

OSVALDO FLÁVIO DE MELO COUTO

**PERFIL SÉRICO DE CITOCINAS E SEU DESEMPENHO NA
AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E FIBROSE HEPÁTICA EM
PACIENTES COM HEPATOPATIA CRÔNICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2015

OSVALDO FLÁVIO DE MELO COUTO

**PERFIL SÉRICO DE CITOCINAS E SEU DESEMPENHO NA
AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E FIBROSE HEPÁTICA EM
PACIENTES COM HEPATOPATIA CRÔNICA**

Orientadora: Prof.^a Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde do Adulto.

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

- **Reitor:** Prof. Jaime Arturo Ramírez
- **Vice-Reitora:** Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida
- **Pró-Reitor de Pós-Graduação:** Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte
- **Pró-Reitora de Pesquisa:** Prof^a. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

- **Diretor:** Prof. Tarcizo Afonso Nunes
- **Vice-Diretor:** Prof. Humberto José Alves
- **Coordenadora do Centro de Pós-Graduação:** Prof^a. Sandhi Maria Barreto
- **Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação:** Prof^a. Ana Cristina C. Gama

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

- **Chefe:** Prof. Unaí Tupinambás

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

- **Coordenadora:** Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
- **Subcoordenador:** Prof. Paulo Caramelli
- **Colegiado:**
 - Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
 - Prof. Paulo Caramelli
 - Prof^a. Gilda Aparecida Ferreira
 - Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade
 - Prof^a. Rosângela Teixeira
 - Prof^a. Valéria Maria Azeredo Passos

Dedico este trabalho:

aos meus pais, Osvaldo e Lílian,
pela minha formação moral e pelo incentivo constante;

aos meus irmãos, Marcos e Kátia,
por serem sinônimo de amizade e companheirismo;

à minha querida esposa, Lílian,
pela paciência, dedicação e por seu carinho; sem os quais, nada disso teria
sido possível.

aos meus filhos, Pedro e Isabela,
por concretizarem a expressão máxima do amor mais genuíno que um ser
humano é capaz de sentir.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Teresa Cristina de Abreu Ferrari, por sua disponibilidade, pelo apoio e incentivo constantes e pela maestria em me guiar pelos difíceis caminhos da metodologia científica. Fica o registro de um agradecimento especial e da minha admiração.

À Prof.^a Rosângela Teixeira por ter sido a pessoa que me influenciou desde o início da minha trajetória na pós-graduação com seu comprometimento e entusiasmo, tornando-se uma referência constante e sempre positiva.

Ao Prof. José Renan da Cunha Melo pela amizade, apoio e exemplo de dedicação à instituição e principalmente ao paciente.

À Dra. Luciana Costa Silva, colega que se tornou grande amiga, pela imprescindível ajuda na realização das biópsias hepáticas.

Ao Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier, pela valiosa contribuição na fase final de elaboração do trabalho.

Aos colegas do Instituto René Rachou (Fiocruz), em especial às doutoras Andréa Teixeira de Carvalho e Ana Carolina Campi Azevedo, pelo auxílio na realização dos experimentos e aos conhecimentos compartilhados ao longo desses anos. Também a todos os pesquisadores e colaboradores do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM).

Ao Prof. Nivaldo Toppa, Prof.^a Lúcia Porto e Prof.^a Paula Vidigal, pela paciente e imprescindível ajuda na revisão das lâminas e pelos ensinamentos em histologia hepática ao longo de toda minha formação.

Ao estatístico Fernando Henrique Pereira, pela ajuda na análise dos dados.

Aos amigos da equipe de gastroenterologia, nutrologia (...e hepatologia...) dos hospitais Mater Dei, Vera Cruz e Lifecenter, pelo apoio, compreensão e ensinamentos diários: Dr.

José Carlos Couto, Dra. Célia Couto, Dr. Alduir Bento, Dr. Lincoln Antinossi, Dra. Patrícia Sato, Dra. Priscila Penido e Nutricionistas Sílvia Ferolla e Tâmara Reis.

Aos amigos do ambulatório de Tumores Hepáticos do Instituto Alfa de Gastroenterologia, pela convivência produtiva e saudável: Dr. Rodrigo Cambraia, Dr. Orlando Scalabrini, Prof.^a Vivian Resende, Dr. Marcelo França, Prof. Cristiano Xavier, Prof. Manoel Jacy, Dr. Rogério Augusto, e a todos os médicos residentes e acadêmicos com os quais tive a oportunidade de dividir experiências e aprendizados durante os últimos anos.

Aos acadêmicos de medicina que participaram em vários momentos do trabalho, em especial às atuais colegas Clara Camelo e Nicole Eudes.

Aos professores Carlos Faria dos Santos Amaral e René Mendes que, de forma muito especial e em momentos diferentes, contribuíram para minha formação acadêmica.

Um agradecimento especial à minha esposa, Lilian Diniz, pelo seu apoio incondicional e pela paciente participação em cada instante, durante toda a realização deste trabalho.

*“A história de uma ciência não deveria ser uma
mera coleção de biografias e ainda menos um quadro
cronológico adornado de histórias. Tem de ser também
uma história da formação, da deformação e da
retificação dos conceitos científicos...”*

Georges Canguilhem, citado pelo Professor René Mendes.

SUMÁRIO

1.	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	17
1.1.	Introdução	17
1.2.	Antecedentes científicos	18
1.2.1.	Etiopatogenia da inflamação e fibrose hepáticas	18
1.2.2.	Citocinas e quimiocinas	24
1.2.3.	A biópsia hepática como método de avaliação de inflamação e fibrose	28
1.2.4.	Marcadores séricos de inflamação e fibrose hepáticas	30
1.2.5.	Citocinas e quimiocinas como marcadores de atividade inflamatória e fibrose hepática em pacientes com hepatopatia crônica	32
1.2.6.	Referências bibliográficas	38
2.	OBJETIVOS	51
3.	PACIENTES E MÉTODOS	52
3.1.	Pacientes	52
3.2.	Classificação histopatológica	53
3.3.	Quantificação das citocinas e quimiocinas	54
3.4.	Análise estatística	56
4.	ARTIGOS ORIGINAIS	58
4.1.	ARTIGO ORIGINAL 1	58
4.2.	ARTIGO ORIGINAL 2	79
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
5.1.	Principais achados do estudo	104
5.2.	Limitações do estudo	106
5.3.	Perspectivas	106
	APÊNDICES E ANEXOS	

LISTA DE TABELAS

Considerações iniciais

Tabela 1	Complicações da biópsia hepática
Tabela 2	Características dos pacientes e distribuição dos casos segundo a intensidade da inflamação e grau de fibrose

Artigo 1

Table 1	Multinomial logistic regression comparing the viral hepatitis, NAFLD, autoimmune and criptogênico groups in relation to the biomarkers CXCL10, CCL2 and CXCL8
Table 2	Multinomial logistic regression results showing the associations between the etiology and the predictors biomarkers

Artigo 2

Table 1	Serum markers with best performance for the diagnosis of inflammation in patients with chronic liver diseases
Table 2	Serum markers with best performance for the diagnosis of inflammation considering different etiologies
Table 3	Serum markers with best performance for the diagnosis of fibrosis considering all patients as a group
Table 4	Serum markers with best performance for the diagnosis of fibrosis considering different etiologies
Table 5	Multiple regression analysis comparing initial fibrosis and significant fibrosis in the virus and autoimmune groups in relation to CCL2
Table 6	Multiple regression analysis comparing no cirrhosis and cirrhosis in the virus group in relation to IL-4, and in the NAFLD group in relation to CCL2

LISTA DE FIGURAS

Considerações iniciais

Figura 1 Representação esquemática da análise de citocinas, do soro, por meio do ensaio com microesferas por citometria de fluxo

Artigo 1

Figure 1 CXCL10 and CCL2 median serum concentrations (pg/ml) in patients with chronic liver disease according to etiologic groups

Figure 2 Radar graphics of cytokines and chemokines in patients with chronic liver diseases and healthy controls

Figure 3 Cytokines and chemokines networks in patients with chronic liver disease and healthy controls

Figure 4 ROC curves of the serum levels of cytokines/chemokines, HA, collagen-IV and APRI for the diagnosis of significant fibrosis (F0-F2 vs. F3-F6)

Figure 5 ROC curves of the serum levels of cytokines/chemokines, HA, collagen-IV and APRI for the diagnosis of cirrhosis (F0-F4 vs. F5-F6)

Artigo 2

Figure 1 ROC curve of the serum levels of the aminotransferases, cytokines and chemokines for the diagnosis of any grade of inflammation (A0 vs. A1-A18)

Figure 2 ROC curves of the serum levels of the aminotransferases, cytokines and chemokines for the diagnosis of moderate/severe inflammation (A0-A3 vs. A4-A18)

Figure 3 ROC curves of the serum levels of the aminotransferases, cytokines and chemokines for the diagnosis of severe inflammation (A0-A8 vs. A9-A18)

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	ácido hialurônico
AI	autoimmune liver disease
ALT	alanino aminotransferase
APRI	aspartate aminotransferase to platelet ratio index
APRI	índice da razão entre aspartato aminotransferase/plaquetas
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
AUROC	area under the receiver operating characteristics curve
BT	bilirrubina total
C	cisteína
CBA	cytometric bead array
CHE	células hepáticas estreladas
CK	células de Kupffer
CLD	chronic liver disease
CTGF	fator de crescimento do tecido conjuntivo
DHC	doença hepática crônica
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
EGF	fator de crescimento epidérmico
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Es	especificidade
ET-1	endotelina-1
FACS	fluorescence activated cell sorter
GGT	gama glutamil transpeptidase
HA	hyaluronic acid

HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HD	hepatic disease
HGF	fator de crescimento hepatocitário
HSC	hepatic stellate cells
IL	interleukin
IL	interleucina
INF	interferon
LR	likelihood ratio
mAb	monoclonal antibody
MCP	monocyte chemoattractant protein
MEC	matriz extracelular
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP	metaloproteinase de matriz
NAFLD	nonalcoholic fat liver disease
NK	natural killer
OR	odds ratio
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PBS	tampão fosfato salínico
PE	phycoerythrin
PE	ficoeritrina
PIIIP	peptídeo amino-terminal do pró-colágeno III

R	receptor
RANTES	regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
RNI	razão normalizada internacional
ROC	receiver operating characteristics
RsTNF- α	receptor solúvel do fator de necrose tumoral alfa
RV	razão de verossimilhança
SD	standard deviation
Sp	specificity
TGF- β	fator transformador do crescimento beta
TIMP	inibidores teciduais das metaloproteinases
TLR	toll like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
Treg	células T regulatórias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

RESUMO

Introdução: a patogenia das doenças hepáticas crônicas ainda não está totalmente estabelecida. Ela envolve inflamação e morte celular em um microambiente de interações entre citocinas e quimiocinas. O conhecimento das características de expressão desses biomarcadores é importante para o auxílio na elucidação dos mecanismos patogênicos das hepatopatias. O objetivo deste trabalho é estudar o perfil sérico de citocinas e quimiocinas em pacientes com doença hepática crônica (DHC) de diferentes etiologias e determinar o desempenho destes biomarcadores no diagnóstico da inflamação e fibrose hepáticas. Avaliou-se também o desempenho dos níveis séricos de ácido hialurônico (AH), colágeno-IV e o índice da relação entre a dosagem sérica da aspartato aminotransferase e das plaquetas (APRI) no diagnóstico da fibrose hepática. **Métodos:** o estudo incluiu 225 pacientes com DHC e indicação de biópsia hepática atendidos consecutivamente e 15 indivíduos saudáveis para formação de um grupo controle. Os níveis séricos dos seguintes marcadores foram quantificados por meio de citometria de fluxo: interleucina (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, fator de necrose tumoral- α , interferon (INF)- γ , CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10. A mediana dos níveis séricos, gráficos em radar e redes de correlação foram utilizados para estudar o perfil das citocinas e quimiocinas. A área sob a curva ROC (*receiver operator characteristics*) foi calculada no intuito de determinar o desempenho dos biomarcadores no diagnóstico de inflamação e fibrose. Regressão logística foi utilizada para estabelecer a relação entre os biomarcadores e as diferentes etiologias de DHC e os diferentes estádios de fibrose. **Resultados:** a mediana do nível sérico de todos os biomarcadores foi significativamente mais elevada nos pacientes com DHC quando comparados aos controles. O perfil das citocinas e quimiocinas apresentou diferenças de acordo com a etiologia. A análise por regressão logística indicou os marcadores CXCL10 e CCL2 como associados de maneira mais significativa ao grupo de pacientes com hepatites virais quando comparado aos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e doenças autoimunes (AI), respectivamente. CXCL8 associou-se de forma mais significativa a DHGNA e AI quando comparados aos pacientes com hepatites virais. CXCL10 apresentou correlação positiva com o grau de inflamação e bom desempenho para o diagnóstico de inflamação no grupo de pacientes com DHC CCL2 apresentou correlação negativa com o grau de inflamação e com o estadiamento da fibrose, mostrando bom desempenho para diagnóstico de ausência de inflamação nos pacientes

com DHC. Na análise por grupos de etiologias de DHC, INF- γ , e CXCL10 apresentaram desempenho razoável para o diagnóstico de inflamação no grupo de hepatites virais, e IL-5 e CXCL8 e no grupo criptogênico. CCL2 apresentou correlação negativa com o grau de inflamação nos grupos de hepatites virais, AI e criptogênico e mostrou desempenho razoável para diagnóstico de ausência de inflamação nesses grupos. Nenhuma das citocinas/quimiocinas avaliadas apresentou desempenho superior àquele das aminotransferases no diagnóstico de inflamação. Os marcadores com melhor desempenho para o diagnóstico dos estádios de fibrose foram AH, colágeno-IV e APRI. CCL2 e CXCL10 mostraram desempenho razoável para diagnóstico de fibrose, sendo negativa a correlação da CCL2 com o estágio da fibrose. **Conclusões:** o perfil de citocinas e quimiocinas apresentou diferenças de acordo com as etiologias de DHC. CXCL10, CCL2 e CXCL8 foram associadas a grupos específicos. CCL2 e CXCL10 apresentaram papel potencial como marcadores diagnósticos para a inflamação e fibrose hepática em pacientes com DHC. CXCL10 correlacionou-se com a presença de inflamação e fibrose e CCL2 com a ausência de ambas. IL-4, IL-10, INF- γ e CXCL-9 apresentaram utilidade diagnóstica potencial em situações específicas.

Palavras-chave

Doença hepática; citocinas; quimiocinas; perfil imunológico; inflamação; fibrose.

ABSTRACT

Background & Aims: the pathogenesis of chronic liver diseases is not fully understood. It involves hepatocellular inflammation and death ruled by a microenvironment of cytokines and chemokines interactions. The characteristics of the expression of these biomarkers are important to further elucidate the pathogenic mechanisms of the hepatic disorders. We aimed to investigate the cytokines and chemokines serum profile of patients with chronic liver disease (CLD) of different etiologies and determine the accuracy of these biomarkers serum levels in the diagnosis of hepatic inflammation and fibrosis. In addition, we evaluated the performance of the serum concentrations of hyaluronic acid (HA), collagen-IV and the aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) in the diagnosis of fibrosis. **Methods:** the study included 225 consecutive adult patients with CLD with indication for a liver biopsy and 15 healthy individuals to serve as a control group. Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, tumor necrosis factor- α , interferon (INF)- γ , CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 were measured in the serum by cytometric bead array. The median serum levels, radar charts and correlation networks were used to study the cytokines/chemokines profile. The areas under the receiver operating characteristic curves (AUROC) were calculated in order to determine their performance for the diagnosis of inflammation and fibrosis. Logistic regression was used to study the relation between the biomarkers and the different etiologies of liver disease and hepatic fibrosis. **Results:** serum levels of all biomarkers were significantly higher in the patients with liver disease when compared to the healthy controls. Cytokines and chemokines profile was somewhat different according to the etiology. The logistic regression demonstrated CXCL10 and CCL2 as significant biomarkers of chronic viral hepatitis, when compared to the non-alcoholic fat liver disease (NAFLD) and autoimmune diseases (AI) patients, respectively. CXCL8 was more commonly associated with NAFLD and AI when compared to chronic virus hepatitis. CXCL10 correlated positively with the grade of inflammation and presented a good performance for the diagnosis of liver inflammation in the group of patients with CLD. CCL2 presented negative correlation with the grade of inflammation and fibrosis stages. When the patients were separated into groups according to the etiology of the liver disease, INF- γ , and CXCL10 presented a relatively good performance for the diagnosis of inflammation in chronic viral hepatitis, and IL-5 and CXCL8 in the cryptogenic group. CCL2 correlated negatively with the grade of inflammation in the groups of chronic viral

hepatitis, AI and cryptogenic, and presented a relatively good performance for the diagnosis of lack of inflammation in these groups. None of the evaluated cytokines/chemokines performed better than the aminotransferases in the diagnosis of hepatic inflammation. The serum markers with best performance for fibrosis staging were HA, Collagen-IV and APRI. CCL2 and CXCL-10 presented a relatively good performance for the diagnosis of fibrosis and CCL2 correlated negatively with fibrosis stage. **Conclusions:** cytokines and chemokines profile was different according to the etiology of the CLD. CXCL10, CCL2 and CXCL8 were associated with specific etiologic groups. CCL2 and CXCL10 are important biomarkers for the diagnosis of inflammation and fibrosis. CXCL10 correlated with the presence of inflammation and fibrosis and CCL2 correlated with the absence of both types of lesion. IL-4, IL-10, INF- γ , CXCL-9 deserve further investigation to confirm or refute their usefulness in specific situations.

Keywords

Hepatic disease; cytokines; chemokines; immune profile; inflammation; fibrosis.

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. 1. Introdução

As doenças hepáticas crônicas são importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Suas principais etiologias são as infecções virais (hepatites B e C), abuso ou contato com substâncias tóxicas (álcool, medicamentos, ervas e alguns produtos provenientes de exposição ocupacional), doenças metabólicas (hemocromatose hereditária, doença de Wilson, deficiência de alfa-1 antitripsina e doença hepática gordurosa não alcoólica), doenças autoimunes (hepatite autoimune, cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária) e doenças vasculares (síndrome de Budd-Chiari, doença veno-oclusiva e esquistossomose mansoni), dentre outras.

As hepatopatias constituem a principal causa de morte dentre as doenças do aparelho digestivo, excluindo-se as neoplasias malignas.¹ Nos Estados Unidos, aproximadamente 30.000 mortes por ano são atribuídas a complicações da cirrose. Cerca de 10.000 mortes acontecem devido ao carcinoma hepatocelular, que surge, em geral, em um fígado cirrótico.² A literatura recente aponta número crescente de indivíduos acometidos por doença hepática de diversas causas.³ É previsto aumento da incidência e prevalência do carcinoma hepatocelular nas próximas duas décadas, principalmente em consequência da melhora do diagnóstico e monitoramento das hepatopatias e do aumento da prevalência da hepatite crônica pelo vírus C.⁴ No Brasil, dados do Ministério da Saúde indicam que cerca de 33 mil novos casos de hepatite viral crônica são notificados a cada ano.⁵

O mecanismo de evolução da maioria das doenças hepáticas crônicas é a inflamação seguida da formação de tecido cicatricial fibroso, que, com o passar do tempo, leva à subversão da arquitetura histológica e desenvolvimento de cirrose.

O diagnóstico, acompanhamento e estudo do tratamento das hepatopatias crônicas passam, necessariamente, pelo melhor conhecimento da etiopatogenia dos processos de inflamação e fibrose hepáticas.

Existem cada vez mais evidências que apontam para o fato da reversibilidade da fibrose hepática e, conseqüentemente, impulsionam o desenvolvimento de novas terapias anti-

fibróticas.⁶ Para que essas possam ser testadas e implementadas, demanda-se o desenvolvimento e validação de métodos acurados e não invasivos de avaliação da inflamação e fibrose hepáticas que possam ser periodicamente repetidos, permitindo-se o acompanhamento dinâmico característico desses dois processos.

O presente trabalho foi delineado com o objetivo de estudar o perfil sérico de citocinas e quimiocinas em pacientes com doença hepática crônica de diversas etiologias e avaliar o potencial desses biomarcadores como substitutos da biópsia hepática na avaliação do grau de inflamação e estágio da fibrose hepática.

1.2. Antecedentes científicos

1.2.1. Etiopatogenia da inflamação e fibrose hepáticas

O conceito fundamental referente à patogênese da fibrose hepática é que esta consiste em processo orgânico de resposta ou reparação à injúria persistente.⁷

A injúria hepática leva à ruptura da homeostase no fígado, resultando em estresse oxidativo com maior produção e liberação de radicais livres extracelulares, citocinas e moléculas sinalizadoras.

Os mecanismos de morte celular conhecidos são a apoptose e a necrose,^{8,9} sendo a intensidade da lesão um de seus principais determinantes. Uma lesão muito discreta afeta poucas organelas celulares que podem ser removidas por autofagia sem levar a dano celular definitivo.⁶ Se a lesão é um pouco mais significativa, há lesão mitocondrial discreta ou moderada, o que leva a célula à apoptose. Uma agressão mais intensa resulta na destruição da maioria das mitocôndrias e queda significativa dos níveis de ATP, resultando em necrose celular (necrose oncótica).¹⁰

A apoptose é um evento pontual, caracterizado morfológicamente pela contração do citoplasma, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos.¹⁰ Em geral ocorre em uma célula isolada e termina com a fagocitose dos corpos apoptóticos, não desencadeando processo inflamatório. Considerando-se a capacidade regenerativa do fígado, essas células são prontamente substituídas. A apoptose em baixa escala é essencial

para o *turnover* celular, e mesmo um aumento moderado na sua taxa não resulta em alterações patológicas. Entretanto, se a agressão for grave o suficiente para afetar um número maior de células, o processo apoptótico pode levar a rápida queda dos níveis de ATP, fazendo com que ocorra perda acelerada da viabilidade celular. Este processo é denominado “necrose secundária” e é descrito em inúmeras situações patológicas.^{11,12} Uma característica da necrose secundária em oposição à necrose oncótica é que o primeiro é inequivocamente precedido de apoptose.¹³ Nestes casos pode haver estímulo para indução de citocinas e quimiocinas, com recrutamento de neutrófilos,⁴ o que sugere a possibilidade de que o processo de morte celular por apoptose possa promover uma reação inflamatória capaz de levar à necrose celular.^{14,15}

Na necrose celular, a lesão hepática é tipicamente inflamatória. O fígado contém macrófagos residentes, também chamados de células de Kupffer (CK), e células *natural killer* (NK) que constituem a primeira resposta à reação inflamatória local. O processo inflamatório, a despeito de sua causa, é o principal estímulo para a resposta fibrogênica.¹⁶

Durante a agressão inicial ao fígado, macrófagos, monócitos e CK residentes iniciam a resposta imune inata. Na fagocitose do material patogênico ocorre liberação de inúmeros mensageiros químicos, dentre os quais o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL), que propiciam a resposta de fase aguda, estabelecendo-se o processo de inflamação. Esta fase caracteriza-se pela elevação da concentração sérica de proteínas plasmáticas coletivamente chamadas de proteínas de fase aguda.¹⁷

A seguir, várias linhagens celulares leucocitárias são recrutadas. Esse processo é finamente regulado e depende de interações sequenciais com moléculas de adesão endotelial e quimiocinas. Inicialmente, ocorrem adesão e deslizamento dos leucócitos na superfície endotelial por meio de pontes transitórias entre seletinas e suas glicoproteínas ligantes. Esse contato inicial permite que os leucócitos fiquem também expostos às quimiocinas que são secretadas pelo endotélio ativado e por células do sistema imune. A ligação das quimiocinas com seus receptores expressos em leucócitos leva ao estímulo de via sinalizadora que ativa as integrinas leucocitárias. As integrinas ativadas conectam-se aos seus ligantes (componentes da superfamília das imunoglobulinas) expressos na superfície endotelial e que são responsáveis pelo carreamento dos leucócitos por deslizamento na superfície endotelial. A seguir, os leucócitos passam através das camadas

endoteliais em um processo denominado migração transendotelial ou diapedese, seguindo um fluxo até o local da infecção ou lesão tecidual.^{18,19}

Os neutrófilos são a linhagem celular mais abundante do sistema imune inato e os primeiros fagócitos a chegar ao foco de injúria, onde modificam o seu fenótipo, tornam-se ativados e liberam moléculas citotóxicas (mais de 300 tipos diferentes são contidas em seus grânulos). Eles também produzem quimiocinas para atrair mais neutrófilos e estender sua meia vida, que é de seis a 12 horas em estado basal, para 24 a 48 horas, quando em sítios de inflamação. Apesar de moléculas de adesão constituir via importante para seu recrutamento, outros fatores quimiotáticos se mostram específicos nesse processo de direcionamento da circulação sistêmica ao sítio de lesão hepática. Tais fatores são citocinas (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β), proteínas do complemento ativadas e quimiocinas, principalmente a CXCL-8. Recentemente o CD44 e seu ligante hialurano têm sido descritos como importantes células recrutadoras de neutrófilos. Eles são intensamente expressos nos sinusóides hepáticos. Experimentos com anticorpos anti-CD44 evidenciaram bloqueio de sua atividade e, em consequência, inibição do processo de migração.²⁰⁻²²

Os monócitos constituem 5% a 10% dos leucócitos da circulação periférica. Apresentam grande heterogeneidade, sendo o subtipo CD14⁺ o de maior expressão, representando 80% deles. O recrutamento dos monócitos segue o paradigma geral do transporte de leucócitos no que se refere à cascata de deslizamento, adesão e transmigração. A principal quimiocina envolvida em sua quimiotaxia é a CCL2/MCP (*monocyte chemoattractant protein*), que se liga ao seu receptor CCR2, intensamente expresso na superfície dessas células. No sítio de inflamação, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, que apresentam função importante na manutenção da homeostase por meio do clareamento de células senescentes, remodelamento e reparação de tecidos após a resolução da inflamação. A fagocitose de tecido necrótico provoca alteração importante na fisiologia dos macrófagos, incluindo modificações na expressão de proteínas de superfície e produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios. As CK são os macrófagos residentes no fígado e consistem em até 90% dos macrófagos fixos do organismo. Elas localizam-se principalmente na região periportal para servir de defesa contra bactérias e produtos bacterianos derivados do intestino e secretam diversas citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e quimiocinas como CCL3/MIP (*macrophage inflammatory*

protein) e CCL5/RANTES (*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*). Desta forma, as CK são as primeiras células a detectar a presença de patógenos no fígado.²³⁻²⁵

Os mastócitos, basófilos e eosinófilos apresentam-se em menores quantidades no contexto da inflamação hepática, quando comparados aos neutrófilos, monócitos e macrófagos. Contudo, desempenham importante função na apresentação de antígenos a linfócitos T CD4⁺ ao expressarem moléculas coestimuladoras CD80/CD86 e por meio da produção de citocinas como IL-4 e IL-3. Diversos estudos têm demonstrado participações específicas dessas células na patogênese de determinadas etiologias de inflamação e fibrose hepáticas.²⁶⁻³⁷

O sistema imune inato tenta proporcionar, de forma coordenada, um ambiente hepático de tolerância, mas que, ao mesmo tempo, detecta, responde e elimina patógenos invasores e células infectadas ou reconhecidas como não-próprias. Esta imunidade protetora é benéfica e importante, quando bem contida e adequadamente regulada. A perpetuação do estímulo pode levar ao acúmulo excessivo de células no local do tecido hepático acometido, contribuindo para o agravamento da patologia por meio de efeitos proinflamatórios e citotóxicos.

O sistema imune inato pode estimular o sistema imune adaptativo por meio de moléculas sinalizadoras que induzem a proliferação e diferenciação de linfócitos T e B antígeno-específicos. Alguns peptídeos atuam como apresentadores de antígenos para células T via complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II. Moléculas como CD28, CD80 e CD86 estão presentes em células apresentadoras de antígenos tais como as células dendríticas e atuam sobre os linfócitos T agindo como coestimuladores de conexão entre os sistemas imunes de resposta inata e adaptativa.

Uma lesão hepática transitória pode evoluir com restituição completa da integridade do parênquima. Contudo, a persistência da agressão resulta em fibrose. No processo fibrogênico, os componentes da membrana basal, como o colágeno e a laminina, são produzidos em maior quantidade e formam estrutura semelhante a uma membrana nos espaços de Disse. Ocorrem modificações na conformação dos sinusóides e redução de

suas fenestrações, fenômeno denominado “capilarização”, pois a estrutura alterada dos sinusóides assemelha-se à dos capilares.³⁸

As células hepáticas estreladas (CHE) do fígado constituem a principal fonte de matriz extracelular (MEC) na gênese da fibrose hepática. Elas situam-se na região perisinusoidal e têm como função básica o armazenamento de vitamina A. Sob a influência de estímulos inflamatórios, desencadeia-se o processo de ativação das CHE, com transformações estruturais e funcionais, resultando na aquisição de um fenótipo proliferativo, contrátil, migratório e fibrogênico. Trata-se de processo complexo, por meio do qual as CHE passam do estado quiescente para o ativado, transformando-se fenotipicamente em células miofibroblásticas.³⁹ As modificações celulares que acompanham a ativação das CHE incluem alterações morfológicas, com formação de proteínas do citoesqueleto, como a actina da musculatura lisa, perda das reservas de vitamina A e aumento no tamanho do retículo endoplasmático rugoso. Sob o aspecto metabólico, há maior síntese de ácido desoxirribonucléico e importante proliferação celular. O padrão de expressão genética também se modifica, com notável aumento na síntese do colágeno (tipos I, III e IV).⁴⁰

As etapas seguintes são complementares no processo de ativação das CHE e compreendem: a) produção de citocinas pró-inflamatórias; b) quimiotaxia; c) perda de retinóides; e d) degradação da matriz. As citocinas autócrinas exercem papel fundamental na regulação da ativação das CHE, sendo as principais o TGF- β , o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento hepatocitário, o fator ativador de plaquetas e a endotelina-1 (ET-1). A perda de retinóides como requisito necessário para a ativação das CHE e a prevenção dessa perda como fator que alteraria a cascata de ativação são discutíveis. As CHE acumulam-se, também, nas regiões de injúria por meio da migração direta ou quimiotaxia. Vários quimioatrativos têm sido descritos, incluindo-se PDGF, ET-1 e as proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP).⁴¹

O TGF- β é derivado de fontes autócrinas e parácrinas e tem sido considerado a mais potente citocina com ação no fígado. Ele é armazenado como uma proteína inativa associada a um peptídeo latente. Uma vez ativado, ele estimula receptores por meio de complexas vias efetoras que influenciam a produção de colágeno. CHE quiescentes são induzidas pelo TGF- β a se diferenciarem e produzirem MEC. Recentemente, foram

descritas novas funções para o TGF- β na homeostase hepática. Enquanto a apoptose e a necrose estimulam a fibrogênese pelas CHE, o TGF- β age também regulando o crescimento e sustentando a massa hepatocitária durante o processo de regeneração. Por exercer ações antagônicas, tentativas experimentais de neutralizar o efeito do TGF- β têm sido difíceis.⁴²⁻⁴⁴

A leptina e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) têm sido implicados na fase inicial da fibrogênese por meio de diversas vias sinalizadoras. A leptina é uma adipocina que estimula a produção de TGF- β pelas CK. A sua deficiência pode reduzir a fibrogênese por meio da redução da produção de noradrenalina. A atividade reduzida da noradrenalina leva a uma redução na atividade das células NK e atenua a produção de outras citocinas, reduzindo o estímulo à síntese de MEC. O CTGF é uma proteína moduladora secretada pelas CHE em situações de hiperglicemia, hiperinsulinemia e lesão hepática proveniente do etanol. Sua ação está relacionada à secreção de TGF- β . Estudos demonstram que seus níveis séricos podem estar relacionados ao estágio de fibrose em pacientes cronicamente infectados pelo vírus C, podendo servir como biomarcador de fibrose.⁴⁵⁻⁴⁸

Outras células que participam da fase de iniciação do processo de ativação das CHE são as plaquetas, os neutrófilos e os linfócitos. As plaquetas produzem mediadores importantes, como o PDGF, o TGF- β e o fator de crescimento epidérmico (EGF). Os neutrófilos, recrutados ao fígado durante o processo de injúria, são fonte importante de intermediários reativos de oxigênio, enquanto os linfócitos, incluindo linfócitos T auxiliares CD4+, representam fonte potencial de citocinas que amplificam a resposta inflamatória à agressão hepática. Em processo contínuo, a perpetuação da ativação das CHE se deve à sua capacidade intrínseca de proliferação, contratilidade e fibrogênese, o que leva ao enrijecimento do parênquima e aumento da pressão na veia porta.⁴⁹⁻⁵⁰

A degradação da MEC ocorre por meio de dois processos: a) quebra da MEC de baixa densidade do fígado normal, denominada “degradação patológica” que pode resultar no agravamento da doença hepática; e b) degradação do excesso de MEC cicatricial que pode restaurar a arquitetura do fígado fibrótico na direção do normal – “degradação restaurativa”. A falha no processo de degradação da matriz cicatricial acumulada é a principal razão da progressão de fibrose para cirrose.^{51,52}

As metaloproteinases participam de ambos os processos de degradação da MEC - restaurativo ou patológico. A metaloproteinase de matriz-1 (MMP-1) é a protease mais importante, capaz de degradar o colágeno (C)-1. A fibrose progressiva está associada a aumento significativo dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP)-1 e TIMP-2, com conseqüente redução, em cadeia, da atividade dessas proteases, e, dessa forma, maior acúmulo de matriz. As CHE são a principal fonte destes inibidores.⁵³

Independentemente da etiologia da lesão inflamatória hepática, a produção de constituintes da MEC é o centro da fibrogênese hepática. As transformações específicas na composição da MEC são semelhantes nas várias formas de lesão hepática, o que sugere que o mecanismo geral de fibrogênese não difere entre as diversas causas de hepatopatia. Esse fato reforça a importância da identificação dos componentes envolvidos na regulação da resposta fibrótica, pois os mesmos podem ser alvos específicos de terapia independentemente da etiologia da doença hepática.

1.2.2. Citocinas e quimiocinas

As citocinas e quimiocinas desempenham papel importante na fibrogênese, pois a inflamação persistente quase sempre precede a formação do tecido cicatricial. Após a lesão hepática, várias células secretam citocinas inflamatórias (CK, hepatócitos, células NK, linfócitos, células dendríticas) que participam na ativação das CHE. Após a ativação das CHE, potencializa-se a produção de citocinas e peptídeos biologicamente ativos que, além da ação autócrina, apresentam importante papel no processo de reparação tecidual.^{54,55}

Há citocinas produzidas pelas CHE que impedem a resposta fibrogênica, o que sugere que as primeiras podem, por si só, desempenhar papel na inibição da fibrose. Foi demonstrado que as CHE produzem IL-10 que é um potente imunomodulador e exerce profunda ação inibitória sobre macrófagos que são células importantes na resposta reparadora. O fator de crescimento hepatocitário (HGF) também pode inibir a fibrogênese.^{56,57}

As citocinas podem ser divididas, portanto, em grupos relacionados predominantemente a ações imunomoduladoras, quimiotáticas, estimulantes do crescimento e fibrogênicas. Em destaque, estão as citocinas imunomoduladoras, que incluem o TNF- α , as ILs e os interferons (IFNs). Elas são produzidas por linfócitos, células NK e macrófagos. São classificadas em pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-12 e TNF- α), e antiinflamatórias e pró-fibrogênicas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13). O IFN- γ tem recebido atenção particular no estudo da fibrogênese devido à sua potente atividade antifibrogênica, aparentemente decorrente de ação direta nas CHE.^{58,59}

As quimiocinas são moléculas de baixo peso molecular (8 a 13KDa) inicialmente identificadas pela sua habilidade em promover a migração de células inflamatórias.⁶⁰

Mais de 50 quimiocinas já foram identificadas e agrupadas em quatro subfamílias de acordo a posição dos pares de resíduos de cisteína em sua estrutura. As duas subfamílias mais importantes são a CC, a maior delas, na qual os primeiros dois resíduos de cisteína (C) são adjacentes; e a CXC, que possuiu esses resíduos de cisteína separados por um aminoácido (X). As quimiocinas são denominadas de acordo com a subfamília, seguidas da letra L (ligante) e de um numero correspondente ao gene que a codifica (ex: CCL5 ou CXCL10). A nomenclatura dos receptores de quimiocinas segue a mesma regra, com a substituição da letra L pela letra R (receptor).^{61,62}

Funções que vão além da migração de células do sistema imunológico têm sido atribuídas às quimiocinas. Receptores específicos foram identificados em células não-imunológicas, e, com isso, suas funções têm se expandido inclusive para órgãos implicados na homeostase e em aspectos não-inflamatórios de lesões. Ressalta-se que, embora os receptores sejam específicos para quimiocinas de determinadas subfamílias, cada receptor geralmente se liga a mais de uma quimiocina. Já foram descritas participação na diferenciação, apoptose e proliferação celular, assim como na fibrogênese, angiogênese e em processos relacionados a metástases tumorais.⁶³⁻⁶⁵

As células inflamatórias infiltrantes produzem quimiocinas, mas a fonte primária no fígado são os hepatócitos, CK, CHE e células do epitélio biliar. Essas células secretam um conjunto de quimiocinas que exercem influência fundamental na direção do infiltrado

inflamatório, sua perpetuação e desenvolvimento de inflamação crônica, lesão hepática, regeneração e progressão para fibrose ou sua resolução.⁶⁶

Os níveis de quimiocinas periféricas geralmente refletem um excedente da produção nos locais de inflamação e são interpretados como marcadores indiretos de atividade inflamatória local. O papel *in vivo* das quimiocinas na circulação periférica ainda não está totalmente estabelecido. Embora possam representar apenas subprodutos não-funcionais, alguns autores têm especulado que essas quimiocinas séricas ou plasmáticas poderiam antagonizar a migração leucocitária, regulando negativamente os receptores na membrana dos leucócitos ou interferindo no gradiente de sinalização responsável pela quimiotaxia dos leucócitos periféricos. Apesar do papel incerto das quimiocinas circulantes e embora elas possam refletir também produção extra-hepática, a utilização dos níveis periféricos desse subgrupo de citocinas como marcadores de dano hepatocelular em pacientes com doenças hepáticas vem sendo estudado.⁶⁷

CCL2 (MCP-1) é uma importante quimiocina envolvida no processo de inflamação hepática, sendo produzida principalmente por estímulos provenientes do *stress* oxidativo. Possui função primária de recrutar monócitos e macrófagos por meio de seu receptor CCR2. Células NK e linfócitos também expressam CCR2 e migram em resposta à CCL2. Os níveis intrahepáticos de CCL2 estão precocemente elevados em alguns modelos animais de hepatite aguda grave, como na toxicidade induzida por paracetamol, por exemplo.⁶⁸⁻⁷¹

Um eixo composto pelas quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (CXCL9-11) é regulado pelo receptor CXCR3 e pela secreção de IFN- γ e IFN- β . No fígado, CXCR3 é expressa pelas CHE e células do endotélio sinusoidal. Exerce estímulo anti-fibrótico em situações de lesão hepática crônica. CXCL9 reduz a expressão de mRNA do colágeno levando a um fenótipo menos ativado, enquanto CXCL10 promove migração de CHE. Tais efeitos opostos podem refletir papéis diferentes para as CHE durante o processo de injúria ou podem representar a separação da população destas células em duas subcategorias com diferentes funções. CXCL9-11 são angiostáticas e estudos experimentais com administração de CXCL9 *in vivo* resultaram em inibição da neoangiogênese e prevenção do desenvolvimento de fibrose.⁷²⁻⁷⁵

Alguns estudos em pacientes com hepatopatia crônica mostram que os níveis hepáticos de CXCR3 e seus ligantes estão elevados e correlacionam-se com a gravidade da doença. Em modelos animais, a presença de CXCR3 pode ser protetora por meio de diversos mecanismos.⁷⁶

Nos pacientes submetidos a transplante hepático, uma das grandes preocupações é a ocorrência de lesão por isquemia e reperfusão favorecendo o surgimento de rejeição aguda. Estudos demonstram que nesta situação, níveis de CXCL9-11 e outras células ligantes ao CXCR3 estão elevados. O bloqueio desta interação reduz a lesão hepatocelular em modelos experimentais de camundongos.⁷⁷⁻⁸¹

Outro eixo importante na inflamação aguda é aquele representado pelas quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL8. Ele apresenta estreita relação com quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos e suas ligações aos receptores CXCR1 e CXCR2.⁸²⁻⁸⁴

Diversas moléculas sinalizadoras exercem suas ações por intermédio dos receptores CXCR1/CXCR2, como, por exemplo, a IL-8 e MIP-2. Em pacientes com hepatite alcoólica e lesão hepática pelo acetaminofeno, os níveis de CXCL8 estão elevados, predizendo intensa agressão hepatocelular. Em pacientes pós-transplante hepático que apresentam níveis elevados de CXCL8, verifica-se elevação concomitante de aminotransferases.⁸⁵

Em situações de lesão hepática, várias células expressam moléculas ligantes aos receptores CXCR1 e CXCR2, incluindo hepatócitos, CK, CHE, células endoteliais e biliares.⁸⁶

CXCL12 liga-se ao receptor CXCR4 e interfere na homeostase e em várias respostas patológicas⁸⁷. Uma característica particular da CXCL12 é sua expressão e níveis elevados mesmo em tecido hepático normal. Estes níveis tornam-se ainda mais acentuados em processos de injúria. Na lesão hepática, o epitélio biliar expressa CXCL12 e em pacientes com doença hepática crônica seus níveis elevam-se paralelamente ao estágio de fibrose.⁸⁸

Ao contrário de várias outras citocinas, CXCL12 não é expressa por hepatócitos e CK, mas sim em células do epitélio biliar, principalmente durante processo de reação ductular.

CHE e do endotélio sinusoidal são outras fontes de CXCL12⁸⁹. A CXCL12, produzida localmente, recruta células imunológicas para o sítio de lesão, promovendo angiogênese.⁹⁰

CXCL12 exerce também papel na adesão, migração e extravasamento de linfócitos para o parênquima hepático. O tratamento de linfócitos com CXCL12 aumenta a capacidade de adesão das moléculas ICAM-1, processo necessário para migração transendotelial, sugerindo ser este um papel da CXCL12 derivada das células endoteliais.⁹¹⁻⁹³

Outras quimiocinas induzidas durante processos de inflamação, como por exemplo, na hepatite aguda grave são a CCL5 e a CX3CL1. A CCL5 liga-se aos receptores CCR1 e CCR5 e tem papel fundamental na fase de migração das CHE.⁹⁴

CX3CR1 é responsável pelo recrutamento de macrófagos ao fígado e está elevada em pacientes com quadros de hepatite aguda ou crônica, principalmente relacionados à agressão e regeneração do epitélio biliar. A inibição da expressão desta quimiocina na superfície de macrófagos leva a uma perda do controle da apoptose, resultando em potencialização do processo de injúria e expressão de um fenótipo pró-inflamatório.⁹⁵⁻⁹⁶

1.2.3. A biópsia hepática como método de avaliação de inflamação e fibrose

Atualmente, o padrão ouro para avaliação da inflamação e fibrose hepáticas é a biópsia. Diversos modelos de classificação histológica buscam estadiar numericamente a intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório e a quantidade e conformação do tecido conjuntivo corado na amostra. Os dois mais utilizados são os modelos de Knodell, modificado por Ishak,⁹⁷ e o Metavir.⁹⁸

A despeito de a biópsia hepática constituir o método mais confiável para a avaliação da fibrose e da inflamação hepática, não se trata de exame isento de riscos e desconforto para os pacientes, o que constitui uma de suas importantes limitações. As complicações dependem da técnica utilizada, da gravidade da doença subjacente e da experiência do profissional, e podem variar, desde mínimas, a muito graves. As complicações leves são as mais comuns e compreendem desconforto transitório, dor com necessidade de

analgésia e hipotensão arterial. Aproximadamente 25% dos pacientes relatam dor no hipocôndrio ou no ombro direito após a biópsia.

Segundo Bravo e col.,⁹⁹ cerca de 1% a 3% dos pacientes submetidos a biópsia hepática ambulatorial necessitam internação devido a complicações, principalmente dor e hipotensão arterial. Cadranel e col.¹⁰⁰ avaliaram prospectivamente 2087 pacientes submetidos a biópsia hepática e registraram complicações graves em 0,57% dos casos. Nesta investigação, dor de intensidade moderada ocorreu em 20% dos pacientes e dor acentuada, com necessidade de analgésia potente e internação hospitalar, ocorreu em 3% dos pacientes, mas não houve relato de morte associada ao procedimento.

Sangramento com repercussão clínica é complicação potencialmente grave que pode estar associada à realização da biópsia hepática. McGill e col.¹⁰¹ descreveram a ocorrência e gravidade de complicações hemorrágicas em 9212 pacientes submetidos ao procedimento. Foram observados 10 casos de hemorragia fatal (0,11%) e 22 de hemorragia não-fatal (0,24%). Os fatores de risco relacionados às complicações hemorrágicas foram presença de cirrose ou carcinoma hepatocelular, idade mais avançada, sexo masculino e maior número de punções para a realização do procedimento. Hemorragia intraperitônea ocorre em geral nas primeiras duas a três horas após o procedimento e pode resultar de laceração do fígado causada pela inspiração profunda durante a biópsia, perfuração de ramo da artéria hepática ou de tributária da veia porta. Picino e col.,¹⁰² ao analisarem retrospectivamente as complicações em 68.276 biópsias hepáticas realizadas em período de dez anos, observaram taxa de mortalidade de nove para cada 100.000 procedimentos. A ocorrência de hemoperitônio em portadores de doença maligna ou cirrose foi a causa do óbito em todos os casos. Alguns estudos citam taxas de mortalidade variando de 0,01% a 0,12%.^{103,104}

A tríade hemorragia digestiva, dor de origem biliar e icterícia sugere hemobilia, que, geralmente, ocorre cerca de cinco dias após a biópsia. Outras complicações raras incluem ascite, pleurite e peritonite biliares, pneumo e hemotórax, enfisema subcutâneo, pneumoperitônio, abscesso subfrênico, pancreatite, anafilaxia após biópsia de cisto equinocócico e quebra da agulha de biópsia.¹⁰⁵

As principais complicações da biópsia hepática e suas frequências, segundo Harinath e col.,¹⁰³ estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Complicações da biópsia hepática*

Complicação	Frequência
Dor em região da punção	33%
Resposta vasovagal com hipotensão arterial	12-15%
Hemorragia intraperitoneal	0,16%-0,32%
Hemobilia	0,059%
Peritonite biliar	0,06%-0,09%
Perfuração da vesícula biliar	0,12%
Perfuração de alça intestinal	0,04%
Formação de abscesso e sepse	0,09%
Hematoma intra-hepático e subcapsular	0,06%
Punção do pulmão levando a hemotórax ou enfisema subcutâneo	0,014%-0,35%
Quebra da agulha de biópsia	0,059%
Óbito	0,01%-0,12%

* Adaptado de Harinath e col.¹⁰³

A biópsia hepática também implica em aumento dos custos e, por ser procedimento invasivo, não pode ser repetido com frequência. O resultado expressa uma avaliação estática do processo fibrogênico e fibrolítico, que constituem processos contínuos de produção e degradação da MEC. Assim, a biópsia hepática não é suficiente para se avaliar a dinâmica do processo de fibrose. Ainda, devem ser consideradas a variabilidade inter-observadores de até 20%, na classificação do estágio de fibrose e os erros de interpretação que podem ocorrer na vigência de tamanho inadequado ou fragmentação da amostra a ser examinada.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷

1.2.4. Marcadores séricos de inflamação e fibrose hepáticas

O meio mais eficaz de reverter a fibrose e impedir sua evolução para cirrose é identificar a origem da lesão inflamatória e tratar a causa primária de doença hepática. Assim, o tratamento efetivo da condição primária torna-se essencialmente antifibrótico, por dois mecanismos: 1) prevenção do acúmulo de cicatriz fibrótica e 2) redução da fibrose instalada pela interrupção do estímulo fibrogênico.

As evidências crescentes a respeito da reversão da fibrose hepática e o maior conhecimento acerca dos mecanismos de inflamação e fibrogênese têm favorecido a possibilidade do tratamento desta condição.¹⁰⁸ Portanto, o advento do tratamento antifibrótico específico representa expectativa e esperança para os portadores de doença

hepática crônica cujo agente causal não é passível de remoção. Por essa razão, a avaliação da eficácia terapêutica por meio da monitorização da inflamação e do processo fibrolítico é necessária e dependerá de novos métodos mais acurados de avaliação da inflamação e fibrose hepáticas. Levando-se em consideração os riscos e as limitações da biópsia hepática, torna-se imperioso o desenvolvimento e a validação de métodos não-invasivos de diagnóstico da inflamação e fibrose hepáticas que possam ser repetidos com segurança durante o acompanhamento dos pacientes.

Atualmente, novos métodos de avaliação da inflamação e fibrose hepáticas vêm sendo investigados. Testes séricos não-invasivos, isolados ou combinados em fórmulas matemáticas, têm sido comparados à gradação da atividade inflamatória e aos estádios de fibrose observados em biópsia hepática. Os testes não-invasivos são classificados em dois grupos: 1) testes simples, ou indiretos, e 2) testes complexos, ou diretos. Os testes simples são os de menor custo, de técnica fácil ou automatizada e constituem, em geral, exames realizados no seguimento dos pacientes com hepatopatia crônica. São chamados testes indiretos por não avaliarem diretamente os produtos da MEC. Os testes complexos são mais caros, tecnicamente mais difíceis de serem realizados e não são utilizados de rotina. São testes que investigam diretamente os produtos ou derivados da MEC.¹⁰⁹

Como exemplos de testes simples isolados destacam-se, dentre outros, a contagem de plaquetas, a dosagem sérica de aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (GGT), bilirrubina total (BT) e tempo de protrombina – Relação Normalizada Internacional (RNI). Como exemplo de fórmulas matemáticas a partir de testes simples inclui-se o índice da razão entre AST e plaquetas (APRI), proposto por Wai e col.¹¹⁰ para diagnóstico de fibrose avançada e cirrose em pacientes com hepatite C crônica. O APRI associou-se a áreas sob a curva ROC de 0,82 e 0,89 para predição de fibrose significativa e cirrose, respectivamente, no período de caracterização, e de 0,88 e 0,94, no período de validação.

Dentre os testes complexos incluem-se: dosagem de citocinas, quimiocinas, ácido hialurônico (AH), alfa-2 macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A1, colágenos tipo I, III e IV e peptídeo amino-terminal do pró-colágeno III (PIIIP), dentre outros. Eles foram testados isoladamente ou em combinações, na forma de painéis de exames, alguns já padronizados e organizados em *kits* comerciais.

1.2.5. Citocinas e quimiocinas como marcadores de atividade inflamatória e fibrose hepática em pacientes com hepatopatia crônica

Vecchiet e col.¹¹¹ estudaram os níveis de IL-18 em 34 pacientes com hepatite C crônica e em 13 com doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) comparando-os àqueles de indivíduos controle hígidos. Observaram níveis mais elevados de IL-18 em pacientes com hepatite C quando comparados àqueles de indivíduos com DHGNA ($p < 0,01$) e controles ($p < 0,005$), sugerindo ser a IL-18 um marcador de inflamação.

Spahr e col.¹¹² avaliaram os níveis séricos de IL-18, da proteína ligante da IL-19 (IL-18BP), $IFN\gamma$ e $TNF-\alpha$ em 84 pacientes com hepatite alcoólica e 10 indivíduos controle hígidos. Os níveis de IL-18 e $TNF-\alpha$ foram mais elevados em pacientes com hepatite alcoólica grave (índice de Maddrey > 32) quando comparados aos controles. Os níveis de IL-18BP foram mais elevados entre os pacientes com hepatite alcoólica (leve e grave) quando comparados aos controles. Houve relação entre o escore de Child-Pugh e os níveis de IL-18, IL-18BP e $TNF-\alpha$. Pacientes que faleceram durante a internação apresentaram níveis mais elevados de IL-18BP e $TNF-\alpha$, à admissão, fato que sugere a possibilidade de tais citocinas se constituírem em marcadores prognósticos.

Jia e col.¹¹³ estudaram o papel da IL-18, IL-10 e $TNF-\alpha$ em pacientes com hepatite C crônica. Observaram níveis séricos mais elevados dessas citocinas nos pacientes com doença crônica quando comparados a indivíduos controles hígidos ($p < 0,05$). Nos pacientes tratados com IFN, houve redução proporcional dos níveis de IL-10 nos não-respondedores, respondedores parciais e respondedores completos, podendo ter utilidade como preditores de resposta à terapia.

Schvoerer e col.¹¹⁴ avaliaram os níveis séricos de IL-18 em 56 pacientes com hepatite C crônica e observaram relação positiva entre estes e os achados de inflamação à biópsia hepática.

Tsuitsui e col.¹¹⁵ descreveram o potencial da IL-18 em ativar a resposta inflamatória por meio da indução de IFN-gama em associação à IL-12. Pacientes com hepatite fulminante,

hepatites virais crônicas e cirrose biliar primária apresentam níveis séricos elevados de IL-18, que se correlacionam positivamente com gravidade da doença.

Cecere e col.¹¹⁶ estudaram a resposta imune de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C. Observaram que a proteína do núcleo viral exerce efeito supressor sobre a produção da IL-12. Como a ação da IL-12 é importante na indução da imunidade Th-1 que participa do clareamento viral intracelular, há *déficit* principalmente da produção de IL-2 e IFN-gama. Esse efeito pode contribuir para maior dificuldade de erradicação do vírus. Os autores sugerem o estudo de novas abordagens terapêuticas como intervenções imunológicas (vacinas de DNA, estimulantes da resposta Th1) e intervenções genéticas (oligonucleotídeos).

Louis e col.¹¹⁷ estudaram o papel da IL-10, citocina de ação antiinflamatória em alguns modelos experimentais de doenças hepáticas. Sua neutralização levou a maior dano hepático, enquanto que sua infusão foi capaz de limitar a necrose celular. Resultados semelhantes foram verificados por Thompson e col.

Avramescu e col.¹¹⁸ estudaram a relação entre níveis séricos de algumas citocinas e aspectos da histologia hepática em 35 pacientes com hepatite C crônica. Níveis elevados de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 foram observados em pacientes com hepatite crônica ativa e cirrose, havendo correlação positiva destes com os graus de atividade inflamatória.

Streetz e col. verificaram níveis séricos e intra-hepáticos elevados de IL-6 em pacientes com hepatopatia crônica. Estes apresentaram relação com a progressão da doença.¹¹⁹⁻¹²⁰

A IL-6 pode desempenhar papel protetor durante a fibrogênese hepática. Kovalovich e col. demonstraram que camundongos que não expressam IL-6 apresentam maior lesão hepática e apoptose após injeção única de CCL4, o que resultou em maior desenvolvimento de fibrose após doses subsequentes.¹²¹ Nasir e col demonstraram que o tratamento sistêmico com injeções de IL-6 seguido de transplante intrahepático de células tronco reduziu a apoptose e fibrogênese relacionada à toxicidade por CCL4.¹²²

Sugimoto e col. demonstraram associação da IL-13 com a progressão da fibrose hepática por meio da indução de produção de colágeno e TGF β por CHEs.¹²³ Shimamura e col

verificaram efeitos antifibróticos após injeção de citotoxina neutralizante de IL-13 em modelo experimental de esteatohepatite.¹²⁴

Meng e col. demonstraram que a IL-17 induz produção de colágeno em CHE.¹²⁵ Zheng e col. mostraram evidências de que o bloqueio da IL-17 reduz a fibrose hepática, enquanto que o tratamento com IL-17 recombinante estimulou a fibrogênese.¹²⁶

Dunn e col.¹²⁷ investigaram o papel da resposta imune inata na mediação do dano hepático em pacientes com hepatite crônica pelo vírus B. Observou-se relação entre os picos de inflamação (*flares*) e elevação dos níveis de IL-8, IFN- α , e na expressão de TNF- α por células NK. Esses achados foram confirmados também quando comparados pacientes com hepatite B crônica e indivíduos portadores inativos do vírus da hepatite B. Os autores sugeriram que as células NK contribuem para a inflamação hepática por meio da ativação de citocinas produzidas durante a infecção pelo vírus B.

Falleti e col.¹²⁸ estudaram a associação entre expressão de IFN- γ , seu receptor 1, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- α e a progressão da fibrose na recorrência da hepatite C em 50 pacientes pós-transplante hepático. Pacientes com maior produção de IL-10 apresentaram progressão mais rápida da fibrose. Pacientes com menor produção de IL-10 e maior produção de IFN- γ apresentaram menor progressão da fibrose quando comparados aos que apresentaram maior produção de IL-10 e menor produção de IFN- γ .

Neumam e col.¹²⁹ avaliaram os níveis séricos de citocinas e quimiocinas em 778 pacientes com hepatite C crônica, sem tratamento, com vários graus de atividade inflamatória e estádios de fibrose. Houve correlação positiva entre o grau de inflamação e os níveis de IL-2 e TNF- α . Os níveis de IL-8 elevaram-se significativamente de acordo com a elevação do escore de Ishak para inflamação. Os níveis de TGF- β elevaram-se proporcionalmente ao estágio de fibrose, mas notou-se redução em pacientes com cirrose.¹¹⁶

Suzuki e col.¹³⁰ estudaram modelos experimentais de doença hepática e observaram elevação dos níveis de IL-15 durante inflamação. Houve resposta do tipo reparadora quando IL-15 foi administrada a camundongos adultos, sugerindo papel na atividade regenerativa em situações de lesão hepática.

Falasca e col.¹³¹ avaliaram o perfil de citocinas em pacientes com hepatite crônica pelos vírus B e C. Níveis séricos de IL-6 e IL-18 foram mais elevados quando comparados aos de pacientes do grupo controle hígidos. Pacientes com hepatite B apresentaram níveis mais elevados de TNF- α e IL-2. Houve relação entre os níveis de IL-6 e duração da infecção e carga viral; e, entre os níveis de IL-18 e aqueles da AST.

Huang e col.¹³² estudaram o tratamento com infusão de IL-10 em modelos animais experimentais de lesão hepática induzida por CCL4. Observaram que a IL-10 pode reverter a fibrose hepática neste modelo por meio do bloqueio da reação inflamatória (redução dos níveis de TNF- α), inibição da expressão de MMP-2 e TIMP-1 e redução do depósito de C-I e C-III.

Itoh e col.¹³³ avaliaram os níveis do receptor solúvel do TNF- α (RsTNF- α) na hepatite C crônica e investigaram a sua associação com parâmetros bioquímicos hepáticos e virais. Foram estudados 84 pacientes e suas respostas ao tratamento antiviral. Os níveis séricos do RsTNF- α elevaram-se na proporção da gravidade da doença hepática e demonstraram correlação com os níveis das aminotransferases, GGT e gama-globulina, mas não com os níveis de proteínas virais. No grupo de pacientes que respondeu ao tratamento, houve redução significativa do RsTNF- α p75, mas não do p55. No grupo não-responder, os níveis de RsTNF- α foram semelhantes antes e após o tratamento, sugerindo que o RsTNF- α , principalmente o p75 pode estar envolvido no processo de inflamação e fibrose hepáticas na hepatite C crônica.

Zylberberg e col.¹³⁴ investigaram os níveis de TNF- α e do RsTNF- α em 60 pacientes com hepatite C crônica antes e após terapia, comparando-os com aqueles de indivíduos saudáveis. Observaram níveis mais elevados de TNF- α e do RsTNF- α nos pacientes infectados. Houve correlação positiva entre os níveis do RsTNF- α p75 e os achados histológicos de inflamação; e, os níveis de RsTNF- α p75 e p55 foram mais elevados em pacientes cirróticos quando comparados aos não-cirróticos. Não houve relação entre os RsTNF- α e o genótipo, carga viral ou resposta ao tratamento.

Abiru e col.¹³⁵ avaliaram um painel de citocinas em 44 pacientes com doença hepática gordurosa não-alcoólica. Eles observaram que pacientes com esteatohepatite apresentaram níveis séricos mais elevados de TNF- α e IL-6 quando comparados a pacientes com esteatose. Houve correlação positiva entre os níveis tanto do RsTNF- α como do receptor solúvel de IL-6 e graus de inflamação e níveis de aminotransferases em pacientes com esteato-hepatite.

Tokushige e col.¹³⁶ compararam os níveis do RsTNF- α com achados histológicos em 82 pacientes com esteatohepatite não-alcoólica. Observaram-se níveis mais elevados de RsTNF- α em pacientes com maior atividade inflamatória e fibrose, mas não houve correlação com a quantidade de esteatose hepática.

As quimiocinas também têm sido relacionadas às alterações histológicas em pacientes com doenças hepáticas de diferentes etiologias.¹³⁷⁻¹³⁹ Os níveis séricos de CXCL9, CXCL10 e CXCL11 estão mais elevados em pacientes com doenças hepáticas e estão associados ao estágio de fibrose.¹⁴⁰⁻¹⁴² A expressão da CXCL10 foi relacionada ao grau de apoptose em pacientes com hepatite C, por meio da ativação do receptor TLR-4.¹⁴³ Essas quimiocinas ligantes do receptor CXCR3 também foram estudadas em trabalhos de Zeremski e col.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Níveis séricos e intrahepáticos elevados de CXCL10 foram associados a estágios mais avançados de fibrose e níveis séricos elevados de CXCL9 foram associados a graus mais intensos de inflamação, em pacientes com hepatite C.

Os níveis séricos de CXCL10 foram identificados como biomarcadores para recorrência de fibrose significativa em pacientes pós-transplante hepático por hepatite C e à resposta ao tratamento com antiviral em pacientes com hepatite B.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

Em modelos experimentais de camundongos, o receptor CXCR3 se mostrou protetor por meio da ação de células T polarizadas (Th1) e células T regulatórias (Treg) subtipo Foxp3C/CD25. No trabalho de Erhardt e col., o bloqueio deste receptor resultou em exacerbação da lesão hepática.¹⁵⁰

As quimiocinas ligantes ao receptor CCR3 (CCL3, CCL4 e CCL5) foram expressas em níveis mais elevados em fígados com estágio mais avançado de fibrose em modelos experimentais.¹⁵¹

Os níveis sérico e hepático da CCL2 foram relacionados ao grau de inflamação em pacientes com hepatopatia alcoólica.¹⁵² Por outro lado, a neutralização do eixo CCL2/CCR2 em um modelo de lesão hepática mediado por célula T resultante da toxicidade por concanavalina A levou a piora do quadro, indicando que, neste modelo, a CCL2 pode apresentar efeitos anti-inflamatórios.¹⁵³ A ação da CCL2 se baseia principalmente no recrutamento de monócitos e linfócitos. A inibição de linhagens específicas de monócitos (Ly-6C⁺) recrutados pela CCL2 pode acelerar o processo de regressão da fibrose em alguns modelos experimentais.¹⁵⁴ Trabalhos recentes têm mostrado diferentes ações em determinados subtipos destas células.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷

As citocinas e quimiocinas estão intimamente relacionadas à regulação da resposta imune, levando ao desenvolvimento das doenças hepáticas crônicas. O efeito exato de determinada citocina depende de diferentes fatores, incluindo o tipo de célula produtora, a natureza da célula na qual sua ação será exercida e a etiologia da doença. Estes efeitos podem ser protetores, patogênicos ou ambos, dependendo do modelo de doença estudada.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

1.2.6. Referências bibliográficas

1. HERNANDEZ-GEA V, FRIEDMAN SL. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annu Rev Pathol Mech Dis** 2011;6:425–56.
2. EL-SERAG HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. **Hepatology** 2002;36:S74–83.
3. KIM WR, BROWN RS JR, TERRAULT NA, et al. Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. **Hepatology** 2002;36:227–42.
4. DAVIS GL, ALBRIGHT JE, COOK SF, et al. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. **Liver Transpl** 2003;9:331–8.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da saúde. www.portalsaude.com.br
6. BENYON I. Is liver fibrosis reversible? **Gut** 2000;46:443–446.
7. SCHAFFER CJ, NANNEY LB. Cell biology of wound healing. **Int Rev Cytol** 1996;169:151–81.
8. JAESCHKE H, LEMASTERS JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. **Gastroenterology** 2003;125:1246-57.
9. JAESCHKE H, GUJRAL JS, BAJT ML. Apoptosis and necrosis in liver disease. **Liver Int** 2004;24:85-89.
10. LEMASTERS JJ, QUIAN T, HE L et al. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis and autophagy. **Antioxid Redox Signal** 2002;4:769-81.
11. ISHII H, ADACHI M, FERNANDEZ JC, et al. Role of apoptosis in alcoholic liver injury. **Alcohol Clin Exp Res** 2003;27:1207-12.
12. KON K, KOM JS, JAESCHKE H et al. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. **Hepatology** 2004;41:170-79.
13. BAJT ML, LAWSON JA, VONDERFECHT SL, et al. Protection against Fas receptor-mediated apoptosis in hepatocytes and nonparenchymal cells by a caspase-8 inhibitor in vivo: evidence for a post-mitochondrial processing of caspase-8. **Toxicol Sci** 2000;58:109-17.
14. FAOUZI S, BURCKHARDTBE, HANSON JC, et al. Anti Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-Kappa B independent caspase 3 dependent pathway. **J Biol Chem** 2001; 276:49077-82.

15. GUJRAL JS, HINSON JA, FARHOOD A, et al. NADPH oxidase-derived oxidant stress is critical for neutrophil cytotoxicity during endotoxemia. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2004;287:243-52.
16. LIASKOU E, WILSON DV, OO YH. Innate Immune Cells in Liver Inflammation. **Med Inflamm** 2012;1-21.
17. BILIAR TR, CURRAN RD, WILLIAMS DL, et al. Liver nonparenchymal cells are stimulated to provide interleukin 6 for induction of the hepatic acute-phase response in endotoxemia but not in remote localized inflammation. **Arch Surg** 1992;127:31–37.
18. ADAMS DH, SHAW S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. **The Lancet** 1994;343:831–36.
19. LEY K, LAUDANNA C, CYBULSKY MI et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol** 2007;7:678–89.
20. MCDONALD B, MCAVOY EF, LAM F et al. Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. **J of Experim Med** 2008;205:915–927.
21. JAESCHKE H, SMITH CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. **J Leukoc Biol** 1997;61:647–653.
22. COUSENS LP, WING EJ. Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. **Immunol Rev** 2000;174:150–59.
23. BILZER M, ROGGEL F, GERBES AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. **Liv Intern** 2006;26:1175–86.
24. MORITA A, ITOH Y, TOYAMA T, et al. Activated Kupffer cells play an important role in intra-hepatic Th1-associated necroinflammation in Concanavalin A-induced hepatic injury in mice. **Hepatol Res** 2003;27:143–50.
25. B. MOSHER, R. DEAN, J. HARKEMA, D. REMICK, et al. Inhibition of Kupffer cells reduced CXC chemokine production and liver injury. **J of Surg Res.** 2001;99:201–10.
26. FARREIL DJ, HINES JE, WALLS AF, et al. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. **Hepatology.** 1995;22:1175–81.
27. FRANCIS H, MEININGER CJ. A review of mast cells and liver disease: what have we learned? **Dig Liv Dis** 2010;42:529–36.

28. BARDADIN KA, SCHEUER PJ. Mast cells in acute hepatitis. **J Pathol** 1986;149:315–25.
29. NAKAMURA A, YAMAZAKI K., SUZUKI K, et al. Increased portal tract infiltration of mast cells and eosinophils in primary biliary cirrhosis. **Am J Gastroenterol** 1997;2:2245–49.
30. ISHII M, IWAI M., HARADA Y, et al. A role of mast cells for hepatic fibrosis in primary sclerosing cholangitis. **Hepatol Res** 2005;31:127–31.
31. TERADA T, MATSUNAGA Y. Increased mast cells in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. **J Hepatol** 2000;33:961–66.
32. TERASAKI S, NAKANUMA Y, YAMAZAKI M et al. Eosinophilic infiltration of the liver in primary biliary cirrhosis: a morphological study. **Hepatology** 1993;17: 206–12.
33. MARTINEZ OM, VILLANUEVA JC, GERSHWIN ME, et al. Cytokine patterns and cytotoxic mediators in primary biliary cirrhosis. **Hepatology**,. 1995;21:113–19.
34. HARTLEB M, KAJOR M, KACZOR R, et al. Hepatic eosinophilic infiltration in primary sclerosing cholangitis. **J Gastroenterol** 1998;33:134–35.
35. SCHEURLEN M, MORK H, WEBER P. Hypereosinophilic syndrome resembling chronic inflammatory bowel disease with primary sclerosing cholangitis. **J Clin Gastroenterol** 1992;14:59–63.
36. NAVARRO VJ, SENIOR JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2006;354:731–39.
37. BJÖRNSSON E, KALAITZAKIS E, OLSSON R. The impact of eosinophilia and hepatic necrosis on prognosis in patients with drug-induced liver injury. **Aliment Pharm Ther** 2007;12:1411–21.
38. FRIEDMAN SL. The Cellular Basis of Hepatic Fibrosis - Mechanisms and Treatment Strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-35.
39. FRIEDMAN SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **J Biol Chem** 2000;275:2247–50.
40. TSUKADA S, PARSONS CJ, RIPPE RA. Mechanisms of liver fibrosis. **Clin Chim Acta**. 2006;364:33–60.
41. FRIEDMAN SL. Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications **Nat Clin Pract**. 2004;1:98-105.

42. INAGAKI Y, OKAZAKI I. Emerging insights into transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. **Gut**. 2007;56:284–92.
43. BREITKOPF K, GODOY P, CIUCLAN L et al. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. **Z Gastroenterol**. 2006;44:57–66.
44. YANG L, PANG Y, MOSES HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends Immunol**. 2007;31:220–7.
45. LI Z, OBEN JA, YANG S et al. Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**. 2004;40:434–41.
46. HORA C, NEGRO F, LEANDRO G et al. Connective tissue growth factor, steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Liv Intern** 2008;28:370–6.
47. GRESSNER OA, LAHME B, DEMIRCI I et al. Differential effects of TGF-beta on connective tissue growth factor [CTGF/CCN2] expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. **J Hepatol** 2007;47:699–710.
48. KOVALENKO E, TACKE F, GRESSNER OA et al. Validation of connective tissue growth factor [CTGF/CCN2] and its gene polymorphisms as noninvasive biomarkers for the assessment of liver fibrosis. **J Viral Hepat**. 2009;16:612-20.
49. FRIEDMAN S, ARTHUR M. Reversing hepatic fibrosis. **Scien Med** 2002;8(3):194-205.
50. ALBANIS E, FRIEDMAN SL. Antifibrotic Agents for Liver Disease. **Am J Transpl** 2006;6:12–19.
51. BATALLER R, BRENNER DA. Liver fibrosis. **J Clin Invest** 2005;115:209-18.
52. PINZANI M, ROMBOUITS K, COLAGRANDE S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. **J Hepatol** 2005;42:S22–S36.
53. RAMADORI G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. **Can J Gastroenterol** 2001;15:187-93.
54. MARRA F, CHOUDHURY GG, PINZANI M, et al. Regulation of platelet-derived growth factor secretion and gene expression in human liver fat-storing cells. **Gastroenterology** 1994;107:1110–7.
55. IKEDA K, WAKAHARA T, WANG YQ, et al. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. **Hepatology** 1999;29:1760–7.

56. THOMPSON KC, TROWERN A, FOWELL A, et al. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation In vitro. **Hepatology** 1998;28:1518–24.
57. WANG SC, OHATA M, SCHRUM L, et al. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. **J Biol Chem** 1998;273:302–8.
58. BARONI GS, D’AMBROSIO L, CURTO P, et al. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. **Hepatology** 1996;23:1189–99.
59. ROCKEY DC, CHUNG JJ. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. **J Investig Med** 1994;42:660–70.
60. WASMUTH HE, TACKE FT, TRAUTWEIN C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. **Semin Liver Dis.** 2010;30:215-225.
61. BROMLEY SK, MEMPEL TR, LUSTER AD. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. **Nat Immunol** 2008; 9: 970–80.
62. FERNANDEZ EJ, LOLIS E. Structure, function, and inhibition of chemokines. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 2002;42:469–99.
63. ZLOTNIK A, BURKHARDT AM, HOMEY B. Homeostatic chemokine receptors and organ specific metastasis. **Nat Rev Immunol** 2011;11:597–606.
64. MUKAIDA N, BABAT. Chemokines in tumor development and progression. **Exp Cell Res** 2012;318:95–102.
65. HONG F, TUYAMA A, LEE TF, et al. Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stromal cell-derived factor 1 alpha-mediated stellate cell activation. **Hepatology** 2009;49:2055–2067.
66. OO YH, SHETTY S, ADAMS DH. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. **Dig Dis** 2010;28:31–44.
67. LARRUBIA JR.. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. **J Hepatol**, 2007;47:632-641.
68. POSSAMAI LA, ANTONIADES CG, ANSTEE QM, et al. Role of monocytes and macrophages in experimental and human acute liver failure. **World J Gastroenterol** 2010;16:1811–19.
69. LEIFELD L, DUMOULIN FL, PURR I, et al. Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure. **J Pathol** 2003;199:335–344.

70. HOGABOAM CM, BONE-LARSON CL, STEINHAUSER ML, et al. Exaggerated hepatic injury due to acetaminophen challenge in mice lacking C-C chemokine receptor 2. **Am J Pathol.** 2000;156:1245–52.
71. DAMBACH DM, WATSON LM, GRAY KR, et al. Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. **Hepatology** 2002;35:1093–1103.
72. SHIELDS PL, MORLAND CM, SALMON M, et al. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C infected liver. **J Immunol** 1999;163:6236–43.
73. CROSBY HA, LALOR PF, ROSS E, et al. Adhesion of human haematopoietic (CD34+) stemcells to human liver compartments is integrin and CD44 dependent and modulated by CXCR3 and CXCR4. **J Hepatol** 2009;51:734–49.
74. WASMUTH HE, TACKE F, TRAUTWEIN C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. **Semin Liver Dis** 2010;30:215–25.
75. SAHIN H, BORKHAM-KAMPHORST E, KUPPE C et al. Chemokine Cxcl9 attenuates liver fibrosis associated angiogenesis in mice. **Hepatology** 2012;55:1610-9.
76. APOLINARIO A, MAJANO PL, ALVAREZ-PEREZ, E et al. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. **Am J Gastroenterol.** 2002;97:2861–70.
77. LUSTER AD, UNKELESS JC, RAVETCH JV. Gamma interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. **Nature** 1985;315:672–6.
78. YANG CH, WEI L, PFEFFER SR et al. Identification of CXCL11 as a STAT3 dependent gene induced by IFN. **J Immunol** 2007;178:986–92.
79. TENSEN CP, FLIER J, RAMPERSAD SS et al. Genomic organization, sequence and transcriptional regulation of the human CXCL11 gene. **Biochim Biophys Acta** 1999;1446:167–72.
80. COLE KE, STRICK CA, PARADIS TJ, et al. Interferon inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. **J Exp Med** 1999;187:2009–2021.

81. OHMORI Y, WYNER L, NARUMI S, et al. Tumor necrosis factor alpha induces cell type and tissue specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. **Am J Pathol** 1993;142:861–70.
82. CHEN X, XU C, ZHANG F, et al. Comparative analysis of expression profiles of chemokines, chemokine receptors, and components of signaling pathways mediated by chemokines in eight cell types during rat liver regeneration. **Genome** 2010;53:608–18.
83. ISHIDA Y, KONDO T, KIMURA A, et al. Opposite roles of neutrophils and macrophages in the pathogenesis of acetaminophen induced acute liver injury. **Eur J Immunol** 2006;36:1028–38.
84. KOBAYASHI Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Front Biosci** 2008;13:2400–07.
85. ILMAKUNNAS M, HOCKERSTEDT K, MAKISALO H, et al. Hepatic IL-8 release during graft procurement is associated with impaired graft function after human liver transplantation. **Clin Transplant** 2010;24:29–35.
86. KUBOKI S, SHIN T, HUBER N, et al. Hepatocyte signaling through CXC chemokine receptor-2 is detrimental to liver recovery after ischemia/reperfusion in mice. **Hepatology** 2008;48:1213–23.
87. NAGASAWA T, HIROTA S, TACHIBANA K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. **Nature** 1996;382:635–38.
88. WALD O, PAPPO O, SAFADI R, et al. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus. **Eur J Immunol** 2004;34:1164–74.
89. SAWITZA I, KORDES C, REISTER S et al. The niche of stellate cells within rat liver. **Hepatology** 2009;50:1617–24.
90. LIEKENS S, SCHOLS D, HATSE S. CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization. **Curr Pharm Des** 2010;16:3903–3920.
91. PELED A, GRABOVSKY V, HABLER L, et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. **J Clin Invest** 1999;104 :1199–211.
92. GODDARD S, WILLIAMS A, MORLAND C et al. Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. **Transplantation** 2001;72:1957–67.

93. CAMPBELL JJ, HEDRICK J, ZLOTNIK A, et al. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. **Science** 1998;279:381–4.
94. SEKI E, DEMINICIS S, GWAK GY, et al. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. **J Clin Invest** 2009;119:1858–70.
95. EFSEN E, GRAPPONE C, DEFRANCO RM et al. Up-regulated expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 during liver injury in humans. **J Hepatol** 2002;37:39–47.
96. AOYAMA T, INOKUCHI S, BRENNER DA, et al. CX3CL1-CX3CR1 interaction prevents carbon tetrachloride-induced liver inflammation and fibrosis in mice. **Hepatology** 2010;52:1390–1400.
97. ISHAK KG, BABPTISTA A, BIANCHI L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **J Hepatol** 1995;22:696-99.
98. POYNARD T, BEDOSSA P, OPOLON P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVER and DOSVIRC groups. **Lancet** 1997;349:825-32.
99. BRAVO AA, SHETH SG. CHOPRA S. Current Concepts: Liver Biopsy. **N Eng J Med** 2001;344:495-500.
100. CADRANEL JF, RUFAT P, DEGOS F. Practices of Liver Biopsy in France: Results of a Prospective Nationwide Survey. **Hepatology** 2000;32(3):477-81.
101. MCGILL DB, RAKELA J, ZINSMEISTER AR, OTT BJ. A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. **Gastroenterology** 1990;99:1396-1400.
102. PICCININO F, SAGNELLI E, PASQUALE G, et al. Complications following percutaneous liver biopsy: a multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. **J Hepatol** 1986;2:165-73,.
103. HARINATH S, SRINIVAS S, CARY C et al. Liver Biopsy: Evolving Role in the New Millennium. **J Clin Gastroenterol** 2005;39:603-10.
104. PERRAULT J, MCGILL DB, OTT BJ. Liver biopsy: complications in 1000 inpatients and outpatients. **Gastroenterology** 1978;74:103-106.
105. BRAVO AA, SHETH SG. CHOPRA S. Current Concepts: Liver Biopsy. **N Eng J Med** 2001;344: 495-500.
106. ROSSON RR, CORRAL J, JASKI T. Outpatient liver biopsy. **JAMA**. 1972;222: 364.

107. SCOTT L. Friedman Liver fibrosis – from bench to bedside. **J Hepatol** 2003;38:S38–S53.
108. BENYON I. Is liver fibrosis reversible? **Gut**. 2000;46: 443–46.
109. BATALLER R, BRENNER DA. Liver fibrosis. **JClin Invest** 2005;115:209-18.
110. WAI CT, GREENSON JK, FONTANA RJ et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology** 2003,38:518-26.
111. VECCHIET J, FALASCA K, CACCIATORE P et al. Association between plasma interleukin-18 levels and liver injury in chronic hepatitis C virus infection and non-alcoholic fatty liver disease. **Ann Clin Lab Sci** 2005;35:415-22.
112. SPAHR L, GARCIA I, BRESSON S et al. Circulating concentrations of interleukin-18, interleukin-18 binding protein, and gamma interferon in patients with alcoholic hepatitis. **Liver Int** 2004;24:582-7.
113. JIA HY, DU J, ZHU SH et al.. The roles of serum IL-18, IL-10, TNF-alpha and sIL-2R in patients with chronic hepatitis C. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**. 2002;1:378-82.
114. SCHVOERER E, NAVAS MC, THUMMANN C et al. Production of interleukin-18 and interleukin-12 in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection before antiviral therapy. **J Med Virol** 2003;70:588-93.
115. TSUITSUI H, ADACHI K, SECHI E et al. Cytokine-induced inflammatory liver injuries. **Curr Mol Méd** 2003;3:545-59.
116. CECERE A, MAROTTA F, VANGIERI B et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection is related to altered cellular immune response and to different cytokine profile. **Panminerva Med** 2004;46:171-87.
117. LOOUIS H, LE MOINE O, GOLDMAN M et al. Modulation of liver injury by interleukin-10. **Acta Gastroenterolol Belg** 2003;66:7-14.
118. AVRAMESCU CS, COMANESCU V, POPESCU SN et al. Correlations among the serum levels of some interleukins and the histopathological aspects in chronic viral hepatitis C. **Rom J Morphol Embryol** 2008;49:57-62.
119. Streetz KL, Tacke F, Leifeld L, et al. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. **Hepatology** 2003;38:218–229.
120. Streetz KL, Wüstefeld T, Klein C, et al. Lack of gp130 expression in hepatocytes promotes liver injury. **Gastroenterology** 2003;125:532–543.

121. Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, et al. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. **Hepatology** 2000;31:149–159.
122. Nasir GA, Mohsin S, Khan M, et al. Mesenchymal stem cells and interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice. **J Transl Med** 2013;11:78.
123. Sugimoto R, Enjoji M, Nakamuta M, et al. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. **Liver Int** 2005;25:420–428.
124. Shimamura T, Fujisawa T, Husain SR, et al. Novel role of IL-13 in fibrosis induced by nonalcoholic steatohepatitis and its amelioration by IL-13R-directed cytotoxin in a rat model. **J Immunol** 2008;181:4656–65.
125. Meng F, Wang K, Aoyama T, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. **Gastroenterology** 2012;143:765–76.
126. Zheng L, Chu J, Shi Y, et al. Bone marrow-derived stem cells ameliorate hepatic fibrosis by down-regulating interleukin-17. **Cell Biosci** 2013;3:46.
127. DUNN C. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. **J Exp Med** 2007;19:204:667-80.
128. FALLETI E. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and liver fibrosis progression due to recurrent hepatitis C. **J Interferon Cytokine Res.** 2007;27:239-46.
129. NEUMAN NG. Cytokine--chemokine and apoptotic signatures in patients with hepatitis C. **Trans Res.** 2007;149:126-36.
130. SUZUKI A. Interleukin-15 increases hepatic regenerative activity. **Journal of Hepatology.** 2006;45:410-8.
131. FALASCA K. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. **Ann Clin Lab Sci** 2006;36:144-50.
132. HUANG YH. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl4-induced hepatic fibrosis in rats. **World J Gastroenterol** 2006;7;12:1386-91.
133. ITOH Y, OKANOUE T, OHNISHI N, et al. Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Am J Gastroenterol.** 1999;94:1332-40.
134. ZYLBERBERG H, RIMANIOL AC, POL S, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. **J Hepatol** 1999;30:185-91.

135. ABIRU S, MIGITA K, MAEDA Y et al. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Liver Int** 2006;26:39-45.
136. TOKUSHIGE K, HASHIMOTO E, TSUCHIYA N et al. Clinical significance of soluble TNF receptor in Japanese patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Alcohol Clin Exp Res.** 2005;29(12 Suppl):298S-303S.
137. CZAJA AJ. Review article: chemokines as orchestrators of autoimmune hepatitis and potential therapeutic targets. **Aliment Pharmacol Ther** 2014;40(3):261-79.
138. SASAKI M, MIYAKOSHI M, SATO Y et al. Chemokine-chemokine receptor CCL2-CCR2 and CX3CL1-CX3CR1 axis may play a role in the aggravated inflammation in primary biliary cirrhosis. **Dig Dis Sci** 2014;59:358-64.
139. PAGE S, BIRERDINC A, ESTEP M et al. Knowledge-based identification of soluble biomarkers: hepatic fibrosis in NAFLD as an example. **PLoS One** 2013;8:e56009.
140. TACKE F, ZIMMERMANN HW, BERRES ML, et al. Serum chemokine receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases. **Liver Int** 2011;31:840–49.
141. WASMUTH HE, LAMMERT F, ZALDIVAR MM, et al. Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans. **Gastroenterology.** 2009;137:309–19.
142. APOLINARIO A, MAJANO PL, ALVAREZ-PEREZ E, et al. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. **Am J Gastroenterol** 2002;97:2861-70.
143. SAHIN H, BORKHAM-KAMPHORST E, DO ONT, et al. Proapoptotic effects of the chemokine, CXCL 10 are mediated by the noncognate receptor TLR4 in hepatocytes. **Hepatology.** 2013;57:797–805.
144. ZEREMSKI M, DIMOVA R, BROWN Q, et al. Peripheral CXCR3-associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **J Infect Dis** 2009;200:1774–1780.
145. ZEREMSKI M, DIMOVA R, ASTEMBORSKI J, et al. CXCL9 and CXCL10 chemokines as predictors of liver fibrosis in a cohort of primarily African-

- American injection drug users with chronic hepatitis C. **J Infect Dis.** 2011;204:832-6.
146. ZEREMSKI M, PETROVIC LM, CHIRIBOGA L, et al. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology** 2008;48:1440–50.
147. BERRES ML, TRAUTWEIN C, SCHMEDING M, et al. Serum chemokine CXC ligand 10 (CXCL10) predicts fibrosis progression after liver transplantation for hepatitis C infection. **Hepatology** 2011;53:596–603.
148. JAROSZEWICZ J, HO H, MARKOVA A, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) decrease and serum interferoninducible protein-10 levels as predictive markers for HBsAg loss during treatment with nucleoside/nucleotide analogues. **Antivir Ther** 2011;16:915–924.
149. SONNEVELD MJ, ARENDS P, BOONSTRA, A et al. Serum levels of interferon-gamma-inducible protein 10 and response to peginterferon therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B. **J Hepatol** 2013;58:898–903.
150. ERHARDT A, WEGSCHEID C, CLAASS B. et al. CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis. **J Immunol** 2011;186:5284–93.
151. SEKI E, DE MINICIS S, GWAK GY et al. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. **J Clin Invest** 2009;119:1858–70.
152. DEGRE D, LEMMERS A, GUSTOT T, et al. Hepatic expression of CCL2 in alcoholic liver disease is associated with disease severity and neutrophil infiltrates. **Clin Exp Immunol** 2012;169:302–310.
153. AJUEBOR MN, HOGABOAM CM, LE T et al. C-C chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 directly inhibits NKT cell IL-4 production and is hepatoprotective in Tcell-mediated hepatitis in the mouse. **J Immunol** 2002;170:5252–59.
154. BAECK C, WEI X, BARTNECK M, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C(+) macrophage infiltration in mice. **Hepatology** 2014;59:1060-72.
155. TACKE F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. **Fibrogenesis Tissue Repair** 2012;6:5(Suppl 1):2-8.

156. LIASKOU E, ZIMMERMANN HW, LI KK. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. **Hepatology** 2013;57:385-98.
157. GALASTRI S, ZAMARA E, MILANI S, et al. Lack of CC chemokine ligand 2 differentially affects inflammation and fibrosis according to the genetic background in a murine model of steatohepatitis. **Clin Sci** 2012;123:459-71.
158. HAMMERICH L, FRANK T. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. **Clin Exp Gastroenterol** 2014;7:297–306.
159. MARRA F, TACKE F. Roles for Chemokines in Liver Disease. **Gastroenterology** 2014;147:577–94.
160. YEDIDYA S, FRIEDMAN S. The role of chemokines in acute liver injury Yedidya. **Front Physiol** 2012;3:1-12.

2. OBJETIVOS

Determinar o nível sérico das seguintes citocinas e quimiocinas: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), interleucina (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 em pacientes com hepatopatia crônica de diferentes etiologias.

Estudar o perfil das citocinas e quimiocinas nos pacientes com doença hepática crônica.

Comparar o nível sérico dos referidos biomarcadores entre os pacientes com doença hepática crônica e indivíduos sadios (doadores de sangue).

Comparar o nível sérico dos referidos biomarcadores entre as diferentes etiologias de doença hepática crônica.

Avaliar o desempenho das concentrações séricas das citocinas e quimiocinas no diagnóstico dos diferentes graus de atividade inflamatória e estádios de fibrose hepática nos pacientes com doença hepática crônica.

Avaliar o desempenho das concentrações séricas do AH, colágeno-IV e APRI no diagnóstico dos diferentes estádios de fibrose hepática nos pacientes com doença hepática crônica.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Incluiu-se nesta investigação uma série constituída por 225 adultos com diagnóstico de hepatopatia crônica de qualquer etiologia e com indicação de realização de biópsia hepática, atendidos entre junho de 2009 e agosto de 2012 no Ambulatório de Fígado Clínico do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A assistência médica incluiu anamnese e exame físico completos, quantificação do consumo de álcool pregresso e atual, exames complementares de avaliação de inflamação e função hepática e investigação completa para as hepatopatias específicas (virais, tóxicas, metabólicas, auto-imunes e vasculares). Todos os pacientes foram submetidos aos exames laboratoriais e à biópsia hepática seguindo o protocolo estabelecido no Serviço e conforme a indicação clínica, de acordo com os protocolos internacionais e nacionais em vigor e não para a finalidade da pesquisa.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 0637.0.203.000-09) e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

As biópsias hepáticas foram realizadas no Serviço de Radiologia do Hospital das Clínicas da UFMG. As amostras foram fixadas em formalina, embebidas em parafina, seccionadas em lâminas de 4 micrômetros de espessura e coradas com hematoxilina e eosina.

A colheita de sangue (aproximadamente 10 mililitros) foi feita instantes antes da realização da biópsia, após leitura, concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O sangue foi centrifugado logo após a colheita e o soro congelado a -80°C até a realização dos experimentos.

Para a análise comparativa entre as etiologias, os pacientes foram agrupados da seguinte forma: hepatites virais (hepatite B ou C crônicas), DHGNA, doença hepática autoimune (hepatite autoimune, cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária) e hepatopatia criptogênica. Encontra-se discriminada na Tabela 2, as características dos

pacientes incluídos no estudo e a distribuição dos casos segundo a intensidade da inflamação e grau de fibrose.

Tabela 2. Características dos pacientes e distribuição dos casos segundo a intensidade da inflamação e grau de fibrose.

	Hepatites Virais (%)	DHGNA (%)	Autoimunes (%)	Criptogênica (%)	Todos os pacientes(%)
n	104	40	50	17	211
Idade média*	48,5	42,6	42,6	47,4	47,4
Masculino	64 (57,6)	21 (52,5)	15 (30,0)	15 (62,5)	115 (51,1)
Inflamação					
Ausente	8 (7,7)	9 (22,5)	2 (4,0)	2 (11,8)	21 (9,9)
Leve	54 (51,9)	19 (47,5)	19 (38,0)	8 (47,1)	100 (47,4)
Moderada	39 (37,5)	10 (25,0)	16 (32,0)	6 (35,3)	71 (33,6)
Intensa	3 (2,9)	2 (5,0)	13 (26,0)	1 (5,9)	19 (9,0)
Fibrose					
Ausente ou discreta	60 (57,7)	23 (57,5)	24 (48,0)	10 (58,8)	119 (56,4)
Moderada	20 (19,2)	8 (20,0)	17 (34,0)	2 (11,8)	55 (26,1)
Cirrose	24 (23,1)	9 (22,5)	9 (18,0)	5 (29,4)	37 (17,5)

*anos; DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica.

Consideraram-se os seguintes critérios de exclusão: biópsia hepática com menos de cinco tratos portais ou fragmentada impedindo a adequada análise histopatológica.

3.2. Classificação histopatológica

As biópsias hepáticas foram revistas simultaneamente por três patologistas, especialistas em histologia hepática, não informados a respeito da história clínica e resultados de exames complementares. O resultado histopatológico registrado foi o consenso desta análise simultânea, método semelhante ao utilizado por Lok e col.¹ O grau de atividade inflamatória e o estágio de fibrose foram definidos segundo a classificação proposta por Ishak.² Para fins deste estudo, a inflamação foi classificada como ausente se pontuação

igual à zero; mínima se pontuação entre um e três; moderada, se pontuação entre quatro e oito; intensa se maior ou igual a nove. A fibrose foi definida como mínima se pontuação menor que três; significativa, se pontuação igual ou maior que três (presença de no mínimo fibrose em ponte); e cirrose se pontuação igual a cinco ou seis. Biópsias fragmentadas ou com menos de cinco tratos portais foram consideradas inadequadas para a investigação. Considerou-se, para a investigação, uma única biópsia de cada paciente.

3.3. Quantificação das citocinas e quimiocinas

Foram dosadas no soro as citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ e as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10. Os níveis das citocinas e quimiocinas foram quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) (BD, Pharmingen, USA) que emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas e recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de quatro a seis biomarcadores no mesmo ensaio, empregando-se um pequeno volume de amostra (25 μ L do soro), como descrito sumariamente a seguir.

Alíquotas de 25 μ L dos padrões de citocinas ou quimiocinas foram submetidas à diluição seriada com diluente G (“Top Standard” – 5000 pg/mL, 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL) e 25 μ L de diluente G (controle negativo). Após a preparação das amostras e dos padrões, estas foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL. A cada tubo foi adicionado 15 μ L da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit, BD, Pharmingen, USA) ou com anticorpos monoclonais anti-citocinas IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α

1. LOK AS, GHANY MG, GOODMAN ZD et al. Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort. *Hepatology* 2005;42:282-92.
2. ISHAK KG, BAPTISTA A, BIANCHI L et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-99.

(Inflammatory Cytokine CBA Kit, BD, Pharmingen, USA) ou com anticorpos monoclonais anti-quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 (Chemokine

CBA Kit, BD, Pharmingen, USA). Os tubos foram incubados por 90 minutos, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L de tampão fosfato salínico (PBS), centrifugadas por sete minutos a 18°C e o sobrenadante cuidadosamente descartado. As esferas foram, então, reincubadas na presença de 18 μ L do coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas ou anti-quimiocinas humanas, conjugados com ficoeritrina (PE) por 90 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas foram novamente lavadas com 500 μ L de PBS, centrifugadas a 600g por sete minutos a 18°C e o sobrenadante cuidadosamente descartado. As esferas foram ressuspensas em 250 μ L de PBS e os dados imediatamente adquiridos e analisados no citômetro de fluxo (FACSCalibur[®], BD, USA).

A aquisição dos dados obtidos foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur[®]. Após as etapas de marcação, um total de 1.800 eventos/região (R1) foi obtido com base em gráficos de tamanho versus granulosidade (Figura 1A). Inicialmente, para a análise dos dados, as microesferas foram separadas em gráficos de distribuição FL3 x FL2, onde as esferas com intensidades de fluorescência distintas ocupam posições específicas ao longo do eixo Y (FL3). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL2) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada citocina ou quimiocinas presente na amostra (Figuras 1B e 1C).

Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa das citocinas ou quimiocinas, uma curva padrão foi construída, baseada nos padrões de citocinas em concentrações de 20pg/mL – 5.000pg/mL. Um modelo de ajustamento, por meio da construção da curva do 4º parâmetro logístico, que permite o ajuste da melhor curva não linear para dados detectáveis, foi utilizado. Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidades de fluorescência de amostras fora dos limites da curva padrão.

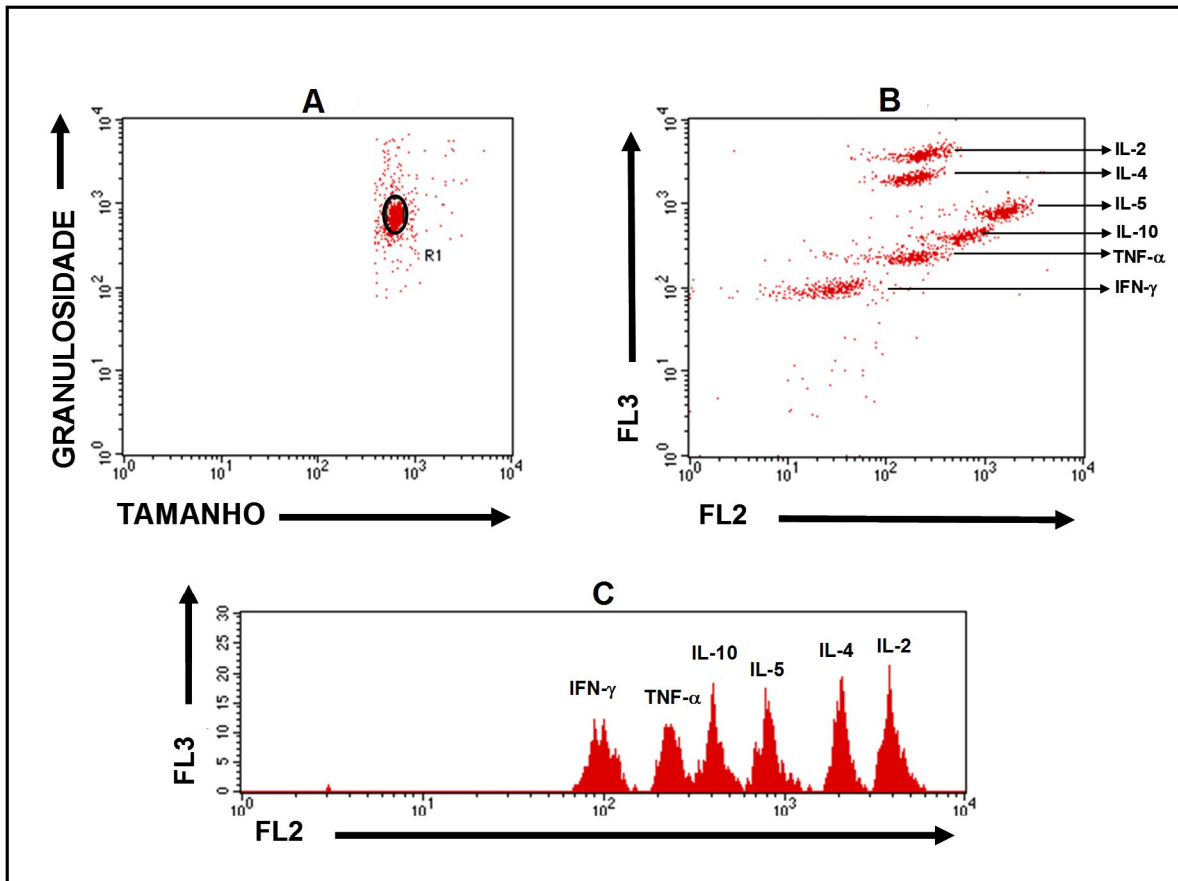


Figura 1: Representação esquemática da análise de citocinas, do soro, por meio do ensaio com microesferas por citometria de fluxo.

(A) Delimitação da região de microesferas, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho versus granulidade.

(B) Discriminação das microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de citocinas com diferentes intensidades de fluorescência, posicionadas em regiões específicas ao longo do eixo Y (FL3) em gráficos de distribuição pontual FL2 versus FL3.

(C) Histograma das microesferas, ao longo do eixo X (FL2) em gráficos de distribuição pontual FL2 versus FL3, proporcional à concentração de cada citocina presente nos padrões, plasmas e sobrenadantes testados.

3.4. Análise estatística

Ao término do estudo os dados foram organizados em banco de dados para viabilizar a realização da análise estatística. As variáveis categóricas foram apresentadas como números e porcentagens. As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana. Para a comparação entre os grupos, foram utilizados os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, de acordo com a indicação. As correlações foram realizadas utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman.

Foram construídas curvas ROC (*receiver operating characteristic*) empregando-se os níveis séricos de cada citocina no intuito de se determinar o desempenho dos biomarcadores no diagnóstico de inflamação e fibrose. A inflamação foi subdividida em três grupos: qualquer grau; moderada/intensa e intensa. Este procedimento foi realizado para todos os pacientes como um grupo e para cada grupo de diferentes etiologias separadamente. O mesmo processo foi realizado para o diagnóstico do estágio de fibrose. Além das citocinas e quimiocinas, o desempenho dos níveis séricos do AH, colágeno-IV e APRI foram avaliados para o diagnóstico de fibrose. Pontos de corte foram determinados para cada biomarcador em cada subcategoria de inflamação e fibrose. Para cada ponto de corte selecionado, foram calculadas a especificidade e a razão de verossimilhança.

A análise de regressão logística múltipla foi utilizada para determinar a relação entre os biomarcadores e os grupos etiológicos de hepatopatia crônica e a relação entre os biomarcadores e o grau de fibrose. Para o último, duas classificações do estágio de fibrose foram utilizadas: 1) fibrose inicial (estádios F0-F2) e fibrose significativa (estádios F3-F6); 2) ausência de cirrose (estádios F0-F4) e cirrose (estádios F5-F6). Os biomarcadores que foram significativamente ($p < 0,25$) associados com os eventos à análise univariada, foram incluídos no modelo de regressão logística $\log \left[\frac{\pi_1}{\pi_0} \right] = \alpha + \beta_i x_i$. A seleção dos biomarcadores foi realizada pelo método *stepwise*. A partir dos modelos finais, calculou-se a *odds ratio* (OR) dos marcadores selecionados. Considerou-se valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada por meio do *software* SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

ARTIGOS ORIGINAIS

ARTIGO ORIGINAL 1

CCL2, CXCL10 and CXCL8 biomarkers are differently associated with different etiologies of chronic liver diseases

Authors: Osvaldo F. M. Couto,¹ Luciana C. Silva,² Marcelo A. P. Xavier,³ Paula V. T. Vidigal,³ Clara G. Camelo,⁴ Ana C. C. Azevedo,⁵ Andrea Teixeira-Carvalho,⁵ Teresa C. A. Ferrari^{1,6}

Affiliations: ¹Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ²Departamento de Anatomia e Imagem, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ³Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ⁴Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ⁵Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brasil; ⁶Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Abstract

Background & Aims: the pathogenesis of liver diseases is not fully understood. It involves hepatocellular inflammation and death ruled by a microenvironment of cytokines/chemokines interactions. The characteristics of the expression of these biomarkers are important to further elucidate the pathogenic mechanisms of the hepatic disorders. We investigated the cytokines and chemokines serum profile of patients with chronic liver disease of different etiologies. **Methods:** the study included 225 consecutive adult patients with chronic liver disease attended at an outpatient liver clinic and 15 healthy individuals to serve as a control group. Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 were measured in the serum by cytometric bead array. **Results:** one hundred and one individuals presented chronic B or C viral hepatitis, 40 nonalcoholic fat liver disease (NAFLD), 50 autoimmune disorders, and 24 cryptogenic diseases. Serum levels of all the biomarkers were significantly higher in the patients with liver disease when compared to the controls. The analysis according to the etiology showed that the cytokines and chemokines profile was somewhat different. The logistic regression demonstrated CXCL10 and CCL2 as significant biomarkers of chronic viral hepatitis, when compared to the NAFLD and autoimmune disorders patients, respectively. CXCL8 was more commonly associated with NAFLD and autoimmune disease when compared to chronic virus hepatitis. **Conclusions:** Cytokines and chemokines profile was somewhat different according to the etiology of the chronic liver disorder. CXCL10, CCL2 and CXCL8 were the most promising biomarkers.

Keywords

Hepatic disease; cytokines; chemokines; immune profile.

Introduction

Liver cirrhosis is one of the leading causes of hospitalization and death worldwide. Its pathogenesis involves hepatocyte inflammation and death, activation and proliferation of hepatic stellate cells (HSC) with subsequent production of extracellular matrix and fibrosis formation, in an inflammatory microenvironment maintained by cytokines and chemokines.¹⁻³

Apoptosis, necrosis and necroptosis constitute the different modes of hepatocellular death. The insult triggers specific cell death responses such as damage-associated molecular patterns which link cell death and inflammation, driving liver disease progression and the development of liver fibrosis and cirrhosis.⁴

Cytokines and chemokines are immunological active molecules responsible for orchestrating the immune response. They exert a spectrum of functions ranging from recruitment of the innate immune response cells to regulation and control of cell death.⁵⁻⁷ Thus, they play a crucial role in different pathologic processes.

Cytokines and chemokines expression in serum and hepatic parenchyma of individuals with liver disease is altered, and influences the different mechanisms of cell death observed in the liver diseases of different etiologies.⁸⁻¹⁰ The description of the magnitude and characteristics of the expression of these biomarkers is important for understanding the pathogenic mechanisms of liver diseases, developing surrogate markers of inflammation and fibrosis, and also for the development of anti-inflammatory and antifibrotic drugs.

We aimed to characterize cytokines and chemokines serum profile in patients with chronic liver disease, compare these levels to those from healthy individuals, and also among the different etiologies of the liver disorder.

Patients and Methods

Study population

A total of 225 consecutive patients with chronic liver disease were prospectively selected among those attended at the Hepatology Clinic, University Hospital, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, during a two-year period (2010-2012).

The group of patients with hepatic disease was separated into four subgroups according to the etiology of the liver disease as follows: chronic viral hepatitis (Virus), which included hepatitis B (HBV) and C (HCV) virus infection without previous treatment; nonalcoholic fat liver disease (NAFLD); autoimmune liver disease (AI) including autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis; and cryptogenic liver disease. Serum sample was obtained from 15 healthy individuals (blood donors) to serve as a control group.

This study was approved by the Ethic Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 0637.0.203.000-09) and written informed consent was obtained from all patients.

Serum biomarkers

Serum sample was obtained from each patient and stored at -80°C. The following serum markers were investigated: the cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ ; and the chemokines CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10.

The serum markers were quantified by flow cytometry, using a cytometric bead array (CBA) immunoassay.

Cytometric bead array immunoassay

CBA measurement of multiple biomarkers in a single sample (25µl) was performed using three different immunoassay kits: Human Th1/Th2 Cytokine Kit, Human Inflammatory Cytokine Kit and Human Chemokine Kit (BD Biosciences, Pharmingen, CA). The CBA kits use polystyrene microbeads, consisting of distinct populations, unique on their type-3 fluorescence intensity (FL-3) each coupled to a monoclonal antibody (mAb) against one of biomarkers IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70 and TNF-α (Human Inflammatory Cytokine Kit), or IL-2, IL-4, IL-5 and IFN-γ (Human Th1/Th2 Cytokine Kit) or CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 (Human Chemokine Kit) to capture a given cytokine. The captured biomarkers were then detected via direct immunoassay using a cocktail of six different mAbs coupled to phycoerythrin (PE) (FL-2).

The biomarkers quantification was performed as previously described.¹¹⁻¹³ Briefly, 25µl of serum or standard were added to 15µl of mixture beads and incubated for 90 minutes at room temperature in the dark. The biomarkers standard calibrator mixture was used for each assay. After incubation, the samples and standards were washed with 500µl of wash buffer and centrifuged at 600g for seven minutes at room temperature. Subsequently, 20µl of detection cocktail consisting of PE conjugated mAbs were added to each tube and the mixture incubated for 90 minutes at room temperature in the dark. Following incubation, the samples and standards were washed again with 500µl of wash buffer and centrifuged at 600g for seven minutes at room temperature to remove unbound detector reagent. After washing, 250µl of wash buffer was added to each tube prior to data acquisition using a fluorescence activated cell sorter (FACS) Calibur® flow cytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA). Although the fluorescently labeled particles in the CBA immunoassay are designed to be excited by the 488nm laser common to all BD flow cytometers, they can also be excited by the red diode laser on dual-laser BD FACS Calibur instruments. The detection of particle emission on the FL-4 channel simplifies the instrument set-up procedure and reduces the need for fluorescence compensation. Thus, a maximum total of 1800 events/gate were acquired after proper setup of a flow cytometer to measure forward (FSC) and side (SSC) light scatters and dual-colour (FL-4 and FL-2) flow cytometric acquisition, using a dual-laser BD CBA template. Data analysis was performed using the BD Bioscience CBA software.

Statistical analysis

Categorical data were presented as numbers and percentages, continuous data were expressed as mean \pm standard deviation or median, as appropriate. Serum cytokines and chemokines concentrations were compared using the Kruskal-Wallis test. Post hoc analysis was performed with Dunn's multiple comparison test. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$.

The cytokines and chemokines profile was assessed to identify low and high biomarkers producers. Briefly, after the establishment of the global (chronic liver diseases plus controls) median of the cytokines and chemokines concentrations, the percentages of individuals showing high biomarkers levels, i.e., above the global median value, were calculated for each cytokine/chemokine. Radars charts were further used to summarize the cytokine signatures. Each axis represents the frequency (%) of cytokine concentrations. The graphics were provided by GraphPad Prism version 5.0 (San Diego, CA).

Cytokines and chemokines networks were developed from the correlation (Spearman's correlation) of the biomarkers between each other. All the statistically significant correlations ($p < 0.05$) were included in the network and categorized according to the strength of the correlation as follows: low ($r < 0.35$), moderate ($r = 0.35$ to 0.65), strong ($r > 0.65$) or negative. The significant correlations representing the interactivity between the investigated cytokines and chemokines were compiled using the open source software, Cytoscape (version 2.8).

Multinomial logistic regression analysis was performed to determine the relation between the biomarkers and the etiology of the liver disease. The biomarkers that were significantly ($p < 0.25$) associated with the events in the univariate analysis (simple linear regression) were included in the multivariable logistic regression model. The selection of the variables followed the stepwise method. The variables that entered the final model

$(\log \left[\frac{\pi_{NAFLD, AI \text{ ou } CRYPTO}}{\pi_{VIRUS}} \right] = \alpha + \beta_i x_i)$ were: IFN- γ , IL-12, CXCL10, CCL2 and CXCL8.

Results

From the 225 patients, 115 (51.1%) were male and the mean age was 47 ± 13.3 (range, 18-80) years. The distribution of the patients according to the etiology of the hepatic disease was as follows: 111 (49.3%) individuals presented chronic viral hepatitis (71 HCV and 40 HBV), 40 (17.8%) NAFLD, 50 (22.2%) autoimmune disorders (23 autoimmune hepatitis, 13 primary biliary cirrhosis and 14 primary sclerosing cholangitis), and 24 (10.7%) were classified as cryptogenic.

Expression of biomarkers in chronic liver diseases of different etiologies

The median serum levels of all biomarkers were significantly higher in the patients with liver disease when compared to that of the healthy controls. When the patients were stratified according to etiology of the liver disease, serum levels of CXCL10 were significantly higher in the Virus and AI groups when compared to the NAFLD patients. Furthermore, serum levels of CCL2 were significantly higher in the patients with NAFLD when compared to the AI and cryptogenic groups, and in the patients with viral hepatitis in comparison to the AI group (Figure 1).

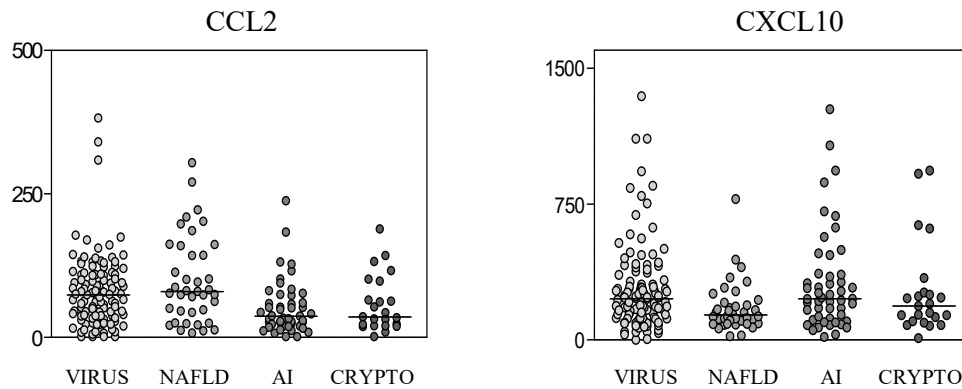


Figure 1. CXCL10 and CCL2 median serum concentrations (pg/ml) in patients with chronic liver disease according to etiologic groups: VIRUS - chronic viral hepatitis B or C (○), NAFLD - nonalcoholic fat liver disease (●), AI - autoimmune liver disorders (autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis) (●) and CRYPTO: cryptogenic hepatic disorder (●).

The intensity and diversity of cytokines and chemokines production is demonstrated by the radar graphics in the healthy controls and liver disease patients as a group and also according to the etiology of the hepatic disorder (Figure 2).

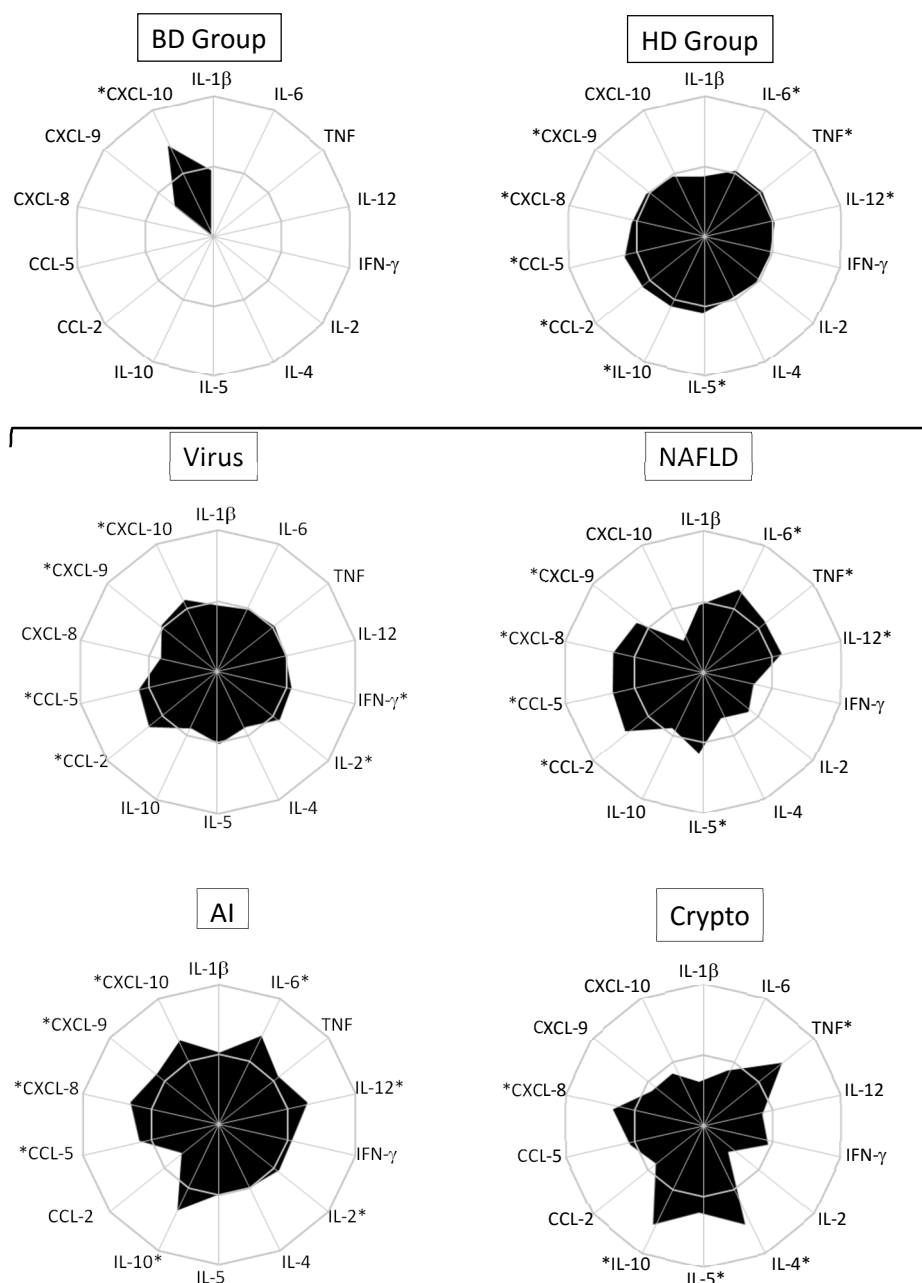


Figure 2. Radar graphics of cytokines and chemokines in patients with chronic liver diseases and healthy controls. The colored area represents the percentage of high producers. BD: blood donors; HD: hepatic diseases; Virus: (chronic viral hepatitis B or C); NAFLD: nonalcoholic fat liver disease; AI: autoimmune; Crypto: cryptogenic; *the proportion of high producers is over 50%.

Except for CXCL10, there were no high producers of any other cytokine in the group of healthy controls. On the other hand, it was observed a proportion higher than 50% of high producers of IL-6, TNF- α , IL-12, IL-5, IL-10, CCL2, CCL5, CXCL8 and CXCL9 in the group of individuals with hepatic disease.

The virus group included a slightly higher proportion than 50% of high producers of IFN- γ , IL-2, CCL2, CCL5, CXCL9 and CXCL10. In the NAFLD group, it was observed around 70% of high producers of TNF- α , IL-6, IL-12, CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, and IL-5. The AI group presented a variable proportion above 50% of high producers of IL-6, IL-12, IL-10, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, and IL-2. Finally, in the cryptogenic group, we observed prevalence around 75% of high producers of TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10 and CXCL8.

Cytokine and chemokine networks are shown in Figure 3.

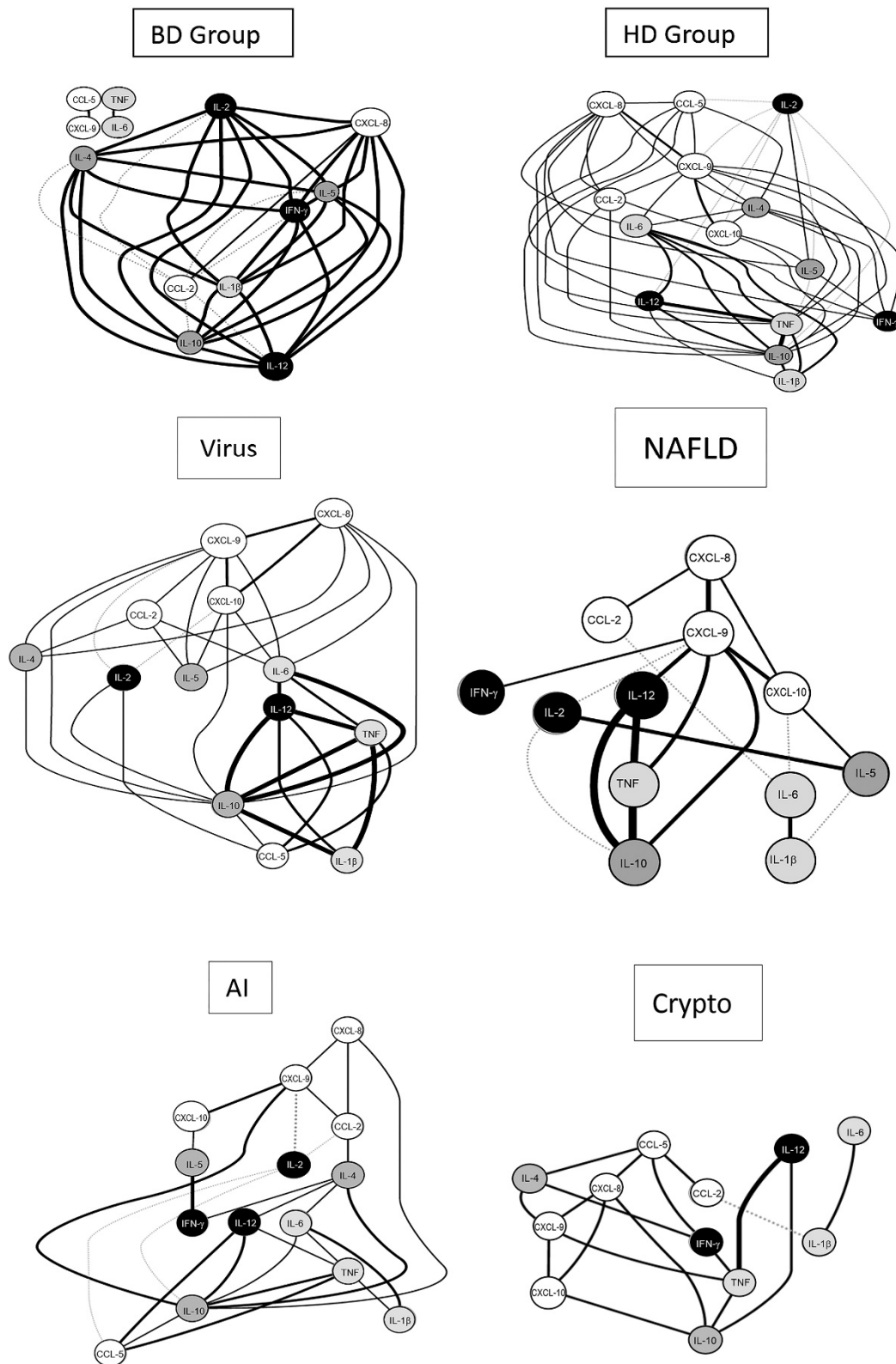


Fig 3. Cytokines and chemokines networks in patients with chronic liver disease and healthy controls. BD: blood donors; HD: hepatic diseases; NAFLD: nonalcoholic fat liver disease; AI: autoimmune; Crypto: cryptogenic. Pro-inflammatory = ●; regulatory = ●; balanced (pro-inflammatory/regulatory) = ●; and chemokines = ○). Connecting edges display the underscore: fragile (—), moderate (—), strong (—) or negative (—) correlation.

In the control group, the network shows that the correlations between most biomarkers were positive and strong, with a hierarchical participation of IL-2, but without effective participation of CCL-5, CXCL-9, TNF- α and IL-6. On the other hand, in the group of patients with liver disease, these four markers presented as major connectors, with TNF- α and IL-6 interacting effectively through strong correlations. Furthermore, IL-2 presented negative correlations.

Considering the different etiologies, it was observed that the virus group network was more intense and complex. Innate immune response cytokines (IL1- β , IL-6, TNF- α) promote strong positive correlations with other inflammatory and regulatory cytokines, mostly IL-12 and IL-10, respectively. On the other hand, the NAFLD and cryptogenic groups presented only a few correlations, occupying the AI group an intermediate position regarding the intensity of the network. Another difference among the groups was the finding that IL-2 presented only positive correlations in the NAFLD group; positive and negative correlations in the cases of viral hepatitis; and only negative correlations in the AI group.

CXCL10, CCL2 and CXCL8 were associated with specific etiologies of chronic liver diseases

CXCL10, CCL2 and CXCL8 were the biomarkers selected for the final logistic model. The results of the multinomial logistic regression comparing the Virus, NAFLD, AI and Crypto groups in relation to the selected biomarkers are presented in Table 1.

Table 1. Multinomial logistic regression comparing the viral hepatitis, NAFLD, autoimmune and cryptogenic groups in relation to the biomarkers CXCL10, CCL2 and CXCL8

	β coefficient	95% CI	Z score	P value
Intercept_I	0,99	(0,12;1,85)	-2,22	0,026
Intercept_{II}	-0,77	(-1,57;0,03)	-1,87	0,061
Intercept_{III}	-1,19	(-2,17;-0,21)	-2,38	0,017
CXCL10_I	-0,68	(-1,05;-0,30)	-3,51	0,000
CXCL10_{II}	-0,05	(-0,36;0,26)	-0,35	0,719
CXCL10_{III}	-0,18	(-0,59;0,23)	-0,86	0,388
CCL2_I	0,14	(-0,21;0,49)	0,81	0,415
CCL2_{II}	-0,51	(-0,82;-0,91)	-3,04	0,002
CCL2_{III}	-0,31	(-0,72;0,10)	-1,49	0,135
CXCL8_I	0,49	(0,15;0,82)	2,73	0,006
CXCL8_{II}	0,56	(0,24;0,87)	3,35	0,007
CXCL8_{III}	0,34	(-0,07;0,75)	1,62	0,103

I, II and III: NAFLD *versus* viral hepatitis group (VIRUS), autoimmune group *versus* VIRUS and cryptogenic group *versus* VIRUS, respectively.

The results of the logistic regression demonstrated significant participation of CXCL10 and CXCL8 in the comparison between the NAFLD and chronic viral hepatitis groups (model I). CCL2 and CXCL8 also presented significant participation when AI and chronic viral hepatitis groups were compared (model II). The model III, comparing the cryptogenic and viral hepatitis groups showed no significant differences of the selected biomarkers. From the models above, the odds ratios (OR) were calculated (Table 2).

Table 2. Multinomial logistic regression results showing the associations between the etiology and the predictors biomarkers

	OR	95%IC
CXCL10_I	0,51	(0,35;0,74)
CXCL10_{II}	0,95	(0,70;1,30)
CXCL10_{III}	0,84	(0,55;1,26)
CCL2_I	1,15	(0,81;1,64)
CCL2_{II}	0,60	(0,44;0,82)
CCL2_{III}	0,73	(0,49;1,11)
CXCL8_I	1,63	(1,17;2,28)
CXCL8_{II}	1,75	(1,28;2,40)
CXCL8_{III}	1,40	(0,93;2,12)

I, II and III: NAFLD *versus* VIRUS, AI *versus* VIRUS and CRYPTO *versus* VIRUS, respectively.

CXCL10 appeared as a significant biomarker in the virus group, with a chance of approximately twice to be observed in this than in the NAFLD group. Similarly, CCL2 had a chance roughly twice to be observed in virus group compared to the AI group. On the other hand, CXCL8 occurred in the NAFLD group with a chance approximately 1.5 times greater

than in the virus group. Likewise, CXCL8 has a chance almost twice higher to be observed in the AI group than in virus group.

Discussion

In this study we compared the serum concentrations of some cytokines and chemokines between healthy individuals and a large group of patients with chronic liver disease of different etiologies. We further used different strategies to describe the cytokines and chemokines profile observed in the normal individuals and in those with hepatic disease.

We showed that cytokines and chemokines were elevated in the serum of patients with chronic liver disease, in accordance with previous reports,¹⁴ demonstrating the activation of the innate and adaptive immune responses. The inflammatory scenario in liver diseases from viral or non-viral nature leads to the production of soluble factors that in cascade totally changes the immunological environment. Considering the central role of inflammation and cell death in the pathogenesis of the chronic liver disorders, it is of major importance to determine the cytokine and chemokine general profile or signature, and identify biomarkers related to each etiology.

Radar graphics and networks serve to further characterize the cytokine profile and highlight the contribution of distinct biomarkers for the overall inflammatory and regulatory balance. Radar graphic is a method for displaying multiple measurements using a number of axes emanating from one central point. Each axis displays the proportion of high producers for each biomarker. The values on each axis are connected by lines to form the central polygon area, which represents the magnitude of the inflammatory and regulatory profiles. The colored area of the graphic represents the percentage of high producers. When this percentage value is over 50%, it indicates that the specific biomarker exert a major influence in the global profile of the group. Its usefulness has been demonstrated in different studies.^{15,16} Cytokines/chemokines networks use the correlations among the different biomarkers to highlight the different influence they exert in each group.

We demonstrated that in all situations of chronic liver disease (patients grouped together or separated according to the etiology) there is an important expression of chemokines

and cytokines from the innate and adaptive immune responses with a balance between the inflammatory and regulatory biomarkers.

Considering the chronic viral hepatitis, INF, IL-2, CCL2, CCL5, CXCL9 and CXCL10 appear to have more important involvement according to the percentage of high producers. Nevertheless, the results of the multivariate analysis showed that CXCL10 and CCL2 had major relation with this condition. CXCL10 is a CXCR3 ligand (CXCL9-11 axis) that has been shown to correlate with the degree of inflammation and apoptosis in patients with hepatitis C, mediated by toll like receptor (TLR)-4.^{17,18} Additionally, intrahepatic and serum levels of CXCL10 have been associated with the extent of HCV liver fibrosis.¹⁹⁻²² Data on the role of chemokines in HBV infection are scarce. HBV X-protein was found to induce the expression of CXCL10 in the hepatocytes²³ and some studies suggest that high baseline levels of serum CXCL10 are associated with a favorable treatment response.^{24,25}

CCL2 is a ligand of CCR2 that mediates effector cell recruitment in chronic hepatitis C.²⁶ Increased serum concentrations of CCL2 correlate with progressive liver inflammation in HCV infected persons compared to healthy individuals.²⁷ IFN- γ stimulates the production of CCL2 in the early phase of HCV infection and its secretion promotes the first wave of infiltrating monocytes. Activated dendritic cells release IFN- γ , TNF- α , CCL4 and CXCL10, and stimulate CCL2 secretion by other IFN-inducible cell types. These phenomena effectively trigger a cascade which amplifies leukocyte recruitment.²⁸ Gu et al. also highlighted CCL2 as a possible prognostic marker of the efficacy of antiviral therapy in hepatitis C patients.²⁹

Our patients with NAFLD presented TNF- α , IL-6, IL-12, CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, and IL-5 as important biomarkers, according to the percentage of high producers, although CCL2 and CXCL8 seem to be the major participants. The role of CCL2 in NAFLD pathogenesis is not completely understood. According to some animal models of NASH, high expression of CCL2 led to insulin resistance and hepatic steatosis.^{30,31} Thus, it has been hypothesized that elevated CCL2 serum levels in mice contribute to insulin resistance triggering up regulation of different inflammatory ligands,³¹ and also that CCR2 inhibition may even improve hepatic steatosis.³² However, controversial results have been reported. According to other experimental models involving diverse

genetic backgrounds, CCL2 did not act as an inflammatory stimulus³³⁻³⁵ and may even be protective for the liver.^{36,37}

The major role of CXCL8 is to orchestrate neutrophil recruitment within inflamed tissues.³⁸ Some studies have demonstrated higher serum levels of CXCL8 in patients with NASH and cirrhosis compared to patients with only steatosis or a healthy control group,³⁹⁻⁴¹ although in another study the authors did not find any difference.⁴²

The intense activation of the immune system observed in the patients with autoimmune disorders in our study reflects the highly inflammatory nature of these conditions. Chemokines have been described to play an important role in pathogenesis of autoimmune diseases. The major chemokine ligands that influence hepatic migration of the immune cell populations implicated in immune mediated liver disease are CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL20, CXCL12 and CX3CL1.⁴³ In our study, we confirmed that CXCL9 and CXCL10 had important expression in this group, as was CXCL8, when compared to the others. CXCL8 is a potent chemoattractant for neutrophils and there are some reports that its serum levels are elevated in patients with autoimmune hepatitis.^{44,45}

There are also a few reports demonstrating that CXCL8 serum levels are significantly increased in serum and liver parenchyma of patients with primary biliary cirrhosis when compared to healthy controls.^{46,47} In one report, intrahepatic CXCL8 was associated with neutrophil infiltration in the liver in this condition.⁴⁷ The neutrophilic infiltration around reactive bile ducts may be related to the CXCL8 expressed in the bile ductular epithelia, possibly induced by bacterial components and proinflammatory cytokines released locally.⁴⁸ In primary sclerosing cholangitis, the reports on cytokine profile are even scarcer. There is one report showing higher serum levels of CXCL8 in patients with this disease when compared to patients with alcoholic cirrhosis and healthy controls.⁴⁹ In this scenario, the high association between primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease, especially ulcerative colitis, should be taken into consideration.

A cytokine often influences the synthesis and action of others. Cytokine communication is often local, within a tissue or between cells in close proximity. These interactions resemble cytokine cascades with one cytokine initially triggering the expression of one or more other cytokines that, in turn, trigger the expression of further factors and create

complicated feedback regulatory circuits. Using the correlation networks we demonstrated how complex these interactions may be, reflecting the changes in immune system imposed by a liver disease and their causative agents, and the potential challenge to the development of treatment strategies based on immune system modulation.⁵⁰

We further deemed to quantify the qualitative findings establishing the relation of each biomarker with the different etiologies of liver disease. Using a logistic regression model, we found that CXCL10, CCL2 and CXCL8 were the most relevant biomarkers of chronic hepatic disease. The OR showed that CXCL10 and CCL2 have major involvement in the virus group, CCL2 and CXCL8 in NAFLD and CXCL8 in the AI group.

In conclusion, chronic liver diseases impose drastic changes in the immune system independently of the etiology of the hepatic disorder. There was increased expression of chemokines and cytokines derived from the innate and adaptive immune response cells. Radar graphics and cytokine networks were demonstrated to be useful tools to select relevant biomarkers, provide an overview of the biomarkers in relation to the etiology of liver disease and also of the interaction between them. CXCL10 and CCL2 emerged as significant biomarkers of chronic viral hepatitis when compared to the NAFLD and AI group, respectively; CXCL8 was more commonly associated with NAFLD and AI disease when compared to chronic virus hepatitis. Further studies are necessary to investigate the role of the cytokines and chemokines in the pathogenesis as well as in the diagnosis and prognosis of hepatic disorders as surrogate markers of liver inflammation and fibrosis.

References

1. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:195-206.
2. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3:344-363.
3. Saiman Y, Friedman SL. The role of chemokines in acute liver injury. *Front Physiol* 2012;3:1-12.

4. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* 2014; 147:765–783.
5. Fallahi P, Ferri C, Ferrari SM, et al. Cytokines and HCV-related disorders. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:1-10.
6. Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* 2010;30:215–225.
7. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-27.
8. Capone F, Guerriero E, Giovanni C, et al. Cytokine profile evaluation in patients with hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2014;20:9261-9269.
9. An L, Wang X, Cederbaum AI. Cytokines in alcoholic liver disease. *Arch Toxicol* 2012;86:1337–1348.
10. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* 2014;20:9261-9269.
11. Peruhype-Magalhães V, Martins-filho OA, Prata A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α + monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 2006;146:124–132.
12. Chen R, Lowe L, Wilson JD et al. Simultaneous quantification of six cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chem* 1999;9:1693–1694.
13. Tamok A, Hambsch J, Chen R, et al. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clin Chem* 2003;49:1000–1002.
14. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* 2014; 147:577-594.
15. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar A, Teixeira-Carvalho A, et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol* 2008;68:516–525.

16. Silva ML, Azevedo ACC, Batista MA et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD Yellow Fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *The J Infect Dis* 2011;204:873–883.
17. Sahin H, Borkham-Kamphorst E, O NT, et al. Proapoptotic effects of the chemokine CXCL10 are mediated by the noncognate receptor TLR4 in hepatocytes. *Hepatology* 2013;57:797-805.
18. Van Raemdonck K, Van Den Steen PE, Liedens S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytok Grow Fac Rev*. 2014. doi: 10.1016 [Epub ahead of print].
19. Zeremski M, Dimova R, Brown Q, et al. Peripheral CXCR3 associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2009;200:1774-1780.
20. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, et al. Intrahepatic levels of CXCR3 associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008;48:1440-1450.
21. Tacke F, Zimmermann HW, Berres ML, et al. Serum chemokine receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases. *Liver Int* 2011;31:840-849.
22. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, et al. CXCL10 and CCL2 chemokine serum levels in patients with hepatitis C associated with autoimmune thyroiditis. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29:345-351.
23. Zhou Y, Wang S, Ma JW, et al. A longitudinal analysis of innate and adaptive immune profile during hepatic flares in chronic hepatitis B. *J Biol Chem* 2010;285:12159-12168.
24. Jaroszewicz J, Ho H, Markova A et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) decrease and serum interferon-inducible protein-10 levels as predictive markers for HBsAg loss during treatment with nucleoside/nucleotide analogues. *Antivir Ther* 2011;16:915-924.
25. Sonneveld MJ, Arends P, Boonstra A et al. Serum levels of interferon-gamma-inducible protein 10 and response to peginterferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis B *J Hepatol* 2013;58:898-903.
26. Fahey S, Dempsey E, Long A. The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection. *Cell Mol Immunol* 2014;11:25–40.
27. Neuman MG, Benhamou JP, Marcellin P, et al. Cytokine–chemokine and apoptotic signatures in patients with hepatitis C. *Transl Res* 2007;149:126–136.

28. Decalf J, Fernandes S, Longman R, et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *J Exp Med* 2007;204:2423–2437.
29. Gu B, Ye B, Mao WL, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 as possible prognostic marker of the efficacy of antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2014;61:55-58.
30. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006;116:1494–1505.
31. Tateya S, Tamori Y, Kawaguchi T, et al. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. *Endocrinology* 2010;151:971–979.
32. Kim HM, Lee ES, Lee BR, et al. C-C chemokine Receptor 2 Inhibitor Ameliorates Hepatic Steatosis by Improving ER Stress and Inflammation in a Type 2 Diabetic Mouse Model. *PLoS One* 2015;10:e0120711.
33. Inouye KE, Shi H, Howard JK, et al. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes* 2007;56:2242–2250.
34. Kirk EA, Sagawa ZK, McDonald TO, et al. Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue. *Diabetes* 2008;57:1254–1261.
35. Galastri S, Zamara E, Milani S, et al. Lack of CC chemokine ligand 2 differentially affects inflammation and fibrosis according to the genetic background in a murine model of steatohepatitis. *Clin Sci (Lond)* 2012;123:459-471.
36. Ajuebor MN, Hogaboam CM, Le T, et al. C-C chemokines ligand2/monocyte chemoattractant protein-1 directly inhibits NKT cell IL-4 production and is hepatoprotective in T cell-mediated hepatitis in the mouse. *J Immunol* 2003;170:5252–5259.
37. Hokeness KL, Kuziel WA, Biron C, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J Immunol* 2005;174 :1549–1556.

38. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, et al. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012;18:727–735.
39. Bahcecioglu IH, Yalniz M, Ataseven H, et al. Levels of serum hyaluronic acid, TNF-alpha and IL-8 in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology* 2005;52:1549–1553.
40. Torer N, Ozenirler S, Yucel A, et al. Importance of cytokines, oxidative stress and expression of BCL-2 in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:1095–1101.
41. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:412–421.
42. Abiru S, Migita K, Maeda Y, et al. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006;26:39–45.
43. Czaja AJ. Chemokines as orchestrators of autoimmune hepatitis and potential therapeutic targets. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;40:261-279.
44. Li YL, Liu N, Zhao DT, et al. Investigate circulating levels of chemokines and evaluate the correlation between these chemokines and liver function indicators in autoimmune hepatitis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2013;21:299-303.
45. Maggiore G, De Benedetti F, Massa M, et al. Circulating levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in children with autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;20:23-27.
46. Yamashiki M, Kosaka Y, Nishimura A, et al. Analysis of serum cytokine levels in primary biliary cirrhosis patients and healthy adults. *J Clin Lab Anal* 1998;12:77-82.
47. Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, et al. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *Plos One* 2011;6:e21381.
48. Isse K, Harada K, Nakanuma Y. IL-8 expression by biliary epithelial cells is associated with neutrophilic infiltration and reactive bile ductules. *Liver Int* 2007;27:672-680.
49. Bansal AS, Thomson A, Steadman C, et al. Serum levels of interleukins 8 and 10, interferon gamma, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and soluble CD23 in patients with primary sclerosing cholangitis. *Autoimmunity* 1997;26:223-229.

50. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 2015;doi:10.1136 [Epub ahead of print].

ARTIGO ORIGINAL 2

Cytokines and chemokines performance for the diagnosis of inflammation and fibrosis in patients with chronic liver diseases

Authors: Osvaldo F. M. Couto,¹ Luciana C. Silva,² Marcelo A. P. Xavier,³ Paula V. T. Vidigal,³ Clara G. Camelo,⁴ Ana C. C. Azevedo,⁵ Andrea Teixeira-Carvalho,⁵ Teresa C. A. Ferrari^{1,6}

Affiliations: ¹Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ²Departamento de Anatomia e Imagem, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ³Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ⁴Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ⁵Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brasil; ⁶Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Abstract

Background & Aims: inflammation and fibrosis are important features of chronic liver disease (CLD). Although liver biopsy is the gold standard for the diagnosis of this condition, it is invasive and has limitations. Cytokines and chemokines are soluble proteins that orchestrate the immune system response to injury, with straight interactions with hepatic stellate cells. We aimed to determine the accuracy of cytokines and chemokines serum levels in the diagnosis of inflammation and fibrosis in patients with CLD of different etiologies. **Methods:** the study included 211 consecutive adult patients with chronic liver disease and indication for a liver biopsy. Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 were measured in the serum by cytometric bead array. Receiver operating characteristics (ROC) curves were calculated in order to determine the performance of the biomarkers in the diagnosis of inflammation and fibrosis. Hyaluronic acid (HA), collagen-IV and aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) were evaluated as markers of fibrosis. **Results:** in the group of patients with CLD, CXCL10 presented a good performance for the mild inflammation with a positive correlation. CCL2 presented a negative correlation with both grade of inflammation and fibrosis stages, with a good performance for the diagnosis of lack of inflammation as well as of significant fibrosis or cirrhosis. When the patients were separated into groups according to the etiology of the liver disease, IL-4, IL-10, INF- γ , CXCL-9 presented good performance for identifying liver inflammation or fibrosis in specific situations. Considering all the patients with CLD or the groups of patients with different etiology of CLD, HA, collagen-IV and APRI were the serum markers with best performance for the diagnosis of significant fibrosis and cirrhosis. **Conclusions:** CCL2 and CXCL10 emerged as biomarkers for the diagnosis of inflammation and fibrosis in patients with CLD. IL-4, IL-10, INF- γ , CXCL-9 deserve further investigation to confirm or refute their usefulness in specific situations. HA, collagen-IV and APRI presented the best performance for the diagnosis of significant fibrosis and cirrhosis.

Keywords

Hepatic disease; cytokines; chemokines; inflammation; fibrosis.

Introduction

Liver diseases are common causes of morbidity and mortality. According to recent data, their prevalence has been increasing worldwide, with an estimated 100 million cirrhotic patients around the world.¹ This fact has been attributed especially to the epidemics of chronic hepatitis C and obesity-related liver disorders.² The impact of chronic liver diseases in public health poses an increasing economic and social burden as they are the leading cause of non neoplastic death among the hepatobiliary and digestive diseases and the 12th cause of overall mortality.^{3,4}

The mechanisms of chronic liver disease involve apoptosis and necrosis of the hepatocytes, and inflammation that progresses to fibrosis and cirrhosis. The hepatic stellate cell is the primary effector cell type, orchestrating the deposition of extracellular matrix in normal and fibrotic liver. It also plays a pivotal role in activating the immune response through secretion of cytokines and chemokines, and interacting with immune cells.⁵⁻⁶ This process usually takes several years to decades to develop and serial evaluation of liver inflammation and fibrosis parameters allows the determination of the severity of the hepatic involvement as well as monitoring the response to specific treatment and clinical outcomes, as the expanding knowledge has led to the development of antifibrotic agents.⁷

Conventional biochemical and serological tests are of limited value in the assessment of hepatic inflammation and fibrosis. As a result, histopathological examination of a liver biopsy specimen is currently the gold standard for grading and staging liver disease. However, liver biopsy has several limitations such as cost, patient morbidity and even mortality, intra and inter-observer disagreements, in addition to provide only static information. Furthermore, as only a small portion of the liver is sampled, it is susceptible to sampling error, especially in the chronic liver diseases in which the pathological lesions are heterogeneously distributed throughout the parenchyma.⁸⁻¹² Therefore, a more accurate, reproducible and non-invasive assessment of hepatic inflammation and fibrosis should be extensively investigated.

Cytokines and chemokines (chemotactic cytokines) are small soluble proteins synthesized, stored and secreted by the immune and other related cells. They are part of an intercellular

communicating system regulating the immune response.¹³ Experimental and human evidence suggests that these molecules play an important role in the pathogenesis of acute and chronic liver diseases by mediating the inflammatory reaction in the injured liver.¹⁴⁻¹⁶ Considering this fact, there is growing interest in the clinical applications of these peptides. Although cytokines and chemokines profile in different hepatic conditions have been studied, data concerning the comparison of their serum levels and the hepatic histology are scarce and contradictory.¹⁷⁻¹⁹ In this context, our investigation aimed to determine the accuracy of cytokines and chemokines serum levels in the diagnosis of inflammation and fibrosis in patients with chronic liver disease. We also investigated the performance of hyaluronic acid (AH) and collagen-IV serum concentrations and the aspartate aminotransferase (AST) to platelet ratio index (APRI)²⁰ in the diagnosis of hepatic fibrosis.

Patients and methods

Study population

A total of 225 patients with chronic liver disease who underwent liver biopsy were consecutively selected among those attended at the Outpatient Hepatology Clinic, University Hospital, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, during a two-year period. All patients were submitted to clinical examination, serum liver biochemistry, screening for viral, autoimmune and metabolic hepatic disorders, and abdominal ultrasound. Other imaging methods were carried out according to the necessity. Indication for liver biopsy was based on clinical judgment in accordance with current guidelines.

The group of patients with hepatic disease (HD) was separated into four subgroups according to the etiology of the liver disease as follows: chronic viral hepatitis (hepatitis B [HBV] and hepatitis C [HCV] virus infection without previous treatment); nonalcoholic fat liver disease (NAFLD); autoimmune liver disease (autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis); and cryptogenic liver disease.

This study was approved by the Ethic Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 0637.0.203.000-09) and written informed consent was obtained from all patients.

Liver biopsy

All liver biopsies were performed percutaneously. The samples were fixed in formalin, embedded in paraffin, cut in 4-micron-thick sections, and stained with haematoxylin and eosin. Microscopic examination was performed simultaneously by three liver pathologists and the results were the consensus among them. For the purposes of this study, liver biopsy was the golden standard with which the investigated tests were compared. Inflammation was classified according to the Ishak's score²¹ as absent (0), mild (1 to 3), moderate (4 to 8) or severe (9 to 18); and fibrosis was subdivided in absent (0), mild (1 or 2), significant (≥ 3) or cirrhosis (5 or 6) as previously described.²²⁻²³ Patients were excluded if there were insufficient material for histological analysis (less than five portal tracts).

Serum markers of inflammation and fibrosis

Blood samples were obtained from every patient immediately before the liver biopsy and the sera were stored at -80°C until the experiments. These samples were also used to measure the serum levels of the aminotransferases.

The following biomarkers: interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, hyaluronic acid (HA), collagen-IV were measured. Additionally, serum concentrations of AST and platelet count were obtained for calculating the APRI.

The cytokines and chemokines were quantified by flow cytometry. Cytometric bead array (CBA) immunoassay measurement of multiple biomarkers in a single sample was performed using three immunoassay kits (Human Th1/Th2 Cytokine kit, Human Inflammatory Cytokine kit and Human Chemokine kit; BD Biosciences Pharmingen, CA) for quantitative analysis as previously described.²⁴⁻²⁶ Briefly, 25 μ l of plasma were added to 15 μ l of mixture beads and incubated for 90 minutes at room temperature in the dark.

After incubation, the samples and standards were washed with 500µl of wash buffer and centrifuged for seven minutes. Subsequently, 20µl of detection cocktail consisting of monoclonal antibodies were added to each tube and the mixture incubated for 90 minutes at room temperature in the dark. A total of 1800 events/gate were acquired after proper setup of a flow cytometer to measure forward and side light scatters and dual-color flow cytometric acquisition, using a dual-laser CBA template. Data analysis was performed using BD Bioscience CBA software (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA). HA and collagen-IV were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits (K-1200 and K-1700, respectively; Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT), and results were expressed in ng/mL.

Statistical analysis

Categorical data were presented as numbers and percentages, and continuous data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or median (range). For comparisons between groups, the Mann-Whitney or the Kruskal-Wallis tests were used, as appropriate. Correlations were evaluated using the Spearman's correlation coefficient.

Receiver operating characteristics (ROC) curves were calculated for each cytokine and chemokine in order to determine the performance of the biological marker for the diagnosis of inflammation according to the following classification: any grade, moderate/severe or severe inflammation. This procedure was performed for all the patients as a group and also for each etiologic group separately. The same process was performed for the diagnosis of significant fibrosis and cirrhosis. In addition to the cytokines and chemokines, HA, collagen-IV and APRI were evaluated for fibrosis diagnosis and staging. Cutoff points were determined for each marker within each subcategory of inflammation and fibrosis. For each cutoff point, sensitivity (Se), specificity (Sp), and likelihood ratio (LR) were calculated. ROC curves were also calculated for the aminotransferases in order to enable the comparison with the investigated biomarkers in the diagnosis of inflammation.

Multiple logistic regression analysis was used to determine the relation between the biomarkers and liver fibrosis staging. Two classifications were used for staging fibrosis:

1) initial fibrosis (stages F0-F2) and significant fibrosis (stages F3-F6); and 2) no cirrhosis (stages F0-F4) and cirrhosis (stages F5-F6). The biomarkers that were significantly ($p < 0.25$) associated with the events in the univariate analysis were included in the logistic regression model $\log \left[\frac{\pi_1}{\pi_0} \right] = \alpha + \beta_i x_i$. The selection of the biomarkers was performed according to the stepwise method. From the final models, the odds ratios (ODs) of the selected predictors were calculated.

A two-sided p value of less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the SPSS 19.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

From a total of 225 patients, 14 were excluded due to insufficient material for histological analysis. From the remaining 211 patients, 111 (52.6%) were male and the mean age was 47 ± 12.1 (range, 18-74) years. The distribution of the patients according to the etiology of chronic liver disease was as follows: 104 (49.3%) chronic viral hepatitis without previous treatment (68 HCV and 36 HBV); 40 (19%), NAFLD; 50 (23.7%), autoimmune liver conditions (23 autoimmune hepatitis, 13 primary biliary cirrhosis and 14 primary sclerosing cholangitis); and 17 (8.1%) cryptogenic hepatic disease.

The number of portal tracts varied from five to 21 (mean, 8 ± 3). Ishak's score for inflammation varied from 0 to 15, and for fibrosis from 0 to 6.

The ROC curves of all serum cytokines and chemokines evaluated as potential markers of any grade, moderate/severe, or severe inflammation are shown in Figures 1, 2 and 3, respectively.

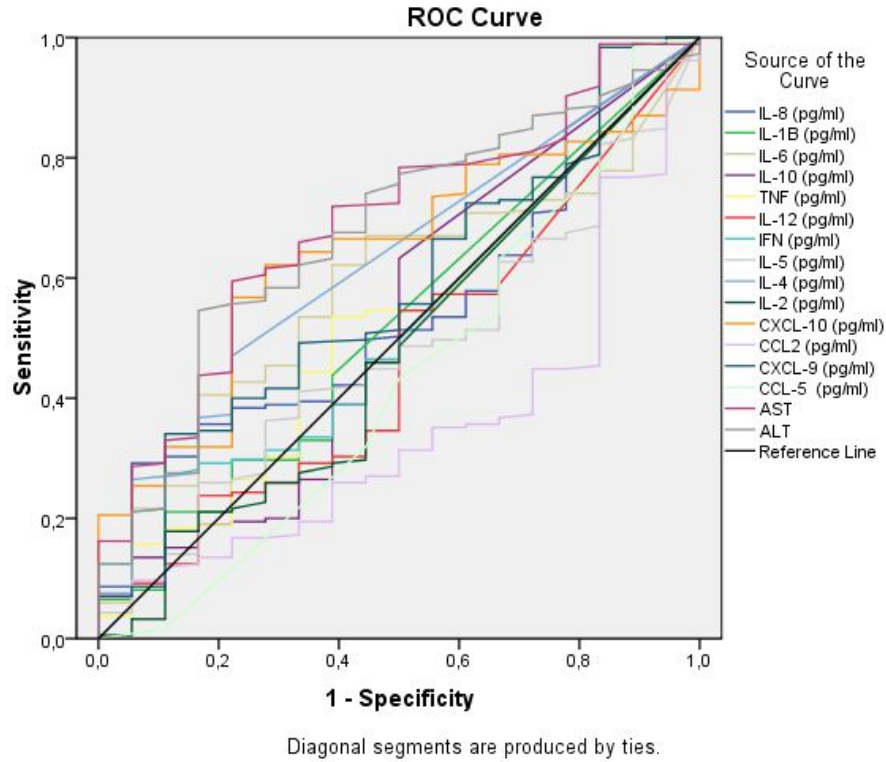


Fig.1. ROC curve of the serum levels of the aminotransferases, cytokines and chemokines for the diagnosis of any grade of inflammation (A0 vs. A1-A18).

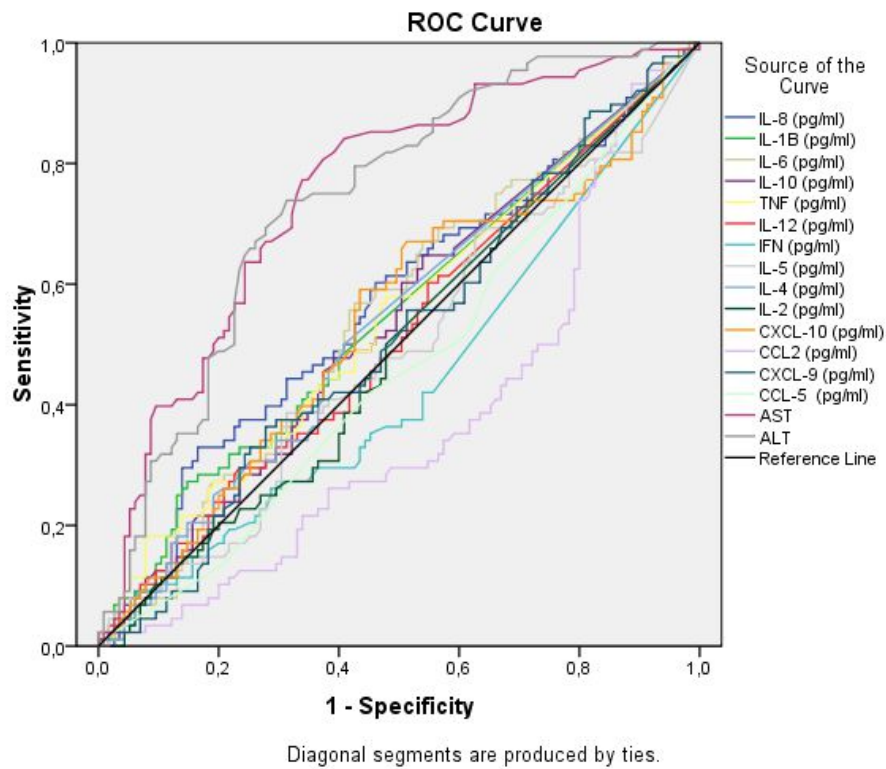


Fig.2. ROC curves of the serum levels of the aminotransferases, cytokines and chemokines for the diagnosis of moderate/severe inflammation (A0-A3 vs. A4-A18).

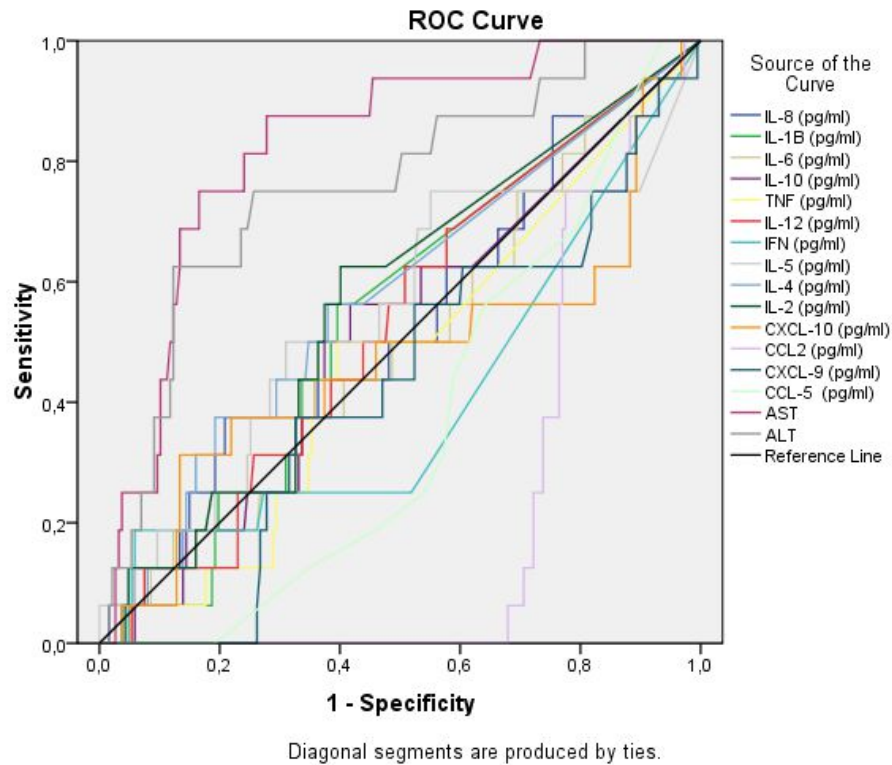


Fig.3. ROC curves of the serum levels of the aminotransferases, cytokines and chemokines for the diagnosis of severe inflammation (A0-A8 vs. A9-A18).

Considering all the patients as a group, the cytokines/chemokines evaluated as possible markers of inflammation for which the areas under the ROC curve (AUROC) were statistically significant or close to the significant p value are described in Table 1.

For the group with all patients with chronic liver diseases, CXCL10 presented significant AUROC for the diagnosis of any grade of inflammation. Serum levels of this chemokine over 410pg/ml presented a Sp of 95% and a likelihood ratio of 10. CCL2 presented significant AUROC for the diagnosis of any grade, moderate and severe inflammation, with negative correlations, indicating that the lower its serum level, the higher is the inflammation grading.

Table 1. Serum markers with best performance for the diagnosis of inflammation in patients with chronic liver diseases

All patients in one group (n: 211)					
Marker	AUROC (p)	Correlation coef.* (p)	Cut off (pg/ml)	Sp% (95%CI)	LR (95%CI)
Any grade of inflammation (A0 vs. A1-A18)					
CXCL10	0.64 (0.05)	+ 0.13 (0.03)	410	95 (92-97)	10.0 (4.9-15.3)
CCL2	0.66 (0.03)	- 0.20 (0.01)	160	95 (89-98)	3.3 (1.2-3.9)
Moderate/severe inflammation (A0-A3 vs. A4-A18)					
CCL2	0.64 (0.001)	- 0.30 (0.001)	150	95 (92-97)	5.0 (2.3-9.3)
Severe inflammation (A0-A8 vs. A9-A18)					
CCL2	0.79 (0.001)	- 0.30 (0.001)	40	94 (91-97)	12.0 (2-17)

*Spearman's correlation; AUROC: area under the receiver operating characteristic curve; coef.: coefficient; Sp: specificity; CI: confidence interval; LR: likelihood ratio.

When the patients were separated into groups according to the etiology of the liver disease, some markers presented a good Sp for the diagnosis of inflammation (Table 2). The markers with best performance were: for chronic viral hepatitis, INF γ , CCL2 and CXCL10; for autoimmune diseases, CCL2; and for cryptogenic disorders, IL-5, CXCL8 and CCL2. Once again, CCL2 presented a negative correlation in all these situations.

Table 2. Serum markers with best performance for the diagnosis of inflammation considering different etiologies

Patients according to etiologic groups					
Marker	AUROC (p)	Correlation coef.* (p)	Cut off (pg/ml)	Sp% (95%CI)	LR (95%CI)
Chronic viral hepatitis					
Moderate/severe inflammation (A0-A3 vs. A4-A18)					
INF- γ	0.63 (0.03)	- 0.10 (0.05)	22	95 (91-99)	2.0 (1.3-8.1)
CCL2	0.61 (0.05)	- 0.20 (0.05)	128	93 (88-98)	3.0 (1.4-10.0)
Severe inflammation (A0-A8 vs. A9-A18)					
CXCL-10	0.83 (0.03)	+ 0.10 (0.05)	460	86 (79-92)	5.4 (2.5-10.1)
Autoimmune					
Moderate/severe inflammation (A0-A3 vs. A4-A18)					
CCL2	0.66 (0.06)	- 0.30 (0.01)	121	93 (86-99)	4.0 (1.4-10.6)
Severe inflammation (A0-A8 vs. A9-A18)					
CCL2	0.73 (0.02)	- 0.20 (0.03)	35	82 (70-91)	4.0 (1.9-10.2)
Cryptogenic					
Moderate/severe inflammation (A0-A3 vs. A4-A18)					
IL-5	0.83 (0.02)	+ 0.50 (0.03)	5.0	90 (76-98)	4.5 (2.6-13.3)
CXCL8	0.84 (0.01)	- 0.25 (0.04)	22	95 (85-98)	2.0 (1.5-15.6)
CCL2	0.76 (0.07)	- 0.30 (0.01)	33	86 (70-97)	6.0 (1.8-13.5)

*Spearman's correlation; AUROC: area under the receiver operating characteristic curve; coef.: coefficient; Sp: specificity; CI: confidence interval; LR: likelihood ratio.

Figures 5 and 6 present the ROC curves of the cytokines/chemokines, HA, collagen-IV and APRI for the diagnosis of significant fibrosis and cirrhosis.

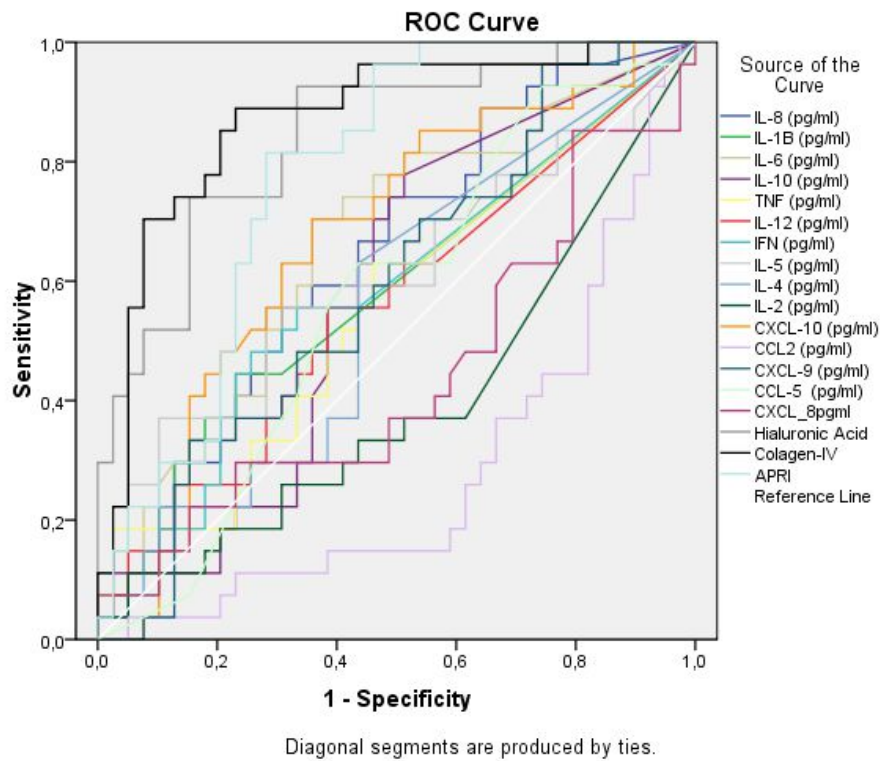
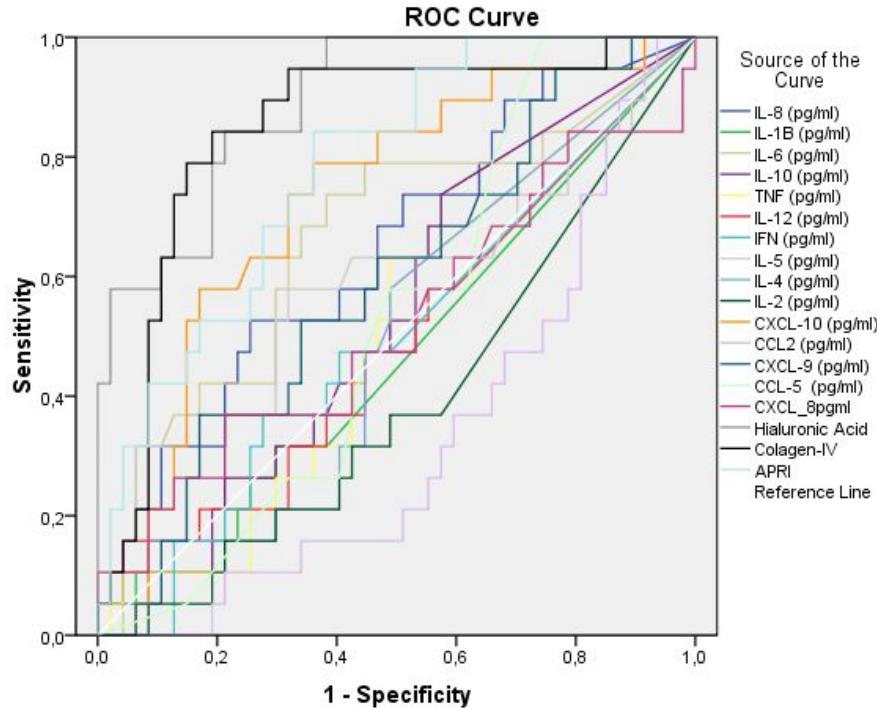


Fig. 5. ROC curves of the serum levels of cytokines/chemokines, hyaluronic acid, collagen-IV and aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) for the diagnosis of significant fibrosis (F0-F2 vs. F3-F6).



Diagonal segments are produced by ties.

Fig. 6. ROC curves of the serum levels of cytokines/chemokines, hyaluronic acid, collagen-IV and aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) for the diagnosis of cirrhosis (F0-F4 vs. F5-F6).

Considering all patients as a group, the serum markers evaluated as possible markers of significant fibrosis or cirrhosis for which the AUROC were statistically significant or close to the significant p value are described in Table 3 and 4.

HA, collagen-IV, APRI and CCL2 presented the best performance for the diagnosis of significant fibrosis or cirrhosis either when considering all the patients as a group (Table 3), or when the patients were grouped according to the etiology of the hepatic disorder (Table 4). Furthermore, CXCL-10 showed a good performance for the diagnosis of significant fibrosis and cirrhosis considering all patients as a group. It is noteworthy that CCL-2 presented a negative correlation with the fibrosis staging and a good Sp for the diagnosis of absence of significant fibrosis or cirrhosis, especially when all the patients were considered as a group.

Table 3. Serum markers with best performance for the diagnosis of fibrosis considering all patients as a group

All patients in one group (n: 211)

Marker	AUROC (p)	Correlation coef.* (p)	Cut off (pg/ml)	Sp% (95%CI)	LR (95%CI)
Significant fibrosis (F0-F2 vs. F3-F6)					
HA	0.84 (< 0.001)	+ 0.6 (< 0.001)	110	93 (90-96)	7.5 (2.3-12.2)
Collagen	0.88 (< 0.001)	+ 0.6 (< 0.001)	65	93 (90-96)	10.0 (3.1-18.7)
APRI	0.86 (< 0.001)	+ 0.6 (0.001)	1.4	90 (86-94)	7.0 (3.9-10.2)
CCL2	0.70 (< 0.001)	- 0.3 (0.01)	160	98 (96-99)	15.0 (1.9-20.6)
CXCL-10	0.64 (0.01)	+ 0.2 (0.01)	520	89 (85-93)	7.0 (4.8-11.0)
Cirrhosis (F0-F4 vs. F5-F6)					
HA	0.90 (<0.001)	+ 0.6 (< 0.001)	214	94 (91-97)	10.0 (3.2-21.7)
Collagen	0.85 (<0.001)	+ 0.5 (< 0.001)	94	92 (88-95)	7.0 (2.5-11.9)
APRI	0.85 (<0.001)	+ 0.5 (0.001)	2.0	90 (86-94)	7.0 (4.1-10.6)
CCL2	0.69 (0.001)	- 0.3 (0.01)	142	97 (95-99)	10.0 (2.5-15.2)
CXCL-10	0.68 (0.01)	+ 0.2 (0.01)	565	89 (85-93)	4.0 (2.2-7.3)

*Spearman's correlation; AUROC: area under the receiver operating characteristic curve; coef.: coefficient; Sp: specificity; CI: confidence interval; LR: likelihood ratio. APRI: aspartate aminotransferase to platelet ratio index. HA: hyaluronic acid.

Table 4. Serum markers with best performance for the diagnosis of fibrosis considering different etiologies

Patients separated in etiologic groups					
Marker	AUROC (p)	Correlation coef.* (p)	Cut off (pg/ml)	Sp% (95%CI)	LR (95%CI)
Chronic viral hepatitis					
Significant fibrosis (F0-F2 vs. F3-F6)					
HA	0.84 (0.01)	+ 0.6 (0.007)	134	92 (87-97)	8.0 (2.6-15.2)
Collagen	0.79 (0.03)	+ 0.5 (0.01)	77	92 (87-97)	5.0 (1.5-13.5)
APRI	0.93 (0.00)	+ 0.7 (0.001)	1.2	92 (87-97)	10.0 (4.4-16.7)
CCL2	0.67 (0.001)	- 0.2 (0.05)	140	96 (92-99)	4.0 (1.3-12.2)
Cirrhosis (F0-F4 vs. F5-F6)					
HA	0.98 (0.002)	+ 0.7 (< 0.001)	143	87 (80-93)	6.5 (1.6-13.4)
Collagen	0.89 (0.01)	+ 0.5 (0.001)	79	88 (82-94)	7.5 (2.1-14.7)
APRI	0.90 (<0.001)	+ 0.5 (0.05)	2.2	92 (87-97)	9.0 (3.6-18.3)
CCL2	0.66 (0.05)	- 0.2 (0.05)	130	93 (88-98)	3.0 (1.3-15.4)
NAFLD					
Significant fibrosis (F0-F2 vs. F3-F6)					
HA	0.84 (0.01)	+ 0.6 (0.01)	80	92 (84-100)	7.1 (1.9-19.8)
Collagen	0.86 (0.01)	+ 0.6 (0.07)	56	92 (84-100)	7.1 (1.9-19.8)
APRI	0.86 (<0.001)	+ 0.6 (0.01)	1.3	96 (90-100)	20.0 (12.8-34.2)
CCL2	0.68 (0.05)	- 0.3 (0.05)	150	82 (73-98)	3.5 (1.8-8.3)
Cirrhosis (F0-F4 vs. F5-F6)					
HA	0.78 (0.05)	+ 0.5 (0.05)	96	92 (84-100)	4.0 (1.3-21.3)
Collagen	0.93 (0.03)	+ 0.7 (0.001)	56	92 (84-100)	9.5 (1.6-16.9)
APRI	0.91 (<0.001)	+ 0.6 (0.01)	1.4	93 (85-100)	13.0 (3.9-16.5)
CCL2	0.71 (0.05)	- 0.3 (0.05)	140	89 (79-98)	4.0 (1.49-12.2)
Autoimmune					
Significant fibrosis (F0-F2 vs. F3-F6)					
HA	0.77 (0.04)	+ 0.5 (0.04)	190	90 (82-98)	4.5 (1.6-13.2)
Collagen	0.84 (0.01)	+ 0.6 (0.009)	43	90 (82-98)	5.0 (1.3-11.7)
APRI	0.76 (0.03)	+ 0.3 (0.05)	2.1	90 (82-98)	4.0 (1.9-9.1)

CCL2	0.77 (0.002)	- 0.5 (0.05)	130	95 (89-100)	3.3 (1.4-12.6)
Cirrhosis (F0-F4 vs. F5-F6)					
HA	0.93 (0.005)	+ 0.7 (0.002)	130	86 (76-95)	6.0 (2.4-19.7)
Collagen	0.77 (0.05)	+ 0.4 (0.07)	95	92 (85-99)	10.0 (2.2-16.9)
APRI	0.75 (0.02)	+ 0.3 (0.05)	2.3	90 (82-98)	7.0 (2.8-11.7)
CCL2	0.73 (0.03)	- 0.3 (0.05)	130	90 (82-98)	10.0 (2.8-21.3)
Cryptogenic					
Significant fibrosis (F0-F2 vs. F3-F6)					
HA	0.93 (0.01)	+0.8 (0.003)	95	67 (45-88)	3.0 (1.7-8.1)
Collagen	0.98 (0.006)	+ 0.87 (0.001)	41	83 (66-100)	5.2 (1.8-13.1)
APRI	0.76 (0.05)	+ 0.4 (0.08)	1.8	90 (78-96)	5.0 (1.7-11.4)
CCL2	0.68 (0.05)	- 0.4 (0.07)	150	86 (50-97)	2.0 (0.9-14.0)
Cirrhosis (F0-F4 vs. F5-F6)					
HA	0.89 (0.03)	+ 0.7 (0.01)	106	83 (66-100)	5.2 (1.8-21.0)
Collagen	0.86 (0.05)	+ 0.6 (0.05)	95	86 (70-100)	4.3 (1.6-19.3)

*Spearman's correlation; AUROC: area under the receiver operating characteristic curve; coef.: coefficient; Sp: specificity; CI: confidence interval; LR: likelihood ratio. APRI: aspartate aminotransferase to platelet ratio index. HA: hyaluronic acid.

The univariate analysis identified the following biomarkers as significant for the logistic model: TNF- α , IL1, IL2, IL4, IL5, CXCL10, CCL2 and CXCL8. These pre-select variables were included in the final multiple logistic regression model.

Considering the first classification of fibrosis, i.e. initial fibrosis (F2-F0) versus significant fibrosis (F3-F6) in the groups of viral hepatitis, NAFLD and autoimmune conditions, the logistic model adjusted only for CCL2 as a marker of fibrosis in the groups of chronic viral hepatitis and autoimmune liver disorders (Tables 5).

Table 5. Multiple regression analysis comparing initial fibrosis and significant fibrosis in the virus and autoimmune groups in relation to CCL2

	β coefficient	SD	Z score	P
Intercept	-0.18	0.38	-0.47	0.635
CCL2 (virus)	-0.56	0.22	-2.48	0.013
Intercept	0.49	0.42	1.16	0.247
CCL2 (AI)	-1.07	0.37	-2.85	0.004

SD: standard deviation; virus: chronic viral hepatitis B or C. AI: autoimmune liver disorders.

The odds ratios (ORs) were calculated from the final model. For the viral group, the OR was 0.57 (95% CI = 0.36-0.89) and for the autoimmune disorders group, 0.34 (95% CI = 0.16-0.71).

Considering the second classification, i.e. no cirrhosis (F0-F4) versus cirrhosis (F5-F6), the regression analysis adjusted for IL-4 and CCL2 as markers of fibrosis in the groups of chronic viral hepatitis and NAFLD, respectively (Table 6).

Table 6. Multiple regression analysis comparing no cirrhosis and cirrhosis in the virus group in relation to IL-4, and in the NAFLD group in relation to CCL2

	β coefficient	SD	Z score	P
Intercept	-1.45	0.33	-4.39	0.000
IL-4 (virus)	-0.73	0.36	-2.00	0.046
Intercept	-0.17	0.61	-0.29	0.771
CCL2 (NAFLD)	-0.67	0.34	-1.95	0.51

SD: standard deviation; virus: chronic viral hepatitis; NAFLD: nonalcoholic fat liver disease.

The OR, calculated from the final model, for the virus group regarding IL-4 was 0.48 (95% CI = 0.23-0.99) and for the NAFLD regarding CCL2 was 0.51 (95% CI = 0.26-1.00).

Discussion

In the current study we evaluated the serum levels of cytokines and chemokines as surrogate markers of liver inflammation and fibrosis. Additionally, we tested the performance of APRI, and serum concentrations of HA and collagen-IV for the diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. None of the evaluated cytokines/chemokines performed better than the aminotransferases for the diagnosis of hepatic inflammation, and neither for the diagnosis of fibrosis in comparison to HA, collagen-IV and APRI.

We also investigated the relation between the cytokines/chemokines and the fibrosis staging. The results suggest more important involvement of CCL2 and IL-4 in the initial phases of the fibrosis in the patients with chronic viral hepatitis. Likewise, CCL2 seems to have a more significant participation in the early stages of fibrosis in NAFLD patients.

The studies comparing serum levels of cytokines and chemokines with liver histology in humans are scarce and their results are contradictory. Some studies demonstrated association between specific markers and inflammation or fibrosis in a particular situation or disease, while other studies do not support these findings.^{17-19,27-33,39-41}

In our study, from a panel of cytokines and chemokines, CCL2 and CXCL10 appeared as the most promising biomarkers associated with liver inflammation and fibrosis. A remarkable finding was the fact that CCL2 presented a negative correlation with both grade of inflammation and stage of fibrosis. This chemokine showed a high Sp for the diagnosis of absence of the different grades of inflammation and fibrosis, especially when all the patients were analyzed as a group. More than a surrogate marker, this finding may indicate a central role of CCL2 in the pathogenesis of the chronic liver diseases. Furthermore, we observed that IL-4, IL-10, INF- γ , CXCL-9 may help identifying liver inflammation or fibrosis in specific situations.

CCL2 is among the most extensively studied chemokines in liver diseases. Its importance in the orchestration the innate immune response is well established. It has also been investigated as a prognostic marker of the efficacy of the antiviral treatment in chronic C hepatitis;⁴²⁻⁴³ potential marker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma;⁴⁴ predictor of prolonged survival in patients with resectable tumors;⁴⁵ and as a marker of early allograft dysfunction post liver transplant.⁴⁶

CCL2 has a central role in the recruitment of different cell types such as monocytes, macrophages, NK cells and lymphocytes via its receptor CCR2. The primary sources of hepatic CCL2 are injured hepatocytes, activated Kupffer cells, hepatic stellate cells and liver sinusoidal endothelial cells.⁴⁷⁻⁴⁸ During liver injury, CCL2 levels in the serum rises and stimulates monocytic hematopoiesis, increasing differentiation and production of the monocyte/macrophage lineages. As CCL2 levels in the liver become higher than in the

blood, it establishes a gradient driving macrophage egress from the bone marrow. Macrophages have distinctive roles in liver injury. Their involvement is critical in phagocytosing necrotic cells, secreting cytokines and growth factors, and recruiting inflammatory cells. Additionally, macrophages assist in the reparative phase leading to hepatic remodeling and returning to normal function.⁴⁹⁻⁵³

In the current study, CCL2 presented a negative correlation with both histological inflammation and fibrosis. This finding may point towards a hepatoprotective role of this chemokine, or the serum levels may not reflect high hepatic concentrations of this biomarker. Similar findings were observed in previous studies⁵⁴⁻⁵⁶. In a mouse model of T-cell mediated hepatitis induced by concanavalin A, CCL2 was demonstrated to have a hepatoprotective role. Pretreatment of the mice with anti-CCL2 anti-serum resulted in enhanced hepatic injury demonstrated by biochemical and histopathological parameters. The hepatoprotective role of CCL2 in this model was associated with suppression of IL-4 production by a specific T cell lineage (CD3⁺NK1.1⁺).⁵⁴ A hepatoprotective effect of CCL2 was also demonstrated in a murine model of hepatic viral infection. Those authors suggested that resident F4/80⁺ liver leukocytes respond to IFN- γ stimulation producing CCL2 and the presence of this chemokine was associated with infection control and improvement of the biochemical and histological abnormalities. All CCL2⁻ and CCR2⁻ knockout mice succumbed to the lethal effects of the infection.⁵⁵

However, other studies point towards a pro inflammatory and pro fibrogenic role of CCL2⁵⁷⁻⁵⁹. Two recent trials in murine models showed that antagonizing CCL2 decreases liver inflammation and accelerates fibrosis regression; however, in a study in which CCL2 deficient mice were evaluated, the liver inflammation was not affected.⁶⁰⁻⁶²

These differences may be, at least partially, related to the different murine models of liver disease used in the diverse studies, which may lead to different patterns of immune response. Another point of interest is the genetic background. In a murine model of steatohepatitis, knockout CCL2 mice behave differently according to their genetic background. According to the study by Galastri et al.,⁶³ in Balb/C mice, the absence of CCL2 resulted in worsening of inflammation, whereas in the C57Bl/6 mice, neither ALT levels nor inflammation or fibrosis were significantly different comparing to the controls (wild type). These observations suggest that different physiopathology, cellular targets

involved and genetic background may be responsible for the contradictory results in the different studies.

CXCL10 is a ligand of the receptor CXCR3 and composes the CXCL9-11/CXCR3 axis which is induced by IFN- γ . CXCL10 main role is the recruitment of lymphocytes to the liver during injury. Some studies showed that in patients with chronic liver disease, intrahepatic levels of both CXCR3 and its ligands are increased, and correlate with the severity of the hepatic disorder, mostly in patients with chronic C hepatitis.²⁷⁻³¹ One investigation showed that serum levels of CXCL10 was higher in patients with chronic liver disease of different etiologies when compared to healthy controls, and were significantly associated with the histological severity of the liver fibrosis, Child-Pugh score and complications of the portal hypertension.³² In other studies, CXCL10 correlated with fibrosis stage, necroinflammatory score, and was an independent predictor of moderate fibrosis and cirrhosis in post-transplant patients.³³⁻³⁴ In our study, CXCL10 demonstrated a significant AUROC for the diagnosis of inflammation, significant fibrosis, and cirrhosis in the group of patients with chronic liver disease of different etiologies, with a positive correlation. These results were also demonstrated regarding severe inflammation in the subgroup of patients with chronic viral hepatitis. On the other hand, studies in mouse models of chronic hepatic diseases demonstrated a hepatoprotective role of CXCL10, which led the authors to speculate that increased expression of CXCR3 ligands could be part of a counter-regulatory response during chronic liver diseases.³⁵⁻³⁷ These contrasting results may result from the balance between subpopulations of effector and regulatory T-cells in different situations. On one side, effector lymphocytes contribute to perpetuation and aggravation of the liver disease; but, on the other side, Th1-polarized T cells, which provide a protective immune response, are rapidly recruited to the liver after injury in a directly dependence on CXCR3.³⁸

Our results regarding CCL2 and CXCL10, together with previous reports, point towards the difficulty in establishing whether a single chemokine is protective or injurious. Some authors hypothesize that the specific disease process and the chemokine/cytokine profile may determine the relative contribution of each cell type, and whether inhibition of a single peptide or its correlated receptor will be protective or injurious, further highlighting the multidimensional approach required to understand the function of any chemokine axis.⁴⁸

This observation suggests that it is probably not sufficient to simply consider the chemokine-dependent attraction of immune cells without addressing their functionality and network correlations in the context of chronic liver diseases.

Finally, in our study, although according to the ROC curves some cytokines and chemokines presented a good performance for the diagnosis of liver inflammation and fibrosis, they did not perform better than the aminotransferases for the diagnosis of the different levels of liver inflammation and neither performed better than the three specific fibrosis markers HA, collagen-IV and APRI for the diagnosis of liver fibrosis.

Conclusions

CCL2 and CXCL10 are important biomarkers of inflammation and fibrosis in patients with chronic liver disease. CXCL10 correlated positively with the grade of inflammation and fibrosis; and, CCL2 correlated negatively with both types of lesion. IL-4, IL-10, INF- γ , CXCL-9 deserve further investigation to confirm or refute their usefulness in specific situations. None of the cytokines/chemokines evaluated performed better than the aminotransferases for the diagnosis of hepatic inflammation and neither for the diagnosis of fibrosis in comparison to HA, collagen-IV and APRI. Studies comparing serum and intrahepatic cytokines/chemokines levels with liver inflammation and fibrosis may contribute to further understand the physiopathology of the hepatic damage in chronic liver diseases, and also to the development of methods that enable better characterization of inflammation and fibrosis in these disorders.

References

1. McAvoy NC, Hayes PC. The cirrhosis epidemic in the UK: evaluating the causes in a European context. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2007;1:51-55.
2. Kim WR, Brown RS Jr, Terrault NA, et al. Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. *Hepatology* 2002;36:227-242.
3. Blachier M, Leleu H, Radosavljevic MP, et al. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 2013;58:593-608.
4. Asrani SK, Kamath PS. Natural history of cirrhosis. *Curr Gastroenterol Rep* 2013;308:1-6.

5. Elpek GO. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol* 2014;23: 7260-7276.
6. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2011; 25:195-206.
7. Zois CD, Baltayiannis GH, Karayianes P et al. Systematic review: hepatic fibrosis – regression with therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:1175–1187.
8. Cadranel JF, Rufat P, Degos F. Practices of Liver Biopsy in France: Results of a Prospective Nationwide Survey. *Hepatology* 2000;32: 477-481.
9. McGill DB, Rakela J, Zinsmeister AR, et al. A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. *Gastroenterology* 1990;99:1396-1400.
10. Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, et al. Complications following percutaneous liver biopsy: a multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J Hepatol* 1986;2:165-173.
11. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Current Concepts: Liver Biopsy. *N Engl J Med* 2001;344:495-500.
12. Harinath S, Srinivas S, Cary C, et al. Liver Biopsy: Evolving Role in the New Millennium. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:603-610.
13. Fallahi P, Ferri C, Ferrari S, et al. Cytokines and HCV-Related Disorders. *Clin Dev Immunol* 2012;468107:1-10.
14. Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* 2010;30:215-225.
15. Saiman Y, Friedman S. The role of chemokines in acute liver injury. *Front Physiol* 2013;213:1-13.
16. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-127.
17. Akcam FZ, Tigli A, Kaya O, et al. Cytokine levels and histopathology in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res.* 2012;32:570-574.
18. Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, et al. Relationship between serum cytokine levels and histopathological changes of liver in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005;11:3260-3263.
19. Bahcecioglu IH, Yalniz M, Ataseven H, et al. Levels of serum hyaluronic acid, TNF-alpha and IL-8 in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology* 2005;52:1549-1553.

20. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518-526.
21. Ishak KG, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699.
22. Shiha G, Zalata K. Ishak versus METAVIR: Terminology, Convertibility and Correlation with Laboratory Changes in Chronic Hepatitis C. *Liver Biopsy*, 2011. Available from: <http://www.intechopen.com/books/liver-biopsy/ishak-versus-metavirterminology-convertibility-and-correlation-with-laboratory-changes-in-chronic-h>.
23. Theise ND. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach. *Mod Pathol* 2007;20:3-14.
24. Chen R, Lowe L, Wilson JD, et al. Simultaneous quantification of six cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chem* 1999;9:1693-1694.
25. Tamok A, Hamsch J, Chen R, et al. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clin Chem* 2003;49:1000-1002.
26. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α + monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 2006;146:124-132.
27. Zeremski M, Dimova R, Brown Q, et al. Peripheral CXCR3 associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2009;200:1774-1780.
28. Apolinario A, Majano PL, Alvarez Perez E, et al. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2861-2870.
29. Zeremski M, Dimova R, Astemborski J. CXCL9 and CXCL10 chemokines as predictors of liver fibrosis in a cohort of primarily african-american injection drug users with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 2011;204:832-836.
30. Reiberger T, Aberle JH, Kundi M. IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non response in HIV-HCV coinfection. *Antivir Ther* 2008;13:969-976.

31. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, et al. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008;48:1440-1450.
32. Tacke F, Zimmermann HW, Berres ML, et al. Serum chemokine receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases. *Liv Int* 2011;31:840-849.
33. Joshi D, Carey I, Foxton M. CXCL10 levels identify individuals with rapid fibrosis at 12 months post-transplant for hepatitis C virus and predict treatment response. *Clin Transplant* 2014;28:569-578.
34. Berres ML, Trautwein C, Schmeding M. Serum chemokine CXC ligand 10 predicts fibrosis progression after liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 2011;53:596-603.
35. Santodomingo-Garzon T, Han J, LE T, et al. Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXC receptor 3-positive regulatory T cells to the liver in mice. *Hepatology* 2009;49:1267-1276.
36. Casrouge A, Decalf J, Ahloulay M, et al. Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 2011;121:308-317.
37. Larson CLB, Hogaboam CM, Evanhof H, et al. IFN- γ -Inducible Protein-10 (CXCL10) Is Hepatoprotective During Acute Liver Injury Through the Induction of CXCR2 on Hepatocytes. *J Immunol* 2001;167:7077-7083.
38. Erhardt A, Wegscheid C, Claass B et al. CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis. *J Immunol* 2011;186:5284-5293.
39. Lapinski TW. The levels of IL-1beta, IL-4 and IL-6 in the serum and the liver tissue of chronic HCV infected patients. *Arch Immunol Ther Exp* 2001; 49:311-316.
40. Verma V, Chakravarti A, Kar P. Cytokine levels of TGF-beta, IL-10 and sTNFalphaRII in type C chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 2008;53:2233-2237.
41. Hassoba H, Leheta O, Sayed A. IL-10 and IL-12p40 in Egyptian patients with HCV related chronic liver disease. *Egypt Immunol* 2003;10:1-8.
42. Panasiuk A, Prokopowicz D, Panasiuk B. Monocyte chemotactic protein-1 and soluble adhesion molecules as possible prognostic markers of the efficacy of

- antiviral treatment in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2004;10:3639-3642.
43. Wright H, Philip A, Nguyen T, et al. Multiplex Cytokine Profiling of Initial Therapeutic Response in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Dig Dis Sci* 2005;50:1793-1803.
 44. Wang W, Ang SF, Kumar R, et al. Identification of serum monocyte chemoattractant protein-1 and prolactin as potential tumor markers in hepatocellular carcinoma. *PLOS ONE* 2013;7 e68904. www.plosone.org
 45. Chew V, Chen J, Lee D et al. Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2012. 61:427-438.
 46. Friedman BH, Wolf JH, Wang L. Serum cytokine profiles associated with early allograft dysfunction in patients undergoing liver transplantation. *Liv Transpl* 2012;18:166-176.
 47. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125-172.
 48. Saiman Y, Friedman SL. The role of chemokines in acute liver injury. *Front Physiol* 2012;3:1-12.
 49. Gunn MD, Nelken NA, Liao X, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J Immunol* 1997;158:376-383.
 50. Chen X, Xu C, Zhang F, et al. Comparative analysis of expression profiles of chemokines, chemokines receptors, and components of signaling pathways mediated by chemokines in eight cell types during rat liver regeneration. *Genome* 2010;53:608-618.
 51. Karlamark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1⁺ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 2010;50:261-274.
 52. Dambach DM, Watson LM, Gray K, et al. Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* 2002;35:1093-1103.

53. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin Invest* 2005;115:56–65.
54. Ajuebor MN, Hogaboam CM, Le T et al. C-C chemokines ligand2/monocyte chemoattractant protein-1 directly inhibits NKT cell IL-4 production and is hepatoprotective in T cell-mediated hepatitis in the mouse. *J Immunol* 2003; 170:5252-5259.
55. Hokeness KL, Kuziel WA, Biron C, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J Immunol* 2005;174:1549-1556.
56. Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhauser ML, et al. Exaggerated hepatic injury due to acetaminophen challenge in mice lacking C-C chemokine receptor 2. *Am J Pathol* 2000;156:1245-1252.
57. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, et al. Chemokine-chemokine receptor CCL2-CCR2 and CX3CL1-CX3CR1 axis may play a role in the aggravated inflammation in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2014;59:358-364.
58. Farci P, Wollenberg K, Dias G, et al. Profibrogenic chemokines and viral evolution predict rapid progression of hepatitis C to cirrhosis. *Proc Nat Acad Sci* 2012;109:14562-14567.
59. Miura K, Yang L, Van Rooijen N, et al. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol* 2012;302:1310-1321.
60. Baeck C, Wei X, Barneck M, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif ligand 2 accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6c⁺ macrophage infiltration in mice. *Hepatology* 2014;59:1060-1073.
61. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 2012;61:416-426.
62. Kassel KM, Guo GL, Tawfik O, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency does not affect steatosis or inflammation in livers of mice fed a methionine-choline-deficient diet. *Lab Invest* 2010;90:1794-1804.
63. Galastri S, Zamara E, Milani S. Lack of CC chemokine ligand 2 differentially affects inflammation and fibrosis according to the genetic background in a murine model of steatohepatitis. *Clin Sci* 2012;123:459-471.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1. Principais achados do estudo

O valor da mediana do nível sérico das citocinas e quimiocinas estudadas (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) apresentou-se mais elevado nos pacientes com doença hepática crônica quando comparados aos indivíduos do grupo controle.

O perfil das citocinas e quimiocinas estudadas apresentou diferenças de acordo com o grupo etiológico estudado.

De acordo com a mediana do nível sérico, os níveis séricos da quimiocina CXCL10 foram mais elevados nos grupos de pacientes com hepatites virais e doenças autoimunes quando comparados aos pacientes com DHGNA. Os níveis séricos de CCL2 foram mais elevados em pacientes com DHGNA quando comparados aos pacientes dos grupos de doenças autoimunes e criptogênicas e nos pacientes do grupo de hepatites virais quando comparados aos pacientes com doenças autoimunes.

Por meio da determinação do perfil de alto e baixo produtores demonstrado pelos gráficos em radar, os seguintes biomarcadores apresentaram-se em mais de 50% dos indivíduos alto produtores, nos respectivos grupo:

- Grupo com todos os pacientes com doenças hepáticas de diversas etiologias: IL-6, TNF- α , IL-12, IL-5, IL-10, CCL2, CCL5, CXCL8 e CXCL9.
- Grupo de pacientes com hepatites virais: IFN- γ , IL-2, CCL2, CCL5, CXCL9 e CXCL10.
- Grupo de pacientes com DHGNA: TNF- α , IL-5, IL-6, IL-12, CCL2, CCL5, CXCL8 e CXCL9.
- Grupo de pacientes com doença hepática autoimune: IL-2, IL-6, IL-12, IL-10, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10.
- Grupo de pacientes com doença criptogênica: TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10 e CXCL8.

De acordo com as redes de correlações observou-se uma intensa ativação das citocinas e quimiocinas em pacientes com DHC, apresentando a IL-2, posição hierárquica.

Dentre os quatro grupos etiológicos estudados, o grupo formado por pacientes com hepatites virais apresentou a rede mais intensa e complexa, seguida pela rede do grupo de pacientes com doenças autoimunes. Os grupos de pacientes com DHGNA e doença criptogênica apresentaram correlações menos intensas quando comparados aos dois grupos anteriores.

Em todos os grupos, as redes demonstraram correlações entre as citocinas da resposta imune inata, citocinas regulatórias e inflamatórias e quimiocinas.

Os resultados da análise de regressão logística indicaram uma maior participação das quimiocinas CXCL10 e CCL2 no grupo de pacientes com hepatites virais e CXCL8 nos grupos de pacientes com DHGNA e doenças autoimunes.

Na comparação entre os níveis séricos dos biomarcadores e o grau de inflamação observado nas biópsias hepáticas, identificou-se AUROC estatisticamente significativas nas seguintes situações:

- No grupo formado por todos os pacientes com doença hepática crônica, as quimiocinas CXCL10 e CCL2;
- No grupo de pacientes com hepatites virais: INF- γ , CCL2 e CXCL10.
- No grupo de pacientes com doenças autoimunes: CCL2.
- No grupo de pacientes com doença criptogênica: IL-5, CXCL8 e CCL2.

Nenhuma das citocinas/quimiocinas apresentou desempenho superior àqueles das aminotransferases no diagnóstico de inflamação.

Os principais marcadores relacionados a fibrose hepática, de acordo com a AUROC, foram o AH, colágeno-IV, APRI, CCL2 e CXCL10.

O desempenho das citocinas e quimiocinas foi inferior ao do AH, colágeno-IV e APRI para o diagnóstico do estágio de fibrose hepática.

De acordo com a análise de regressão logística, a quimiocina CCL2 apresentou participação mais significativa na fibrose inicial (F0-F2) nos grupos de pacientes com hepatites virais e doenças autoimunes na comparação F0-F2 vs F3-F6.

No mesmo sentido, IL-4 no grupo de pacientes com hepatites virais e CCL2 no grupo de pacientes com DHGNA apresentaram maior participação nos casos de fibrose sem cirrose, quando comparados os estádios F0-F4 vs F5-F6.

5.2. Limitações do estudo

Trata-se de estudo transversal, com única dosagem sérica de cada biomarcador por paciente, não permitindo análise evolutiva.

As citocinas e quimiocinas são peptídeos que sofrem influência de outros estados patológicos que podem ter fugido ao controle do pesquisador e influenciado os resultados das dosagens séricas.

O número de pacientes, embora relativamente grande, foi pequeno para permitir que fossem formados grupos etiológicos mais específicos. .

5.3. Perspectivas

Os avanços recentes no conhecimento dos mecanismos patogênicos da fibrogênese hepática têm sido notáveis nas últimas décadas e têm produzido mudanças realísticas nos paradigmas, como a reversibilidade da fibrose e até mesmo da cirrose hepática. Com isso pode-se tornar possível o tratamento antifibrótico específico para pacientes com doença hepática crônica avançada de diversas etiologias. Este novo e promissor cenário demanda maior conhecimento das interações celulares responsáveis pela resolução ou perpetuação do processo de injúria hepática, assim como o desenvolvimento de métodos de monitorização dos processos dinâmicos de inflamação e fibrose hepática (fibrogênico e fibrolítico), o que constitui um dos principais desafios da hepatologia moderna.

Para o futuro próximo, é necessário aprofundar-se na investigação do perfil ou assinatura de citocinas e quimiocinas e no estudo de suas correlações, assim como na determinação dos possíveis resultados do bloqueio ou estímulo de um ou mais destes peptídeos. O papel das citocinas e quimiocinas como marcadores substitutos da inflamação e fibrose é também ainda controverso. Existem inúmeros estudos publicados, mas não há uma uniformidade na metodologia, nos critérios de inclusão dos pacientes e nos objetivos investigados. Há carência de estudos prospectivos em coortes bem definidas.

APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: DESEMPENHO DE TESTES NÃO-INVASIVOS PARA AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM HEPATOPATIA CRÔNICA.

Introdução e objetivo do estudo

Prezado(a) paciente,

Sr(a) _____

Você foi convidado(a) para participar de um projeto de pesquisa sobre a avaliação do grau de inflamação e fibrose no fígado através de resultados de exames colhidos no sangue.

Normalmente, a inflamação e a fibrose (cirrose) no fígado são avaliadas por meio da biópsia hepática. A biópsia é um procedimento invasivo, que acarreta riscos de complicações. Essa pesquisa tem como objetivo, verificar a possibilidade de medir o grau de inflamação e fibrose por meio dos resultados de exames laboratoriais, colhidos no sangue.

Procedimentos

Serão utilizados resultados de exames registrados na sua papeleta (exames de sangue e biópsia hepática). No dia da realização da biópsia, será puncionada uma veia periférica (do braço). Este procedimento faz parte da rotina do serviço e serve para garantir uma via de administração rápida de soro ou medicamentos, caso isso seja necessário. Por exemplo, pode ser administrado remédio para dor logo após a biópsia. No momento dessa punção, será colhida uma amostra de sangue para realização de alguns exames que não constam da rotina de atendimento. A quantidade de sangue retirada é mínima (10ml), não trazendo nenhum risco ou prejuízo à saúde.

Benefícios

A realização deste estudo poderá trazer um melhor conhecimento sobre o processo de inflamação e fibrose que ocorre no fígado durante uma doença. Desta forma, estudaremos alternativas à biópsia para a avaliação do grau de inflamação e fibrose. Se isso se tornar possível, poderemos restringir o uso da biópsia hepática, reduzindo, assim, suas complicações. Os resultados dos exames serão disponibilizados aos médicos assistentes assim como aos pacientes e serão utilizados apenas para este estudo. Caso novos estudos forem realizados, um novo termo de consentimento será solicitado.

Riscos

Não há nenhum tipo de risco relevante à saúde em consequência da sua participação no estudo. As complicações relacionadas à punção da veia periférica são raras e constituem-se em dor e formação de hematoma no local da punção. As complicações possíveis após a biópsia são dor no local da punção, dor no ombro direito, hipotensão arterial e raramente

sangramento intra abdominal. Ressalta-se que a biópsia hepática está sendo realizada por indicação clínica e não para efeitos de pesquisa.

Confidencialidade das informações

Seu nome não será divulgado em momento algum. A única pessoa que terá acesso aos seus dados será o seu médico.

Participação voluntária no estudo

Sua participação nesse estudo é voluntária. Se você assinar este termo, significa que você concorda com a utilização destes dados para esta pesquisa. Você pode recusar participar ou voltar atrás na sua decisão em qualquer momento sem que isto lhe cause qualquer prejuízo, inclusive no seu acompanhamento.

Não haverá qualquer tipo de pagamento ou recompensa individual para a participação neste estudo.

Para qualquer esclarecimento, por favor, entre em contato com o Dr. Osvaldo Flávio de Melo Couto, no Ambulatório de Fígado, todas as quintas-feiras de 13:00h às 17:00h, ou pelo Telefone: 91470089, ou por email: ofmcouto@medicina.ufmg.br. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG para informações sobre o projeto.

Endereço do Ambulatório de Fígado:
Ambulatório Bias Fortes. Alameda Álvaro Celso, 110, 5º andar.
Bairro Santa Efigênia, BH - MG

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP)
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627
Prédio da Reitoria – 7º andar sala 7018 – BH – MG
Tel: 3409 4592 email: coep@prpq.ufmg.br

O que significa sua assinatura

Ao assinar este documento você demonstra ter entendido as informações sobre o estudo e estar disposto a participar do projeto descrito na página anterior.

Eu, _____, após ser esclarecido sobre o projeto de pesquisa, concordo em participar do estudo acima.

Dr. Osvaldo Flávio de Melo Couto

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

ANEXO 1



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

Parecer nº. ETIC 0637.0.203.000-09

Interessado(a): Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de abril de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Desempenho de testes não-invasivos para avaliação da inflamação e fibrose hepáticas em pacientes com hepatopatia crônica**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG