

Oswaldo Flávio de Melo Couto

Validação e comparação de testes laboratoriais simples como preditores de fibrose hepática em portadores de hepatite C crônica

Trabalho em formato de coletânea de artigos apresentado ao curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em medicina.

Orientadora: Prof.^a Rosângela Teixeira

Co-orientadora: Prof.^a Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

PROFESSOR RONALDO TADÊU PENA

VICE-REITORA

PROFESSORA HELOISA MARIA MURGEL STARLING

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

PROFESSOR JAIME ARTURO RAMIREZ

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

PROFESSOR CARLOS ALBERTO PEREIRA TAVARES

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA:

PROFESSOR FRANCISCO JOSÉ PENNA

VICE-DIRETOR:

PROFESSOR TARCIZO AFONSO NUNES

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

PROFESSOR CARLOS FARIA SANTOS AMARAL

COLEGIADO DA PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

PROFESSOR CARLOS FARIA SANTOS AMARAL (COORDENADOR)

PROFESSORA MARIA DA CONSOLAÇÃO VIEIRA MOREIRA

PROFESSOR ANTÔNIO CARLOS MARTINS GUEDES

PROFESSOR NILTON ALVES REZENDE

PROFESSORA SUELY MEIRELES REZENDE

REPRESENTANTE DISCENTE: ELIZABETE ROSÁRIA DE MIRANDA

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 amor; sem os quais, nada disso teria sido possível.

Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Prof.^a Rosângela Teixeira, por ajudar a lapidar a idéia inicial e pelo apoio e incentivo constantes e Prof.^a Teresa Cristina de Abreu Ferrari por me guiar com maestria pelos difíceis caminhos da metodologia científica. Para elas fica o registro de um agradecimento especial e da minha admiração.

Aos meus grandes amigos da equipe de gastroenterologia, nutrologia (...e hepatologia...) dos hospitais Vera Cruz e Lifecenter, pelo apoio, compreensão e ensinamentos diários: Dr. José Carlos Couto, Dra. Célia Couto, Dr. Alduir Bento, Dr. Marcos Paulo Taranto, Dr. Lincoln Antinossi e Nutricionista Sílvia Ferolla.

Aos colegas do Instituto Alfa de Gastroenterologia, em especial aos amigos do ambulatório de fígado: Dra. Cláudia Couto e todos os médicos residentes e voluntários com os quais tive a oportunidade de dividir experiências e aprendizados durante os últimos cinco anos.

Às Prof.^a Lúcia Porto e Prof.^a Virgínia Rios, pela paciente e imprescindível ajuda na revisão das lâminas e pelos ensinamentos neste trabalho e nas reuniões do grupo de fígado.

Aos acadêmicos de medicina que participaram em vários momentos do trabalho, em especial às futuras colegas Tatiana Espíndola e Simone Vargas.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, em especial à Dra. Silvana Araújo, Dr. Guilherme Santiago, Dr. Carlos Bomtempo.

Às secretárias do quinto andar e aos funcionários do Serviço de Atendimento Médico e Estatística do anexo Bias Fortes do Hospital das Clínicas da UFMG.

Aos Professores Carlos Faria dos Santos Amaral, José Renan da Cunha Melo e René Mendes que, de forma especial e em momentos diferentes, contribuíram para minha formação acadêmica.

*“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

Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de abreviaturas	
Resumo	
Summary	

PARTE 1 – ARTIGO DE REVISÃO

1. Introdução.....	16
2. Fibrogênese hepática.....	17
3. A biópsia hepática como método de avaliação da fibrose.....	19
3.1 Limitações da biópsia hepática.....	20
4. Métodos não-invasivos de avaliação da fibrose hepática.....	22
4.1 Testes simples ou indiretos.....	23
4.1.1 Contagem de plaquetas.....	23
4.1.2 Aminotransferases.....	25
4.1.3 Modelos matemáticos com base em testes simples.....	27
4.2 Testes complexos ou diretos.....	32
5. Discussão.....	42
6. Referências bibliográficas.....	48

PARTE 2 – ARTIGO ORIGINAL

1. Introdução.....	58
2. Pacientes e Métodos.....	61
2.1. Classificação histopatológica.....	62
2.2. Marcadores e modelos.....	62
2.3. Análise estatística.....	62
3. Resultados.....	64
3.1. Validação do desempenho dos testes a partir dos pontos de corte descritos nos estudos originais.....	66
3.2. Avaliação do desempenho dos testes segundo o resultado dicotômico.....	69
3.2.1. Avaliação dos testes a partir de ponto de corte definido pelo percentil 95%.....	69

3.2.2. Avaliação dos testes a partir de ponto de corte definido pela curva TG-ROC.....	71
3.2.3. Avaliação dos testes a partir de dois pontos de corte definidos a partir da curva ROC.....	74
4. Avaliação do desempenho dos testes por faixa de valores definidas a partir de razões de verossimilhança.....	78
5. Discussão.....	80
5.1. Validação dos testes.....	82
5.2. Análise do desempenho dos testes segundo o resultado dicotômico definido por um único ponto de corte.....	83
5.3. Análise do desempenho dos testes a partir de dois pontos de corte com base na curva ROC.....	83
5.4. Análise de diferentes intervalos de resultados.....	87
6. Conclusões.....	88
6.1. Validação dos testes.....	88
6.2. Avaliação de novos pontos de corte.....	89
7. Perspectivas.....	90
8. Referências bibliográficas.....	91

LISTA DE TABELAS

ARTIGO DE REVISÃO

Tabela 1. Classificação histológica de fibrose hepática – modelo Metavir.....	20
Tabela 2. Classificação histológica de fibrose hepática – modelo de Ishak.....	20
Tabela 3. Complicações da biópsia hepática.....	22
Tabela 4. Investigações de avaliação dos estádios de fibrose hepática com base em testes laboratoriais simples.....	31

ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1. Motivos de exclusão de 76 entre 324 pacientes selecionados para a investigação.....	64
Tabela 2. Idade, dados bioquímicos, hematológicos e histológico de 248 pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos no AHEV/IAG/HC/UFGM.....	66
Tabela 3. Validação dos três modelos a partir dos pontos de corte descritos nos estudos originais.....	68
Tabela 4. Desempenho dos três modelos utilizando-se o ponto de corte único selecionado a partir do percentil 95%.....	70
Tabela 5. Desempenho dos três modelos utilizando-se o ponto de corte único selecionado a partir da curva TG-ROC.....	73
Tabela 6. Desempenho dos três modelos utilizando-se dois pontos de corte selecionados a partir da curva ROC.....	75
Tabela 7. Índices de desempenho do APRI para o diagnóstico de fibrose significativa (F0-F2 <i>versus</i> F3-F6) e cirrose (F0-F4 <i>versus</i> F5-F6) no estudo original (Wai e col.) e no presente estudo (Couto e col.).....	76
Tabela 8. Índices de desempenho do GUCI para o diagnóstico de cirrose (F0-F4 <i>versus</i> F5-F6) no estudo original (Islam e col.) e no presente estudo (Couto e col.).....	76

Tabela 9. Índices de desempenho do modelo de Lok para o diagnóstico de cirrose (F0-F4 *versus* F5-F6) no estudo original (Lok e col.) e no presente estudo (Couto e col.).....77

Tabela 10. Áreas sob a curva ROC para diagnóstico de fibrose significativa (F0-F2 *versus* F3-F6) e cirrose (F0-F4 *versus* F5-F6) para os modelos APRI, GUCI e Lok.....77

Tabela 11. Razões de verossimilhança para faixas de resultados dos modelos APRI, GUCI e Lok, com as respectivas probabilidades pós-teste.....79

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO DE REVISÃO

Figura 1. Algoritmo para diagnóstico de fibrose significativa (Metavir ≥ 2) em pacientes com hepatite C crônica e ALT elevada.....40

Figura 2. Algoritmo para diagnóstico de fibrose significativa (Metavir ≥ 2) em pacientes com hepatite C crônica e ALT normal.....40

Figura 3. Algoritmo para diagnóstico de cirrose (Metavir ≥ 3) em pacientes com hepatite C.....41

ARTIGO ORIGINAL

Figura 1. Distribuição dos pacientes por gênero.....64

Figura 2. Distribuição dos pacientes portadores de hepatite C crônica por cor.....65

Figura 3. Distribuição dos pacientes portadores de hepatite C crônica pelo estágio de fibrose à biópsia hepática.....65

Figura 4. Distribuição dos pacientes portadores de hepatite C crônica por estágios agrupados de fibrose hepática.....65

Figura 5. Curvas TG-ROC para definição de ponto de corte para distinguir ausência (F0-F2) e presença de fibrose significativa (F3-F6).....71

Figura 6. Curvas TG-ROC para definição de ponto de corte para distinguir ausência (F0-F4) e presença de cirrose (F5-F6).....72

Figura 7. Curvas ROC para avaliação de ausência ou presença de fibrose significativa (F0-F2 *versus* F3-F6) para os modelos APRI, GUCI e Lok.....74

Figura 8. Curvas ROC para avaliação de ausência ou presença de cirrose (F0-F4 *versus* F5-F6) para os modelos APRI, GUCI e Lok.....74

LISTA DE ABREVIATURAS

HCV	vírus da hepatite C
RNA	ácido ribonucléico
PCR	reação em cadeia da polimerase
MEC	matriz extracelular
AH	ácido hialurônico
NK	célula <i>natural killer</i>
CHE	célula hepática estrelada
DNA	ácido desoxirribonucléico
CK	célula de Kupffer
TGF-β	fator transformador do crescimento beta
IRO	intermediário reativo do oxigênio
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
ET-1	endotelina 1
MMP	metaloproteinase de matriz
TIMP	inibidor tecidual das metaloproteinases
AST	aspartato-aminotransferase
ALT	alanino-aminotransferase
IgG	imunoglobulina G
VPP	valor preditivo positivo
VPN	valor preditivo negativo
ROC	<i>receiver operating characteristics</i>
RNI	razão normalizada internacional
FA	fosfatase alcalina
APRI	índice da razão AST/plaquetas
GUCI	<i>Gotemborg University Chirrosis Index</i>
Se	sensibilidade
Es	especificidade
CDS	escore discriminante para cirrose
AP	índice idade/plaquetas
GGT	gama-glutamil transpeptidase
A2M	alfa-2 macroglobulina
C-IV	colágeno tipo IV
C-I	colágeno tipo I
PC-III	pró-colágeno tipo III

PPIII	peptídeo n-terminal do pro-colágeno tipo III
LN	laminina
HGF	fator de crescimento do hepatócito
YKL-40	glicoproteína de cartilagem humana-39
AHEV	Ambulatório de Hepatites Virais
IAG	Instituto Alfa de Gastroenterologia
HC	Hospital das Clínicas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
RV	razão de verossimilhança
TG-ROC	<i>two-graph receiver operating characteristics</i>
IC95%	intervalo de confiança a 95%
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>

RESUMO

Introdução: a infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) é uma causa importante de cirrose. A biópsia hepática é, atualmente, o padrão ouro para o diagnóstico do estágio de fibrose. Entretanto, testes simples têm sido estudados como marcadores de fibrose. O índice da relação aspartato aminotransferase (AST) sobre a contagem de plaquetas – APRI – tem demonstrado bom desempenho no diagnóstico de fibrose significativa e cirrose. O índice de cirrose da universidade de Gotemborg (GUCI) e o modelo proposto por Lok mostraram potencial utilidade no diagnóstico de cirrose, mas não foram estudados para o diagnóstico de fibrose significativa e não foram validados. O objetivo do presente estudo é validar esses modelos para o diagnóstico do estágio de fibrose em pacientes com hepatite C crônica e investigar novos pontos de corte, incluindo valores para o diagnóstico de fibrose significativa com os modelos GUCI e de Lok.

Métodos: 248 pacientes com diagnóstico de hepatite C submetidos à biópsia hepática foram incluídos. O desempenho dos testes foi estudado por meio do cálculo da sensibilidade (Se), especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN), razões de verossimilhança (RV) para teste positivo e negativo, acurácia e índice J de Youden. A curva ROC (*receiver operating characteristics*) foi utilizada para a definição dos novos pontos de corte.

Resultados: 140 (56%) pacientes foram do sexo masculino e a média de idade foi de 51 anos. Os estádios de fibrose foram F0-F2 em 79(32%), F3-F4 em 67(27%) e F5-F6 em 102(41%) pacientes. Utilizando-se os pontos de corte descritos nos trabalhos originais, o APRI apresentou Se e Es de 78% e 97%, respectivamente, para o diagnóstico de fibrose significativa. O VPP foi igual a 99% e a RV, 30. Para o diagnóstico de cirrose, APRI apresentou Se e Es de 63% e 90%, respectivamente; GUCI, 79% e 67%, respectivamente e o modelo de Lok, 96% e 46%, respectivamente. Os novos pontos de corte selecionados a partir das curvas ROC foram: para fibrose significativa: APRI: $\leq 0,45/\geq 1,2$; GUCI: $\leq 0,45/\geq 1,4$ e Lok: $\leq 0,2/\geq 0,6$; para cirrose: APRI: $\leq 0,42/\geq 2,6$, GUCI: $\leq 0,46/\geq 2,0$ e Lok: $\leq 0,3/\geq 0,76$. Eles resultaram nos seguintes índices: para diagnóstico de fibrose significativa: APRI: Se, 88% e Es, 89%; GUCI: Se, 88% e Es, 89%; Lok, Se, 89% e Es, 83%. Para o diagnóstico de cirrose: APRI: Se, 90% e Es, 86%; GUCI: Se, 97% e Es, 78% e Lok: Se, 84% e Es, 89%. Para diagnóstico de fibrose significativa, APRI, GUCI e Lok apresentaram as seguintes áreas sob a curva ROC: 0,83; 0,83 e 0,81; respectivamente e para diagnóstico de cirrose: 0,82; 0,82 e 0,81; respectivamente.

Conclusão: na fase de validação, o APRI e o modelo de Lok confirmaram o desempenho reportado originalmente. O GUCI não confirmou o mesmo desempenho para diagnóstico de cirrose descrito no trabalho original. Os resultados obtidos com os novos pontos de corte demonstraram a utilidade potencial dos testes para o diagnóstico de fibrose significativa e cirrose e determinaram que os modelos GUCI e de Lok podem ser utilizados para o diagnóstico de fibrose significativa. Os três testes poderão ter utilidade na avaliação do tratamento em pacientes com HCV.

SUMMARY

Background: hepatitis C virus (HCV) chronic infection is a relevant cause of progressive liver disease, leading to cirrhosis worldwide. Liver biopsy is the gold standard to assess hepatic fibrosis but non-invasive fibrosis markers are needed. The aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) have demonstrated good accuracy to predict significant fibrosis and cirrhosis. The Gotemborg University Cirrhosis Index (GUCI) and the Lok's model may predict cirrhosis but lack specific points to predict significant fibrosis and external validation. We sought to validate these models in patients with HCV and to investigate new points, including predictive of significant fibrosis with GUCI and Lok models.

Methods: 248 patients with liver biopsy (Ishak's score) were included. Sensitivity(Se), specificity(Sp), positive(PPV) and negative(NPV) predictive values and likelihood ratios(LR) were calculated. Analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves provided the new points. Areas under ROC curves (AUC) were calculated.

Results: 140(56%) patients were male, mean age was 51 years. Fibrosis stages were F0-F2 in 79(32%), F3-F4 in 67(27%) and F5-F6 in 102(41%) patients. Using original points for prediction of significant fibrosis, Se and Sp to APRI were 78% and 97%, respectively. PPV and LR were 99% and 30. Se, Sp, PPV and NPV for cirrhosis were: 63%, 90%, 77%, 82% (APRI), 79%, 67% 63%, 83% (GUCI), 96%, 46%, 67% and 91% (Lok), respectively. AUC for APRI, GUCI and Lok models were 0.83, 0.83 and 0.81 to predict significant fibrosis and 0.82, 0.82, and 0.81 to predict cirrhosis, respectively. Novel cut off points to predict significant fibrosis were: APRI: $\leq 0.45/\geq 1.2$; GUCI: $\leq 0.45/\geq 1.4$ and Lok: $\leq 0.2/\geq 0.6$; and to predict cirrhosis were: APRI: $\leq 0.42/\geq 2.6$, GUCI: $\leq 0.46/\geq 2.0$ and Lok: $\leq 0.3/\geq 0.76$. Total number of classified patients ranged from 50% to 60%. These new points provided the following results: for prediction of significant fibrosis: APRI: Se, 88%; Sp, 89%; PPV, 96% and NPV: 72%; GUCI: Se, 88%; Sp, 89%; PPV, 96% and NPV, 72%; Lok, Se, 89%; Sp, 83%; PPV, 94% and NPV, 71%. For prediction of cirrhosis: APRI: Se, 90%, Sp, 86%; PPV, 79 and NPV, 94%; GUCI: Se, 97%, Sp, 78%; PPV, 81% and NPV, 96%; Lok: Se, 84%; Sp: 89%; PPV: 82% and NPV, 90%. The AUC for significant fibrosis were for APRI, GUCI e Lok: 0,83; 0,83 e 0,81; respectively and for prediction of cirrhosis: 0,82; 0,82 e 0,81; respectively.

Conclusions: the validation set confirmed the performance for APRI and Lok's model previously reported. GUCI did not perform as well as in the original report for evaluating cirrhosis. The novel cut-off points support the good performance potential of the three models for evaluation of fibrosis stage, mostly to confirm significant fibrosis and to exclude cirrhosis. They also suggest that GUCI and Lok's model may be used not only for cirrhosis but also for significant liver fibrosis. These models might be used as surrogate markers to select patients for HCV treatment.

PARTE 1
ARTIGO DE REVISÃO

DIAGNÓSTICO DA FIBROSE HEPÁTICA EM PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA: MARCADORES SÉRICOS COMO SUBSTITUTOS DA BIÓPSIA HEPÁTICA

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (HCV) foi identificado em 1989 por Choo e colaboradores a partir de amostras de plasma de chimpanzés infectados experimentalmente com soros de pacientes portadores de hepatite crônica não-A não-B¹. Assim, identificou-se que o HCV era o responsável por 90% das hepatites pós-transfusionais ocorridas antes de 1992, acometendo 5% a 15% dos indivíduos com história de múltiplas transfusões. Atualmente, estima-se que 200 milhões de pessoas no mundo estão infectadas por esse vírus. A principal via de transmissão é a parenteral e o uso de drogas ilícitas injetáveis contribui como o principal fator de risco para os novos casos de contaminação pelo vírus C. Os profissionais de saúde em contato hospitalar ou expostos a sangue ou hemoderivados, indivíduos tatuados e os que usam *piercing* também constituem grupos de risco para a infecção pelo vírus C. A transmissão sexual é pouco comum, sendo responsável por 10% a 20% dos casos. A transmissão vertical de mãe para filho pode ocorrer, porém com frequência inferior a 3%. Outros indivíduos com risco aumentado de infecção pelo HCV são os alcoolistas e os pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise. Em cerca de 10% dos casos não é possível identificar o fator de risco associado à transmissão do HCV²⁻³.

A maior importância da infecção pelo HCV se deve ao fato desse vírus causar lesão hepática progressiva, insidiosa e silenciosa na maioria das pessoas infectadas. Cerca de 80% dos pacientes que adquirem o vírus C evoluem para hepatite crônica e 25% dos portadores crônicos progridem para a cirrose hepática após 25 a 30 anos de infecção. Uma vez instalada a cirrose, o paciente apresenta risco de 1% a 2% ao ano de evoluir para o carcinoma hepatocelular⁴⁻⁷.

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HCV é feito por meio dos testes de triagem que identificam anticorpos contra antígenos virais no soro. A identificação do ácido ribonucléico (RNA) do HCV por métodos de biologia molecular, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR), a mais utilizada na atualidade⁷, confirma a infecção.

FIBROGÊNESE HEPÁTICA

A fibrose hepática e a cirrose representam as consequências de um processo regenerativo sustentado em resposta à injúria persistente, de diversas causas, como a infecção crônica pelo HCV. A cirrose é o resultado final do processo de fibrose e expressa a subversão do parênquima com a formação de nódulos e conseqüente comprometimento da função hepática⁸.

A fibrose hepática caracteriza-se, morfológicamente, pelo acúmulo dos constituintes da matriz extracelular (MEC) que compõem o tecido cicatricial do fígado, formado principalmente de colágenos tipos I (C-I) e IV (C-IV), em suas formas fibrilares, e de substâncias glicoconjugadas, que incluem os proteoglicanos, a fibronectina e o ácido hialurônico (AH). O fígado cirrótico contém cerca de seis vezes mais colágeno e proteoglicanos do que o órgão normal.

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. A lesão hepática é tipicamente inflamatória. O fígado contém macrófagos e células *natural killers* (NK) residentes 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.

Uma lesão hepática transitória pode evoluir com restituição completa da integridade do parênquima. Contudo, a persistência da agressão resulta em dano tissular. No processo fibrogênico, os componentes da membrana basal, como o C-IV, a laminina (LN) e outros, são produzidos em maior quantidade e formam uma 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 capilares⁹.

As células hepáticas estreladas (CHE) do fígado constituem a principal fonte de MEC na gênese da fibrose hepática. Elas situam-se na região peri-sinusoidal e têm como função básica o armazenamento de vitamina A. Sob a influência de estímulos inflamatórios, as CHE sofrem o processo de ativação, com transformações estruturais e funcionais, resultando na aquisição de um fenótipo proliferativo, contrátil, migratório e fibrogênico. Trata-se de um processo complexo onde as CHE passam do estado

quiescente para o ativado, transformando-se fenotipicamente em células miofibroblásticas⁸⁻¹⁰. As transformações celulares que acompanham a ativação das CHE incluem modificações morfológicas, com a formação de proteínas do citoesqueleto, como a actina da musculatura lisa; a perda das reservas de vitamina A e o aumento no tamanho do retículo endoplasmático rugoso. Sob o aspecto metabólico, há maior síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) e importante proliferação celular. O padrão de expressão genética também se modifica, com notável aumento na síntese do C-I e C-IV. Ocorre, ainda, maior expressão de HSP47, proteína ligante de colágeno¹¹.

O evento primário, ou iniciador da ativação das CHE é a infiltração das células de Kupffer (CK). Estas células são responsáveis pela síntese de MEC, pela proliferação celular e pelo estímulo à produção de retinóides pelas CHE, através da ação de citocinas e outros mediadores, sendo principais, o fator transformador do crescimento beta (TGF- β), os intermediários reativos do oxigênio (IRO) e os peróxidos lipídicos. As CK também influenciam as CHE por meio da secreção de metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), que ativa o TGF- β latente, que, por sua vez, estimula a síntese de colágeno pelas CHE¹².

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 fator de crescimento derivado de plaquetas (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 IRO, enquanto os linfócitos, incluindo linfócitos T auxiliares CD4+, representam fonte potencial de citocinas, que amplificam a resposta inflamatória à lesão hepática.

Em um processo contínuo, a perpetuação da ativação das CHE se deve à sua capacidade intrínseca de proliferação, fibrogênese e contratilidade⁸.

O PDGF constitui o principal mediador e regulador dos estímulos proliferativos. O processo proliferativo amplifica, efetivamente, o número de células fibrogênicas no fígado. A produção de matriz pelas CHE ativadas é estimulada, principalmente, pela ação do TGF- β produzido pelas CHE, CK e plaquetas. A ativação das CHE está também associada ao aumento da contratilidade celular, que leva ao enrijecimento do parênquima e ao aumento da pressão na veia porta. A endotelina 1 (ET-1) é o estímulo contrátil mais potente¹³.

As etapas seguintes são complementares no processo de ativação: 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 principais o TGF- β , o PDGF, o fator de crescimento hepatocitário, o fator ativador de plaquetas e a 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 através da migração direta, ou quimiotaxia. Vários quimioatrativos têm sido descritos, incluindo-se o PDGF, a ET-1 e as proteínas quimiotáticas de monócitos⁹⁻¹².

A degradação da MEC ocorre através de dois processos: a) quebra da MEC de baixa densidade do fígado normal, denominada “degradação patológica” e 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 para a progressão da fibrose para a cirrose¹⁴⁻¹⁵.

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 C-I. 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 inibidores¹⁶.

A BIÓPSIA HEPÁTICA COMO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA FIBROSE

Atualmente, o padrão ouro para avaliação da fibrose hepática é a biópsia. Diversos modelos de classificação histológica buscam estadiar numericamente a quantidade e a conformação do tecido conectivo corado na amostra. Os dois mais utilizados são os modelos de Knodell, modificado por Ishak¹⁷, e o Metavir¹⁸. O modelo de Ishak, mais detalhado, classifica a fibrose em estádios de zero a seis, significando, o primeiro, ausência de fibrose, e o último, cirrose estabelecida. (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Classificação histológica de fibrose hepática – modelo Metavir¹⁷

Estádio	Descrição
F0	Ausência de fibrose
F1	Fibrose portal sem septos
F2	Poucos septos fibrosos
F3	Numerosos septos fibrosos
F4	Cirrose

Tabela 2. Classificação histológica de fibrose hepática – modelo de Ishak¹⁸

Estádio	Descrição
F0	Ausência de fibrose
F1	Alargamento de alguns tratos portais por fibrose
F2	Alargamento da maioria dos tratos portais por fibrose
F3	Alargamento da maioria dos tratos portais e raras pontes fibrosas ligando tratos
F4	Alargamento da maioria dos tratos portais com pontes freqüentes ligando tratos portais e veias centro-lobulares
F5	Marcante fibrose em ponte e esboço de nódulos
F6	Cirrose

Limitações da biópsia hepática

A despeito de a biópsia hepática constituir o método mais confiável para a avaliação da fibrose e da inflamação hepática, não se trata de um 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 analgesia e hipotensão arterial. Aproximadamente 25% dos pacientes relatam dor no hipocôndrio ou no ombro direito após a biópsia.

Segundo Bravo e col.²², cerca de 1% a 3% dos pacientes submetidos à biópsia hepática ambulatorial necessitam internação devido a complicações, principalmente dor e hipotensão arterial. Cadranel e col.¹⁹ avaliaram prospectivamente 2087 pacientes submetidos à 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 analgesia potente e internação hospitalar, ocorreu em 3% dos pacientes, mas não houve relato de morte associada à biópsia hepática.

O sangramento com repercussões clínicas é uma complicação potencialmente grave que pode estar associada à realização da biópsia hepática. McGill e col.²⁰ descreveram a ocorrência e a gravidade de complicações hemorrágicas em 9212 pacientes submetidos ao procedimento. Foram observados 10 casos de hemorragias fatais (0,11%) e 22 de

hemorragias não fatais (0,24%). Os fatores de risco relacionados às complicações hemorrágicas foram a presença de cirrose ou carcinoma hepatocelular, idade mais avançada, sexo masculino e maior número de punções para a realização do procedimento. A hemorragia intraperitoneal 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.²¹, ao analisarem retrospectivamente as complicações em 68.276 biópsias hepáticas realizadas em um período de dez anos, observaram uma taxa de mortalidade de 9 para cada 100.000 procedimentos. A ocorrência de hemoperitônio em portadores de doenças malignas ou cirrose foi a causa do óbito em todos os casos. Alguns estudos citam taxas de mortalidade variando de 0,01% a 0,12%²³⁻²⁴.

A tríade de hemorragia digestiva, dor 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 biópsia²².

As principais complicações da biópsia hepática e suas frequências, segundo Harinath e col²³, estão listadas na Tabela 3.

Além dos riscos inerentes ao exame, a biópsia hepática também implica em aumento dos custos e, por ser um procedimento invasivo, não pode ser repetido com frequência. Outra limitação importante da biópsia hepática se deve ao fato do resultado do exame expressar 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 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 do tamanho inadequado ou da fragmentação da amostra a ser examinada²⁵⁻²⁶.

Tabela 3. 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.²³

MÉTODOS NÃO INVASIVOS DE AVALIAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA

O estágio da fibrose hepática é um dos principais fatores que influenciam na decisão para a terapêutica dos portadores de hepatite C crônica. Em conformidade com os protocolos e diretrizes atuais de tratamento da hepatite C, os pacientes sem fibrose ou com fibrose mínima apresentam evolução mais lenta da hepatopatia e o tratamento pode ser postergado com segurança. Não obstante, o tratamento deve ser considerado para aqueles pacientes com fibrose avançada, em razão do risco de evolução da fibrose para a cirrose e suas complicações⁷.

O meio mais eficaz de reverter a fibrose e impedir sua evolução para a cirrose é curar a causa primária da doença hepática. Assim, o tratamento efetivo da condição primária é essencialmente antifibrótico, por dois mecanismos: 1) prevenção do acúmulo de cicatriz fibrótica e 2) redução da fibrose instalada pela interrupção do estímulo fibrogênico. Contudo, a eficácia limitada do tratamento atual da hepatite C com a combinação de interferon peguilado mais ribavirina, os eventos adversos e efeitos colaterais sérios desse esquema terapêutico, além da contra-indicação do tratamento em considerável população de portadores da doença constituem impedimentos que limitam a erradicação do HCV em portadores de hepatite C crônica e, conseqüentemente, a remoção do principal fator que leva à fibrose hepática.

As evidências crescentes a respeito da reversão da fibrose hepática e o maior conhecimento dos mecanismos de fibrogênese e dos sítios precisos de sua formação têm

favorecido a possibilidade do tratamento desta condição²⁷. Portanto, o advento do tratamento antifibrótico específico representa uma expectativa e uma esperança para os portadores de doenças hepáticas crônicas cujo agente causal nem sempre é removível, como é o caso do HCV. Por essas razões, a avaliação da eficácia terapêutica, através da monitorização do processo fibrolítico, é necessária e dependerá de novos métodos mais acurados de avaliação da fibrose hepática. 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 fibrose hepática que sejam confiáveis e que possam ser repetidos com segurança durante o acompanhamento dos pacientes. Da mesma forma, esses testes serão ferramentas essenciais para o monitoramento dinâmico do processo fibrogênico em indivíduos sem indicação ou com contra-indicações ao tratamento.

Atualmente, novos métodos de avaliação da fibrose vêm sendo investigados. Assim, testes séricos não invasivos que visam quantificar a fibrose hepática, isolados ou combinados em fórmulas matemáticas, têm sido comparados aos estádios de fibrose observados em biópsias hepáticas.

Os testes não invasivos de fibrose hepática 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 hepatite C 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 MEC¹⁴.

TESTES SIMPLES OU INDIRETOS

Entre os testes simples, os mais estudados são a contagem de plaquetas, a relação dos níveis séricos da aspartato-aminotransferase (AST) e da alanino-aminotransferase (ALT) - relação AST/ALT - e algumas fórmulas matemáticas que incluem, além desses, outros marcadores séricos.

Contagem de plaquetas

A redução de plaquetas no sangue periférico é um indicador do estágio de fibrose hepática, especialmente em pacientes portadores de hepatite C crônica. Contudo, as causas para explicar a freqüente trombocitopenia observada nesse grupo específico de

24
pacientes não são completamente conhecidas. De acordo com Schmidt e col.²⁸, o seqüestro esplênico com conseqüente destruição de plaquetas em portadores de cirrose hepática e hipertensão porta é um dos mecanismos para explicar a redução de plaquetas notada em portadores de hepatites virais crônicas. Outros mecanismos são a diminuição da produção de trombopoetina hepática e a destruição de plaquetas por anticorpos anti-plaquetários²⁹⁻³³.

A associação entre os níveis séricos de trombopoetina e os estádios de fibrose hepática tem sido sugerida na literatura. Adinolfi e col.³¹, ao avaliarem 209 pacientes com hepatite C crônica, verificaram que pacientes com contagem normal de plaquetas apresentaram níveis mais altos de trombopoetina quando comparados aos pacientes trombocitopênicos ($p < 0,0001$). Houve relação inversa entre os níveis de trombopoetina e o estágio da fibrose, com média de 58 e 27 pg/ml para os estádios 0-1 e 4, respectivamente ($p < 0,001$). Outras investigações também reforçaram esta associação²⁹⁻³⁰.

A detecção de RNA do HCV em plaquetas obtidas de pacientes com hepatite C crônica sugere que a trombocitopenia pode ser causada por mecanismo auto-imune, resultante da própria infecção pelo vírus C. Grober e col.³² relatam que a associação do HCV com imunocomplexos anti-HCV na superfície plaquetária pode resultar na expressão de imunoglobulinas G (IgG) anti-plaquetas. Nagamine e col.³³ afirmam que as quantidades de IgG associadas às plaquetas aumentam de acordo com a progressão histológica da doença em pacientes com hepatite C crônica.

O valor absoluto das plaquetas em sangue periférico tem sido amplamente investigado como índice preditor do estágio de fibrose hepática³⁴. Murawaki e col.³⁵ compararam o número de plaquetas com o estágio de fibrose em biópsias de 165 pacientes com hepatite C crônica, excluindo-se os portadores de cirrose. Houve associação significativa entre a redução de plaquetas e o estágio de fibrose. Os autores estabeleceram dois pontos de corte para a detecção de fibrose moderada ou avançada. A contagem de plaquetas menor ou igual a $160 (x10^3/mm^3)$ apresentou sensibilidade (Se), especificidade (Es) e acurácia global para diagnóstico de fibrose moderada ou avançada de 68%, 71% e 70%, respectivamente. Para o valor de plaquetas menor ou igual a $140 (x10^3/mm^3)$, os índices foram 68%, 74% e 73%, respectivamente. Giannini e col.³⁶, ao avaliaram 252 pacientes com hepatite C crônica observaram que o número de plaquetas menor que $130 (x10^3/mm^3)$ apresentou Se de 91,1%, Es de 88,3%, valor preditivo

positivo (VPP) de 81,2% e valor preditivo negativo (VPN) de 94,7% para diagnosticar cirrose. Outra investigação que incluiu 323 pacientes portadores de hepatite C crônica³⁷, a contagem média de plaquetas de 200 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) foi associada à ausência de fibrose e a média de plaquetas de 143 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) foi notada em pacientes cirróticos. Na contagem de plaquetas abaixo de 150 ($\times 10^3/\text{mm}^3$), a área sob a curva ROC (*receiver operating characteristics*) para fibrose entre F2–F4 foi igual a 0,67; a Se, 34%; a Es, 89%; o VPP 67% e o VPN 66%. Outro estudo que incluiu 194 portadores de hepatite C crônica³⁸ utilizando-se como ponto de corte o valor de plaquetas abaixo de 150 ($\times 10^3/\text{mm}^3$), os VPP e VPN para diagnóstico de cirrose foram 93% e 95%, respectivamente. A área sob a curva ROC para a análise de pacientes com fibrose significativa foi 0,71 e, para cirrose, 0,90.

Poynard e Bedossa³⁹ analisaram diversas variáveis clínicas e marcadores séricos com o objetivo de definir os fatores relacionados à fibrose hepática em uma coorte de 500 pacientes portadores de hepatite C crônica. Em análises uni e multivariadas, os autores identificaram a idade e a contagem de plaquetas como as variáveis capazes de prever o estágio da fibrose. Entre os pacientes com cirrose, 98% apresentavam plaquetas abaixo de 200 ($\times 10^3/\text{mm}^3$). Os autores sugeriram uma escala de zero a cinco para diferentes faixas etárias (quanto maior a faixa etária, maior pontuação) e contagens de plaquetas (quanto menor a contagem, maior a pontuação), em um escore de zero a dez. Para um ponto de corte maior ou igual a seis, a Es foi 90% e o VPP igual a 93% para detecção de fibrose avançada (F2-F4 do Metavir). A área sob a curva ROC foi igual a 0,794.

Aminotransferases

Há várias décadas, a dosagem sérica das enzimas hepáticas AST e ALT tem sido utilizada, na prática, para investigação e monitoramento das doenças hepáticas⁴⁰. Apesar do grande interesse em correlacionar os níveis das aminotransferases com o estágio de fibrose, diversos estudos têm comprovado que esses exames, isoladamente, não são adequados para avaliar a fibrose hepática⁴¹⁻⁴⁴.

A maior parte da AST está localizada nas mitocôndrias dos hepatócitos, enquanto a ALT localiza-se principalmente no citoplasma. No citoplasma, a relação AST:ALT é de 0,6:1,0, enquanto no hepatócito (mitocôndria mais citoplasma) é de aproximadamente 3,0:1,0. Caracteristicamente, observa-se que os valores séricos da ALT são mais altos do que os da AST na vigência de hepatite viral aguda. Isto pode ser explicado pela liberação simultânea de enzimas dos compartimentos citoplasmáticos, que possuem

maior concentração de ALT. Em pacientes com hepatite C crônica, os valores da AST superiores aos da ALT indicam liberação adicional de AST das mitocôndrias dos hepatócitos, em consequência de dano hepatocelular mais grave ou prolongado.

Os níveis séricos da AST mais altos observados em pacientes cirróticos indicam que a extensão da fibrose pode ter influência nessa medida⁴⁵⁻⁴⁷.

Alguns estudos sugerem que o clareamento da AST é modulado pelas células sinusoidais do fígado⁴⁸. Com o desenvolvimento de fibrose avançada e cirrose, há comprometimento progressivo da função das células sinusoidais, resultando no aumento relativo nos níveis séricos da AST.

Com base nesses dados, alguns autores estudaram a relação da razão AST/ALT para avaliar o estágio de fibrose hepática.

Giannini e col.⁴⁹ avaliaram 177 pacientes com hepatite crônica sem cirrose e 171 com cirrose e observaram associação entre o aumento da razão AST/ALT e alterações na cinética de clareamento da indocianina verde, sugestivas de piora da função hepática e progressão da fibrose. Williams e col.⁵⁰ observaram que, em pacientes com hepatites virais crônicas, a razão AST/ALT > 1,0 tem relação estatisticamente significativa com a presença de cirrose. De forma semelhante, Anderson e col.⁵¹ também observaram aumento da razão AST/ALT com a progressão das alterações histológicas em 133 pacientes com hepatite C crônica. Houve predomínio da razão $\geq 1,0$ em cirróticos.

Na investigação retrospectiva de Sheth e col.⁵² que incluiu 139 pacientes com hepatite C crônica, a razão média da AST/ALT foi maior em pacientes cirróticos quando comparada à dos não-cirróticos ($p < 0,001$). A razão AST/ALT $\geq 1,0$ apresentou 100% de Es e VPP para diagnóstico de cirrose, com 53,2% de Se e 80,7% de VPN.

Por outro lado, investigações posteriores mostraram resultados variáveis na razão AST/ALT $\geq 1,0$ para o diagnóstico de cirrose em pacientes com hepatite C crônica. Reedy e col.⁵³ encontraram razão de verossimilhança e VPP de 7,3 e 77%, respectivamente, em 77 pacientes. Imperiale e col.⁵⁴ encontraram Se de 56% e Es de 90%, com VPP de 64% em 177 pacientes. Em 153 pacientes investigados por Park e col.⁵⁵, a razão AST/ALT $\geq 1,0$ foi associada a Es de 95,9% e VPP de 73,7%. Em análise posterior⁵⁶, estes autores demonstraram que as áreas sob a curva ROC para diagnósticos

de cirrose (F4), fibrose avançada ($F \geq 3$) e fibrose significativa ($F \geq 2$) foram iguais a 0,85; 0,81 e 0,71, respectivamente.

No trabalho de Giannini e col.³⁶, a relação $AST/ALT > 1,0$ apresentou Se de 77,8%, Es de 96,9%, VPP de 93,3% e VPN de 88,7% na identificação de pacientes cirróticos. A avaliação conjunta da relação AST/ALT e contagem de plaquetas abaixo de $130 (x10^3/mm^3)$ resultou em VPP igual a 97% e VPN igual a 97,9%.

Pohl e col.⁵⁷ também utilizaram a razão AST/ALT em combinação com a contagem de plaquetas em vários pontos de corte em um grupo de 211 pacientes com hepatite C crônica. A razão $AST/ALT > 1,0$ relacionou-se a estádios mais avançados de fibrose, assim como a contagem de plaquetas decresceu significativamente com o aumento do estágio de fibrose. Quando associadas a razão $AST/ALT > 1,0$ à contagem de plaquetas $< 150 (x10^3/mm^3)$ para a detecção de fibrose avançada (F3-F4 do Metavir), a Es foi de 99,1% e o VPP foi igual a 93,1%.

Modelos matemáticos com base em testes simples

Bonacini e col.⁵⁸ desenvolveram o “índice discriminante de cirrose” com o objetivo de identificar fibrose avançada em pacientes com hepatite C crônica, utilizando-se dos valores de plaquetas, da razão AST/ALT e da razão normalizada internacional (RNI). Para as faixas de valores dos resultados desses três testes foram atribuídos pontos cuja soma final variou entre 0 e 11. Na análise de 79 pacientes, o resultado do índice foi significativamente menor em pacientes com fibrose leve quando comparados aos pacientes com fibrose avançada ou cirrose ($p < 0,0001$). Para diagnosticar fibrose avançada ou cirrose, o valor ≥ 8 apresentou Se de 46% e Es de 98%.

Mais recentemente, Forns e col.⁵⁹ utilizaram dados de 351 pacientes (grupo de estimativa) para construir a seguinte fórmula matemática com a finalidade de prever a presença ou ausência de fibrose significativa ($F \geq 2$ na classificação de Scheuer): $7,811 - 3,131$ (contagem de plaquetas) + $0,781$ (GGT) + $3,467$ (idade) - $0,014$ (colesterol).

Em seguida, este modelo foi testado em 125 pacientes (grupo de validação) o que permitiu aos autores definir dois pontos de corte para ausência ($< 4,21$) ou presença ($> 6,9$) de fibrose significativa. Os valores da área sob a curva ROC foram 0,86 para o grupo de estimativa e 0,81 para o grupo de validação. Utilizando-se os pontos de corte propostos, fibrose significativa pôde ser excluída com Se de 94% e VPN de 96%.

Resultados semelhantes foram observados por Patel e col.⁶⁰. Em análise de 110 pacientes com características semelhantes, o VPN para o ponto de corte menor que 4,2 foi de 89%. Em ambos os relatos, não foi possível classificar cerca de 50% dos casos por estarem na zona de pontuação situada entre 4,2 e 6,9.

Outra proposta de validação de testes não invasivos para estagiar a fibrose hepática em portadores de hepatite C crônica foi sugerida por Wai e col.⁶¹. Diversas variáveis clínicas e laboratoriais foram testadas em análises uni e multivariadas visando identificar as que se associam ao estágio de fibrose hepática. Em uma etapa inicial chamada “treinamento”, 192 pacientes foram investigados. As variáveis significantes para o diagnóstico de fibrose avançada ($F \geq 3$ de Ishak) foram a contagem de plaquetas, a AST e a fosfatase alcalina (FA). Já para o diagnóstico de cirrose foram a contagem de plaquetas, a AST, a FA, a contagem de leucócitos e a razão AST/ALT. Em seguida, diferentes fórmulas testaram estas variáveis, resultando no desenvolvimento, pelos autores, de um modelo denominado “índice da razão AST/plaquetas” (APRI) com a seguinte descrição:

$$\text{APRI} = \frac{\text{AST} / \text{limite superior da normalidade (LSN)} \times 100}{\text{Plaquetas (x10}^3\text{/mm}^3\text{)}}$$

Esse modelo apresentou áreas sob a curva ROC iguais a 0,80 e 0,89 para diagnóstico de fibrose significativa e cirrose, respectivamente. Com base nessa curva, dois pontos de corte foram definidos para diagnosticar a ausência ($\text{APRI} \leq 0,5$) e a presença ($\text{APRI} > 1,5$) de fibrose significativa. Utilizando-se os pontos de corte citados, a Se foi de 91% e a Es, 95%, com VPP de 88% e VPN de 86%. Foi possível identificar corretamente 51% dos pacientes.

Os autores estabeleceram, ainda, dois outros pontos de corte para a predição de ausência ($\text{APRI} \leq 1,0$) ou presença ($\text{APRI} > 2,0$) de cirrose. Com base nesses pontos, a Se foi de 89%, Es, 93% VPP 57% e VPN, 98%. Esses pontos de corte permitiram classificar 81% dos pacientes.

Com a finalidade de validar o teste, os autores testaram ainda o APRI em outro grupo de 78 pacientes com características semelhantes. As áreas sob a curva ROC para diagnóstico de fibrose significativa e cirrose foram 0,88 e 0,94, respectivamente. Os VPP e VPN para fibrose significativa com resultados do $\text{APRI} \leq 0,5$ foram 64% e 90%, respectivamente. Os valores correspondentes para o $\text{APRI} > 1,5$ foram 91% e 65%,

respectivamente. Para o diagnóstico de cirrose, o VPP e o VPN do APRI $\leq 1,0$ foram, respectivamente, 35% e 100% e, para APRI $> 2,0$, 65% e 95%, respectivamente.

Em seguida, utilizando metodologia semelhante, Islam e col.⁶² avaliaram 179 pacientes portadores de hepatite C crônica e desenvolveram o modelo GUGI (*Gotemborg University Chirrosis Index*), que emprega a dosagem sérica de AST, RNI e a contagem de plaquetas, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{GUCI: } \frac{\text{AST (LSN)} \times \text{RNI} \times 100}{\text{Plaquetas (x10}^3\text{/mm}^3\text{)}}$$

Quando utilizado o ponto de corte ≥ 1 , o diagnóstico de cirrose ($F \geq 5$ de Ishak) pôde ser excluído com VPN de 97% (3% dos pacientes com GUCI < 1 tinham cirrose). Para o ponto de corte $< 0,2$, o VPN para fibrose avançada ($F \geq 3$ de Ishak) foi 100% (nenhum paciente com GUCI $< 0,2$ apresentou fibrose avançada). Os autores testaram o APRI na mesma coorte e encontraram melhores índices de Se, Es, VPP e VPN com o GUCI. A área sob a curva ROC do para o GUCI também foi maior, quando comparada ao APRI, para o diagnóstico de cirrose (0,85 e 0,83, respectivamente) e fibrose de avançada (0,72 e 0,71, respectivamente).

Mais recentemente, Lok e col.⁶³ desenvolveram outro modelo para prever cirrose em portadores de hepatite C crônica com base em exames realizados na rotina da avaliação desses pacientes. Os autores analisaram dados relativos a 1141 pacientes, sendo 429 cirróticos. Estabeleceram-se dois grupos - treinamento (n=783) e validação (n=358). Variáveis significativas na análise univariada para pacientes com ($F \geq 5$ de Ishak) e sem ($F < 5$ de Ishak) cirrose foram submetidas à regressão logística. Entre os diversos modelos formulados e testados, o descrito abaixo teve o melhor desempenho para diagnosticar cirrose:

$$- 5,56 - 0,0089 \times \text{contagem de plaquetas (x } 10^3\text{/mm}^3\text{)} + 1,26 \times \text{AST/ALT} + 5,27 \times \text{RNI}$$

A área sob a curva ROC no grupo treinamento foi 0,78 e, no grupo validação, 0,81. O valores de corte $< 0,2$ e $> 0,5$ apresentaram Se e Es de 92%, VPP de 75% e VPN de 86%. Aproximadamente metade dos pacientes não foi classificada por estarem os resultados entre os dois pontos de corte propostos. O ponto de corte $> 0,6$ poderia melhorar o desempenho para identificação de pacientes cirróticos, mas com prejuízo de elevar a proporção dos não classificáveis para 59,3%.

Mais recentemente, diversas investigações que comparam a eficácia dos modelos não invasivos de fibrose hepática tem sido publicadas. Gómez e col.⁶⁴ compararam os modelos *Forn's* e APRI em 199 pacientes com hepatite C crônica biopsiados. Dois grupos foram estabelecidos: portadores de fibrose ausente ou leve (Metavir F0-F1) (n=110) e fibrose avançada (Metavir F3-F4) (n=89). O modelo *Forn's* possibilitou o diagnóstico de fibrose leve em 71,4% e o APRI em 72,7%. O modelo *Forn's* confirmou fibrose avançada em 78,6% e o APRI em 54,2%. Com os modelos combinados, os VPP e VPN atingiram 90%.

Iacobellis e col.⁶⁵ avaliaram o desempenho de modelos não invasivos baseados em testes simples em 1252 pacientes com hepatite C crônica. Foram diversos os modelos comparados, sempre em uma combinação dos seguintes índices: contagem de plaquetas < 140 ($\times 10^3/\text{mm}^3$); razão AST/ALT ≥ 1 ; razão globulina/albumina > 1 ; APRI $> 1,5$ e escore de *Forn's* $> 6,9$. Os resultados demonstraram melhor desempenho para exclusão do diagnóstico de cirrose, com VPN acima de 90%.

Lackner e col.³⁸ compararam, em 194 pacientes portadores de hepatite C crônica, os seguintes testes: razão AST/ALT, escore discriminante para cirrose⁵⁸ (CDS), índice idade/plaquetas³⁹ (AP), escore de Pohl⁵⁷, APRI⁶¹ e contagem de plaquetas. Considerando-se a área sob a curva ROC, o desempenho do CDS, AP, APRI e contagem de plaquetas foram semelhantes para determinar fibrose significativa (F3-F6 de Ishak) (0,71; 0,74; 0,80; e 0,71, respectivamente) e cirrose (F5-F6 de Ishak) (0,91; 0,91; 0,90 e 0,89, respectivamente). A acurácia do APRI para identificar fibrose significativa foi superior ao da razão AST/ALT ($p < 0,05$). A fibrose significativa pôde ser diagnosticada com o valor do $\text{APRI} \geq 1,5$ e $\text{plaquetas} < 150$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$) em 24% e 22% dos pacientes, respectivamente, enquanto que $\text{APRI} < 2,0$ e contagem de $\text{plaquetas} \geq 150$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$) permitiu excluir o diagnóstico de cirrose em 85% e 78% dos pacientes, respectivamente.

A Tabela 1 apresenta um sumário do desempenho dos testes simples (e modelos matemáticos baseados nestes) para o diagnóstico de fibrose hepática.

Tabela. 4 Investigações de avaliação dos estádios de fibrose hepática com base em testes laboratoriais simples

Autor	Teste	Fibrose	Corte	Se	Es	VPP	VPN
Murawaki ³⁵	Plaquetas	moderada/ avançada	< 160	68	71	68	70
			< 140	68	74	44	73
Gianini ³⁶	Plaquetas	cirrose	<130	91	88	81	95
Myers ³⁷	Plaquetas	moderada/ avançada	<150	34	89	67	66
Lackner ³⁸	Plaquetas	avançada	<150	42/45	97/97	93/93	63/67
		cirrose		77/77	88/88	56/56	95/95
Poynard ³⁹	Idade/ Plaquetas	avançada	>6	57	90	93	47
Sheth ⁵²	AST/ALT	cirrose	>1	53	100	100	81
Reedy ⁵³	AST/ALT	cirrose	>1	44	94	77	78
Imperiale ⁵⁴	AST/ALT	cirrose	>1	56	90	64	87
Park ⁵⁵	AST/ALT	cirrose	>1	47	96	74	88
Gianini ³⁶	AST/ALT	cirrose	>1	78	97	93	89
Pohl ⁵⁷	AST/ALT Plaquetas	avançada	>1 <150	41	99	93	85
Bonacini ⁵⁸	Plaquetas AS/ALT RNI	avançada	>8	46	98		
Forns ⁵⁹	Plaquetas GGT Colesterol Idade	ausência	<4,2	94	51	40	96
		presença	>6,9	30	95	60	80
Patel ⁶⁰	Forns	presença	<4,2	85	38	31	89
		ausência	>6,9	26	97	77	80
Wai ⁶¹	APRI	significativa	>1,5	41	95	88	64
		cirrose	>2,0	57	93	57	93
Islam ⁶²	AST RNI Plaquetas	cirrose	> 1	80	78	31	97
Lok ⁶³	Plaquetas AST/ALT RNI	sem cirrose	< 0,2	92	30	46	86
		cirrose	> 0,5	37	92	75	69

Se: sensibilidade; Es: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

TESTES COMPLEXOS OU DIRETOS

Dentre os testes complexos, os mais estudados são os seguintes: AH, metaloproteinases (MMP) e seus inibidores (TIMP), alfa-2 macroglobulina (A2M), haptoglobina, colágeno tipo IV (C-IV), pró-colágeno tipo III (PC-III) e seu peptídeo n-terminal (PPIII), laminina (LN), além de modelos matemáticos que incluem, simultaneamente, alguns desses testes.

O AH é um polissacarídeo produzido em diversos tecidos e amplamente distribuído no espaço extracelular. É sintetizado no fígado e secretado pelas CHE. Parte do AH percorre o sistema linfático, entra na circulação sanguínea e é rapidamente depurado e degradado pelas células endoteliais do fígado através de um processo mediado por receptores específicos.

A elevação dos níveis de AH em pacientes com hepatite C crônica pode representar o aumento da sua produção, pela ativação e proliferação das CHE, ou a queda da sua captação e degradação resultante da disfunção das células endoteliais que, eventualmente, perdem a capacidade de metabolizar o AH na doença hepática crônica. É possível que ocorra também uma redução do número de receptores para o AH com a capilarização dos sinusóides⁶⁶⁻⁶⁷.

As MMP constituem uma família de endopeptidases ligadas ao zinco e capazes de degradar o colágeno. Essas endopeptidases exercem papel fundamental no processo de remodelação tecidual e na formação do tecido cicatricial de feridas, além de atuarem em vários processos patológicos, como na fibrose hepática. A atividade das MMP é regulada por inibidores teciduais específicos, os TIMPs. O desequilíbrio entre as MMPs e os TIMPs é fator determinante na deposição e na degradação da MEC⁶⁸⁻⁶⁹.

A A2M é uma proteína de fase aguda produzida pelos hepatócitos e pelas CHE nos locais de inflamação e fibrose. Ela atua como inibidora de proteinases e, portanto, o aumento de sua síntese pode inibir o catabolismo da MEC e potencializar o processo fibrótico. Já a haptoglobina diminui com o aumento da fibrose. Esses efeitos contrários resultantes da ação da A2M e da haptoglobina, durante o processo de fibrogênese, são mediados pela atuação de citocinas, como o fator de crescimento do hepatócito (HGF), durante a resposta inflamatória de fase aguda. O HGF estimula a síntese de A2M e reduz a síntese de haptoglobina⁸⁶.

Diversos estudos têm avaliado o valor desses marcadores diretos de MEC na determinação do estágio de fibrose. Assim, Wong e col.⁷⁰ compararam a dosagem do AH com a da ALT para determinação do estágio de fibrose hepática identificada à biópsia em um estudo prospectivo que incluiu 130 pacientes portadores de hepatite C crônica. A concentração de AH em pacientes com fibrose avançada foram significativamente mais altas do que em pacientes com fibrose leve a moderada, com Se e Es de 85% e 88%, respectivamente, para a primeira. Esse resultado foi superior àquele obtido pela determinação da ALT, que não se correlacionou aos estágios de fibrose.

Resultados semelhantes também foram relatados por Mc Hutchison e col.⁷¹ ao observarem, em 486 pacientes com hepatite C crônica, concentrações mais elevadas de AH em cirróticos quando comparados aos não-cirróticos ($p < 0,001$). Entretanto, o índice de concordância entre as concentrações de AH e o componente de fibrose na biópsia para estágios individuais foi considerado moderado. Para diagnosticar cirrose, os autores estabeleceram o valor de 110 $\mu\text{g/L}$ como ponto de corte. Valores $< 110\mu\text{g/L}$ identificaram corretamente 97% dos pacientes não-cirróticos, enquanto medidas $> 110\mu\text{g/L}$ identificaram 44% daqueles com cirrose. A sensibilidade foi de 88% e a especificidade, 78%. A acurácia global foi 79%. Para avaliação de fibrose significativa, o ponto de corte definido foi 60 $\mu\text{g/L}$, com Se de 88% e Es de 59%, VPP de 47%, VPN de 93% e acurácia global de 68%. Os autores observaram maior aplicabilidade do AH em excluir o diagnóstico de cirrose.

Halfon e col.⁷² avaliaram o valor potencial do AH para prever a presença ou ausência de fibrose significativa, fibrose avançada e cirrose em 405 pacientes com hepatite C crônica. Os pontos de corte para excluir o diagnóstico de fibrose significativa, fibrose avançada e cirrose foram AH: $< 16\mu\text{g/L}$, $< 25\mu\text{g/L}$ e $< 50\mu\text{g/L}$, respectivamente, resultando em VPNs de 82%, 89% e 100%. Para a confirmação de fibrose significativa, fibrose avançada e cirrose, os pontos de corte foram: AH $> 121\mu\text{g/L}$, $> 160\mu\text{g/L}$ e $> 237\mu\text{g/L}$. Eles resultaram em VPP de 94%, 100% e 57%, respectivamente. As áreas sob a curva ROC para o diagnóstico de fibrose significativa, fibrose avançada e cirrose foram 0,73; 0,77 e 0,97, respectivamente.

Os testes diretos têm sido avaliados, ainda, nos períodos pré e pós-tratamento da hepatite C crônica. Assim, Guechot e col.⁷³ estudaram a relação entre os níveis de AH e os índices de fibrose hepática em biópsias de 52 pacientes antes e após o tratamento da hepatite C crônica com interferon convencional por seis meses. Houve correlação entre

os níveis de AH e o estágio de fibrose tanto no pré quanto no pós-tratamento. Os níveis de AH diminuíram significativamente nos pacientes com regressão da fibrose ($p < 0,01$) e, inversamente, observou-se aumento de AH nos pacientes com piora da fibrose ($p < 0,05$). Não houve alteração nos valores de AH nos pacientes que mantiveram inalterado o estágio da fibrose. Resultados discrepantes foram relatados por Patel e col.⁷⁴, que observaram correlação menos expressiva entre as concentrações séricas de AH e o estágio de fibrose no pré e pós-tratamento, com baixa relação entre a evolução dos níveis de AH e as modificações no estágio da fibrose em 76 pacientes. Os autores concluíram que o AH é bom marcador para avaliar fibrose em um momento isolado, mas tem valor limitado na avaliação da evolução histológica em um determinado período. Já Ninomiya e col.⁷⁵ demonstraram que o AH apresentou melhor relação com o estágio de fibrose na biópsia quando comparado ao PIIIP e ao C-IV, com queda significativa dos níveis de AH em pacientes com melhora da fibrose após o tratamento.

Murawaki e col.³⁵ compararam a dosagem C-IV com a contagem de plaquetas para a determinação do estágio de fibrose em 165 pacientes com hepatite C crônica. Houve aumento de C-IV e diminuição de plaquetas com a progressão da fibrose. A análise das áreas sob a curva ROC permitiu demonstrar que a dosagem de C-IV foi mais acurada na diferenciação de fibrose moderada ou avançada da fibrose leve ou ausente. Os testes foram semelhantes na diferenciação entre fibrose avançada e estágios mais leves de fibrose. Para detecção de fibrose acima de F2 (classificação de Scheuer), o ponto de corte para o C-IV $> 110 \text{ ng/mL}$ associou-se a Se de 77%, Es de 73% e acurácia global de 75%. A associação do C-IV $> 110 \text{ ng/mL}$ à contagem de plaquetas $< 160 \text{ (} \times 10^3/\text{mm}^3\text{)}$ associou-se a Se de 53%, Es, 93%, VPP, 87%, VPN, 69% e acurácia global de 74%.

A aplicação clínica dos marcadores de fibrose C-IV, PIIIP, AH e YKL-40 (uma glicoproteína da cartilagem humana) foi investigada em 109 pacientes com hepatite C crônica por Saitou e col.⁷⁶. A elevação nos níveis séricos de todos esses marcadores, principalmente do AH, correlacionou-se com os níveis de fibrose definidos pela classificação Metavir. O YKL-40 teve boa correlação com o AH, com áreas sob a curva ROC iguais a 0,809 e 0,805, respectivamente.

De forma semelhante, a acurácia da dosagem sérica do AH e do PPIII para diagnosticar fibrose hepática foi comparada em uma coorte de 326 pacientes com hepatite C crônica⁷⁷. Ambos apresentaram correlação com o estágio da fibrose. O AH obteve melhor desempenho, quando comparadas as áreas sob a curva ROC, tanto para

diagnosticar fibrose avançada (0,864 *versus* 0,691; $p < 0,001$), quanto para discriminar presença e ausência de cirrose (0,924 *versus* 0,734; $p < 0,001$).

Xie e col.⁷⁸ avaliaram as dosagens de AH, PPIII e C-IV em 253 pacientes com hepatite C crônica. Os melhores pontos de corte para identificação de pacientes com fibrose significativa (Metavir $F \geq 2$) foram: AH = 90 μ g/L; PPIII = 90 μ g/L; e C-IV = 75 μ g/L. Estes valores proporcionaram as seguintes Se, Es, VPP e VPN: AH - 80,4%, 70,2%, 86,7% e 59,8%; PPIII - 82%, 60,8%, 83,5% e 58,4%; e C-IV - 63,1%, 83,8%, 90,4% e 48,4%, respectivamente. Os pontos de corte definidos para detecção de cirrose (Metavir $F \geq 3$) foram: AH = 210 μ g/L, com Se de 96,2%, Es, 85,3%, VPP, 65,4% e VPN, 98,8%; PPIII = 150 μ g/L, com valores de 76,4%, 68,7%, 40,4% e 91,3%; C-IV = 90 μ g/L, com valores de 80%, 75,8%, 47,8% e 93,2% para Se, Es, VPP e VPN, respectivamente. Os três testes mostraram bom desempenho, sendo melhor a dosagem sérica do AH.

Zheng e col.⁷⁹ utilizaram curvas ROC para avaliar o desempenho de vários marcadores para detecção de fibrose avançada. Foram dosados os níveis séricos de AH, PC-III, PPIII, LN e C-IV em 114 pacientes com hepatite C crônica e comparados aos achados histológicos observados nas biópsias. As áreas sob as curvas ROC obtidas foram as seguintes: PPIII = 0,80, AH = 0,728, PC-III = 0,727, C-IV = 0,583 e LN = 0,463. Quando combinados dois parâmetros, o AH e o PPIII obtiveram o melhor desempenho e, quando combinados três ou mais índices, sendo o AH um deles, a Es foi 100%, mas com Se intermediária.

A quantificação das MMPs e TIMPs como marcadores de fibrose hepática também está sendo investigadas em portadores de hepatite C crônica. Assim, Reif e col.⁸⁰ avaliaram os níveis das MMPs 2 e 9 no soro e no fígado de 35 pacientes com hepatite C crônica e de um grupo controle de nove pacientes com aminotransferases normais. Não houve correlação entre os valores de MMP-2 ou MMP-9 e o estágio de fibrose determinado na biópsia.

Boeker e col.⁸¹ investigaram o estágio de fibrose hepática e os níveis séricos de TIMP-1 e MMP-2 em 78 pacientes com hepatite C crônica, comparando-os com 30 controles sadios. Os valores de MMP-2 foram semelhantes nos controles e nos pacientes com e sem fibrose, mas foram significativamente maiores nos pacientes com cirrose. Os valores de TIMP-1 foram normais em pacientes sem fibrose e aumentaram, gradativamente, com a presença de fibrose e cirrose. A Se dos níveis de MMP-2 para

diagnóstico de fibrose foi próxima a 80%, com acurácia global de 56% e 58% nos dois ensaios laboratoriais utilizados. Para a detecção de cirrose, a Se foi 74% e 83%, e a Es, 96% e 100%, com acurácia de 92%. Os níveis séricos do TIMP-1 apresentaram Se de 52% e 67% e Es de 68% e 88%, com acurácia de 68% e 71% para o diagnóstico de fibrose. Para a detecção de cirrose, a Se foi 100%, com Es de 56% e 71%. O desempenho diagnóstico dos níveis séricos do TIMP-1 foi semelhante àquele do AH.

Leroy e col.⁸² avaliaram os níveis séricos de AH, PPIII, MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em 194 pacientes portadores de hepatite C crônica submetidos a biópsia hepática. Os valores obtidos foram comparados com aqueles de 194 controles saudáveis. Em análise univariada, todos, com exceção do TIMP-1, apresentaram relação com o estágio de fibrose. Já na análise multivariada, apenas dois marcadores, PPIII e MMP-1, foram independentemente associados aos estágios de fibrose. A combinação desses dois marcadores, em análise de regressão logística, resultou na seguinte equação: $0,5903 \log \text{PPIII (ng/ml)} - 0,1749 \log \text{MMP-1(ng/ml)}$. Com o emprego dessa fórmula, a área sob a curva ROC para diferenciar fibrose mínima de fibrose avançada (F0-F1 *versus* F2-F4 - escore Metavir) foi 0,82, com Se, 60% e Es, 92%.

Mais recentemente, Adams e col.⁸³ sugeriram um modelo constituído de marcadores séricos para a avaliação não-invasiva da fibrose hepática. Dez marcadores foram avaliados em 117 portadores de hepatite C crônica (fase de treinamento). Empregando-se análise multivariada por regressão logística e cálculo da área sob a curva ROC, criou-se uma equação e foram definidos pontos de corte para o diagnóstico de fibrose significativa (Metavir F2-F4), fibrose avançada (F3-F4) e cirrose (F4). Em seguida, esse modelo, formado pelas variáveis bilirrubinas, GGT, AH, A2M, além de idade e sexo, foi validado em 104 pacientes. Na fase de treinamento, um resultado $\geq 0,5$ apresentou Es e Se de 92% e 67%, respectivamente, e Se de 95% e Es de 81% para fibrose avançada. Um resultado $< 0,84$ para avaliação de cirrose apresentou Se de 71% e Es de 84%. Na fase de validação, as áreas sob a curva ROC para fibrose significativa, avançada e cirrose foram 0,82; 0,90 e 0,89, respectivamente.

Patel e col.⁸⁴ avaliou o desempenho de vários marcadores de fibrose em 294. Os valores do AH, A2M e TIMP-1 apresentaram os melhores desempenhos. Em seguida, um painel desses três marcadores foi testado em 402 pacientes. Os VPP e VPN obtidos para diferenciar fibrose mínima (F0-F1 de Metavir) de fibrose avançada (F2-F4 de Metavir) foram 74,3% e 75,8%, respectivamente, com acurácia global de 75%. Não foi possível a

diferenciação detalhada entre os estádios individuais de fibrose. Com base nesses resultados e na indicação de tratamento da hepatite C para os pacientes que apresentaram fibrose hepática Metavir F2-F4, pode-se considerar que o painel proposto pelos autores poderia “evitar” a realização da biópsia hepática em 284 (41%) pacientes. Entretanto, 98 (14%) desses seriam classificados erroneamente como portadores de fibrose significativa tratados sem necessidade. De forma semelhante, se a decisão fosse tomada considerando-se que os casos F0-F1 não têm indicação de tratamento, a biópsia seria evitada em 238 (34%) pacientes, com resultados falso-negativos em 76 (11%). Esses pacientes poderiam ter sido equivocadamente considerados sem indicação terapêutica.

Imbert-Bismut e col⁸⁵ também sugeriram um painel de marcadores bioquímicos e o compararam à biópsia hepática. Na avaliação prospectiva de 205 pacientes no primeiro ano e 134 pacientes no segundo, onze marcadores foram analisados em portadores de hepatite C com (Metavir F2-F4) e sem (Metavir F0-F1) fibrose hepática avançada. Os marcadores com diferença significativa entre os dois grupos foram submetidos a análise multivariada e foram propostos três modelos em combinações independentes. Dois deles, um formado por seis marcadores (A2M, alfa-2 globulina, bilirrubina total, gama globulina, apolipoproteína A1 e GGT) e outro por cinco marcadores (excluindo-se a alfa-2 globulina e a gama-globulina e acrescentando a haptoglobina) apresentaram melhores desempenhos com áreas sob a curva ROC de 0,836 e 0,827 no primeiro ano e 0,870 e 0,851 no segundo ano, respectivamente. Os dois modelos apresentaram desempenho semelhante, com VPN e VPP > 90%. A análise dos pacientes do segundo ano mostrou a possibilidade de não realização da biópsia em 62 de 134 (46%) pacientes considerando o desempenho destes. Para o diagnóstico de fibrose avançada ou cirrose (F3-F4), a área sob a curva ROC foi 0,923. Obteve-se VPN > 90% e VPP > 85% na avaliação de fibrose acentuada.

O mesmo painel de cinco marcadores foi estudado retrospectivamente em 165 pacientes tratados com interferon, por Poynard e col.⁸⁶. Os testes foram realizados antes, ao final e 6 meses após o término do tratamento. Duas biópsias hepáticas e os níveis séricos do AH foram as referências comparativas. Houve redução nos valores do painel em 17 pacientes com resposta virológica sustentada, quando comparados aos de 92 pacientes não respondedores e 56 recidivantes. Não houve diferença significativa entre os índices do painel e as dosagens do AH. Este painel de cinco marcadores, associado às variáveis sexo e idade, foi denominado FibroTest[®]. Posteriormente, Meyers e col.⁸⁷ compararam

o FibroTest[®] com índices históricos (gênero, idade à biópsia e consumo de álcool) para determinar a fibrose hepática em 211 pacientes com hepatite C crônica. Para diagnosticar fibrose significativa (Metavir F2-F4), a área sob a curva ROC foi 0,796 para o FibroTest[®] e, para os índices históricos, 0,709. Para diagnosticar fibrose avançada (F3-F4), as áreas sob a curva ROC foram 0,920 e 0,762, respectivamente. Em seguida, estes investigadores compararam o FibroTest[®] com marcadores frequentemente utilizados na avaliação não invasiva da fibrose hepática (tempo de protrombina, plaquetas, e índice idade/plaquetas) em 323 pacientes com hepatite C crônica⁸⁸. Utilizando-se a biópsia como o padrão-ouro para quantificar fibrose, os autores demonstraram que apenas o FibroTest[®] ($p < 0,0001$) e o tempo de protrombina ($p = 0,02$) foram preditivos de fibrose significativa. A área sob a curva ROC foi superior para o FibroTest[®], quando comparada às áreas para plaquetas, tempo de protrombina e índice idade/plaquetas. A adição de um dos três índices ao FibroTest[®] não aumentou a sua acurácia.

O desempenho do FibroTest[®] foi, também, avaliado em 352 pacientes com hepatite C crônica tratados⁸⁹. O teste mostrou-se útil no acompanhamento da evolução da fibrose, tendo-se observado redução em 184 pacientes com resposta virológica sustentada (de $0,39 \pm 0,02$ para $0,28 \pm 0,02$), comparados a 126 pacientes não respondedores (de $0,59 \pm 0,03$ para $0,56 \pm 0,03$; $p < 0,001$). A fórmula do FibroTest[®] não é informada em nenhum dos estudos publicados originalmente pelo grupo responsável pelo seu desenvolvimento, mas está descrita na patente⁹⁰, como cita Castera e col.⁹¹: $\text{escore} = 4,467 \times \log \text{A2M (g/L)} - 1,357 \times \log \text{haptoglobina (g/L)} + 1,017 \times \log \text{GGT (IU/L)} + 0,0281 \times \text{idade (em anos)} + 1,737 \times \log \text{bilirrubina (\mu mol/L)} - 1,184 \times \text{apolipoproteína A1 (g/L)} + 0,301 \times \text{sexo (feminino = 0, masculino = 1)} - 5,540$.

Castera e col.⁹¹ compararam a elastografia transitória (Fibroscan[®]), que é um método ultrassonográfico para se medir a espessura do parênquima hepático, com o Fibrotest[®] e o APRI em 183 pacientes com hepatite C crônica. O padrão de referências foram biópsias hepáticas classificadas pelo Metavir. Os três métodos apresentaram bom desempenho, obtendo-se as seguintes áreas sob a curva ROC para o Fibroscan[®], Fibrotest[®] e APRI: $F \geq 2 = 0,83, 0,85$ e $0,78$, $F \geq 3 = 0,90, 0,90$ e $0,84$, e $F = 4: 0,95, 0,87$ e $0,83$, respectivamente. A associação de métodos apresentou melhor desempenho quando comparada à avaliação isolada. Le Calvez e col.⁹² também compararam o FibroTest[®] e o APRI em 323 pacientes. Para diagnosticar fibrose significativa (F2-F4), a

área sob a curva ROC foi 0,74 para o APRI e 0,83 para o FibroTest[®]; e para diagnosticar cirrose, 0,80 e 0,92, respectivamente. Não obstante, uma avaliação do FibroTest[®] em 125 pacientes com hepatite C crônica não confirmou o desempenho observado nos estudos anteriores⁹³. Os índices de Se, Es, VPP e VPN foram inferiores aos relatados originalmente. A área sob a curva ROC foi 0,739, e, portanto, também foi inferior à relatada no estudo original (0,837).

Outro estudo avaliou o desempenho de três modelos (APRI, Forns e FibroTest[®]) para a avaliação do estágio de fibrose em 190 pacientes com hepatite C crônica⁹⁴. Para a detecção de fibrose significativa (Metavir ≥ 2) os pacientes foram distribuídos em dois grupos com base no valor da ALT elevada (grupo 1) ou normal (grupo 2). No grupo 1, o APRI apresentou o melhor Se e o FibroTest[®], a melhor Es. A melhor acurácia global foi obtida com APRI (81,2%). Não houve diferença significativa na área sob a curva ROC para os três testes. No grupo 2, o modelo de Forns apresentou maior Se, o FibroTest[®], maior Es e o APRI a maior área sob a curva ROC e melhor acurácia global. Para a detecção de cirrose foram comparados o APRI e o FibroTest[®] uma vez que o Forns não distingue fibrose avançada de cirrose. O FibroTest[®] apresentou desempenho superior em todos os índices (Se: 50% *versus* 38,4%, Es: 92,9% *versus* 86,7%, VPP: 57,9% *versus* 38,5%, VPN: 90,5% *versus* 86,7%, acurácia global: 85,9% *versus* 78,1% e área sob a curva ROC: 0,71 *versus* 0,61). A combinação dos testes em algoritmos sequenciais foi sugerida, pelos autores, como método para obter acurácia global acima de 90%.

Em seguida, esses algoritmos, desenvolvidos com base no VPP e VPN dos testes individuais, foram validados em 100 pacientes com hepatite C crônica (Figuras 1, 2 e 3). O primeiro, empregado para identificar fibrose significativa (Metavir ≥ 2) naqueles com ALT alta, teve acurácia global de 94%. O APRI foi calculado para todos os pacientes e, nos casos não classificados, utilizou-se o FibroTest[®]. O mesmo modelo foi aplicado para pacientes com ALT normal, no segundo algoritmo, com o cálculo do APRI para todos os pacientes, seguido pelo FibroTest[®] naqueles cujo resultado foi F0-F1 e nos casos não classificados. A acurácia global foi de 93,9%. Um terceiro algoritmo foi proposto para otimizar o diagnóstico de pacientes com cirrose. Os pacientes classificados pelo APRI como F0-F1 não necessitaram avaliação adicional devido ao seu alto VPN. Para os demais pacientes foi aplicado, sequencialmente, o FibroTest[®],

com indicação de biópsia nos casos classificados como F2-F3. A acurácia global foi 92,7%.

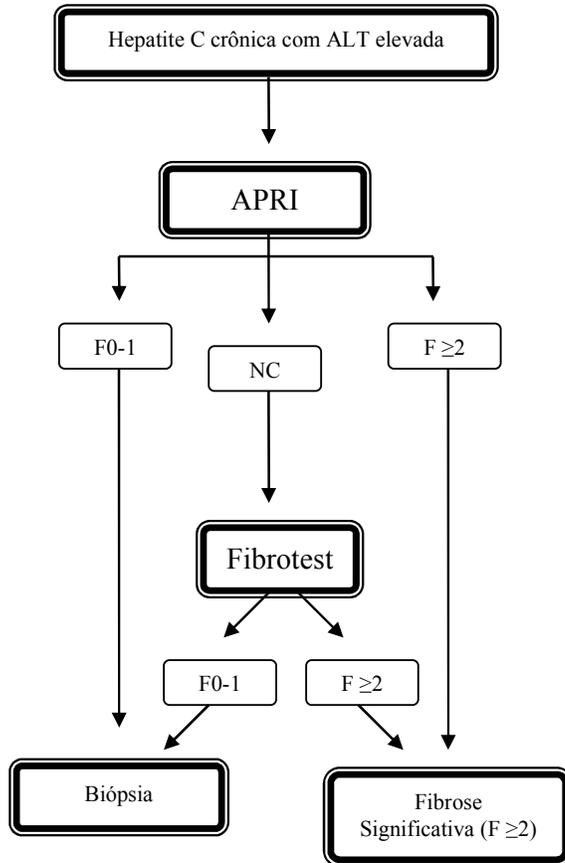


Fig. 1. Algoritmo para diagnóstico de fibrose significativa (Metavir ≥ 2) em pacientes com hepatite C crônica e ALT elevada. Sebastiani e col⁹⁴
NC: não classificáveis, F: fibrose.

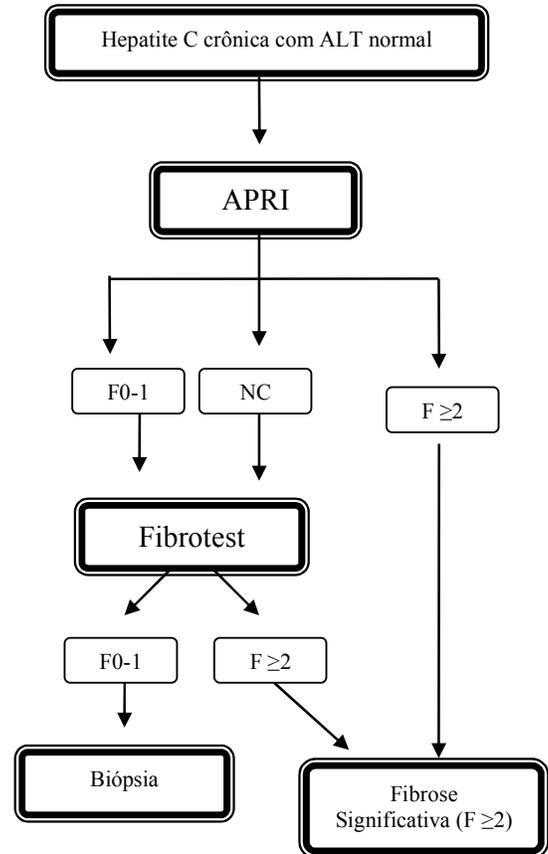


Fig. 2. Algoritmo para diagnóstico de fibrose significativa (Metavir ≥ 2) em pacientes com hepatite C crônica e ALT normal. Sebastiani e col⁹⁴
NC: não classificáveis, F: fibrose.

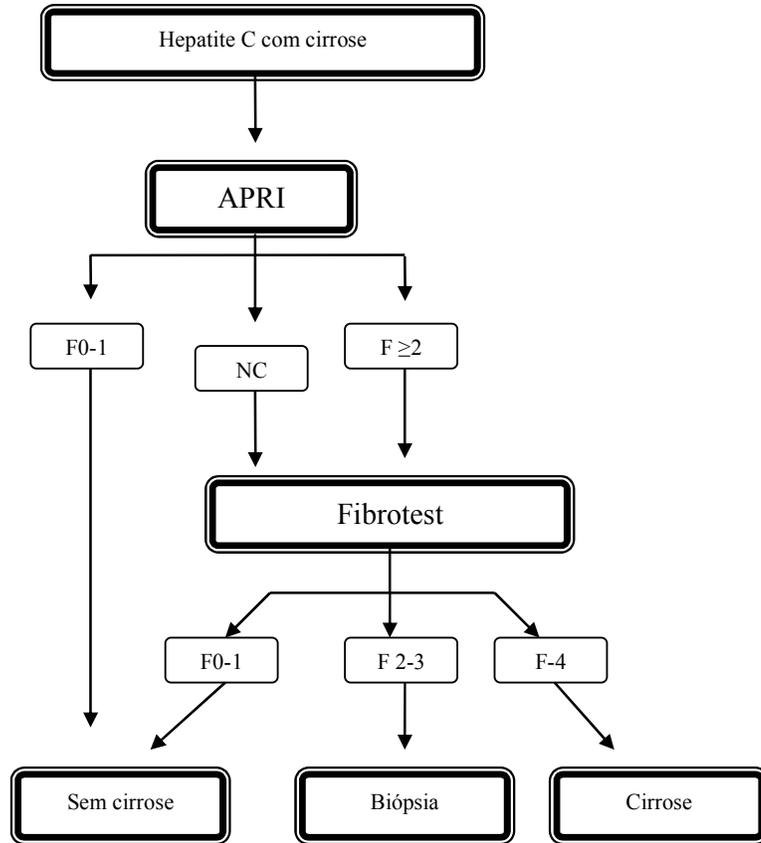


Fig. 3. Algoritmo para diagnóstico de cirrose (Metavir ≥ 3) em pacientes com hepatite C. Sebastiani e col⁹⁴. NC: não classificáveis, F: fibrose.

DISCUSSÃO

A biópsia tem sido considerada o “padrão ouro” para o estadiamento da fibrose hepática nas últimas seis décadas. Contudo, não se trata de método isento de risco e de limitações. Assim, as indicações de sua realização têm sido amplamente discutidas. As complicações graves que requerem hospitalização ou prolongamento da internação hospitalar ocorrem em até 3% dos pacientes. Raramente o procedimento pode levar ao óbito, sendo maior o risco naqueles portadores de cirrose avançada, coagulopatias, sepse ou tumores hepáticos e nos casos de múltiplas punções no mesmo procedimento. O método semiquantitativo de análise histopatológica através de índices de pontuações, também tem recebido críticas por ser estático e não estimar adequadamente a dinâmica do processo fibrogênico ou fibrolítico. Assim, as classificações numéricas não quantificam, com acurácia, o tecido fibrótico depositado no espaço extracelular e não fornecem informações a respeito da progressão ou regressão clínica da doença.

A biópsia hepática representa, em média, cerca de 1/50.000 do fígado, que, no adulto, tem peso médio de 1.500g. Biópsias pequenas ou fragmentadas estão sujeitas a maiores chances de erro amostral. Através de modelos de computação gráfica, estima-se que uma biópsia medindo 25 mm pode apresentar uma taxa de erro de interpretação de até 25%⁹⁵. Assim, sugere-se que, para a obtenção de resultados adequados, o fragmento de biópsia deve medir 40 mm ou mais. Não obstante, somente 16% das biópsias são maiores que 20 mm mesmo quando realizadas por profissionais experientes⁹⁶.

A comparação de amostras de biópsia com resultados de autópsias indicam que a biópsia percutânea pode não identificar cirrose em 10% a 30% dos casos⁹⁷⁻⁹⁹. Uma investigação que comparou biópsias laparoscópicas realizadas nos lobos direito e esquerdo revelou discrepâncias de resultados entre os dois lobos em quase metade dos casos. Em 14,5% dos casos a cirrose foi notada em um lobo apenas e, em 33,1% dos casos, os dois lobos apresentaram diferenças em pelo menos um estágio de fibrose¹⁰⁰. Portanto, os erros de amostragem e a variabilidade observacional para o estadiamento da biópsia hepática limitam a sua utilidade como método de referência, ou padrão ouro, na determinação do estágio de fibrose hepática.

É importante ressaltar que o estadiamento da fibrose não é o único objetivo da biópsia hepática. Ela tem utilidade prática para diagnosticar ou afastar as diversas hepatopatias, graduar a atividade inflamatória e avaliar a resposta ao tratamento, como na hepatite

auto-imune. Em pacientes no pós-transplante hepático, é exame indispensável para diagnosticar rejeições agudas e crônicas, recorrências da doença de base e infecções oportunistas.

Alguns métodos de quantificação da fibrose em amostras de tecido, como, por exemplo, a morfometria ou a detecção de RNAm da matriz extracelular, podem aumentar a acurácia da avaliação histológica, mas não são utilizados de rotina e somente em protocolos de investigação¹⁰¹⁻¹⁰².

Na hepatite C crônica, o estadiamento da fibrose é essencial para indicar o tratamento e prever o prognóstico. Conforme os protocolos atualmente em vigor, os pacientes com alterações histológicas discretas à biópsia hepática não requerem tratamento imediato. A infecção crônica que evolui com inflamação leve e nenhuma fibrose tem excelente prognóstico a longo prazo, com chances de evoluir para a cirrose em menos de 20% no período de 20 anos ou mais. Nesses casos, está indicada a monitoração histológica periódica e o tratamento está indicado apenas se houver progressão da doença.

Os avanços recentes no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da fibrogênese hepática têm sido notáveis nas últimas décadas e têm provocado 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, incluindo o HCV. Este novo e promissor cenário demanda o desenvolvimento de métodos de monitorização do processo dinâmico da fibrose hepática, fibrogênico e fibrolítico, o que constitui um dos principais desafios da hepatologia moderna.

Considerando-se, portanto, a demanda de novos métodos de monitorização da fibrose hepática e as limitações da biópsia, os testes séricos, menos invasivos, vêm sendo amplamente investigados como métodos de substituição da biópsia na avaliação do estágio de fibrose. Esses métodos têm a perspectiva otimista de um desempenho diagnóstico satisfatório, da isenção de complicações e do custo-benefício favorável.

Entre os testes simples isolados, a contagem de plaquetas foi o mais estudado, inicialmente. Nas diversas investigações reportadas³⁵⁻³⁹, pode-se observar ampla variação nos seus valores de referência (130 a $160 \times 10^3/\text{mm}^3$) e nos pontos de corte para a detecção de fibrose avançada ou cirrose, bem como nos índices de Se, Es, VPP e

VPN. Em geral, observa-se melhor desempenho para diagnosticar fibrose avançada e cirrose quanto menor for o ponto de corte. As Se variam, nos diversos estudos, entre 34% e 91%, e a Es, entre 70% e 97%.

A relação AST/ALT é o modelo mais simples de ser aplicado na prática. Seu ponto de corte é uniforme, e o resultado >1 permite identificar pacientes com cirrose. Contudo, há discrepância na literatura a respeito da sua acurácia. Um estudo demonstrou Es e VPP de 100%⁵², mas esses índices não foram comprovados em investigações posteriores⁵³⁻⁵⁵. A associação da relação AST/ALT com a contagem de plaquetas tem apresentado bons resultados⁵⁷.

O APRI⁶¹ é um teste que utiliza duas variáveis simples - a contagem de plaquetas e o valor da AST. Quando avaliados os pontos de corte para diagnóstico de fibrose avançada e cirrose, as áreas sob a curva ROC são 0,83 e 0,90, respectivamente. Não obstante, uma parcela considerável de pacientes situa-se em zona de pontuação intermediária, que, portanto, não podem ser classificados. Alguns trabalhos comparativos mostraram bom desempenho do teste^{38,65}, mas inferiores aos descritos no trabalho original⁶¹.

Outros modelos que utilizam testes simples como os de Forns⁵⁹, Bonacini⁵⁸, GUCI⁶² e o de Lok⁶³ apresentaram bons resultados, mas não foram, ainda, suficientemente validados para serem utilizados na prática.

O modelo de Forns⁵⁹ tem bom desempenho para excluir o diagnóstico de fibrose significativa (Se de 94% e VPN de 96%) e boa Es para confirmar cirrose (95%). Esse modelo emprega dois pontos de corte distintos, impossibilitando classificar uma parcela significativa de pacientes. A inclusão do colesterol como variável pode levar a um viés importante quando da realização de estudos para validação do modelo, pois outras condições clínicas não relacionadas ao quadro hepático podem interferir nessa variável.

O índice discriminante da cirrose, desenvolvido por Bonacini⁵⁸, apresentou baixa Se e alta Es para diagnóstico de pacientes com fibrose avançada ou cirrose. O trabalho original foi desenvolvido em apenas 79 pacientes. Colli e col.¹⁰³ associaram o índice de Bonacini a características ultrassonográficas, obtendo melhores resultados.

O modelo derivado do APRI (com acréscimo de RNI), desenvolvido na universidade de Goteborg – GUCI⁶², apresentou bom desempenho para excluir cirrose e maior área sob a curva ROC quando comparado ao APRI, mas não foi validado em trabalhos posteriores.

O modelo desenvolvido por Lok e col⁶³. utiliza uma fórmula de regressão logística de maior complexidade operacional a despeito de empregar variáveis simples e poder ser acessado pela internet⁶³. A despeito de o trabalho original ter testado o modelo em uma grande população de portadores de hepatite C, suas principais limitações são o fato de ser retrospectivo e as informações foram obtidas de um banco de dados cujo propósito original não fora criar um teste para validar fibrose hepática. Assim, o modelo foi desenvolvido a partir de uma coorte de pacientes previamente submetidos ao tratamento e com fibrose em ponte ou cirrose (Ishak maior ou igual a 3). No mesmo trabalho, ele foi validado, a partir de dados de pacientes não tratados com estádios variados de fibrose. Esse modelo teve bom desempenho para diagnosticar pacientes com cirrose. Em razão de utilizar dois pontos de corte distintos, uma parcela significativa de pacientes não pôde ser classificada. Contudo, trata-se de um modelo que tem a possibilidade teórica de dispensar a realização da biópsia em cerca de 50% dos pacientes, mas requer validação em outros estudos.

Entre os testes complexos, o AH é o mais investigado. Na maioria dos trabalhos, suas concentrações séricas são significativamente maiores nos pacientes cirróticos quando comparadas às daqueles com fibrose discreta ou ausente, a despeito da grande variação nos parâmetros relatados de Se, Es, VPP e VPN. Os pontos de corte avaliados e definidos são muito variáveis e não há relação estabelecida entre a elevação sérica e o aumento seqüencial dos estádios de fibrose, não sendo possível a diferenciação detalhada entre os estádios individuais.

Alguns marcadores como o C-IV, YKL-40 e PPIII apresentaram desempenho semelhante ao AH em trabalhos isolados^{35,73-79}, mas sem validação suficiente até o momento.

O Fibrotest[®] é um dos modelos mais estudados dentre os que utilizam testes complexos. Cinco variáveis compõem um painel, combinando testes simples (bilirrubina total e GGT) e testes complexos (A2M, haptoglobina e apolipoproteína A1). Os resultados originais⁸⁵⁻⁸⁶ mostraram boa acurácia para identificar pacientes com fibrose mínima e

pacientes com fibrose avançada. Outros estudos de validação foram publicados pelo mesmo grupo, com resultados semelhantes⁸⁷⁻⁸⁹. Poucos trabalhos independentes foram realizados e alguns não confirmaram os resultados satisfatórios iniciais⁹³. Resultados falso-positivos podem ocorrer na vigência do aumento da bilirrubina por causas diversas, como colestase, síndrome de Gilbert ou hemólise, essa última muito freqüente em pacientes em tratamento de hepatite C com ribavirina. Estados inflamatórios agudos podem levar a aumentos inespecíficos da A2M e da haptoglobina, que também podem influenciar no resultado do teste. Outra consideração importante diz respeito à variação analítica de alguns parâmetros do painel em razão da ausência de padronização. Para exemplificar, Allieri e col.¹⁰⁴ compararam duas técnicas laboratoriais em exames de pacientes com hepatite C crônica e encontraram variação de 12% nos resultados da apolipoproteína A1 e 40% nos resultados da A2M. O custo para realização dos testes complexos, somado à taxa cobrada para o cálculo do índice, são fatores limitantes à utilização desse teste na prática clínica.

Os testes simples apresentam como vantagens o fato de serem realizados na rotina do acompanhamento dos pacientes e, portanto, são mais aplicáveis. Contudo, não estão diretamente relacionados aos mecanismos de fibrogênese, e também sofrem influência de outras doenças ou estados inflamatórios.

Os testes complexos estimam, em sua maioria, os eventos dinâmicos da matriz extracelular durante o processo fibrogênico, incluindo a ativação das CHE, a inflamação, a lesão hepática e a reabsorção da matriz. Se por um lado representam diretamente a dinâmica da produção do tecido fibrótico, eles podem não refletir os aspectos qualitativos da matriz fibrótica remanescente, relativamente acelular. Esses testes têm desempenho semelhante ou melhor do que os testes simples na identificação de pacientes com fibrose avançada ou cirrose. As principais desvantagens são o alto custo e a indisponibilidade para uso na prática clínica.

A complexidade dos estudos que utilizam os testes séricos para avaliar a fibrose hepática se deve, também à heterogeneidade dos modelos propostos. Além da diversidade de marcadores isolados e dos modelos matemáticos, diferentes pontos de corte dificultam a sua reprodutibilidade. As populações analisadas são heterogêneas e a maioria das investigações têm incluído amostras pequenas. Há diferenças quanto à idade e os momentos de avaliação. Assim, há estudos que avaliam pacientes no pré-tratamento, enquanto outros buscam validar os testes durante ou após o tratamento. De

forma semelhante, os diferentes estádios de fibrose observados são, também, fatores que limitam a reprodutibilidade dos resultados. Há diferentes sistemas de semiquantificação da fibrose (Ishak, Metavir, Knodell e Scheuer) e diferentes categorizações dos estádios de fibrose, o que dificulta a análise comparativa. Os estudos de validação são, ainda, bastante escassos. Os resultados comprovam que os testes são úteis para distinguir os pacientes com e sem fibrose significativa e cirrose, mas não diferenciam os estádios individuais de fibrose.

Do ponto de vista prático, o teste não invasivo ideal deve ser simples, facilmente disponível, de baixo custo e bom desempenho. Contudo, nenhum dos modelos estudados apresenta todas estas características. Assim, estima-se que, em futuro próximo, a combinação de testes com validações em amostras homogêneas e metodologia sistematizada possa demonstrar melhor desempenho e menor custo na avaliação da fibrose hepática.

Em razão dessas limitações, os marcadores séricos não foram, ainda, suficientemente validados para substituir a biópsia hepática. Não obstante, em casos específicos, podem ser úteis para indicar doença inicial ou avançada nas situações em que a biópsia hepática, por razões diversas, for contra-indicada.

Como perspectiva futura, a utilização de testes séricos será ampliada através da aplicação de tecnologias para estudo do proteoma. Em uma amostra única de sangue é possível analisar, em larga escala, centenas de proteínas. Após a purificação e utilizando-se de *chips* eletrônicos, diversos perfis proteômicos são estabelecidos. Alguns padrões específicos vêm sendo comparados ao estadiamento histológico, com resultados promissores na identificação de cirrose e maior distinção dos diversos estádios da fibrose¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Na fronteira da tecnologia estão as técnicas de “nanoimagem”, que poderão proporcionar, em futuro próximo, utilizando-se da bioluminescência e de semicondutores fluorescentes de nanocristais, o estudo do funcionamento celular associado a um padrão de imagem macroscópica mais detalhado e de maior definição¹⁰⁸⁻¹⁰⁹. Assim, será possível a detecção direta e a quantificação precisa da fibrose e da atividade inflamatória, o que deverá resolver, em parte, as deficiências dos marcadores não invasivos de fibrose hepática testados até o momento.

Referências bibliográficas

1. CHOO QL, KUO G, WEINER AJ, OVERBY LR, BRADLEY DW, HOUGHTON M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, 244: 359-362, 1989.
2. STRADER DB, SEEFF LB. The natural history of chronic hepatitis C infection. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, 8: 324–328, 1996.
3. SHEFF LB, HOOFNAGLE JH. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. **Hepatology**, 36(suppl 1): S1–S2, 2002.
4. AFDHAL NH. The natural history of hepatitis C. **Semin. Liver Dis.**, 24 (Suppl 2): 3-8, 2004.
5. RYDER SD, IRVING WL, JONES DA, NEAL KR, UNDERWOOD JC. Trent Hepatitis C Study Group. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. **Gut**, 53(3): 451-5, 2004.
6. SHIFFMAN ML. Natural history and risk factors for progression of hepatitis C virus disease and development of hepatocellular cancer before liver transplantation. **Liver Transpl.**, 9(11): S14-20, 2003.
7. POYNARD T, BEDOSSA P, OPOLON P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. **Lancet**, 349(9055): 825-32, 1997.
8. FRIEDMAN SL. The Cellular Basis of Hepatic Fibrosis - Mechanisms and Treatment Strategies. **N. Eng. J. Med.**, 328(24): 1828-35, 1993.
9. FRIEDMAN SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **J. Biol. Chem.**, 275: 2247–50, 2000.
10. TSUKADA S, PARSONS CJ, RIPPE RA. Mechanisms of liver fibrosis. **Clinica Chimica Acta**, 364: 33–60, 2006.
11. FRIEDMAN SL. Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications **Nat. Clin. Pract.**, 1(2): 98-105, 2004.
12. FRIEDMAN S, ARTHUR M. Reversing hepatic fibrosis. **Science & Medicine**, 8(3): 194-205, 2002.
13. ALBANIS E, FRIEDMAN SL. Antifibrotic Agents for Liver Disease. **American Journal of Transplantation**, 6: 12–19, 2006.
14. BATALLER R, BRENNER DA. Liver fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, 115(2): 209-18, 2005.
15. PINZANI M, ROMBOUTS K, COLAGRANDE S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. **Journal of Hepatology**, 42: S22–S36, 2005.

16. NEUBAUER K, SAILE B, RAMADORI G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. **Can. J. Gastroenterol.**,15(3): 187-93, 2001.
17. 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**, 349: 825-32, 1997.
18. ISHAK KG, BABPTISTA A, BIANCHI L, CALLEA F, DE GROOTE J, GUDAT J, DENK H. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **Journal of Hepatology**, 22: 696-99, 1995.
19. CADRANEL JF, RUFAT P, DEGOS F. Practices of Liver Biopsy in France: Results of a Prospective Nationwide Survey. **Hepatology**, 32(3): 477-81, 2000.
20. MCGILL DB, RAKELA J, ZINSMEISTER AR, OTT BJ. A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. **Gastroenterology**, 99: 1396-1400, 1990.
21. PICCININO F, SAGNELLI E, PASQUALE G, GIUSTI G. Complications following percutaneous liver biopsy: a multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. **Journal of Hepatology**, 2: 165-173, 1986.
22. BRAVO AA, SHETH SG, CHOPRA S. Current Concepts: Liver Biopsy. **N. Engl. J. Med.**, 344: 495-500, 2001.
23. HARINATH S, SRINIVAS S, CARY C, BOYER J, DHANPAT J. Liver Biopsy: Evolving Role in the New Millennium. **J. Clin. Gastroenterol.**, 39(7): 603-10, 2005.
24. PERRAULT J, MCGILL DB, OTT BJ. Liver biopsy: complications in 1000 inpatients and outpatients. **Gastroenterology**, 74: 103-106, 1978.
25. ROSSON RR, CORRAL J, JASKI T. Outpatient liver biopsy. **J.A.M.A.**, 222: 364, 1972.
26. SCOTT L. Friedman Liver fibrosis – from bench to bedside. **Journal of Hepatology**, 38: S38–S53, 2003.
27. BENYON I. Is liver fibrosis reversible? **Gut**, 46: 443–46, 2000.
28. SCHMIDT KG, RASMUSSEN JW, BEKKER C, MADSEN PER. Kinetics and in vivo distribution of 111-in labeled autologous platelets in chronic hepatic disease: Mechanisms of thrombocytopenia. **Scand. J. Haematol.**, 34: 39–46, 1985.
29. PECK-RADOSAVLJEVIC M, ZACHER J, MENG YG *et al.* Is inadequate thrombopoietin production a major cause of thrombocytopenia in cirrhosis of the liver? **Journal of Hepatology**, 27: 127–31, 1997.
30. KAWASAKI T, TAKESHITA A, SOUDA K. Serum thrombopoietin levels in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. **Am. J. Gastroenterol.**, 94: 1918–22, 1999.

31. ADINOLFI LE, GIORDANO MG, ANDREANA A, TRIPODI MF, UTILI R, CESARO G, RAGONE E, DURANTE MANGONI E, RUGGIERO G. Hepatic fibrosis plays a central role in the pathogenesis of thrombocytopenia in patients with chronic viral hepatitis. **Br. J. Haematol.**, 113(3): 590-5, 2001.
32. GROBER D, GIULIANI D, LEEVY CM, MORSE B. Platelet associated IgG in hepatitis and cirrhosis. **J. Clin. Immunol.**, 4: 109-13, 1984.
33. NAGAMINE T, OHTUKA T, TAKEHARA K, ARAI T, TAKAGI H, MORI M. Thrombocytopenia associated with hepatitis C viral infection. **Journal of Hepatology**, 24: 135-40, 1996.
34. ONO E, SHIRATORI Y, OKUDAIRA T. Platelet count reflects stage of chronic hepatitis C. **Hepatol. Res.**, 15: 192-200, 1999.
35. MURAWAKI Y, KODA M, OKAMOTO K, MIMURA K, KAWASAKI H. Diagnostic value of serum type IV collagen test in comparison with platelet count for predicting the fibrotic stage in patients with chronic hepatitis C. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 16(7): 777-81, 2001.
36. GIANNINI E, RISSO D, BOTTA F, CHIARBONELLO B, FASOLI A, MD, MALFATTI F, ROMAGNOLI P, TESTA E, CEPPA P, TESTA R. Validity and Clinical Utility of the Aspartate Aminotransferase-Alanine Aminotransferase Ratio in Assessing Disease Severity and Prognosis in Patients With Hepatitis C Virus-Related Chronic Liver Disease. **Arch. Intern. Med.**, 163: 218-224, 2003.
37. MYERS RP, TORRES M, IMBERT-BISMUT F, RATZIU V, CHARLOTTE F, POYNARD T. Biochemical Markers of Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C - A Comparison with Prothrombin Time, Platelet Count, and Age-Platelet Index. **Digestive Diseases and Sciences**, 48(1): 146-53, 2003.
38. LACKNER C, STRUBER G, LIEGL B, LEIBL S, OFNER P, BANKUTI C, BAUER B, STAUBER RE. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology**, 41(6): 1376-82, 2005.
39. POYNARD T, BEDOSSA P. Age and platelet count: a simple index for predicting the presence of histological lesions in patients with antibodies to hepatitis C virus. **Journal of Viral Hepatitis**, 4(3): 199-208, 1997.
40. KARMEN A, WROBLEWSKI F, LA DUE J. Transaminase activity in human blood. **J. Clin. Invest.**, 34: 126-33, 1955.
41. LUO JC, HWANG SJ, LAI CR, LU CL, LI CP, TSAY SH, WU JC, CHANG FY, LEE SD. Relationships between serum aminotransferase levels, liver histologies and virological status in patients with chronic hepatitis C in Taiwan. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 13: 685-90, 1998.
42. HABER MM, WEST AB, HABER AD, REUBEN A. Relationship of aminotransferases to liver histological status in chronic hepatitis C. **Am. J. Gastroenterol.**, 90: 1250-7, 1995.

43. HEALEY CJ, CHAPMAN RWG, FLEMING KA. Liver histology in hepatitis C infection: a comparison between patients with persistently normal or abnormal transaminases. **Gut**, 37: 274-8, 1995.
44. PERSICO M, ROMANO M. Alanine aminotransferase measurements and histological disease in hepatitis C. **Lancet**, 342: 1369-70, 1993.
45. BOYDE TRC, LATNER AR. Starch-gel electrophoresis of transaminase in human tissue extracts and sera. **Biochem. J.**, 82:51, 1961.
46. MATLOFF DF, SELINGER MJ, KAPLAN MM. Hepatic transaminase activity in alcoholic liver disease. **Gastroenterology**, 78: 1389-92, 1980.
47. CLERMONT RJ, CHALMERS TC. The transaminase test in liver disease. **Medicine**, 46:197-205, 1967.
48. KAMIMOTO Y, HORIUCHI S, TANASE S, MORINO Y. Plasma clearance of intravenously injected aspartate aminotransferases isoenzymes: evidence for preferential uptake by sinusoidal liver cells. **Hepatology**, 5: 367-75, 1985.
49. GIANNINI E, BOTTA F, FASOLI A. Progressive liver functional impairment is associated with an increase in AST/ALT ratio. **Digestive Diseases and Sciences**, 44: 1249-53, 1999.
50. WILLIAMS AL, HOOFNAGLE JH. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. **Gastroenterology**, 95: 734-9, 1988.
51. ANDERSON FH, ZENG L, ROCK NR, YOSHIDA EM. An assessment of the clinical utility of serum ALT and AST in chronic hepatitis C. **Hepatology Res.**, 18(1): 63-71, 2000.
52. SHETH SG, FLAMM SL, GORDON FD, CHOPRA S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Am. J. Gastroenterol.**, 93(1): 44-8, 1998.
53. REEDY DW, LOO AT, LEVINE RA. AST/ALT ratio ≥ 1 is not diagnostic of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Digestive Diseases and Sciences**, 43(9): 2156-9, 1998.
54. IMPERIALE TF, SAID AT, CUMMINGS OW, BORN LJ. Need for validation of clinical decision aids: use of the AST/ALT ratio in predicting cirrhosis in chronic hepatitis C. **Am. J. Gastroenterol.**, 95(9): 2328-32, 2000.
55. PARK GJ, LIN BP, NGU MC, JONES DB, KATELARIS PH. Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 15(4): 386-90, 2000.
56. PARK GJ, LIN BP, KATELARIS PH. Value of AST/ALT ratio as fibrotic predictor in chronic hepatitis C. **Am. J. Gastroenterol.**, 100(7): 1623-24, 2005.

57. POHL A, BEHLING C, OLIVER D, KILANI M, MONSON P, HASSANEIN T. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **Am. J. Gastroenterol.**, 96: 3142-46, 2001.
58. BONACINI M, HADI G, GOVINDARAJAN S, LINDSAY KL. Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Am. J. Gastroenterol.**, 92(8): 1302-4, 1997.
59. FORNS X, AMPURDANES S, LLOVET JM, APONTE J, QUINTO L, MARTINEZ-BAUER E, BRUGUERA M, SANCHEZ-TAPIAS JM, RODES J. Identification of Chronic Hepatitis C Patients Without Hepatic Fibrosis by a Simple Predictive Model. **Hepatology**, 36(4): 986-92, 2002.
60. PATEL K, MUIR AJ, MCHUTCHISON JG. Validation of a simple predictive model for the identification of mild hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. **Hepatology**, 37(5): 1222, 2003.
61. WAI CT, GREENSON JK, FONTANA RJ, KALBFLEISCH JD, MARRERO JA, CONJEEVARAM HS, LOK AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, 38(2): 518-26, 2003.
62. ISLAM S, ANTONSSON L, WESTIN J, LAGGING M. Cirrhosis in hepatitis C virus-infected patients can be excluded using an index of standard biochemical serum markers. **Scand. J. Gastroenterol.**, 40(7): 867-72, 2005.
63. LOK AS, GHANY MG, GOODMAN ZD, WRIGHT EC, EVERSON GT, STERLING RK, EVERHART JE, LINDSAY KL, BONKOVSKY HL, DI BISCEGLIE AM, LEE WM, MORGAN TR, DIENSTAG JL, MORISHIMA C. Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort. **Hepatology**, 42(2): 282-92, 2005.
64. ROMERO GOMEZ M, RAMIREZ MARTIN DEL CAMPO M, OTERO MA, VALLEJO M, CORPAS R. Comparative study of two models that use biochemical parameters for the non-invasive diagnosis of fibrosis in patients with hepatitis C. **Med. Clin.**, 28, 124(20): 761-4, 2005.
65. IACOBELLIS A, MANGIA A, LEANDRO G, CLEMENTE R, FESTA V, ATTINO V, RICCIARDI R. External validation of biochemical indices for noninvasive evaluation of liver fibrosis in HCV chronic hepatitis. **Am. J. Gastroenterol.**, 100(4): 868-73, 2005.
66. GRESSNER AM. Connective tissue parameters in serum for diagnosis and follow-up of liver fibrosis. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, 24: 283-92, 1987.
67. FRASER J, LAURENT T, PERTOFT N, BAXTER E. Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronan injected intravenously in the rabbit. **Biochem. J.**, 200: 415-24, 1981.
68. BENYON RC, IREDALE JP, GODDART S. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. **Gastroenterology**, 110: 821-31, 1996.

69. KOSSAKOWSKA AE, EDWARDS DE, LEE SS. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. **Am. J. Pathol.**, 153(6): 1895-902, 1998.
70. WONG VS, HUGHES V, TRULL A, WIGHT DG, PETRIK J, ALEXANDER GJ. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**, 5(3): 187-92, 1998.
71. MCHUTCHISON JG, BLATT LM, DE MEDINA M, CRAIG JR, CONRAD A, SCHIFF ER, TONG MJ. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. **J Gastroenterol. Hepatol.**, 15(8): 945-51, 2000.
72. HALFON P, BOURLIERE M, PENARANDA G, DEYDIER R, RENOUE C, BOTTA-FRIDLUND D, TRAN A, PORTAL I, ALLEMAND I, ROSENTHAL-ALLIERI A, OUZAN D. Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. **Comp. Hepatol.**, 11, 4:6, 2005.
73. GUECHOT J, LORIA A, SERFATY L, GIRAL P, GIBOUDEAU J, POUPON R. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of alpha-interferon therapy. **Journal of Hepatology**, 22(1): 22-6, 1995.
74. PATEL K, LAJOIE A, HEATON S, PIANKO S, BEHLING CA, BYLUND D, POCKROS PJ, BLATT LM, CONRAD A, MCHUTCHISON JG. Clinical use of hyaluronic acid as a predictor of fibrosis change in hepatitis C. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 18(3): 253-7, 2003.
75. NINOMIYA T, YOON S, HAYASHI Y, SUGANO M, KUMON Y, SEO Y, SHIMIZU K, KASUGA M. Clinical significance of serum hyaluronic acid as a fibrosis marker in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha: histological evaluation by a modified histological activity index scoring system. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 13(1): 68-74, 1998.
76. SAITOU Y, SHIRAKI K, YAMANAKA Y, YAMAGUCHI Y. Noninvasive estimation of liver fibrosis and response to interferon therapy by a serum fibrogenesis marker, YKL-40, in patients with HCV-associated liver disease. **World J. Gastroenterol.**, 28, 11(4): 476-81, 2005.
77. GUECHOT J, LAUDAT A, LORIA A, SERFATY L, POUPON R, GIBOUDEAU J. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. **Clin. Chem.**, 42(4): 558-63, 1996.
78. XIE SB, YAO JL, ZHENG RQ, PENG XM, GAO ZL. Serum hyaluronic acid, procollagen type III and IV in histological diagnosis of liver fibrosis. **Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.**, 2(1): 69-72, 2003.
79. ZHENG M, CAI WM, WENG HL, LIU RH. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. **World J. Gastroenterol.**, 8(6): 1073-6, 2002.

80. REIF S, SOMECH R, BRAZOVSKI E, REICH R, BELSON A, KONIKOFF FM, KESSLER A. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are markers of inflammation but not of the degree of fibrosis in chronic hepatitis C. **Digestion**, 71(2): 124-30, 2005.
81. BOEKER KH, HABERKORN CI, MICHELS D, FLEMMING P, MANNS MP, LICHTINGHAGEN R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Clin. Chim. Acta.**, 316(1-2): 71-81, 2002.
82. LEROY V, MONIER F, BOTTARI S, TROCME C, STURM N, HILLERET MN, MOREL F, ZARSKI JP. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. **Am. J. Gastroenterol.**, 99(2): 271-9, 2004.
83. ADAMS LA, BULSARA M, ROSSI E, DEBOER B, SPEERS D, GEORGE J, KENCH J, FARRELL G, MCCAUGHAN GW, JEFFREY GP. Hepascore: An Accurate Validated Predictor of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Infection. **Clin. Chem.**, 51(10): 1867-73, 2005.
84. PATEL K, GORDON SC, JACOBSON I, HEZODE C, OH E, SMITH KM, PAWLOTSKY JM, MCHUTCHISON JG. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. **Journal of Hepatology**, 41(6): 935-42, 2004.
85. IMBERT-BISMUT F, RATZIU V, PIERONI L, CHARLOTTE F, BENHAMOU Y, POYNARD T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. **Lancet**, 7; 357(9262): 1069-75, 2001.
86. POYNARD T, IMBERT-BISMUT F, RATZIU V, CHEVRET S, JARDEL C, MOUSSALLI J, MESSOUS D, DEGOS F. GERMED group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. **Journal of Viral. Hepatitis**, 9(2): 128-33, 2002.
87. MYERS RP, RATZIU V, IMBERT-BISMUT F, CHARLOTTE F, POYNARD T. Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with historical features in patients with chronic hepatitis C. **Am. J. Gastroenterol.**, 97(9): 2419-25, 2002.
88. MYERS RP, DE TORRES M, IMBERT-BISMUT F, RATZIU V, CHARLOTTE F, POYNARD T. MULTIVIRC Group. Biochemical markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a comparison with prothrombin time, platelet count, and age-platelet index. **Digestive Diseases and Sciences**. 48(1): 146-53, 2003.
89. POYNARD T, MCHUTCHISON J, MANNS M, MYERS RP, ALBRECHT J. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. **Hepatology**, 38: 481-92, 2003.

90. POYNARD T. Diagnosis method of inflammatory, fibrotic or cancerous disease using the biochemical markers. United States: Patent No US 6,631,330 B1, 2003.
91. CASTERA L, VERGNIOL J, FOUCHER J, LE BAIL B, CHANTELOUP E, HAASER M, DARRIET M, COUZIGOU P, DE LEDINGHEN V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, 128(2): 343-50, 2005.
92. Le CALVEZ C, THABUT D, MESSOUS D, MUNTEANU M, RATZIU V, IMBERT-BISMUT S, POYNARD T. The predictive value of Fibrotest vs APRI for the diagnosis of fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology**, 39: 862-63, 2004.
93. ROSSI E, ADAMS L, PRINS A, BULSARA M, DE BOER B, GARAS G. Validation of the FibroTest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis C patients. **Clin. Chem.**, 49: 450-54, 2003.
94. SEBASTIANI G, VARIO A, GUIDO A. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, 44: 686-93, 2006.
95. ABDI W, MILLAN JC, MEZEY E. Sampling variability on percutaneous liver biopsy. **Arch. Intern. Med.**, 139: 667-69, 1979.
96. BEDOSSA P, DARGERÉ D, PARADIS V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology**, 38: 1449-57, 2003.
97. PONIACHIK J, BERNSTEIN DE, REDDY KR. The role of laparoscopy in the diagnosis of cirrhosis. **Gastrointest. Endosc.**, 43: 568-71, 1996.
98. PAGLIARO L, RINALDI F, CRAXI A. Percutaneous blind biopsy x laparoscopy with guided biopsy in diagnosis of cirrhosis. A prospective, randomized trial. **Digestive Diseases and Sciences**, 28: 39-43, 1983.
99. MAHARAJ B, MAHARAJ RJ, LEARY WP. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. **Lancet**, 1:523-25, 1986.
100. REGEV A, BERHO M, JEFFERS LJ. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. **Am. J. Gastroenterol.**, 97: 2614-18, 2002.
101. O'BRIEN MJ, KEATING NM, ELDERINY S, CERDA S, KEAVENY AP, AFDHAL NH. An assessment of digital image analysis to measure fibrosis in liver biopsy specimens of patients with chronic hepatitis C. **Am. J. Clin. Pathol.**, 114: 712-18, 2000.
102. BUSTIN SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J. Mol. Endocrinol.**, 25: 169-93, 2000.

103. COLLI A, COLUCCI A, PAGGI S, FRAQUELLI M, MASSIRONI S, ANDREOLETTI M, MICHELA V, CONTE D. Accuracy of a predictive model for severe hepatic fibrosis or cirrhosis in chronic hepatitis C. **World. J. Gastroenterol.**, 14, 11(46): 7318-22, 2005.
104. ALLIERI AMR, PERITORE M, TRAN A. Analytical variability of the Fibrotest protein. **Clin. Bioch.**, 38: 473-78, 2005.
105. DEV A, WHITE I, SYMONDS W, PATEL K. A serum proteomic analysis in hepatitis C fibrosis. **Journal of Hepatology**, 42(S2): 117A, 2005.
106. CALLEWAERT N, VAN VLIERBERGHE H, VAN HECKE A, LAROY W, DELANGHE J, CONTRERAS R. Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics. **Nat. Med.**, 10: 429-34, 2004.
107. POON T, CHUI AY, CHAN HL. Prediction of liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B infection by serum proteomic fingerprinting: a pilot study. **Clin. Chem.**, 51(2): 328-35, 2005.
108. MICHALET X, PINAUD FF, BENTOLILA LA. Quantum dots for live cells, in vivo imaging and diagnostics. **Science**, 307: 538-44, 2005.
109. NTZIACHRISTOS V, RIPOLL J, WANG LV. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. **Nat. Biotechnol.**, 23: 313-20, 2005.

PARTE 2
ARTIGO ORIGINAL

VALIDAÇÃO E COMPARAÇÃO DE TESTES LABORATORIAIS SIMPLES COMO PREDITORES DE FIBROSE HEPÁTICA EM PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA

INTRODUÇÃO

A identificação do vírus da hepatite C (HCV) em 1989¹ e os exames diagnósticos para sua detecção, a partir do início da década de 90, permitiram o reconhecimento de uma verdadeira endemia de hepatite C que representa um dos maiores desafios para a saúde pública do atual milênio. Até 1998, estimavam-se em aproximadamente 170 milhões de pessoas infectadas, mas, atualmente, as cifras já superam esse número. Assim, estimam-se em 200 milhões os portadores do HCV, ou cerca de 3% da população mundial infectada por esse vírus².

As principais complicações da hepatite C crônica, como a cirrose e o carcinoma hepatocelular, o alto custo do tratamento e a sua eficácia limitada indicam um panorama sombrio da hepatite C nos próximos decênios³.

Cerca de 25% dos pacientes que desenvolvem a doença crônica apresentam cirrose em um período médio de 25 a 30 anos. A cirrose representa a principal seqüela resultante da reparação do parênquima à agressão pelo HCV e tem relação com o aumento da morbidade, mortalidade e impacto econômico na rede pública em razão das complicações da doença hepática terminal⁴. A hepatite C crônica é, na atualidade, a principal indicação de transplante hepático em vários centros no Brasil e no mundo⁵⁻⁶.

A determinação do estágio da fibrose hepática é essencial na avaliação de pacientes com hepatite C crônica, pois é determinante na decisão terapêutica e fornece informações que permitem inferir sobre o prognóstico do paciente infectado. Conforme protocolos atuais de tratamento, os pacientes com fibrose moderada ou avançada devem ser tratados, a despeito da limitada eficácia das drogas disponíveis na atualidade. Pacientes com cirrose compensada devem ser considerados para o tratamento e recomenda-se vigilância permanente em relação ao aparecimento do carcinoma hepatocelular, que é mais freqüente nesta população⁷⁻¹⁰.

A biópsia hepática constitui, na atualidade, o padrão ouro para se estadiar a fibrose¹¹. Não obstante, trata-se de procedimento sujeito a complicações que variam de leves a

muito graves, podendo ocorrer óbito raramente, em até 0,12% dos pacientes submetidos ao exame. Outros inconvenientes são o alto custo e o fato de tratar-se de um método de avaliação estática, insuficiente para determinar, com acurácia, os fenômenos dinâmicos dos processos de fibrogênese e fibrólise hepática. Esse último representa, de fato, a principal limitação de sua utilidade durante a infecção crônica e após o tratamento. Além disso, a análise histopatológica da biópsia hepática é sujeita a significativa variação de resultados intra e inter-observadores. Assim, têm sido descritas variações de até 20% na classificação do estágio da fibrose¹⁷. Há possibilidade de erro de amostragem, devido à natureza focal e não homogênea na distribuição das lesões necroinflamatórias e fibróticas, típicas das doenças hepáticas crônicas. Outros fatores que contribuem para erros de interpretação são a insuficiência no tamanho e a fragmentação da amostra¹²⁻¹⁷.

O exame físico pode revelar sinais e sintomas sugestivos de doença hepática crônica. Os exames laboratoriais e os métodos de imagem são ferramentas indispensáveis que também auxiliam no diagnóstico. Entretanto, há uma grande demanda de métodos diagnósticos seguros e eficazes capazes de substituir a biópsia na avaliação do estágio de fibrose hepática. Assim, tem sido crescente a investigação de testes laboratoriais simples e de marcadores complexos de substâncias diretamente relacionadas ao processo de fibrogênese como meios complementares de avaliação menos invasiva. Não obstante, até o momento, nenhum método apresentou acurácia suficiente para substituir a biópsia hepática no diagnóstico e estadiamento da fibrose¹⁸.

Os testes simples apresentam como vantagens o baixo custo, a facilidade técnica e o fato de se constituírem em exames de rotina na avaliação dos pacientes com hepatite C crônica.

Diversos estudos utilizando testes simples isolados ou agrupados em modelos matemáticos têm sido descritos. Esses modelos foram desenvolvidos a partir de resultados da análise univariada de vários testes simples, com seleção daqueles que apresentaram relação mais significativa com o estágio de fibrose. Em seguida, a partir de análise multivariada (por meio de regressão logística) dos testes selecionados, foram desenvolvidas fórmulas que permitem o cálculo de índices numéricos. Curvas ROC (*receiver operating characteristics*) foram construídas e utilizadas na determinação de pontos de corte desses índices, relacionando-os a variáveis categóricas, sendo as

principais a fibrose hepática significativa (fibrose avançada ou cirrose - estádios F3-F6 de Ishak) e a cirrose (estádios F5-F6 de Ishak).

Entre os testes simples isolados, a contagem de plaquetas¹⁹⁻²² e a relação entre a aspartato aminotransferase (AST) e a alanino aminotransferase (ALT) (AST/ALT)²³⁻²⁶ vêm sendo amplamente investigadas com resultados relativamente satisfatórios. Dos modelos de fórmulas matemáticas, três têm apresentado desempenho razoável na identificação de pacientes com fibrose avançada e cirrose²⁷⁻²⁹. Contudo, essas fórmulas não tiveram, até o momento, validação externa suficiente para emprego de rotina na prática clínica.

Wai e col.²⁷ desenvolveram o “índice da relação AST/plaquetas” (APRI). Esse modelo apresentou área sob a curva ROC igual a 0,80 e 0,89 para diagnóstico de fibrose significativa e cirrose, respectivamente. Dois pontos de corte foram definidos para prever ausência (APRI \leq 0,5) e presença (APRI $>$ 1,5) de fibrose significativa e ausência (APRI \leq 1,0) e presença (APRI $>$ 2,0) de cirrose. A utilização desses pontos de corte permitiu investigar fibrose significativa em 51% dos pacientes e cirrose em 81%. Contudo, os pacientes cujos resultados encontraram-se entre os pontos de corte determinados não puderam ser classificados.

Em seguida, Islam e col.²⁸ acrescentaram a atividade de protrombina, - razão normalizada internacional (RNI) à fórmula do APRI e nomearam o novo teste GUCI (*Gotemborg University Cirrhosis Index*). Utilizando-se de um ponto de corte único ($>$ ou $<$ que 1,0), os autores obtiveram valor preditivo negativo (VPN) de 97% para excluir cirrose, considerando-se a prevalência de 12% dessa característica nessa população. A área sob a curva ROC para diagnóstico de cirrose foi igual a 0,85. Mais recentemente, Lok e col.²⁹ desenvolveram fórmula para predição de cirrose que resultou em área sob a curva ROC igual a 0,78 com VPN de 85% e valor preditivo positivo (VPP) de 75%. A prevalência de cirrose nesse estudo foi de 38%. Dois pontos foram escolhidos para exclusão ($<$ 0,2) e confirmação ($>$ 0,5) de cirrose. Não foi possível classificar 48,5% dos casos entre os dois pontos de corte estabelecidos pelos autores.

Entre os modelos que utilizam testes simples para diagnóstico do estágio da fibrose hepática, os citados acima são os que apresentam resultados mais favoráveis. Alguns autores compararam o APRI²⁷ com outros testes não invasivos para avaliação da fibrose. Não obstante, não foram realizadas investigações de validação que utilizassem

o GUCI²⁸ ou o modelo de Lok²⁹. Portanto, constitui objetivo deste estudo verificar o desempenho desses três métodos na avaliação da fibrose significativa e cirrose em pacientes portadores de hepatite C crônica, atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (AHEV/IAG/HC/UFMG). Constituíram objetivos específicos desta investigação: (1) validar o desempenho dos três testes, utilizando-se os pontos de corte descritos na literatura e a amostra de casos do presente estudo; (2) analisar o desempenho dos três modelos segundo resultado dicotômico, ou seja, ausência *versus* presença de fibrose significativa e ausência *versus* presença de cirrose; e (3) analisar o desempenho dos três modelos segundo faixas de valores. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG).

PACIENTES E MÉTODOS

Incluiu-se nesta investigação uma coorte constituída por 324 adultos com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica, atendidos consecutivamente entre janeiro de 1998 e dezembro de 2005. A assistência médica incluiu anamnese e exame físico completos, quantificação do consumo de álcool pregresso e atual, exames complementares de avaliação da função hepática e exclusão de outras hepatopatias (co-infecção pelo vírus da hepatite B e o vírus da imunodeficiência humana, hepatopatias 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 nacional em vigor (Portaria 863 do Ministério da Saúde) e não para a finalidade da pesquisa.

O diagnóstico sorológico de hepatite C por meio da identificação de anticorpos anti-HCV pelo método imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de terceira geração foi confirmado pela pesquisa do ácido ribonucléico (RNA) do vírus C pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme previamente descrito³⁰⁻³².

Consideraram-se os seguintes critérios de exclusão: concomitância de outras doenças hepáticas, insuficiência de registro dos testes laboratoriais, biópsia hepática indisponível para revisão ou inadequada para análise histopatológica. Incluíram-se somente os portadores de doença hepática crônica compensada sem tratamento prévio, ou tratados durante a investigação.

CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As biópsias hepáticas foram revistas simultaneamente por duas patologistas, especialistas em histologia hepática, não informadas 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.²⁹. O estágio de fibrose foi definido segundo a classificação proposta por Ishak³³. Para fins deste estudo, fibrose mínima foi definida como escore de Ishak menor que 3; fibrose significativa, como Ishak igual ou maior que 3 (presença de no mínimo fibrose em ponte), e cirrose foi classificada como escores 5 ou 6. 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.

MARCADORES E MODELOS

Os resultados dos seguintes testes laboratoriais foram registrados: AST, ALT, RNI e contagem de plaquetas. Os exames selecionados foram aqueles com data mais próxima à data da biópsia e foram considerados válidos se realizados em até dois meses de diferença dessa data. Em seguida, calcularam-se as razões AST/limite superior da normalidade (LSN) e ALT/LSN. A partir destes resultados, calcularam-se os três índices, conforme os modelos descritos nos estudos originais:

$$\text{APRI, por Wai e col.}^{27}: \quad \frac{\text{AST} / \text{LSN} \times 100}{\text{Plaquetas (10}^3/\text{mm}^3)}$$

$$\text{GUCI, por Islam e col.}^{28}: \quad \frac{\text{AST} / \text{LSN} \times \text{RNI} \times 100}{\text{Plaquetas (10}^3/\text{mm}^3)}$$

e o modelo descrito por Lok e col.²⁹: $- 5,56 - 0,0089 \times \text{contagem de plaquetas (x10}^3/\text{mm}^3) + 1,26 \times \text{AST/ALT} + 5,27 \times \text{RNI}$.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística, utilizando-se o programa SPSS, versão 9.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos da América), foi realizada em três etapas:

1. Análise de desempenho dos testes para a coorte investigada com o objetivo de validação dos três modelos considerando-se os pontos de corte previamente descritos para a identificação de fibrose significativa e cirrose²⁷⁻²⁹. Para isto, calcularam-se os

valores de sensibilidade (Se), especificidade (Es), VPP, VPN, acurácia, índice J de Youden e das razões de verossimilhança (RV) para o resultado positivo e negativo;

2. Análise do desempenho dos três modelos segundo o resultado dicotômico a partir de pontos de corte definidos no presente estudo. Para a determinação dos índices de desempenho dos três modelos segundo ausência (F0-F2) *versus* presença de fibrose significativa (F3-F6) e ausência (F0-F4) *versus* presença de cirrose (F5-F6), foram definidos pontos de corte diferentes a partir de metodologias diversas, a saber: percentil 95% e curva ROC³⁴⁻³⁵. Para a primeira, escolheu-se, entre os indivíduos da amostra, o valor equivalente ao caso que correspondeu ao percentil 95% da distribuição; ou seja, percentil 95% do grupo F3-F6 para a distinção entre ausência e presença de fibrose significativa; e, percentil 95% do grupo F5-F6 para a distinção entre ausência e presença de cirrose. A curva ROC foi utilizada tanto na definição de ponto de corte único³⁴ quanto na definição de dois pontos de corte simultâneos³⁵. Para a definição de ponto de corte único, utilizou-se a TG-ROC (*two-graph receiver operating characteristics*)³⁴, que define o ponto de corte na intersecção das curvas de sensibilidade e especificidade. Para a definição de dois pontos de corte simultâneos, utilizou-se a curva ROC como descrita por Hanley e McNeil³⁵, com a inclusão de todos os casos do estudo e selecionando-se, arbitrariamente, os dois pontos de corte que corresponderam às Se e Es de 95%. Essa última abordagem foi desenvolvida com a finalidade de se verificar se há melhor desempenho dos testes na discriminação entre ausência e presença de fibrose significativa e ausência e presença de cirrose hepática.

3. Análise do desempenho dos três modelos segundo faixas de valores: para a análise de diferentes intervalos de resultados dos três modelos, foram calculadas as RVs para faixas de valores. As faixas de valores foram selecionadas, arbitrariamente, objetivando RVs para teste positivo acima de 10 e RVs para teste negativo abaixo de 0,1. Em seguida, combinando-se a probabilidade pré-teste de fibrose significativa e cirrose com os valores das RVs, determinaram-se as probabilidades pós-teste dessas duas características.

RESULTADOS

Dos 324 pacientes, 76 foram excluídos (Tabela 1) e 248 foram elegíveis para o estudo. Destes, 140 (56%) eram do sexo masculino, 132 (53%) eram brancos, 69 (28%) pardos e 47 (19%) pretos, segundo a cor (Fig. 1 e 2). A média de idade foi de 50,6 anos (desvio padrão: 11,27; mínima 19 e máxima 75 anos).

A média de tratos portais nas biópsias hepáticas foi 10,3 (desvio padrão: 3,96). O estadiamento da fibrose hepática teve o seguinte resultado: F0 a F2 em 79 (32%), F3 a F4 em 67 (27%) e F5 a F6 em 102 (41%) casos. As características dos pacientes, os graus de fibrose e os resultados dos testes laboratoriais estão apresentados nas Figuras 3 e 4 e na Tabela 2.

Tabela 1. Motivos de exclusão de 76 entre 324 pacientes selecionados para a investigação

Motivos de exclusão	Nº de pacientes (%)
Hepatopatia alcoólica	18 (5,6)
Hepatite B	17 (5,3)
Esquistossomose mansoni	19 (5,9)
Insuficiência de dados	09 (2,8)
Biópsia inadequada	13 (4,0)
Total	76 (23,6)

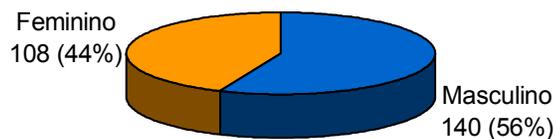


Fig. 1. Distribuição dos pacientes por gênero.

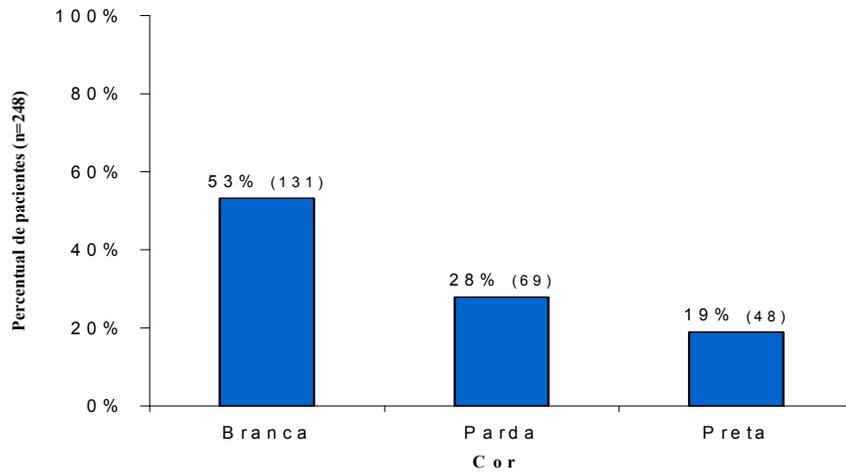


Fig. 2. Distribuição dos pacientes portadores de hepatite C crônica por cor.

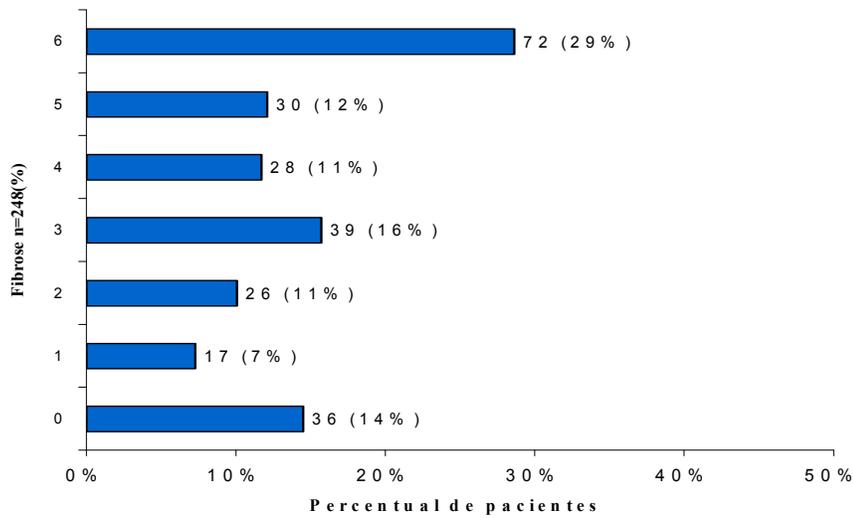


Fig. 3. Distribuição dos pacientes portadores de hepatite C crônica pelo estágio de fibrose à biópsia hepática.

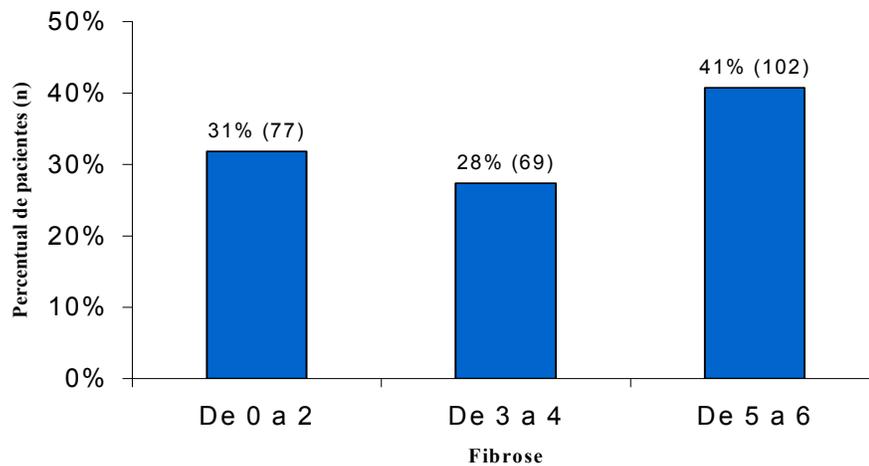


Fig. 4. Distribuição dos pacientes portadores de hepatite C crônica por estádios agrupados de fibrose hepática.

Tabela 2. Idade, dados bioquímicos, hematológicos e histológico de 248 pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos no AHEV/IAG/HC/UFMG

Variáveis	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Idade	50,62	50,50	11,27	19,00	75,00
Tratos portais*	10,33	10,00	3,96	5,00	30,00
ALT (mg/dL)	95,04	81,00	54,88	12,00	317,00
ALT/LSN	1,78	1,48	1,16	0,30	7,38
AST (mg/dL)	77,75	65,50	49,52	10,00	366,00
AST/LSN	1,78	1,51	1,13	0,28	7,96
RNI	1,18	1,1	0,66	1,0	2,7
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	169	165	62	36	325

*número de tratos portais nas biópsias hepáticas. ALT: alanino aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. LSN: limite superior da normalidade. RNI: relação normalizada internacional. AHEV: ambulatório de hepatites virais. IAG: instituto Alfa de gastroenterologia. HC: Hospital das Clínicas. UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais.

VALIDAÇÃO DO DESEMPENHO DOS TESTES A PARTIR DOS PONTOS DE CORTE DOS ESTUDOS ORIGINAIS

Os valores dos diversos índices de desempenho dos três modelos (APRI, GUCI e o de Lok), calculados empregando-se a amostra de casos do presente estudo, estão discriminados na Tabela 3, com os respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%). Deve-se levar em conta que o único teste que foi usado na avaliação de fibrose significativa nos estudos originais foi o APRI.

Observou-se que, na avaliação de fibrose significativa, o APRI apresentou altos índices de Es (98%), VPP (99%) e de RV para o resultado positivo (30), com amplitude total dos intervalos de confiança a 95% inferiores a 10. Foi possível classificar 54% dos casos.

Para o diagnóstico de cirrose, o APRI foi o teste que apresentou maiores Es (90%) e VPP (77%) (considerando-se a prevalência de 41% para essa característica). Sessenta e dois (25%) casos, por apresentarem resultados do teste entre os pontos de corte, não foram classificados. O modelo descrito por Lok associou-se aos maiores valores de Se (96%) e VPN (91%) para o diagnóstico de cirrose, deixando de classificar 106 (43%) casos pelo mesmo motivo mencionado acima. A RV para o resultado negativo (0,1) foi a menor entre os três testes. Os índices de desempenho do modelo GUCI (Se, Es, VPP e VPN) variaram entre 63% e 83%. Por empregar ponto de corte único, esse último teste permitiu a classificação de todos os pacientes. A acurácia global do teste foi um pouco maior para o APRI (81%) quando comparada ao GUCI e ao modelo de Lok (72% e 73%, respectivamente). Quando se aplicou o índice J de Youden, os valores foram

reduzidos (63%, 45% e 58% para APRI, CUCI e Lok, respectivamente), como esperado.

Tabela 3. Validação dos três modelos a partir dos pontos de corte descritos nos estudos originais

	Pontos de corte	Classificados (%)	Se (IC)	Es (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)	Acurácia	J Youden	RV teste +	RV teste -
APRI										
F0-F2 x F3-F6	≤ 0,5 e > 1,5	133 (54)	77,7% (69,2; 86,1)	97,4% (92,5; 100)	98,6% (96; 100)	64,4% (52,2; 76,5)	83,5% (77,1; 89,8)	59,3% (54,1; 63,3)	30,3	0,2
F0-F4 x F5-F6	≤ 1,0 e > 2,0	186 (75)	63,1% (51,3; 74,8)	90,1% (84,8; 95,4)	77,4% (66,1; 88,6)	82,0% (75,4; 88,5)	80,6% (75,0; 86,3)	63,0% (59,2; 69,6)	6,4	0,4
GUCI										
F0-F4 x F5-F6	1,0	248 (100)	79,2% (71,3; 87,1)	67,3% (59,8; 74,9)	62,5% (54,1; 70,9)	82,5% (75,7; 89,3)	72,2% (66,6; 77,8)	45% (40,3; 51,1)	2,4	0,3
LOK										
F0-F4 x F5-F6	< 0,2 e > 0,5	142 (57)	96,0% (91,6; 100)	46,3% (34,3; 58,2)	66,7% (57,8; 75,6)	91,2% (81,6; 100)	72,5% (65,2; 79,9)	57,8% (52,1; 63,2)	1,8	0,1

Se: sensibilidade, Es: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, RV: razão de verossimilhança, IC: intervalo de confiança a 95%, APRI: índice da razão aspartato aminotransferase/plaquetas, GUCI: *Gotemborg University Cirrhosis Index*, Lok: modelo de Lok.

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS TESTES SEGUNDO O RESULTADO DICOTÔMICO

Para a determinação dos índices de desempenho dos três modelos segundo ausência (F0-F2) *versus* presença de fibrose significativa (F3-F6) e ausência (F0-F4) *versus* presença de cirrose (F5-F6), foram definidos pontos de corte diferentes a partir do cálculo do percentil 95% e da curva TG-ROC.

Avaliação dos testes a partir de ponto de corte definido pelo percentil 95%

Os pontos de corte e os índices de desempenho do APRI, GUCI e modelo de Lok, com os respectivos IC-95%, estão descritos na Tabela 4. Na diferenciação entre ausência (F0-F2) e presença de fibrose significativa (F3-F6), a Se (81%, 82% e 81%, respectivamente) e o VPN (82%, 80% e 84%, respectivamente) foram superiores à Es (62%, 57% e 67%, respectivamente) e VPP (61%, 60% e 62%, respectivamente). Por outro lado, na diferenciação entre ausência (F0-F4) e presença (F5-F6) de cirrose, os valores de Es (78%, 82% e 89%, respectivamente) e VPP (81%, 79% e 76%, respectivamente) foram superiores aos de Se (74%, 68% e 55%, respectivamente) e VPN (69%, 72% e 74%, respectivamente).

A acurácia global do teste para os três métodos mostrou valores entre 74% e 77% e o índice J de Youden, valores entre 40% e 51%.

Por se tratar de ponto de corte único, todos os pacientes foram classificados.

Tabela 4 - Desempenho dos três modelos utilizando-se o ponto de corte único selecionado a partir do percentil 95%.

	Pontos de corte	Classificados (%)	Se (IC)	Es (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)	Acurácia	J Youden	RV teste +	RV teste -
APRI										
F0-F2 x F3-F6	0,62	248 (100)	81,1% (75,2; 87,0)	62,0% (51,3; 72,7)	60,5% (49,8; 71,1)	82,0% (76,2; 87,9)	75,0% (69,6; 80,4)	42,5% (36,7; 47,1)	2,1	0,3
F0-F4 x F5-F6	1,1	248 (100)	74,3% (65,7; 82,8)	77,6% (70,8; 84,3)	81,4% (75,0; 87,9)	69,4% (60,8; 78,1)	76,2% (70,9; 81,5)	50,8% (44,3; 56,7)	3,3	0,3
GUCI										
F0-F2 x F3-F6	0,62	248 (100)	82,2% (76,5; 88,0)	57,0% (46,0; 67,9)	60,0% (48,9; 71,1)	80,3% (74,4; 86,3)	74,2% (68,7; 79,6)	40,3% (34,3; 45,3)	1,9	0,3
F0-F4 x F5-F6	1,43	248 (100)	68,3% (59,2; 77,4)	81,6% (75,4; 87,9)	78,9% (72,5; 85,4)	71,9% (62,9; 80,9)	76,2% (70,9; 81,5)	50,8% (44,3; 56,7)	3,7	0,4
LOK										
F0-F2 x F3-F6	0,32	248 (100)	81,1% (75,2; 87,0)	67,1% (56,7; 77,5)	62,4% (52,1; 72,7)	84,0% (78,4; 89,7)	76,6% (71,3; 81,9)	46,4% (41,0; 52,4)	2,5	0,3
F0-F4 x F5-F6	0,68	248 (100)	54,5% (44,7; 64,2)	89,1% (84,1; 94,2)	77,5% (67,7; 87,2)	74,0% (67,6; 80,5)	75,0% (69,6; 80,4)	51,4% (45,1; 56,2)	5,0	0,5

Se: sensibilidade, Es: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, IC: intervalo de confiança a 95%, RV: razão de verossimilhança, APRI: índice da razão aspartato aminotransferase/plaquetas, GUCI: *Gotemborg University Cirrhosis Index*, Lok: modelo de Lok.

Avaliação dos testes a partir de ponto de corte definido pela curva TG-ROC

Os pontos de corte obtidos por meio das curvas TG-ROC para diagnóstico de fibrose significativa e cirrose, foram, respectivamente, para o APRI: 0,76 e 1,04; para o GUCI: 0,82 e 1,2 e para o modelo de Lok: 0,34 e 0,43. (Figuras 5 e 6).

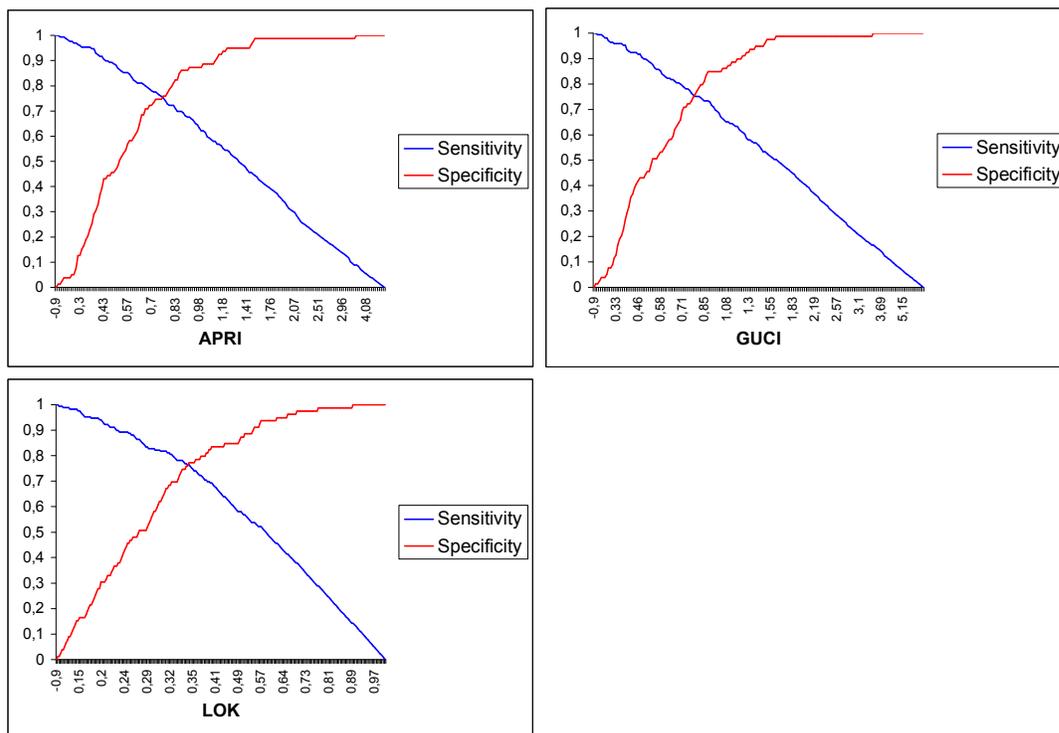


Fig. 5. Curvas TG-ROC para definição de ponto de corte para distinguir ausência (F0-F2) e presença de fibrose significativa (F3-F6).

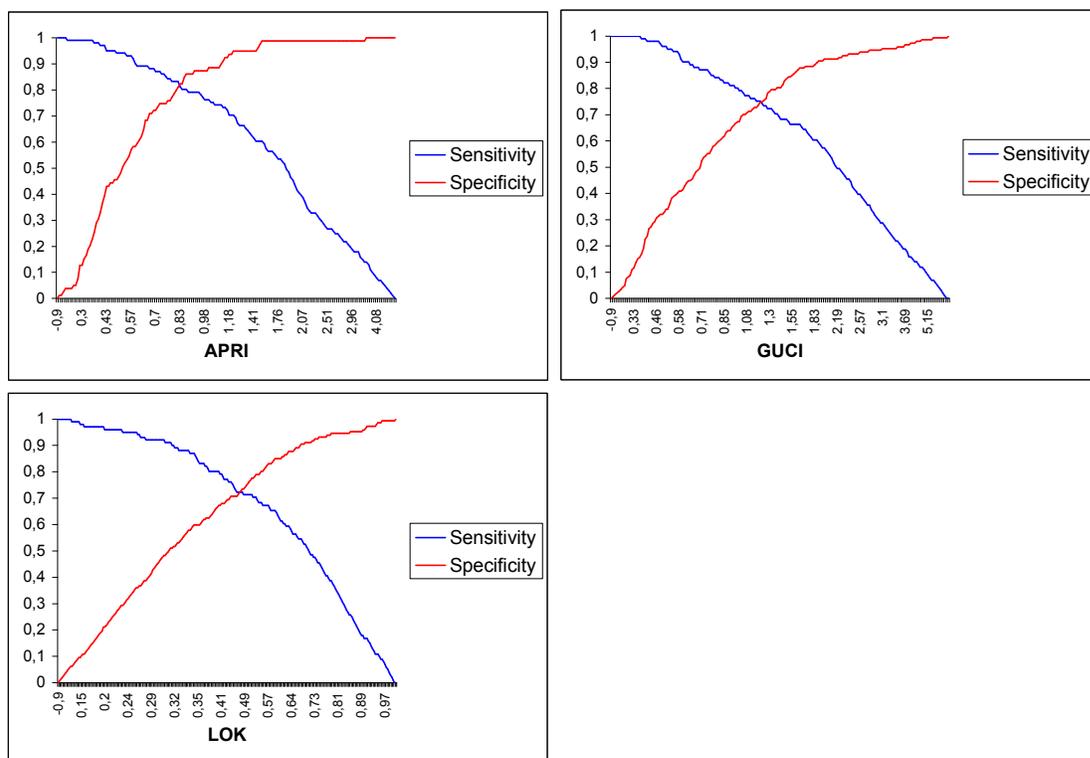


Fig. 6. Curvas TG-ROC para definição de ponto de corte para distinguir ausência (F0-F4) e presença de cirrose (F5-F6).

Os índices de desempenho dos três modelos com os respectivos intervalos de confiança estão apresentados na Tabela 5. Destacam-se os VPPs para fibrose significativa e os VPNs para cirrose.

A acurácia global do teste foi variou de 73% a 77% e os valores para o índice J de Youden, de 45% a 49%.

De forma semelhante ao cálculo do ponto de corte definido pelo percentil 95%, todos os casos puderam ser classificados.

Tabela 5. Desempenho dos três modelos utilizando-se o ponto de corte único selecionado a partir da curva TG-ROC

	Pontos de corte	Classificados (%)	Se (IC)	Es (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)	Acurácia	J Youden	RV teste +	RV teste -
APRI										
F0-F2 x F3-F6	0,76	248 (100)	74,0% (67,3; 80,6)	75,9% (66,5; 85,4)	86,8% (81,3; 92,3)	57,7% (48,2; 67,2)	74,6% (69,2; 80,0)	44,5% (38,0; 52,3)	3,1	0,3
F0-F4 x F5-F6	1,04	248 (100)	75,2% (66,8; 83,7)	74,8% (67,8; 81,8)	67,3% (58,6; 75,9)	81,5% (74,9; 88,0)	75,0% (69,6; 80,4)	48,7% (41,2; 54,7)	3,0	0,3
GUCI										
F0-F2 x F3-F6	0,82	248 (100)	75,1% (68,6; 81,7)	79,7% (70,9; 88,6)	88,8% (83,6; 94,0)	60,0% (50,6; 69,4)	76,6% (71,3; 81,9)	48,8% (41,1; 53,3)	3,7	0,3
F0-F4 x F5-F6	1,2	248 (100)	75,2% (66,8; 83,7)	74,8% (67,8; 81,8)	67,3% (58,6; 75,9)	81,5% (74,9; 88,0)	75,0% (69,6; 80,4)	48,7% (41,4; 52,9)	3,0	0,3
LOK										
F0-F2 x F3-F6	0,34	248 (100)	78,1% (71,9; 84,3)	74,7% (65,1; 84,3)	86,8% (81,5; 92,2)	61,5% (51,7; 71,2)	77,0% (71,8; 82,3)	48,3% (40,9; 52,7)	3,1	0,3
F0-F4 x F5-F6	0,43	248 (100)	76,2% (67,9; 84,5)	70,7% (63,4; 78,1)	64,2% (55,6; 72,7)	81,3% (74,5; 88,0)	73,0% (67,5; 78,5)	45,4% (39,9; 52,8)	2,6	0,3

Se: sensibilidade, Es: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, IC: intervalo de confiança a 95%, RV: razão de verossimilhança, APRI: índice da razão aspartato aminotransferase/plaquetas, GUCI: *Gotemborg University Cirrhosis Index*, Lok: modelo de Lok.

AVALIAÇÃO DOS TESTES A PARTIR DE DOIS PONTOS DE CORTE DEFINIDOS A PARTIR DA CURVA ROC.

As figuras 7 e 8 demonstram as curvas ROC utilizadas para selecionar os pontos de corte correspondentes às Se e Es de 95%. A Tabela 6 apresenta os pontos de corte, os índices de desempenho dos testes com IC de 95% e o número de casos classificados com base nesses pontos propostos.

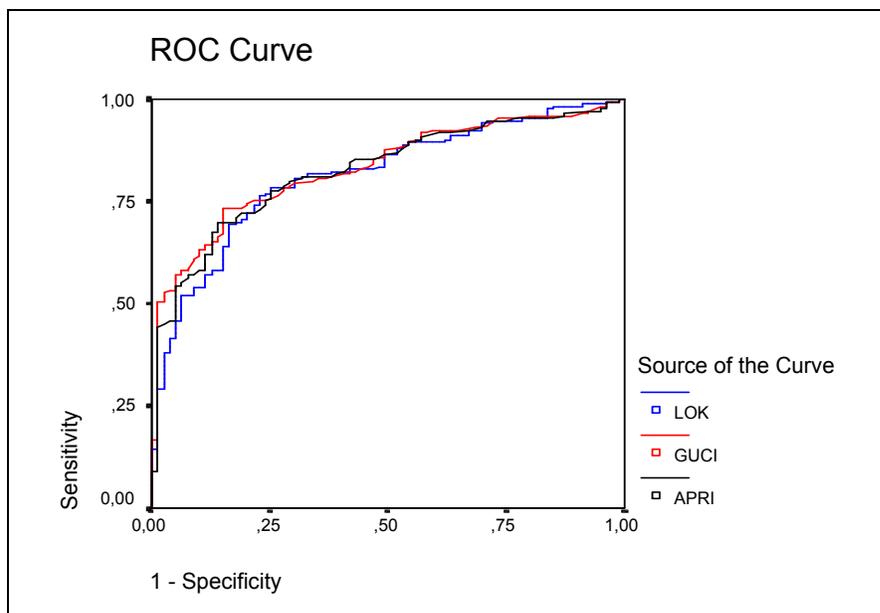


Fig. 7. Curvas ROC para avaliação de ausência ou presença de fibrose significativa (F0-F2 x F3-F6) para os modelos APRI, GUCI e Lok

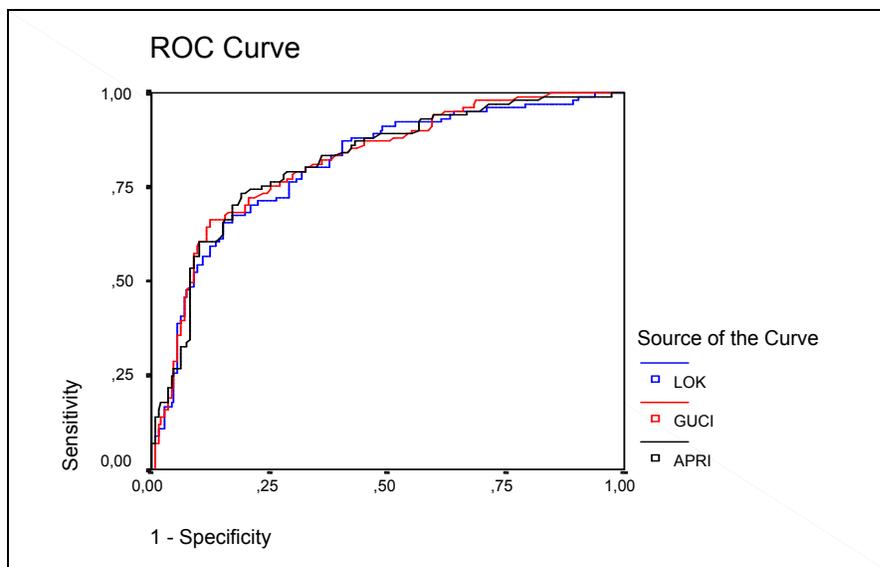


Fig. 8. Curvas ROC para avaliação de ausência ou presença de cirrose (F0-F4 x F5-F6) para os modelos APRI, GUCI e Lok

Tabela 6. - Desempenho dos três modelos utilizando-se dois pontos de corte selecionados a partir da curva ROC

	Pontos de corte	Classificados (%)	Se (IC)	Es (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)	Acurácia	J Youden	RV teste +	RV teste -
APRI										
F0-F2 x F3-F6	$\leq 0,45$ e $\geq 1,2$	142 (57)	87,6% (80,7; 94,5)	89,1% (80,7; 99,3)	95,8% (91,8; 99,8)	71,7% (59,1; 84,2)	86,3% (79,7; 91)	62,5% (56,8; 68)	10,8	0,2
F0-F4 x F5-F6	$\leq 0,45$ e $\geq 2,6$	80 (32)	89,7% (78,6; 100)	86,3% (76,8; 95,7)	78,8% (64,8; 92,7)	93,6% (86,6; 100)	87,5% (80,3; 94,7)	72,4% (66,7; 78,1)	6,5	0,1
GUCI										
F0-F2 x F3-F6	$\leq 0,45$ e $\geq 1,4$	144 (58)	87,9% (81,7; 94)	89,2% (79,2; 99,2)	95,9% (92; 99,8)	71,7% (58,7; 84,8)	88,2% (82,9; 93,5)	67,6% (61,8; 72,8)	11,2	0,1
F0-F4 x F5-F6	$\leq 0,46$ e $\geq 2,0$	117 (47)	96,6% (91,9; 100)	78,0% (67,4; 88,5)	81,2% (71,9; 90,4)	95,8% (90,2; 100)	87,2% (81,1; 93,2)	76,9% (71,6; 82,8)	6,8	0,09
LOK										
F0-F2 x F3-F6	$\leq 0,2$ e $\geq 0,6$	121 (49)	89,1% (82,8; 95,5)	82,8% (69; 96,5)	94,3% (89,6; 99,8)	70,6% (55,3; 85,9)	87,6% (81,7; 93,5)	65% (59,9; 71,3)	8,2	0,2
F0-F4 x F5-F6	$\leq 0,3$ e $\geq 0,76$	127 (51)	83,7% (73,3; 94)	88,5% (83,8; 94,3)	82% (71,4; 92,6)	89,6% (82,8; 96,4)	86,6% (80,7; 92,5)	72% (67,1; 78,9)	7,3	0,17

Se: sensibilidade, Es: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, IC: intervalo de confiança a 95%, RV: razão de verossimilhança, APRI: índice da razão aspartato aminotransferase/plaquetas, GUCI: *Gotemborg University Cirrhosis Index*, Lok: modelo de Lok.

Para o diagnóstico de fibrose significativa, obtiveram-se os seguintes valores de Es, VPP e RV para resultado positivo: APRI, 89%, 96% e 11, respectivamente; GUCI, 89%, 96% e 11, respectivamente e Lok, 83%, 94% e 8, respectivamente. Para o diagnóstico de cirrose, os valores de Se, VPN e RVs para resultado negativo foram: APRI, 90%, 94% e 0,1, respectivamente; GUCI, 97%, 96% e 0,09, respectivamente e Lok, 84%, 90% e 0,17, respectivamente.

Os modelos APRI e GUCI permitiram a classificação de maior número de casos (57% e 58%, respectivamente) na avaliação de fibrose significativa quando comparados ao modelo de Lok (49%). Maior número de pacientes com cirrose (51%) foi classificado pelo modelo de Lok, e menor número pelo APRI (32%).

As tabelas 7, 8 e 9 mostram os índices de desempenho do APRI, GUCI e modelo de Lok, respectivamente, empregando-se os pontos de corte propostos pelos estudos originais e aqueles definidos, a partir da curva ROC, no presente estudo.

Tabela 7. Índices de desempenho do APRI para o diagnóstico de fibrose significativa (F0-F2 *versus* F3-F6) e cirrose (F0-F4 *versus* F5-F6) no estudo original (Wai e col.) e no presente estudo (Couto e col.)

	Se (IC)	Es (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)
APRI				
F0-F2 x F3-F6				
Wai e col.	91,0%	95,0%	88,0%	86,0%
Couto e col.	87,6%	89,1%	95,8%	71,7%
	(80,7; 94,5)	(80,7; 99,3)	(91,8; 99,8)	(59,1;84,2)
F0-F4 x F5-F6				
Wai e col.	89,0%	93,0%	57,0%	98,0%
Couto e col.	89,7%	86,3%	78,8%	93,6%
	(78,6; 100)	(76,8; 95,7)	(64,8; 92,7)	(86,6; 100)

Se: sensibilidade, Es: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, IC: intervalo de confiança a 95%. APRI: índice da razão aspartato aminotransferase/plaquetas.

Tabela 8. Índices de desempenho do GUCI para o diagnóstico de cirrose (F0-F4 *versus* F5-F6) no estudo original (Islam e col.) e no presente estudo (Couto e col.)

	Se (IC)	Es (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)
GUCI				
F0-F4 x F5-F6				
Islam e col.	80,0%	78,0%	31,0%	97,0%
Couto e col.	96,6%	78,0%	81,2%	95,8%
	(91,9; 100)	(67,4; 88,5)	(71,9; 90,4)	(90,2; 100)

Se: sensibilidade, Es: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, IC: intervalo de confiança a 95%, GUCI: *Gotemborg University Cirrhosis Index*.

Tabela 9. Índices de desempenho do modelo de Lok para o diagnóstico de cirrose (F0-F4 *versus* F5-F6) no estudo original (Lok e col.) e no presente estudo (Couto e col.)

	Se (IC)	Es (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)
Lok				
F0-F4 x F5-F6				
Lok e col.	92,0%	92,0%	75,0%	86,0%
Couto e col.	83,7%	88,5%	82%	89,6%
	(73,3; 94)	(83,8; 94,3)	(71,4; 92,6)	(82,8; 96,4)

Se: sensibilidade, Es: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, IC: intervalo de confiança a 95%, Lok: modelo de Lok.

As áreas sob a curva ROC obtidas, no presente estudo, para avaliação de fibrose significativa e cirrose para os três modelos estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Áreas sob a curva ROC para diagnóstico de fibrose significativa (F0-F2 *versus* F3-F6) e cirrose (F0-F4 *versus* F5-F6) para os modelos APRI, GUCI e Lok.

Modelo	Área sob a curva ROC (F0-F2 <i>versus</i> F3-F6)	Área sob a curva ROC (F0-F4 <i>versus</i> F5-F6)
APRI	0,825	0,819
GUCI	0,831	0,820
LOK	0,814	0,810

ROC: *receiver operating characteristics*, APRI: índice da razão aspartato aminotransferase/plaquetas, GUCI: *Gotemborg University Cirrhosis Index*, Lok: modelo de Lok.

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS TESTES POR FAIXA DE VALORES DEFINIDAS A PARTIR DE RAZÕES DE VEROSSIMILHANÇA

As faixas de valores dos resultados obtidos para os três modelos com as respectivas RVs e probabilidades pós-teste de doença estão discriminadas na Tabela 8.

Para o modelo APRI, resultados $\leq 0,5$ foram quatro vezes mais prováveis de serem observados em indivíduos sem fibrose do que naqueles com fibrose significativa. Por outro lado, valores $> 1,2$ resultaram em altos valores de RVs e probabilidade pós teste para o diagnóstico de fibrose significativa e valores $> 1,6$ são aproximadamente seis vezes mais prováveis de serem observados em pacientes com cirrose.

Na análise do modelo GUCI, valores $\leq 0,5$ foram cinco vezes mais prováveis de serem observados em indivíduos sem fibrose significativa e oito vezes mais prováveis de originarem-se de indivíduos sem cirrose. Valores $> 1,4$ permitem confirmar o diagnóstico de fibrose significativa, sendo que quando $> 2,0$ são seis vezes mais prováveis de provirem de paciente com cirrose estabelecida.

Na avaliação do modelo de Lok, valores $\leq 0,2$ foram cinco vezes mais prováveis de serem encontrados na ausência de fibrose significativa e valores $\leq 0,4$ foram três vezes mais prováveis de serem encontrados na ausência de cirrose. Por outro lado, valores $> 0,6$ foram cerca de oito vezes mais prováveis de serem encontrados na presença de fibrose significativa, sendo que se maior que 0,8 a chance de cirrose foi sete vezes maior.

Tabela 11. Razões de verossimilhança para faixas de resultados dos modelos APRI, GUCI e Lok, com as respectivas probabilidades pós-teste.

	Resultados	RVs	Probabilidade pós-teste (%)
APRI			
F0-F2 x F3-F6	≤ 0,5	0,25	35
	0,51-1,2	0,70	60
	>1,2	10,8	96
F0-F4 x F5-F6	≤ 0,6	0,24	15
	0,61-1,6	0,74	34
	>1,6	6,2	81
GUCI			
F0-F2 x F3-F6	≤ 0,5	0,2	30
	0,51-1,4	0,7	60
	>1,4	11,2	96
F0-F4 x F5-F6	≤ 0,5	0,12	9
	0,51-2,0	0,72	33
	>2,0	6,75	83
LOK			
F0-F2 x F3-F6	≤ 0,2	0,2	30
	0,21-0,6	0,73	60
	>0,6	8,2	95
F0-F4 x F5-F6	≤ 0,4	0,3	17
	0,41-0,8	1,7	54
	>0,8	7	83

RV: razão de verossimilhança. APRI: índice da razão aspartato aminotransferase/plaquetas, GUCI: *Gotenborg University Cirrhosis Index*, Lok: modelo de Lok.

DISCUSSÃO

Diversos modelos para diagnóstico e avaliação do estágio da fibrose hepática têm sido propostos com o objetivo de validar métodos não invasivos que poderão substituir a biópsia hepática, considerada, ainda, o “padrão ouro” para o estadiamento da fibrose. De fato, os modelos com base em testes laboratoriais simples, se validados, poderão oferecer grandes benefícios, como maior conforto e segurança para os pacientes, redução de custos, facilidade de uso na prática clínica e possibilidade de serem repetidos, sempre que necessário, no seguimento dos pacientes. Por essas razões, o objetivo dessa investigação foi validar, em uma coorte de pacientes portadores de hepatite C, atendidos no nosso meio, três modelos matemáticos desenvolvidos recentemente para o diagnóstico de fibrose hepática, nos quais são utilizados resultados de testes laboratoriais simples. Também constituiu objetivo analisar o desempenho desses três modelos na coorte de pacientes portadores de hepatite C crônica selecionada para esta investigação.

O método para estadiamento histológico da fibrose nos fragmentos de tecido hepático foi o escore proposto por Ishak³³, em razão de oferecer maior detalhamento das características histológicas, quando comparado ao Metavir³⁴, mais utilizado na prática clínica. O agrupamento dos pacientes de acordo com o estágio de fibrose (fibrose mínima, fibrose significativa e cirrose), para o fim da investigação, foi utilizado previamente em estudos publicados por Wai e col.²⁷, Islam e col.²⁸ e Lok e col.²⁹.

A alta prevalência de portadores de hepatite C crônica com fibrose significativa e cirrose na coorte examinada é atribuída ao fato de os pacientes serem atendidos em centro de referência de atenção secundária e terciária à saúde.

As principais limitações do estudo foram o desenho retrospectivo e o tamanho relativamente pequeno da amostra, que não permitiu que a amplitude total dos IC95% fosse sempre inferior ao limite recomendado de 10%. Contudo, os resultados permitiram inferências importantes a respeito da utilidade desses métodos na avaliação da fibrose hepática.

Outra limitação diz respeito às características inerentes à biópsia hepática, sujeita a variações de interpretação inter e intra-observadores, influência do tamanho do fragmento biopsiado no resultado e inadequação da amostra de tecido que pode ocorrer em razão da distribuição heterogênea das lesões no parênquima hepático. Contudo, buscou-se minimizar essas limitações uma vez que foram incluídas na análise apenas biópsias consideradas adequadas para o estudo histopatológico, revistas simultaneamente por duas patologistas experientes.

O critério adotado nesta investigação, de inclusão somente de biópsias com, no mínimo, cinco tratos portais, foi descrito em estudo prévio²⁸. Deve-se considerar que não há outros métodos propedêuticos disponíveis que sejam comparáveis à biópsia para se definir o estágio da fibrose hepática nas hepatopatias crônicas.

Limitações relativas à biópsia hepática têm sido ressaltadas nos trabalhos originais. No estudo de Lok e col.²⁶, por exemplo, naqueles pacientes sem cirrose à análise histológica, mas com indicação de cirrose pelo modelo testado pelos autores, as biópsias foram descritas como mais fragmentadas e de menor tamanho, quando comparadas àquelas dos pacientes que, no modelo, não eram compatíveis com cirrose. Esses pacientes, segundo os autores, apresentavam evidências de doença hepática avançada, como hipoalbuminemia, esplenomegalia e presença de varizes esofagianas ou gástricas. Portanto, é provável que alguns pacientes classificados como não cirróticos, no referido estudo, fossem, de fato, portadores de cirrose hepática não comprovada em biópsias em razão de erro de amostragem ou de interpretação. Desta forma, pode-se inferir que os erros de amostragem e variabilidade de observação para o estadiamento em biópsias hepáticas são fatores limitantes nos estudos que visam validar, por métodos comparativos, os modelos não invasivos de diagnóstico da fibrose hepática.

A despeito dessas limitações, a perspectiva de novos métodos não invasivos substitutos da biópsia hepática que associam custo-efetividade com risco-benefício para os pacientes portadores de hepatite C crônica constitui não apenas uma necessidade, mas também uma esperança para o futuro próximo. Portanto, investigações que visam validar testes não invasivos e estabelecer pontos de corte confiáveis para se determinar e distinguir, com acurácia, todos os estádios individuais de fibrose hepática, devem ser estimulados.

Para finalidade prática, tem-se agrupado os pacientes como portadores de fibrose mínima (F0-F2) ou significativa (F3-F6), uma vez que essa classificação é útil para identificar pacientes com indicação de tratamento, em conformidade com os critérios atuais de tratamento da hepatite C crônica, que estabelecem que os portadores de estágio de fibrose igual ou superior a F2 (Metavir) ou F3 (Ishak) devem ser tratados⁴. De forma semelhante, a distinção entre pacientes cirróticos (F5-F6) e não cirróticos é essencial para prever a evolução e o prognóstico e, portanto, tem ampla aplicação na condução clínica dos pacientes portadores de hepatite C crônica. Por exemplo, os portadores de cirrose devem ser monitorados com maior frequência em razão das possíveis complicações associadas à doença hepática terminal, como o carcinoma hepatocelular.

VALIDAÇÃO DOS TESTES

A partir dos resultados empregando-se os três modelos matemáticos com os respectivos pontos de corte originais²⁴⁻²⁶, procedeu-se a validação desses na presente coorte.

No estudo de Wai e col.²⁴, para a determinação de fibrose significativa, o APRI $\leq 0,5$ apresentou Se de 91% e o APRI $> 1,5$ apresentou Es de 95%. A Es encontrada no presente estudo foi semelhante. No entanto, a Se foi inferior (78%, IC95%: 69%-86%). No estudo original, os VPP e VPN foram muito próximos (88% e 86%, respectivamente). Já no presente estudo, observou-se VPP superior (99%), e VPN inferior (64%), mesmo levando-se em conta os limites do IC95%. Para o diagnóstico de cirrose, o estudo original apresentou, para APRI $\leq 1,0$ e $> 2,0$, Se de 89% e Es de 93%. Mais uma vez, a Es encontrada na presente investigação foi semelhante àquela do estudo original e a Se, inferior (63%). Como observado para fibrose significativa, no presente estudo, o VPP encontrado foi superior e o VPN (82%), inferior àqueles da investigação de Wai e col²⁴, mesmo levando-se em conta os limites do IC95%. Os índices mais elevados de VPP encontrados no presente estudo, tanto para fibrose significativa quanto para cirrose, devem-se, ao menos em parte, à maior prevalência dessas duas condições clínicas neste estudo (68% e 41% *versus* 47% e 15%, respectivamente). Os valores inferiores de Se encontrados no presente estudo, possivelmente têm relação com as características da amostra estudada.

Os resultados de validação para o APRI, nesta investigação, a despeito de terem apresentado alguns valores discrepantes dos índices do estudo original, reafirmam que o APRI apresenta bom desempenho para se confirmar o diagnóstico de fibrose significativa e de cirrose, particularmente da primeira. A análise das RVs, observadas no presente estudo, também suportam esses achados, uma vez que, na avaliação da fibrose significativa, o valor do APRI $> 1,5$ associou-se a RV igual a 30. Isto significa que tal valor do APRI é 30 vezes mais provável de ser observado em um paciente com essa condição em relação a um indivíduo que apresenta fibrose mínima, o que permite confirmar o diagnóstico de fibrose significativa. Já a RV para diagnóstico de cirrose foi inferior (6,4).

O número de pacientes classificados no estudo original de Wai e col²⁴ foi semelhante para avaliação de fibrose significativa (51% *versus* 54%) e maior para avaliação de cirrose (81% *versus* 75%) quando comparados ao da presente investigação.

Islam e col.²⁵ avaliaram o desempenho do GUCI apenas para diagnosticar cirrose com um ponto de corte único (1,0). A Se e Es obtidas no estudo original foram 78% e 80%, respectivamente. Na presente investigação, utilizando-se também o mesmo ponto de corte, observou-se Se semelhante, mas menor índice de Es (67%, IC95%: 60%-75%). No trabalho original, o VPP foi de 31% e o

VPN, 97%. No presente estudo, o VPP foi superior e o VPN inferior, mesmo considerando-se os limites dos IC95%. As diferenças entre os valores preditivos encontrados no estudo original e neste, devem-se, ao menos em parte, à menor prevalência de cirrose no estudo original quando comparada à deste estudo (12% *versus* 41%, respectivamente).

Os resultados da fase de validação do modelo GUCI não confirmaram o desempenho do teste para o diagnóstico de cirrose descrito no trabalho original. Os valores das RVs no presente estudo, tanto para teste positivo quanto para teste negativo, situaram-se em faixa intermediária, praticamente não contribuindo para definição diagnóstica definitiva.

O estudo de Lok e col.²⁶ também investigou a predição de cirrose. Os autores definiram dois pontos de corte: $< 0,2$ para ausência e $> 0,5$ para presença de cirrose. A Se e Es encontradas no trabalho original foram ambas superiores a 90%. No presente estudo, a Se foi semelhante àquela do estudo de Lok e col.²⁶ e a Es, inferior (46%). Os VPP e VPN no estudo original foram, respectivamente, 75% e 86%. No presente trabalho, ambos foram semelhantes, quando considerados os limites dos IC95%. Desta forma, os resultados da fase de validação reforçam o bom desempenho do teste para se excluir o diagnóstico de cirrose, mas não para a sua confirmação. A RV para teste negativo, encontrada no atual estudo, ratifica tal achado. Um resultado do modelo de Lok $< 0,2$ associou-se a RV igual a 0,1. Isto significa que tal valor é 10 vezes menos provável de ser encontrado em um indivíduo com cirrose do que em um indivíduo sem essa condição.

O número de pacientes classificados foi menor no presente estudo, quando comparado ao estudo original de Lok e col.²⁶ (43% *versus* 50%).

ANÁLISE DO DESEMPENHO DOS TESTES SEGUNDO O RESULTADO DICOTÔMICO DEFINIDO POR UM ÚNICO PONTO DE CORTE

A definição de um ponto de corte único apresenta como vantagem a classificação de todos os pacientes. Dois métodos distintos foram avaliados. Os resultados não foram suficientes para distinguir, com acurácia, a presença ou ausência das duas características estudadas. Desta forma, sua aplicação clínica é restrita.

ANÁLISE DO DESEMPENHO DOS TESTES A PARTIR DE DOIS PONTOS DE CORTE DEFINIDOS COM BASE NA CURVA ROC

Curvas ROC foram construídas, para os três modelos testados, para se estabelecer o diagnóstico de fibrose significativa e cirrose, o que permitiu investigar e propor novos pontos de corte (Tabela 6).

Para o diagnóstico de fibrose significativa, os três testes apresentaram valores de Se próximos de 90% com amplitude total dos IC95% semelhantes (aproximadamente 12%-14%). As Es também foram próximas de 90%, com exceção do modelo de Lok, que foi um pouco inferior (83%). Contudo, os IC95% apresentaram amplitude total maior que 10% (18% a 20%), indicando que os valores encontrados não são tão precisos, como desejável. Os VPPs foram altos (aproximadamente 95%, com amplitude total dos IC95% inferiores a 10) para os três testes e os VPNs mais baixos. Tal fato pode ser parcialmente explicado pela alta prevalência de fibrose significativa na amostra de indivíduos estudada (69%). As RVs para teste positivo foram próximas (Lok) ou acima (APRI e GUCI) de 10, o que significa que os pontos de corte definidos associam-se a uma chance aproximadamente 10 vezes maior de haver fibrose significativa do que fibrose mínima. As RVs para teste negativo apresentaram valores baixos, destacando-se a do modelo GUCI (0,1) que está associada a uma chance dez vezes menor de haver fibrose significativa quando comparada a outros estádios de fibrose. Estes resultados demonstram que os três modelos podem ser úteis na abordagem diagnóstica de fibrose significativa e apresentam desempenho similar para essa característica.

Para o diagnóstico de cirrose, o modelo GUCI apresentou Se superior aos demais (97%) e a amplitude total do seu IC95% foi estreita, indicando precisão do índice estimado. A Es dos três testes foi semelhante, sendo, entretanto, ligeiramente superior no modelo APRI e de Lok. Cabe, no entanto, ressaltar que a amplitude total dos IC95% foram acima de 10. Contudo, as faixas superiores demonstram que pode haver aplicação dos testes para diagnóstico de cirrose, de acordo com o contexto clínico e a probabilidade pré-teste. Os VPPs foram semelhantes (em torno de 80%), mas tais estimativas são relativamente pouco precisas, pois apresentaram IC95% amplos. Os VPNs foram elevados e semelhantes para os três testes, como era de se esperar a partir dos valores de Se. As RVs para teste positivo apresentaram valores intermediários. Já as RVs para teste negativo apresentaram valores próximos a 0,1, o que demonstra a habilidade dos testes para afastar cirrose. Em síntese, pode-se afirmar que o modelo GUCI destacou-se na abordagem diagnóstica da cirrose hepática, tendo sido particularmente útil para a sua exclusão.

Tanto para o diagnóstico de fibrose significativa quanto de cirrose, as áreas sob a curva ROC e os valores de acurácia global e do índice J de Youden foram semelhantes. Esses resultados apontam para uma equivalência no desempenho geral dos três modelos testados. Cabe, entretanto, comentar que tais indicadores do desempenho global do teste são desprovidos de importância prática, uma vez que o que interessa são índices individuais, como discutido acima.

O número de pacientes classificados para o diagnóstico de fibrose significativa foi semelhante para os modelos APRI e GUCI e inferior para o modelo de Lok. Para o diagnóstico de cirrose, esse número foi semelhante para os modelos GUCI e de Lok e inferior para o APRI.

Buscou-se, também, comparar o desempenho dos testes na fase de validação (pontos de corte descritos nas publicações originais) com os novos pontos de corte propostos, obtidos pela curva ROC. Para diagnóstico de fibrose significativa pelo APRI, a Se, Es, VPP e VPN foram semelhantes, considerando-se os IC95%. Chama atenção os IC95% mais estreitos para os índices de Es e VPP com os pontos de corte originais, assim como o valor superior da RV para teste positivo. Esse desempenho semelhante, entre os pontos de corte originais e os novos pontos, reforça a reprodutibilidade do teste.

Para o diagnóstico de cirrose pelo APRI, a Se foi maior com os novos pontos de corte, mesmo considerando-se o limite inferior do IC95%. A redução do ponto de corte de 1,0 (original) para 0,45 (novo) explica esse resultado, e foi importante, porque a Se obtida com os pontos de corte originais foi baixa. A Es foi semelhante, a despeito da elevação do ponto de corte de 2,0 para 2,6. Essa elevação tornou o teste menos útil para esse propósito, uma vez que, além de não ter proporcionado melhora na Es, levou à classificação de menor número de indivíduos. O VPP foi semelhante e o VPN foi superior com os novos pontos de corte, mas ressalva-se pequena sobreposição (2%) entre o limite inferior do IC95% deste, com o limite superior do IC95% do VPN obtido com os pontos de corte originais. As RVs para teste positivo foram semelhantes. A RV para teste negativo obtida com os novos pontos de corte foi quatro vezes menor quando comparada àquela obtida com os originais. O número de pacientes classificados com os pontos de corte originais foi bastante superior.

Dessa forma, os novos pontos de corte para o APRI apresentaram desempenho semelhante para o diagnóstico de fibrose significativa. Para a confirmação do diagnóstico de cirrose, o ponto de corte original do APRI foi aparentemente mais adequado, uma vez que permitiu a classificação de maior número de pacientes, sem redução da Es e VPP. Já para afastar tal diagnóstico, o novo ponto de corte para o APRI apresentou desempenho superior.

Para o diagnóstico de cirrose utilizando-se o modelo GUCI, a Se foi maior e a Es foi também ligeiramente superior com os pontos de corte definidos no estudo atual, assim como o VPP e o VPN. A RV para teste positivo foi bem superior com os novos pontos de corte (6,8 *versus* 2,4) e a RV para teste negativo foi inferior (0,09 *versus* 0,3).

Os novos pontos de corte para o GUCI apresentaram desempenho um pouco mais satisfatório na abordagem diagnóstica de cirrose hepática, quando comparados aos resultados obtidos com o ponto de corte original. Entretanto, o número de pacientes classificados foi menor com os novos pontos, o que é óbvio, posto que o ponto de corte original é único.

Para o diagnóstico de cirrose utilizando-se o modelo de Lok, a Se foi ligeiramente superior com os pontos de corte originais. Houve, entretanto, pequena sobreposição dos IC95%, sendo a amplitude total deste inferior a 10% na análise empregando-se os pontos de corte originais e de 21% com os dados dos novos pontos de corte. A Es foi mais elevada com os novos pontos de corte (84% *versus* 46%). Os VPP e VPN foram semelhantes, considerando-se os IC95%. Entretanto, observa-se clara tendência de superioridade do VPP com os pontos de corte do atual estudo, e discreta tendência de superioridade do VPN com os pontos de corte da literatura. A RV para teste positivo foi aproximadamente quatro vezes maior com os novos pontos de corte, o que está de acordo com a Es mais elevada. As RVs para teste negativo foram semelhantes e adequadas para se afastar o diagnóstico de cirrose com relativa precisão, particularmente com os pontos de corte do estudo original.

Os novos pontos de corte para o modelo de Lok mostraram melhor desempenho para a confirmação do diagnóstico de cirrose quando comparados aos pontos de corte originais. Isso foi obtido com a elevação do ponto de corte superior de 0,5 (original) para 0,76 (novo) e foi importante, posto que a Es obtida com os pontos de corte originais foi muito baixa. O ponto de corte inferior também foi maior, passando de 0,2 para 0,3, preservando-se Se razoável, apesar de não tão expressiva, principalmente se se considerar o limite inferior do IC95%. Os novos pontos de corte classificaram menor número de indivíduos por apresentarem intervalo mais amplo entre os pontos de corte selecionados.

Em seguida, o desempenho dos testes reportados nos trabalhos originais foi comparado com o obtido por meio dos novos pontos de corte definidos a partir da curva ROC no presente estudo (Tabelas 7, 8 e 9).

Para o APRI, na avaliação de fibrose significativa, os pontos de corte do presente estudo e os pontos de corte do estudo original apresentaram Se e Es próxima ou acima de 90%. Esses índices são semelhantes, se considerarmos os IC95%. O VPP foi superior com os novos pontos de corte (88% *versus* 96% - IC95%: 92%; 100%), o que pode ser explicado, ao menos parcialmente, pela maior prevalência de fibrose significativa no presente estudo (69% *versus* 47%). A área sob a curva ROC para diagnóstico de fibrose significativa foi ligeiramente superior na presente investigação quando

comparada ao estudo original (0,83 *versus* 0,80), o que é compatível com um desempenho global um pouco melhor. Para avaliação de cirrose, mais uma vez os valores de Se e Es do estudo original e do presente estudo foram semelhantes e próximos ou acima de 90%. O VPP foi superior no presente estudo, assim como a prevalência de cirrose (41% *versus* 28%). A área sob a curva ROC foi menor nesta investigação quando comparada à do estudo original (0,82 *versus* 0,89; respectivamente). Como no estudo original, os resultados encontrados nesta investigação reforçam o bom desempenho do APRI para o diagnóstico de fibrose significativa e de cirrose.

Para o diagnóstico de cirrose pelo modelo GUCI, os novos pontos de corte propostos apresentaram maior Se (97% *versus* 80%) e Es semelhantes. O VPP foi muito superior (81% *versus* 31%) e o VPN foi semelhante. O mais alto VPP pode ser explicado, ao menos parcialmente, pela diferença na prevalência de cirrose nos dois estudos (12% no estudo original *versus* 41% no presente estudo). A área sob a curva ROC foi ligeiramente maior no estudo original (0,85 *versus* 0,82; respectivamente). Esses resultados reforçam o bom desempenho do modelo GUCI principalmente para excluir o diagnóstico de cirrose.

Para o diagnóstico de cirrose por meio do modelo de Lok, a Se e a Es apresentaram índices próximos ou superiores a 90% e foram semelhantes no estudo original e na presente investigação, se considerarmos os IC95%. O VPP foi maior no presente estudo (94% *versus* 75%) e o VPN foi semelhante. A prevalência de cirrose no estudo original foi semelhante à do presente estudo (38% x 41%). A área sob a curva ROC foi maior no presente estudo (0,81 *versus* 0,78; respectivamente). Esses resultados também apontam para a boa reprodutibilidade e o bom desempenho do modelo de Lok no diagnóstico de cirrose.

ANÁLISE DE DIFERENTES INTERVALOS DE RESULTADOS

Foram calculadas as RVs e probabilidades pós teste por faixas de resultados. RVs superiores a 10 resultam em grande mudança e são, em geral, conclusivas de uma probabilidade pré-teste a uma probabilidade pós-teste de uma doença³⁶⁻³⁷.

Os resultados encontrados forneceram mais informações quando se consideraram as faixas extremas. Assim, pôde-se constatar que, para um resultado do APRI > 1,2, a chance de o paciente apresentar fibrose significativa é 11 vezes maior do que a de apresentar fibrose mínima. Considerando-se a prevalência de fibrose significativa na coorte investigada, determinou-se a chance pós-teste e obteve-se uma probabilidade pós-teste de 96%. Resultados idênticos foram encontrados para valores do GUCI > 1,4. Resultados do modelo de Lok > 0,6 associaram-se a chances de fibrose significativa oito vezes maiores do que de fibrose mínima, com probabilidade

pós-teste de 95%. É interessante notar que os pontos de corte para avaliação da fibrose significativa obtidos por faixas de valores e análise das RVs foram próximos aos obtidos por meio da curva ROC. Como os desempenhos dos testes foram muito semelhantes e satisfatórios em determinados aspectos, pode-se afirmar que os três testes podem ter utilidade clínica para se diagnosticar fibrose significativa em portadores de hepatite C crônica.

Para avaliação da cirrose, o resultado do teste APRI $\leq 0,6$ associou-se a uma chance quatro vezes menor de cirrose, em relação a graus menores de fibrose. O resultado do GUCI $\leq 0,5$ associou-se a uma chance nove vezes menor de cirrose com baixa probabilidade pós-teste e no modelo de Lok, um resultado $\leq 0,4$, a uma chance três vezes menor de haver cirrose. Com exceção do APRI, observou-se que os pontos de corte para diagnóstico de cirrose, definidos nesta etapa, foram semelhantes aos pontos de corte obtidos por meio da análise das curvas ROC. Desta forma, pode-se inferir que os testes apresentaram melhor desempenho para afastar a possibilidade de cirrose do que para confirmar este diagnóstico. O modelo GUCI foi o melhor teste para se excluir o diagnóstico de cirrose com os pontos de corte considerados.

Os valores intermediários não foram discriminativos e contribuem pouco para o diagnóstico. Isso pode ser esperado se levarmos em consideração a dinâmica do processo evolutivo da fibrose. Os estádios determinados arbitrariamente nas classificações semi-quantitativas (como as de Metavir e Ishak) não são capazes de traduzir o espectro ou o contínuo desenvolvimento da fibrose que ocorre entre um estágio e outro dessas classificações.

CONCLUSÕES

Validação dos testes

Os pontos de corte originais propostos para o modelo APRI, quando aplicados aos dados da presente coorte, apresentaram índices de desempenho semelhantes aos publicados por Wai e col.²⁷ para a confirmação do diagnóstico de fibrose significativa e de cirrose, ratificando os achados da investigação original.

O ponto de corte original estabelecido para o modelo GUCI não permitiu, neste estudo, concluir a respeito da presença ou não de cirrose. Desta forma, a presente investigação não reforçou os índices de desempenho publicados originalmente por Islam e col.²⁸ para o modelo GUCI, com o ponto de corte sugerido.

Para o modelo de Lok e col.²⁹, os dados do presente estudo reforçaram o bom desempenho dos pontos de corte originais para exclusão do diagnóstico de cirrose, mas não para sua confirmação.

Avaliação de novos pontos de corte

Para o modelo APRI:

Os novos pontos de corte propostos apresentaram bom desempenho, principalmente para confirmação de fibrose significativa e para exclusão de cirrose.

Para diagnóstico de fibrose significativa, os novos pontos de corte propostos mostraram desempenho semelhante aos pontos de corte originais, mas permitiram a classificação de um maior número de pacientes.

Para diagnóstico de cirrose, os novos pontos de corte propostos mostraram desempenho semelhante aos pontos de corte originais, mas com a classificação de um menor número de pacientes.

Para o modelo GUCI:

Os novos pontos de corte propostos apresentaram bom desempenho para confirmação e exclusão do diagnóstico de fibrose significativa e para exclusão de cirrose.

Na avaliação de cirrose, os novos pontos de corte apresentaram desempenho semelhante aos pontos de corte originais para a confirmação e melhor desempenho para afastar esse diagnóstico, com menor número de pacientes classificados.

Para o modelo de Lok:

Os novos pontos de corte apresentaram desempenho razoável para confirmação e exclusão do diagnóstico de fibrose significativa e bom desempenho para exclusão do diagnóstico de cirrose.

Na avaliação de cirrose, os novos pontos de corte apresentaram desempenho semelhante aos pontos de corte originais tanto para confirmação quanto para exclusão desse diagnóstico.

Em síntese:

Resultados do teste APRI acima de 1,2 e, principalmente, acima de 1,5 apresentaram Es e RV para o resultado positivo com desempenho suficiente para se reforçar a presença de fibrose significativa em portadores de hepatite C crônica. O mesmo se aplica para resultados do modelo GUCI acima de 1,4 e do modelo de Lok acima de 0,6. Esses valores foram confiáveis para diagnosticar fibrose significativa e poderão ter utilidade como possíveis substitutos da biópsia hepática.

Valores do APRI menores que 0,45, resultados do modelo GUCI iguais ou menores que 0,5 e do modelo de Lok iguais ou menores que 0,3 podem ser úteis para se afastar o diagnóstico de cirrose e mostram-se importantes no contexto do estudo dos marcadores substitutos da biópsia hepática.

Portanto, aplicando-se os pontos de corte estudados para os três modelos, foi possível, no presente estudo, diagnosticar a presença de fibrose significativa e afastar a presença de cirrose em pacientes com hepatite C crônica. O presente estudo demonstrou, também, a utilidade dos modelos GUCI e de Lok para avaliação de fibrose significativa, o que ainda não havia sido proposto na literatura.

PERSPECTIVAS

Para o futuro próximo, é necessário aprofundar-se na investigação e validação de testes não invasivos de avaliação da fibrose hepática, que, eventualmente, possam substituir a biópsia. Há uma carência de estudos prospectivos em coortes bem definidas. Existem inúmeros modelos sendo investigados, mas não há uma uniformidade na metodologia, nos critérios de inclusão dos pacientes e nos objetivos investigados. Para maior segurança quanto ao real desempenho destes testes é muito importante que haja um consenso quanto à utilização do padrão ouro. Não há definição, por exemplo, sobre o tamanho ideal do fragmento biopsiado. Alguns estudos advogam um mínimo de 10 tratos portais, outros incluem biópsias com 5 tratos portais ou até mesmo as biópsias fragmentadas. Também o modelo para estadiamento das biópsias deverá ser melhor estabelecido. A maioria dos autores emprega os escores de Ishak e o Metavir, mas há os que interpretaram a biópsia pelo modelo de Scheuer ou Knodell. Desta forma, é mandatório definir-se um padrão para a condução de novas investigações, para que os resultados dos estudos possam ser melhor reproduzidos e comparados.

É muito importante, paralelamente, ampliar a função potencial dos testes não invasivos além de sua finalidade atual como métodos diagnósticos de fibrose avançada ou cirrose. Novos objetivos precisam ser explorados, como a identificação dos estádios individuais de fibrose hepática, assim como a sua ausência.

Os avanços recentes no conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares constituem novos paradigmas no conceito de reversão da fibrose hepática e nas bases do tratamento antifibrótico iminente como nova intervenção terapêutica. Essas possibilidades terapêuticas dependem de novos métodos não invasivos capazes de distinguir, com acurácia, o processo estático de fibrose dos processos dinâmicos de fibrogênese e fibrólise. Assim, o aperfeiçoamento desses métodos, em

futuro próximo, deverá transformá-los em ferramentas indispensáveis para a vigilância evolutiva da fibrose hepática e a sua reversão após o tratamento das hepatopatias crônicas.

Referências bibliográficas

1. CHOO QL, KUO G, WEINER AJ, OVERBY LR, BRADLEY DW, HOUGHTON M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, 244:359-362, 1989.
2. WASLEY A & ALTER MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Seminars in Liver Diseases**, 20:1-16, 2000.
3. TEIXEIRA R & VELASCO HMA. Epidemiologia e impacto da infecção pelo vírus C na saúde pública. In: TEIXEIRA R, MARTINS FILHO AO, OLIVEIRA GC. **Hepatite C. Aspectos críticos de uma epidemia silenciosa**. Ed. Coopmed. Cap 1:1-12, 2005.
4. SEEFF LB, HOOFNAGLE JH. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. **Hepatology**, 36(1):S1-S2, 2002.
5. HEPP J, INNOCENTI FA. Liver transplantation in Latin America: current status. **Transplant. Proc.**, 36 (6):1667-8, 2004.
6. SHARMA P, LOK A. Viral hepatitis and liver transplantation. **Seminars in Liver Diseases**, 26(3):285-97, 2006.
7. YANO M, KUMADA H, HAGE M, IKEDA K, SHIMAMATSU K, INOUE O, HASHIMOTO E. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. **Hepatology**, 23:1334-40, 1996.
8. AFDHAL NH. The natural history of hepatitis C. **Seminars in Liver Diseases**, 24 (2):3-8, 2004.
9. RYDER SD, IRVING WL, JONES DA, NEAL KR, UNDERWOOD JC. Trent Hepatitis C Study Group. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. **Gut**, 53(3):451-5, 2004.
10. SHIFFMAN ML. Natural history and risk factors for progression of hepatitis C virus disease and development of hepatocellular cancer before liver transplantation. **Liver Transplantation**, 9(11):S14-20, 2003.
11. HARINATH S, SRINIVAS S, CARY C, BOYER J, DHANPAT J. Liver Biopsy: Evolving Role in the New Millennium. **J. Clin. Gastroenterol.**, 39(7):603-10, 2005.
12. PERRAULT J, MCGILL DB, OTT BJ. Liver biopsy: complications in 1000 inpatients and outpatients. **Gastroenterology**, 74:103-106, 1978.
13. ROSSON RR, CORRAL J, JASKI T. Outpatient liver biopsy. **J.A.M.A.**, 222:364, 1972.
14. CADRANEL JF, RUFAT P, DEGOS F. Practices of Liver Biopsy in France: Results of a Prospective Nationwide Survey. **Hepatology**, 32(3):477-81, 2000.
15. MCGILL DB, RAKELA J, ZINSMEISTER AR, OTT BJ. A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. **Gastroenterology**, 99:1396-1400, 1990.

16. PICCININO F, SAGNELLI E, PASQUALE G, GIUSTI G. Complications following percutaneous liver biopsy: a multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. **Journal of Hepatology**, 2:165-173, 1986.
17. BRAVO AA, SHETH SG, CHOPRA S. Current Concepts: Liver Biopsy. **N. Engl. J. Med.**, 344:495-500, 2001.
18. FONTANA RJ, LOK AS. Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, 36:S57-S64, 2002.
19. MURAWAKI Y, KODA M, OKAMOTO K, MIMURA K, KAWASAKI H. Diagnostic value of serum type IV collagen test in comparison with platelet count for predicting the fibrotic stage in patients with chronic hepatitis C. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 16(7):777-81, 2001.
20. GIANNINI E, RISSO D, BOTTA F, CHIARBONELLO B, FASOLI A, MD, MALFATTI F, ROMAGNOLI P, TESTA E, CEPPA P, TESTA R. Validity and Clinical Utility of the Aspartate Aminotransferase–Alanine Aminotransferase Ratio in Assessing Disease Severity and Prognosis in Patients With Hepatitis C Virus–Related Chronic Liver Disease. **Arch. Intern. Med.**, 163:218-224, 2003.
21. MYERS RP, TORRES M, IMBERT-BISMUT F, RATZIU V, CHARLOTTE F, POYNARD T. Biochemical Markers of Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C - A Comparison with Prothrombin Time, Platelet Count, and Age–Platelet Index. **Digestive Diseases and Sciences**, 48(1):146–53, 2003.
22. LACKNER C, STRUBER G, LIEGL B, LEIBL S, OFNER P, BANKUTI C, BAUER B, STAUBER RE. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology**, 41(6):1376-82, 2005.
23. SHETH SG, FLAMM SL, GORDON FD, CHOPRA S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Am. J. Gastroenterol.**, 93(1):44-8, 1998.
24. REEDY DW, LOO AT, LEVINE RA. AST/ALT ratio \geq 1 is not diagnostic of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Digestive Diseases and Sciences**, 43(9):2156-9, 1998.
25. IMPERIALE TF, SAID AT, CUMMINGS OW, BORN LJ. Need for validation of clinical decision aids: use of the AST/ALT ratio in predicting cirrhosis in chronic hepatitis C. **Am. J. Gastroenterol.**, 95(9):2328-32, 2000.
26. PARK GJ, LIN BP, NGU MC, JONES DB, KATELARIS PH. Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 15(4):386-90, 2000.
27. WAI CT, GREENSON JK, FONTANA RJ, KALBFLEISCH JD, MARRERO JA, CONJEEVARAM HS, LOK AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, 38(2):518-26, 2003.
28. ISLAM S, ANTONSSON L, WESTIN J, LAGGING M. Cirrhosis in hepatitis C virus-infected patients can be excluded using an index of standard biochemical serum markers. **Scand. J. Gastroenterol.**, 40(7):867-72, 2005.

29. LOK AS, GHANY MG, GOODMAN ZD, WRIGHT EC, EVERSON GT, STERLING RK, EVERHART JE, LINDSAY KL, BONKOVSKY HL, DI BISCEGLIE AM, LEE WM, MORGAN TR, DIENSTAG JL, MORISHIMA C. Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort. **Hepatology**, 42(2): 282-92, 2005.
30. JEROME KR, GRETCH DR. Laboratory approaches to the diagnosis of hepatitis C virus infection. **Minerva Gastroenterol. Dietol.**, 50(1):9-20, 2004.
31. MORADPOUR P, BLUM HE. A primer on the molecular virology of hepatitis C. **Liver Int.**, 24(6):519-25, 2004.
32. GRETCH DR. Use and interpretation of HCV diagnostic tests in the clinical setting. **Clin. Liver Dis.**, 1(3):543-57, 1997.
33. ISHAK K, BAPTISTA A , BIANCHI L, CALLEAQ F, DE GROOTE J, GUDAT F et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **Journal of Hepatology**, 22:696-99, 1995.
34. GREINER M, SOHR D, GOBEL P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, 185:123-32, 1995.
35. HANLEY JA, McNEIL BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. **Radiology**, 143:29-36, 1982.
36. JAESCHKE R, GUYATT GH, SACKETT DL. User's guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. **J.A.M.A.**, 271:703-7, 1994.
37. FERRARI TCA. Abordagem diagnóstica da mieloradiculopatia causada pelo *Schistosoma mansoni*: imunodiagnóstico em liquor pela técnica de ELISA. **Tese (Doutorado)**. Gastroenterologia. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.