 2019.
- 23 BRASIL **Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais 2022, Ministério da Saúde**. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2022-numero-especial/view> Junho de 2022.
- 24 CHEN, S. L.; MORGAN, T. R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int J Med Sci**, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2006. ISSN 1449-1907.
- 25 AXLEY, P. et al. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review. **J Clin Transl Hepatol**, v. 6, n. 1, p. 79-84, Mar 28 2018. ISSN 2225-0719
- 26 SMITH, A.; BAUMGARTNER, K.; BOSITIS, C. Cirrhosis: Diagnosis and Management. **Am Fam Physician**, v. 100, n. 12, p. 759-770, Dec 15 2019. ISSN 0002-838x.

- 27 POL, S.; LAGAYE, S. The remarkable history of the hepatitis C virus. **Genes Immun**, v. 20, n. 5, p. 436-446, May 2019. ISSN 1466-4879.
- 28 Hepatitis C Guidance 2018 Update: AASLD-IDS A Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. **Clin Infect Dis**, v. 67, n. 10, p. 1477-1492, Oct 30 2018. ISSN 1058-4838
- 29 SINGAL, A. K. et al. Antiviral therapy reduces risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 8, n. 2, p. 192-9, Feb 2010. ISSN 1542-3565.
- 30 MORGAN, T. R. et al. Outcome of sustained virological responders with histologically advanced chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 52, n. 3, p. 833-44, Sep 2010. ISSN 0270-9139
- 31 LOK, A. S. et al. Maintenance peginterferon therapy and other factors associated with hepatocellular carcinoma in patients with advanced hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 840-9; quiz e12, Mar 2011. ISSN 0016-5085
- 32 EL-SERAG, H. B. et al. Risk of hepatocellular carcinoma after sustained virological response in Veterans with hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 130-7, Jul 2016. ISSN 0270-9139
- 33 CARDOSO, H. et al. High incidence of hepatocellular carcinoma following successful interferon-free antiviral therapy for hepatitis C associated cirrhosis. **J Hepatol**, v. 65, n. 5, p. 1070-1071, Nov 2016. ISSN 0168-8278.
- 34 REIG, M. et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. **J Hepatol**, v. 65, n. 4, p. 719-726, Oct 2016. ISSN 0168-8278.
- 35 MUN, E. J. et al. No difference between direct-acting antivirals for hepatitis C in hepatocellular carcinoma risk. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 31, n. 1, p. 47-52, Jan 2019. ISSN 0954-691X
- 36 WAZIRY, R. et al. Hepatocellular carcinoma risk following direct-acting antiviral HCV therapy: A systematic review, meta-analyses, and meta-regression. **J Hepatol**, v. 67, n. 6, p. 1204-1212, Dec 2017. ISSN 0168-8278.
- 37 TREVISANI, F. et al. Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 7, p. 1299-305, Jul 2008. ISSN 0143-3334.
- 38 DHANASEKARAN, R. et al. Genomic Medicine and Implications for Hepatocellular Carcinoma Prevention and Therapy. **Gastroenterology**, v. 156, n. 2, p. 492-509, Jan 2019. ISSN 0016-5085.
- 39 COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-7, Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836

- 40 IRSHAD, M.; GUPTA, P.; IRSHAD, K. Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection. **World J Hepatol**, v. 9, n. 36, p. 1305-1314, Dec 28 2017. ISSN 1948-5182
- 41 JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 996-1006, Oct 2013. ISSN 1529-2908.
- 42 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology, -South Asia Edition-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2021. ISBN 8131264580.
- 43 ARAVALLI, R. N. Role of innate immunity in the development of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 43, p. 7500-14, Nov 21 2013. ISSN 1007-9327.
- 44 LIU, C. et al. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. **Adv Sci (Weinh)**, v. 8, n. 15, p. e2004433, Aug 2021. ISSN 2198-3844.
- 45 BUDHU, A.; WANG, X. W. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. **Journal of leukocyte biology**, v. 80, n. 6, p. 1197-1213, 2006. ISSN 1938-3673.
- 46 DONNE, R.; LUJAMBIO, A. The liver cancer immune microenvironment: Therapeutic implications for hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 77, n. 5, p. 1773-1796, May 1 2023. ISSN 0270-9139
- 47 MARRA, F.; TACKE, F. Roles for chemokines in liver disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 3, p. 577-594.e1, Sep 2014. ISSN 0016-5085.
- 48 DONDETI, M. F.; EL-MAADAWY, E. A.; TALAAT, R. M. Hepatitis-related hepatocellular carcinoma: Insights into cytokine gene polymorphisms. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 30, p. 6800-16, Aug 14 2016. ISSN 1007-9327.
- 49 ZEKRI, A. N. et al. Role of relevant immune-modulators and cytokines in hepatocellular carcinoma and premalignant hepatic lesions. **World J Gastroenterol**, v. 24, n. 11, p. 1228-1238, Mar 21 2018. ISSN 1007-9327.
- 50 LEE, S.; LOECHER, M.; IYER, R. Immunomodulation in hepatocellular cancer. **J Gastrointest Oncol**, v. 9, n. 1, p. 208-219, Feb 2018. ISSN 2078-6891
- 51 RIBEIRO, I. G. et al. Remodeling of immunological biomarkers in patients with chronic hepatitis C treated with direct-acting antiviral therapy. **Antiviral Res**, v. 190, p. 105073, Jun 2021. ISSN 0166-3542.
- 52 NTANASIS-STATHOPOULOS, I.; FOTIOU, D.; TERPOS, E. CCL3 Signaling in the Tumor Microenvironment. **Adv Exp Med Biol**, v. 1231, p. 13-21, 2020. ISSN 0065-2598
- 53 RESCHKE, R.; GAJEWSKI, T. F. CXCL9 and CXCL10 bring the heat to tumors. **Sci Immunol**, v. 7, n. 73, p. eabq6509, Jul 22 2022. ISSN 2470-9468.

- 54 BRANDT, E. F. et al. Chemokine CXCL10 Modulates the Tumor Microenvironment of Fibrosis-Associated Hepatocellular Carcinoma. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 15, Jul 23 2022. ISSN 1422-0067.
- 55 REN, T.; ZHU, L.; CHENG, M. CXCL10 accelerates EMT and metastasis by MMP-2 in hepatocellular carcinoma. **Am J Transl Res**, v. 9, n. 6, p. 2824-2837, 2017. ISSN 1943-8141
- 56 YANG, X. et al. Essential contribution of a chemokine, CCL3, and its receptor, CCR1, to hepatocellular carcinoma progression. **Int J Cancer**, v. 118, n. 8, p. 1869-76, Apr 15 2006. ISSN 0020-7136
- 57 YUAN, Y. et al. Chemokine CCL3 facilitates the migration of hepatoma cells by changing the concentration intracellular Ca. **Hepatol Res**, v. 40, n. 4, p. 424-31, Apr 2010. ISSN 1386-6346.

## IX - ANEXOS

**Tabela 1** -Características dos participantes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS)

Grupos	Carcinoma hepatocelular		P
	HCV n = 30	RVS n =32	
Idade <sup>a</sup>	66.0±7.8	65.9±8.3	0.95
Sexo (n %)			
Feminino	10 (33.3)	10 (31.2)	0.86
Masculino	20 (66.7)	22 (68.8)	
IMC <sup>b</sup>	23.9 (22.1 – 27.6)	24.3 (22.1 – 28.2)	0.75
HAS (n %)	13 (43.3)	14 (43.8)	0.97
DM (n %)	7 (23.3)	12 (37.5)	0.23
Ingestão de álcool (n %)	16 (53.3)	13 (41.9)	0.37
Hipertensão portal (n %)	30 (100)	28 (87.5)	0.11
Varizes esofagianas	13 (68.4)	18 (69.2)	0.95
Cirrose (n %)			
Compensada (A5-A6)	19 (63.3)	28 (87.5)	0.04*
Descompensada (B7-C10)	11 (36.7)	4 (12.5)	
Antecedentes de descompensação hepática (n %)			
Hemorragia digestiva alta	4 (14.8)	6 (19.4)	0.74
Ascite	16 (55.2)	4 (12.5)	0.001***
Encefalopatia hepática	4 (15.4)	3 (9.7)	0.69

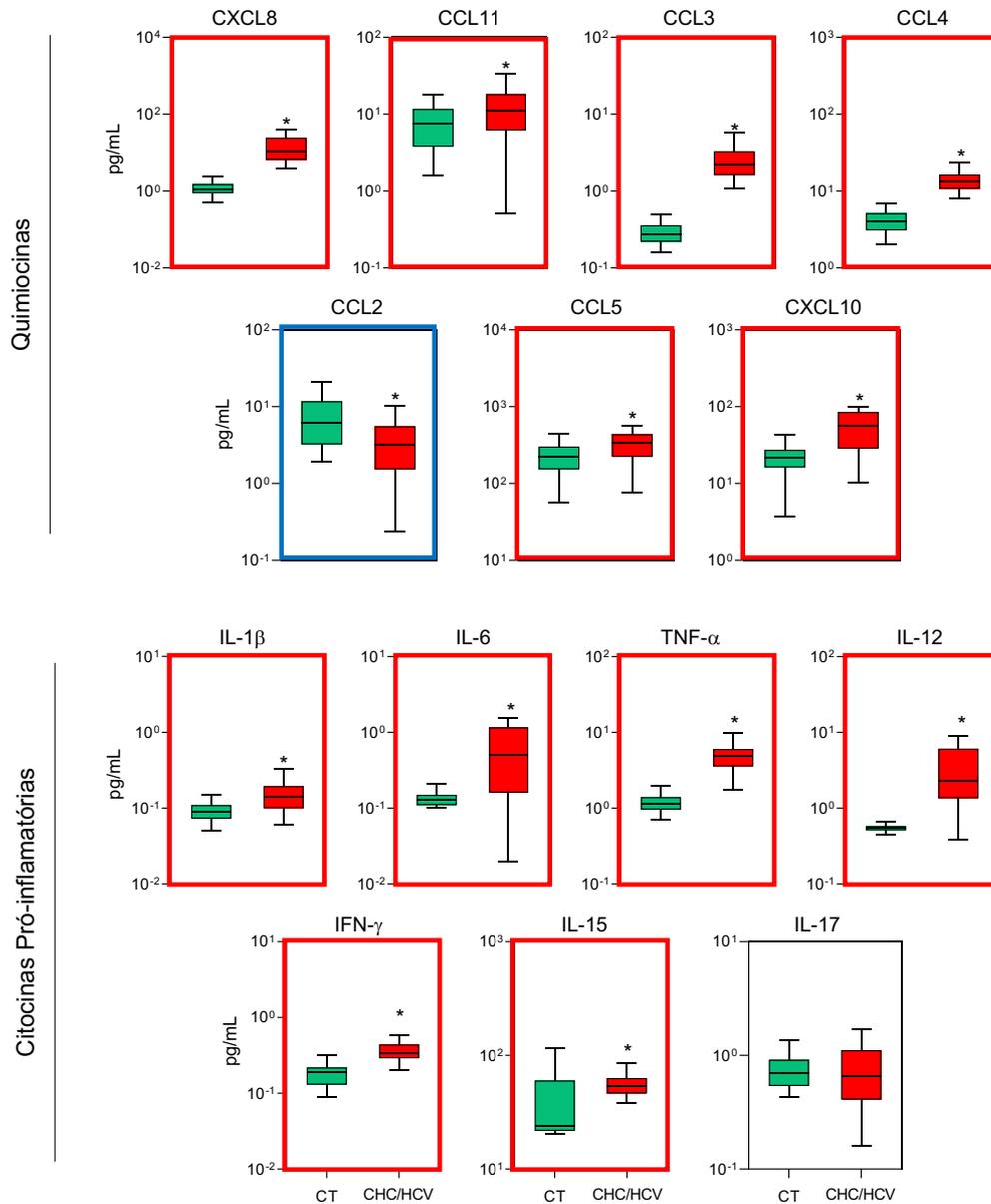
a: média ± desvio padrão; b: mediana (primeiro quartil – terceiro quartil);

**Tabela 2** - Parâmetros laboratoriais de participantes com carcinoma hepatocelular e cirrose pelo HCV categorizados como virêmicos (HCV) ou com resposta virológica sustentada (RVS)

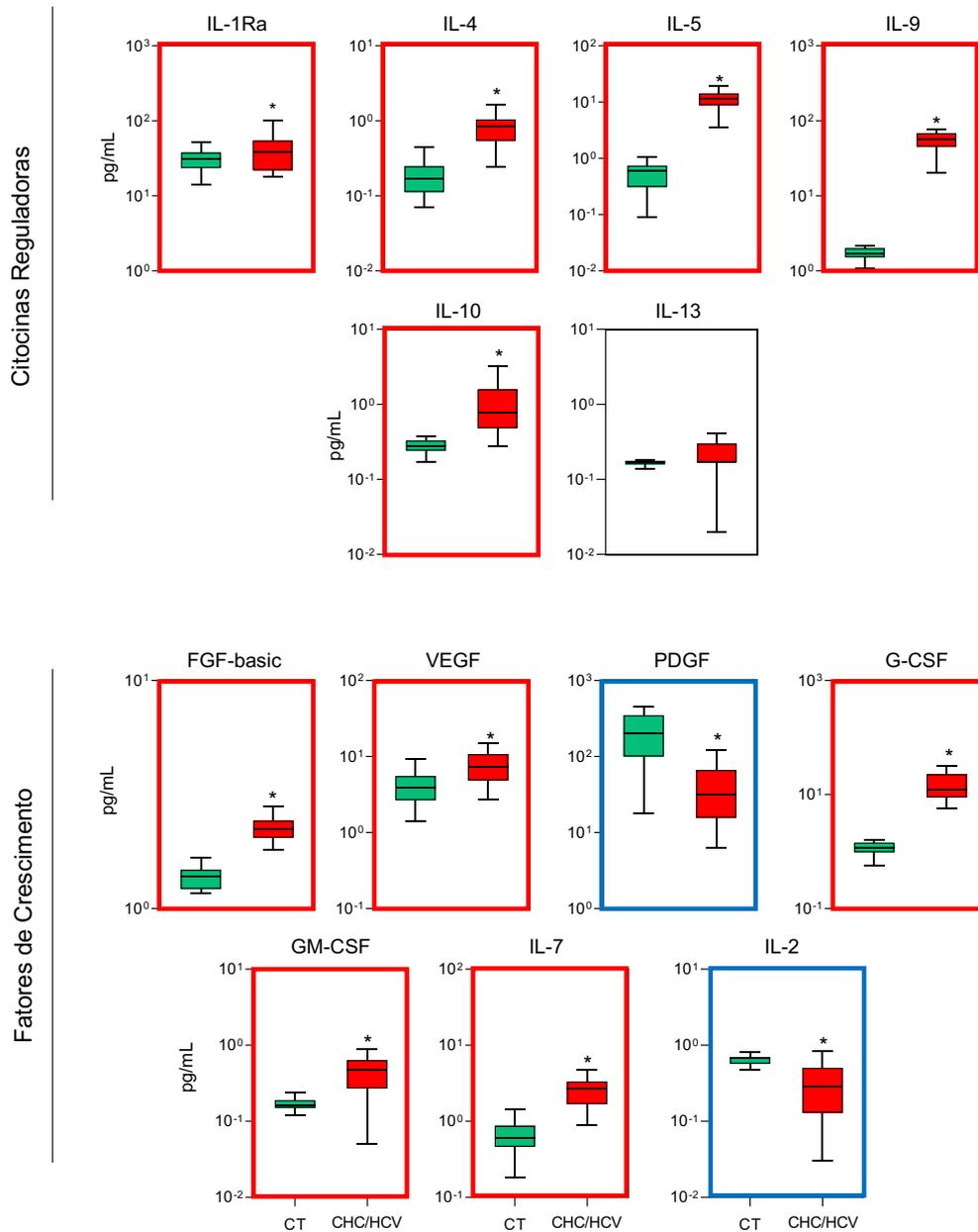
Grupos	Carcinoma hepatocelular (N=62)		P
	HCV n = 30	RVS n =32	
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>	115 (78.5 – 137.3)	117 (96.3 – 189)	0.36
RNI <sup>b</sup>	1.12 (1.05 – 1.23)	1.09 (1.00 – 1.18)	0.16
Alfa fetoproteína <sup>b</sup>	106.5 (25.6 – 1019)	14.8 (4.5 – 406.5)	0.04*
Albumina <sup>a</sup>	3.48 ± 0.63	4.07 ± 0.53	<0.001***
Bilirrubina total <sup>b</sup>	1.28 (0.93 – 1.80)	0.83 (0.67 – 1.24)	0.02*
Creatinina <sup>b</sup>	0.94 (0.80 – 1.16)	0.90 (0.75 – 1.00)	0.18
ALT <sup>b</sup>	75.0 (41.8 – 119.8)	28.5 (22.0 – 44.0)	<0.001***
AST <sup>b</sup>	105.5 (68.5 – 142.3)	39.0 (27.5 – 49.5)	<0.001***
FA <sup>b</sup>	173.5 (130.8 – 234)	117.5 (91.3 – 163.3)	0.006**
GGT <sup>b</sup>	160.5 (101.8 – 315)	91.5 (54.3 – 146.3)	0.007**

a: média ± desvio padrão; b: mediana (primeiro quartil – terceiro quartil)

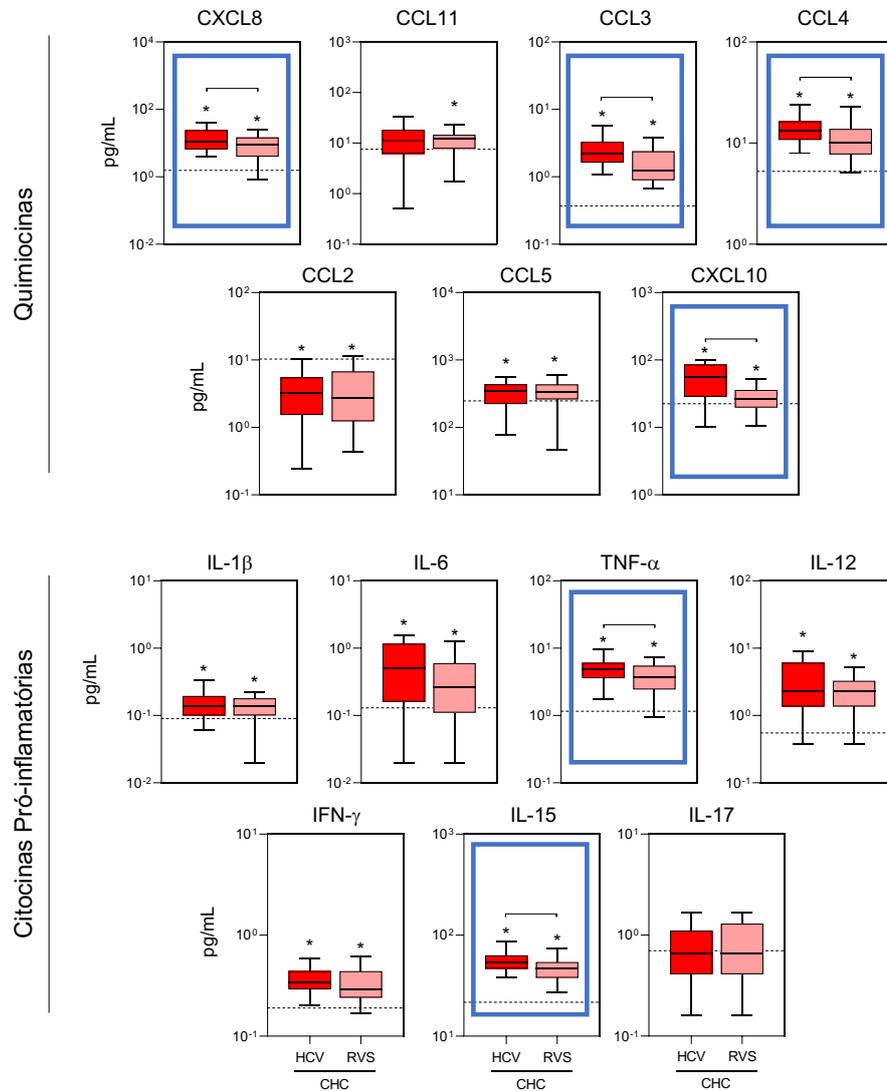
**Gráficos (figuras 4 a 7) das análises quantitativas dos mediadores imunes**



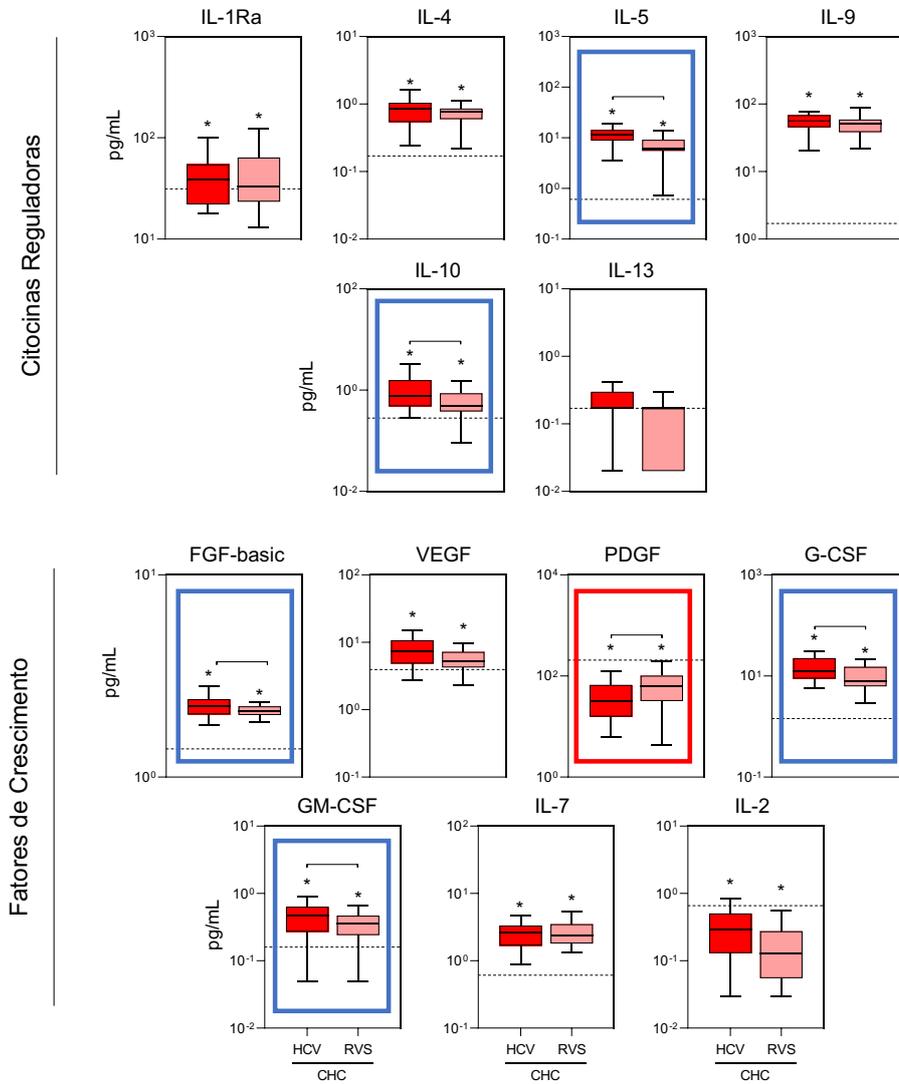
**Figura 4** - Análise quantitativa de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (expressos em pg/mL) em amostras de soro de participantes com carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica (grupo CHC-HCV) comparados ao grupo controle de indivíduos saudáveis (CT). O grupo CT está representado pela barra verde, o \* indica diferença dos mediadores dos grupos CHC em relação ao CT, os contornos vermelho e azul indicam aumento e diminuição dos mediadores dos grupos CHC em relação ao CT, respectivamente. A barra sinaliza os pares nos quais há diferença de mediadores.



**Figura 5** –Análise quantitativa de citocinas reguladoras e fatores de crescimento (expressos em pg/mL) em amostras de soro de participantes com carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica (grupo CHC-HCV) comparados ao grupo controle de indivíduos saudáveis (CT). O grupo CT está representado pela barra verde, o \* indica diferença dos mediadores dos grupos CHC em relação ao CT, os contornos vermelho e azul indicam aumento e diminuição dos mediadores dos grupos CHC em relação ao CT, respectivamente. A barra sinaliza os pares nos quais há diferença de mediadores. contorno azul indica diminuição dos mediadores.



**Figura 6**– Análise quantitativa de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (expressos em pg/mL) em amostras de soro de participantes com carcinoma hepatocelular e curados da infecção (grupo CHC-RVS) comparados ao grupo controle de indivíduos saudáveis (CT). O grupo CT está representado pela linha tracejada. O \* indica a diferença dos mediadores dos grupos CHC em relação ao CT, o contorno azul indica e diminuição dos mediadores dos grupos CHC em relação ao CT A barra sinaliza os pares nos quais há diferença de mediadores.



**Figura 7** – Análise quantitativa de citocinas reguladoras e fatores de crescimento (expressos em pg/mL) em amostras de soro de participantes com carcinoma hepatocelular e curados da infecção (grupo CHC-RVS) comparados ao grupo controle de indivíduos saudáveis (CT). O grupo CT está representado pela linha tracejada. O \* indica a diferença dos mediadores dos grupos CHC em relação ao CT, o contorno azul indica e diminuição dos mediadores dos grupos CHC em relação ao CT A barra sinaliza os pares nos quais há diferença de mediadores.

***Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)*****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do estudo:** “Fisiopatologia da Infecção crônica pelos Vírus das Hepatites B e C: análise de biomarcadores imunológicos de resposta terapêutica e de associação com o carcinoma hepatocelular”. Projeto: CAAE –15732513.0.1001.5149

Prezado(a)

Sr(a).

O(A) Sr(a). está sendo convidado para participar do estudo denominado “Fisiopatologia da Infecção crônica pelos Vírus das Hepatites B e C: análise de biomarcadores imunológicos de resposta terapêutica e de associação com o carcinoma hepatocelular”.

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 melhor entendimento da associação dos vírus causadores das hepatites B ou C com o sangue e suas células imunes e as que secretam substâncias que circulam no sangue, chamadas de citocinas ou de quimiocinas, para entender: 1) como estas células e suas secreções se comportam nessas doenças; 2) como é a evolução desses componentes em relação ao tratamento da hepatite; e 3) como essas células e as substâncias que elas secretam se comportam nos pacientes com hepatites por vírus que desenvolvem nódulos malignos no fígado.

O estudo será realizado a partir de testes laboratoriais que serão realizados em uma amostra de sangue obtida em veia periférica do(a) Sr(a) que foi colhida para um estudo semelhante que está sendo realizado pelo nosso grupo. No entanto, caso o Sr(a) ainda não tenha participado nem colhido amostra ou tenha desenvolvido nódulo no fígado, pedimos que nos autorize a coleta de outra amostra igual à primeira para que possamos comparar pacientes com e sem essas lesões no fígado. Esta comparação poderá nos fornecer informações como, por exemplo, se algumas alterações no seu sistema imunológico podem nos indicar a possibilidade do aparecimento desses nódulos, bem como se há alterações que permitam conhecer melhor os aspectos dessas lesões. 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.<sup>a</sup> Rosângela Teixeira, que coordena o Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, a médica Lucy Ana Santos Fonseca e a enfermeira pesquisadora Isabela Gomes Ribeiro.

Espera-se que este estudo, iniciado em 2013, prossiga até por volta de 2020. Portanto, caso o Sr(a) opte por participar, é importante saber que sua amostra de sangue poderá ficar armazenada

em local apropriado na Faculdade de Medicina ou na Fiocruz de Belo Horizonte, para ser utilizada em pesquisas semelhantes a esta.

### **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 o 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 poderão 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, a amostra de sangue oriunda do(a) Sr(a) será coletada 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. Coletará também informações sobre o tratamento da hepatite e os 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 esta coleta não afetará em nada o seu tratamento proposto.

### **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 indicado para seu caso.

A pequena quantidade de sangue será colhida 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 imunidade de pacientes com hepatite por vírus que desenvolvem e que não desenvolvem os nódulos no fígado. Estas informações, somadas à de outras pesquisas feitas em outros locais, 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 aos tratamentos propostos por seu médico e equipe 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 gratuito ou adicional 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 às Dras. Rosângela Teixeira, Lucy Ana Santos Fonseca ou Isabela Gomes Ribeiro 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 - e-mail: [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)

<b>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>
---

Li o termo de consentimento livre e esclarecido para este estudo “Fisiopatologia da Infecção crônica pelos Vírus das Hepatites B e C: análise de biomarcadores imunológicos de resposta terapêutica e de associação com o carcinoma hepatocelular”.

1. 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.
2. Concordo livremente em participar deste estudo.
3. 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.
4. 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.
5. Ao assinar este documento, dou permissão para coleta de amostra de sangue e análise dos meus dados no prontuário médico do Hospital das Clínicas da UFMG.
6. Dou o meu consentimento para o uso, armazenamento e retenção da minha amostra de sangue e dos meus dados pessoais para as finalidades desse estudo e de estudos futuros sobre o mesmo assunto.

\_\_\_\_\_  
Nome do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome do representante (se aplicável)

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Data

**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 da pesquisadora

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
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.

*Parecer COEP*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** "Fisiopatologia da Infecção crônica pelos Vírus das Hepatites B e C: análise de biomarcadores imunológicos de resposta terapêutica e de associação com o carcinoma hepatocelular".

**Pesquisador:** Rosângela Teixeira

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 15732513.0.1001.5149

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da UFMG

**Patrocinador Principal:** Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/ FIOCRUZ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.469.662

**Apresentação do Projeto:**

Mesma apresentação do parecer 300.383 de 11/06/2013

**Objetivo da Pesquisa:**

Os mesmos objetivos descritos no parecer 300.383 de 11/06/2013.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

São os mesmo do parecer 300.383 de 11/06/2013.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Justificativa da emenda:

\* 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 de resposta terapêutica" foi aprovado em 11 de junho de 2013 e sua emenda, aprovada em 28 de julho de 2015, nos autorizou a prorrogar o prazo de inclusão de pacientes em 2016.

A inclusão de pacientes foi completada no primeiro trimestre de 2017. Nessa ocasião, o material coletado está armazenado na Faculdade de Medicina da UFMG e na Fiocruz de Belo Horizonte, para dar início aos procedimentos laboratoriais de pesquisa. Os TCLEs estão arquivados no nosso

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.489.662

laboratório de hepatites localizado na Faculdade de Medicina da UFMG.

A lentidão do processo de inclusão e, conseqüentemente, de realização dos procedimentos se deveu ao processo demorado de mudanças nos protocolos de tratamento da hepatite C crônica, padronizado em todo o país e dependente das políticas de saúde pública. Assim, atrasos e interrupções no fornecimento de medicamentos, bem como na atualização de protocolos, são rotina na nossa prática e constituem entraves para que pesquisas sejam concluídas no prazo estimado. Contudo, lidamos com esta situação desde o início de nossas pesquisas e temos tido a compreensão institucional e do COEP/UFMG para a concessão de prorrogação de prazos.

Com o passar do tempo, novos desafios e resultados de investigações sobre biomarcadores em hepatites virais nos estimulam a continuar nessa linha de pesquisa. Mais recentemente, nos deparamos com a alta prevalência de carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatites virais B ou C e a literatura aponta para a importância de investigações que possam sugerir biomarcadores imunológicos como preditores dessa séria complicação. Por esta razão, vimos solicitar ao COEP/UFMG autorização para prosseguir nossas pesquisas em biomarcadores, em parceria com a Fiocruz, com a inclusão de pacientes com hepatites virais crônicas B e C e com carcinoma hepatocelular.

A metodologia será a mesma empregada no projeto original aprovado pelo COEP. O suporte financeiro será através de solicitações às agências de fomento à pesquisa e também recursos da Fiocruz que dispõe de verbas do Ministério da Saúde para pesquisas em suas áreas de interesse, que incluem as hepatites virais, sob coordenação do Dr. Olindo Assis Martins Filho e Dra. Andréa Teixeira de Carvalho, ambos nossos parceiros científicos há anos em projetos sobre biomarcadores.

Portanto, constitui nosso objetivo atual o estudo de biomarcadores em pacientes com hepatites virais crônicas B e C e carcinoma hepatocelular. Os grupos controles serão os mesmos do projeto previamente aprovado que inclui pacientes com hepatite crônica C sem carcinoma hepatocelular. Solicitamos que, para o objetivo atual, sejamos autorizados a incluir também pacientes com hepatite B crônica com e sem carcinoma hepatocelular, em amostra de conveniência, visto que a hepatite B crônica é fator importante para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Estimamos a inclusão de pacientes entre 2017 a 2020 visto que novas drogas de tratamento das hepatites virais B e C, atualmente no portfólio do Ministério da Saúde para serem incluídas às opções de tratamento atuais, poderão atrasar a inclusão de pacientes.

Tendo em vista a importância científica do biomarcadores em hepatites virais crônicas e, e em razão da complexidade da associação entre esses agravos e o carcinoma hepatocelular, vimos

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.469.662

também solicitar a autorização do COEP/UFMG para que as amostras de sangue armazenadas em nosso laboratório sejam utilizadas como biorepositório para pesquisas nessa linha de investigação – a análise da resposta imune e de biomarcadores preditores de desenvolvimento e na caracterização do carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatites virais.

Como produto de nossas investigações, citamos nosso paper recentemente publicado em periódico CAPES QUALIS A1 cuja referência segue abaixo.

Seguem, também, modificações nos TCLE para incluir os novos objetivos propostos.

Estamos certos de que nossos novos objetivos estão alinhados às demandas científicas atuais e são eticamente corretas. A atenção e cuidados dispensados aos nossos pacientes com hepatites virais crônicas em nosso serviço, incluídos ou não em pesquisas clínicas, é de nossa inteira responsabilidade e compromisso ético. Não há previsão de vantagens ou ganhos diretos para os pacientes incluídos, porém nossos resultados já publicados têm somado conhecimento científico que poderá, no futuro, contribuir para mudanças no cenário desses sérios agravos de grande impacto para os pacientes e para a saúde pública no Brasil.\*

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram acrescentados carta emenda e novo TCLE.

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

SMJ, sou favorável à aprovação da emenda da pesquisa intitulada "Fisiopatologia da Infecção crônica pelos Vírus das Hepatites B e C: análise de biomarcadores imunológicos de resposta terapêutica e de associação com o carcinoma hepatocelular" da pesquisadora Rosângela Teixeira.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad. Sl 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.489.682

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_593785 E1.pdf	25/11/2017 22:32:41		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COEP.pdf	25/11/2017 22:32:08	Rosângela Teixeira	Aceito
Outros	carta_emenda.docx	25/11/2017 19:27:45	Rosângela Teixeira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	22/11/2017 16:56:41	Rosângela Teixeira	Aceito
Outros	emenda.docx	22/11/2017 16:54:52	Rosângela Teixeira	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto Assinada.pdf	02/05/2013 14:28:06		Aceito
Outros	15732513parecer.pdf	18/01/2018 13:47:28	Vivian Resende	Aceito
Outros	15732513aprovacao.pdf	18/01/2018 13:47:40	Vivian Resende	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 18 de Janeiro de 2018

---

**Assinado por:  
Vivian Resende  
(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Si 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br