

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA**

**MARIA DA GRAÇA FERRONATO**

**MARCADORES DE APOPTOSE E INFLAMAÇÃO EM PACIENTES  
PORTADORES DE INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C  
SUBMETIDOS OU NÃO A TRATAMENTO ANTIVIRAL**

Porto Alegre

2014

**MARIA DA GRAÇA FERRONATO**

**MARCADORES DE APOPTOSE E INFLAMAÇÃO EM PACIENTES  
PORTADORES DE INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C  
SUBMETIDOS OU NÃO A TRATAMENTO ANTIVIRAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação, Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Mário Reis Alvares-da-Silva

Porto Alegre

2014

## CIP - Catalogação na Publicação

Ferronato, Maria da Graça

MARCADORES DE APOPTOSE E INFLAMAÇÃO EM PACIENTES  
PORTADORES DE INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE  
C SUBMETIDOS OU NÃO A TRATAMENTO ANTIVIRAL / Maria  
da Graça Ferronato. -- 2014.  
57 f.

Orientador: Mário Reis Alvares-da-Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e  
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Hepatite C. 2. Apoptose hepatocitária. 3.  
Inflamação . 4. Fibrose Hepática. I. Reis Alvares-da-  
Silva, Mário, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico meu trabalho às pessoas mais especiais da minha vida:

**Meus pais**, Irineu e Maria, pelo exemplo de vida, por tudo o que vocês me ensinaram, por serem os mais generosos dos pais e por serem minha fortaleza sempre.

**Meu marido**, Leandro, pelo apoio incondicional, exemplo, companheirismo, amizade, alegria e amor. Por sua presença em minha vida esse sonho foi concretizado.

**Minha filha**, Marina, meu maior presente.

## AGRADECIMENTOS

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.” Albert Einstein*

**A Deus**, o grande responsável pela minha vida. Aquele que me carrega no colo quando a caminhada se torna difícil e coloca sempre as pessoas certas no meu caminho.

**Aos meus irmãos:** Eliézer, Rosário e Elias pela cumplicidade, por andarmos sempre juntos e por serem luz no meu caminho. Vocês fazem a minha vida mais feliz.

**Ao meu orientador**, professor Mário Reis, por me abrir as portas, pelos ensinamentos, idéias inovadoras, convívio, paciência e por acreditar no meu trabalho.

**Ao querido Fábio Leite Gastal** pelos ensinamentos durante meus primeiros passos na vida acadêmica. Você é parte essencial deste trabalho, por ser meu pai na medicina, por ter me ensinado a ter gosto pela pesquisa e a resolver os problemas mais complexos com as soluções mais simples. Obrigada por compartilhar comigo a sua sabedoria.

**À amiga de infância Renata Etchepare** pela presença constante, por me fazer lembrar quem eu sou nas dificuldades e por trilharmos o mesmo caminho. Juntas a vida fica mais leve.

**Aos amigos Ari Leão** pelo estímulo e companhia desde o início dessa jornada e **Fernando Schacher** pela disponibilidade em me ajudar a qualquer momento.

**À professora Denise Cantarelli Machado**, pela gentileza de oferecer o seu laboratório para a realização dos testes que geraram os resultados desta dissertação.

**Aos meus queridos mestres e amigos: Esther Dantas Correa, Viriato Cunha, Cíntia Meireles e Leonardo Schiavon** por me fazerem amar ainda mais a medicina, serem meu exemplo sempre e acreditarem na minha capacidade desde o início. Vocês caminham sempre comigo.

**Ao PPG, GPPG-HCPA e ao FIPE**, pelo auxílio e apoio concedido.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: Adenosina trifosfato

CHC: Carcinoma Hepatocelular

CASPASES: *Cysteynil aspartatic acid proteases*

CK 18: Citoqueratina 18

DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica

DM: Diabetes Melito

Fas: CD-95

HBV: Vírus da hepatite B

HCV: Vírus da Hepatite C

HCC: Hepatite C Crônica

IFN: Interferon

IL-28B: Interleucina 28B

IMC: Índice de massa corporal

MIF: Fator inibidor da migração de macrófagos

Naive: virgens de tratamento

NK: Natural Killer

NR: Não Respondedores

PAI: Inibidor do ativador do plasminogênio

RI: Resistência periférica à insulina

RVS: Resposta virológica sustentada

sICAM-1 - molécula de adesão intercelular solúvel do tipo 1

sVCAM-1: molécula de adesão vascular solúvel do tipo 1

SM: Síndrome Metabólica

TNF: Fator de necrose tumoral

TTG: Teste de tolerância à glicose

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>11</b>
2.1	VÍRUS DA HEPATITE C	11
2.2	VÍRUS DA HEPATITE C E DOENÇA HEPÁTICA	12
2.3	MECANISMO DE MORTE CELULAR PROGRAMADA	13
2.4	RELAÇÃO ENTRE APOPTOSE, INFLAMAÇÃO E O VÍRUS C	15
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA DO ESTUDO</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>QUESTÃO DE PESQUISA</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
6.1	OBJETIVO GERAL	22
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
<b>7</b>	<b>TARGET JOURNAL</b>	<b>23</b>
<b>8</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>24</b>
<b>9</b>	<b>ORÇAMENTO</b>	<b>43</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>44</b>
<b>11</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>46</b>
	<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>52</b>
	<b>APÊNDICE B - RESUMO SELECIONADO PARA APRESENTAÇÃO ORAL NO CONGRESSO BRASILEIRO DE HEPATOLOGIA 2013</b>	<b>55</b>

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Foi recentemente sugerido que a suscetibilidade à fibrose hepática, induzida pelo HCV, está relacionada a genes que regulam a apoptose. **OBJETIVOS:** Este trabalho visa elucidar a possível interação entre apoptose, inflamação e fibrose em pacientes com hepatite crônica C (HCC). **MATERIAL E MÉTODOS:** Pacientes com HCC, mono infectados, com idade entre 18 a 60 anos, foram incluídos e submetidos a exames clínico e histopatológico. Aqueles com insuficiência renal crônica, neoplasias malignas, abuso de álcool, gravidez e/ou uso de imunossuppressores foram excluídos. Foram determinados o índice de massa corporal, glicose, insulina, HOMA-IR, perfil lipídico, fibrose (METAVIR), níveis séricos de CK-18 (M30-Apoptosense, ELISA - Lausen, Switzerland), Fas, Fas-L, I-CAM, V-CAM, MIF, PAI (HSEP-63k, Milliplex, Millipore, Copenhagen, Denmark). **RESULTADOS:** Cinquenta e cinco pacientes foram incluídos, 23 deles eram virgens de tratamento. Dos pacientes que receberam tratamento antiviral, 15 obtiveram resposta virológica sustentada (RVS) e 17 foram não respondedores (NR). A inflamação, avaliada pelo sVCAM foi diretamente associada à fibrose avançada ( $p = 0,009$ ). Além disso, níveis de apoptose mensurados pelo sFas-L e inflamação mensurados através do sVCAM foram mais elevados no grupo RVS em relação aos virgens de tratamento ( $p = 0,006$  e  $0,019$ , respectivamente). sVCAM correlacionou-se tanto com o sFas-L ( $r_s = 0,778$ ,  $p < 0,001$ ) quanto com o MIF ( $r_s = 0,621$ ,  $p < 0,001$ ). MIF e sFas-L também apresentaram correlação positiva ( $r_s = 0,526$ ,  $p = 0,001$ ). CK-18 não diferiu entre os grupos. **CONCLUSÃO:** Fibrose avançada teve uma correlação positiva com a inflamação, mensurada pelo sVCAM, mas não foi associada a marcadores de apoptose. Os níveis de apoptose via sFas-L e inflamação via sVCAM evidenciaram-se maiores em pacientes que eliminaram o vírus quando comparados a pacientes não tratados. MIF também revelou tendência a ter níveis mais elevados naqueles com fibrose avançada.

**Palavras-chave:** Hepatite C. Apoptose. Inflamação. Fibrose.



## ABSTRACT

**AIMS:** HCV-related liver fibrosis was recently suggested to be linked to genes that regulate apoptosis. Our study aims to elucidate the possible crosstalk between apoptosis, inflammation and fibrosis in patients with HCV. **METHODS:** HCV monoinfected patients, aging from 18 to 60 years old were included and underwent clinical pathological examination. Those with chronic renal failure, malignancies, alcohol abuse, pregnancy and/or taking immunosuppressant agents, were excluded. Body mass index, glucose, insulin, HOMA-IR, lipid profile, and fibrosis (METAVIR) were determined as well as serum levels of CK-18 (M30-Apoptosense, ELISA - Lausen, Switzerland), Fas, Fas-L, I-CAM, V-CAM, MIF, and PAI (HSEP-63k, Milliplex, Millipore, Copenhagen, Denmark). **RESULTS:** Fifty-five patients were included, 23 of them naïve. From the antiviral-experienced patients, 15 had sustained virological response (SVR) and 17 were non-responders (NR). Inflammation as assessed by sVCAM was directly associated to advanced fibrosis ( $p=0.009$ ). As well the levels of apoptosis via sFas-L and inflammation via sVCAM both were increased in SVR group in comparison to naïve ( $p=0.006$  and  $0.019$ , respectively). sVCAM correlated both with sFas-L ( $r_s=0.778$ ,  $p < 0.001$ ) and MIF ( $r_s = 0.621$ ,  $p < 0.001$ ). MIF and sFas-L also displayed a correlation ( $r_s=0.526$ ,  $p=0.001$ ). CK-18 did not differ among the groups. **CONCLUSION:** Advanced fibrosis had a positive correlation with inflammation by sVCAM, but was not associated with apoptosis markers, while levels of apoptosis via sFas-L and inflammation via sVCAM were increased in patients who cleared the virus when compared to naïves. MIF also showed a tendency to have higher levels those with advanced fibrosis.

**Keywords:** Hepatitis C. Apoptosis. Inflammation. Fibrosis.

## 1 INTRODUÇÃO

O dano hepático determinado pelo vírus da hepatite C (HCV) caracteriza-se por graus diversos de inflamação e fibrose, com alto risco de desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular. Diversos mecanismos fisiopatológicos relacionados à síndrome metabólica (SM) e à esteatose hepática têm sido ligados à presença do HCV, incluindo resistência à insulina (RI), hepática e periférica, e a eles têm sido atribuída relevância na evolução da doença. Por sua vez, SM, RI e esteatose são a base causal da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), cuja incidência vem aumentando significativamente nos últimos anos. Dados atuais sugerem que a apoptose desempenha um papel importante na injúria hepática e na progressão da DHGNA, mas ainda não se sabe exatamente qual seu papel direto na doença hepática secundária à infecção pelo HCV <sup>(1)</sup>.

A morte celular programada (apoptose) é um mecanismo biológico fundamental na regulação da infecção viral e representa um mecanismo de defesa do hospedeiro contra a infecção. É o mais eficiente processo que o sistema imunológico dispõe para eliminar células infectadas por vírus <sup>(2)</sup>. Nos últimos anos, vários marcadores de apoptose foram reconhecidos, sendo que, desses, o Fas, o Fas-ligand (Fas-L) e a citoqueratina 18 (CK-18) se sobressaem nas doenças hepáticas.

O Fas é uma proteína que pertence à família do fator de necrose tumoral (TNF) e possui um receptor de membrana que está diretamente envolvido neste tipo de morte celular. Foi indicado que o Fas é constitutivamente expresso nos hepatócitos em pequenas quantidades. No entanto, na infecção pelo HCV, a sua expressão está aumentada, contribuindo para maior eliminação dessas células <sup>(3)</sup>. Com isso é possível afirmar que o mecanismo de aumento da apoptose hepatocitária, na infecção pelo HCV, seja dependente das interações Fas-FasL.

Em relação a CK-18, estudos apontam que o grau de apoptose tecidual hepática dado por imuno-histoquímica tem forte associação com seus níveis séricos <sup>(4)</sup>. Por isso essa pode se constituir em um marcador não invasivo de apoptose, o que tem sido confirmado por estudos em DHGNA <sup>(5-8)</sup>.

Sobre o processo de inflamação e fibrose hepática, merecem destaques as células estreladas hepáticas; localizadas no espaço de Disse, entre o endotélio sinusoidal e os hepatócitos, são células responsáveis pelo recrutamento de células

inflamatórias para o parênquima hepático. Moléculas de adesão intercelular (ICAM) e vascular (VCAM) são essenciais para o processo inicial e sequencial de fibrose. Essas moléculas, que pertencem à família das imunoglobulinas, precedem o recrutamento de células inflamatórias para sítios extravasculares de inflamação, sendo centrais para iniciar este processo <sup>(9)</sup>. Outra molécula em estudo é o Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF), uma citocina inflamatória ainda pouco elucidada no processo de fibrogênese hepática. Experimentos realizados em modelo animal apontam para um papel antifibrótico dessa citocina <sup>(10)</sup>. Seguindo nesta linha, tem-se o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI), molécula que atua como inibidora da fibrinólise. Pesquisas publicaram resultados controversos quanto à sua atividade no processo de fibrose hepática <sup>(11, 12)</sup>.

Ainda não é totalmente conhecido o comportamento desses marcadores de inflamação e apoptose em portadores de HCV e sua contribuição na evolução da fibrose hepática induzida por esse vírus.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 VÍRUS DA HEPATITE C

O vírus da hepatite C (HCV) é um vírus RNA, com organização genômica semelhante ao *Flavivirus*. O HCV foi descoberto em 1989, a partir da clonagem do genoma viral de uma partícula de DNA do plasma de chimpanzês infectados com fator VIII humano contaminado <sup>(13)</sup>. O HCV é formado por um envelope lipídico (glicoproteínas E1 e E2), capsídeo proteico (core) e o genoma viral (RNA). O genoma viral é composto de proteínas estruturais e não estruturais (NS), as quais codificam as proteínas NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, que são importantes na replicação viral <sup>(14)</sup>. A heterogeneidade genômica atribuída ao HCV se deve a uma frequência elevada de mutações espontâneas. Em 1994, foi proposto um sistema único de nomenclatura, baseado na comparação entre sequências restritas ao gene NS5B, que caracterizou seis genótipos virais: 1 (1a, 1b, 1c), 2 (2a, 2b, 2c), 3 (3a, 3b), 4, 5 (5a) e 6 <sup>(15)</sup>.

A taxa de persistência do HCV no organismo é alta quando comparada a outros vírus hepatotrópicos <sup>(16)</sup>. O clareamento viral espontâneo ocorre em apenas 20% dos indivíduos. Para eliminar o vírus, quando da infecção aguda, o organismo depende de uma resposta imune inata com a secreção de interferon (IFN) tipo I e ativação de células natural killer (NK), além de uma resposta adaptativa, com a ativação de genes IFN-gama-induzidos e respostas vigorosas das células CD4 <sup>(17)</sup>. A produção de IFN produz um estado antiviral no fígado, contribuindo para eliminação do HCV <sup>(18)</sup>. Essa produção de IFN leva à ativação das células de Kupffer e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Estudos recentes apontam também para a importância de IFNs tipo III (interleucinas 28A, 28B e 29) para eliminação viral. O IFN III assim como o IFN I são regulados através da ativação de genes e seus receptores, com distintos padrões de distribuição celular <sup>(19)</sup>. Qualquer falha na sequência desses mecanismos contribui para persistência viral e, assim, para cronicidade da doença. Estudos recentes sugerem associação da IL-28B com a eliminação espontânea do HCV durante a infecção aguda <sup>(20)</sup>. Além disso, uma variação genética desta interleucina foi apontada como preditor independente de resposta ao tratamento com Interferon Peguilado e Ribavirina em pacientes com genótipo 1 <sup>(21)</sup>. Sobre a resposta imune adaptativa, uma

das características desse vírus é o atraso no aparecimento de anticorpo específico e resposta das células T <sup>(22)</sup>. Mesmo com a resposta adequada das células T CD4 e CD8, a infecção pode evoluir para cronicidade. Foi sugerido, então, que essa transição para infecção crônica não é resultado de falha no sistema imunológico, e sim causada por um mecanismo secundário que leva ao colapso da resposta CD4 para o HCV <sup>(23)</sup>.

## 2.2 VÍRUS DA HEPATITE C E DOENÇA HEPÁTICA

Estima-se que aproximadamente 130 milhões de indivíduos estejam cronicamente infectados pelo HCV, o que representa cerca de 3% da população mundial. Inquérito realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia, de 2004 a 2008, que incluiu 1.173.406 pré-doadores de sangue, revelou que 1,23% era reativo ao teste para a presença do anticorpo Anti-HCV. Recente estudo de base populacional brasileira com 19.503 indivíduos avaliados nas capitais dos estados e Distrito Federal, no entanto, individuou prevalência de 2,09% na região Norte e 1,9% na região Sul do país, em população com idade superior a 20 anos <sup>(24)</sup>. A principal via de transmissão desse vírus é a parenteral e o principal fator de risco, atualmente, é o uso de drogas injetáveis.

Vários fatores podem influenciar a história natural da hepatite C até chegar ao estágio de cirrose hepática. Em torno de 5% a 20% dos pacientes com atividade inflamatória moderada à intensa no fígado irão desenvolver cirrose após 20 a 30 anos de doença <sup>(25)</sup>. Entre os fatores relacionados à progressão acelerada da fibrose, estão o sexo masculino, a idade de contágio, o etilismo, a coinfeção com o vírus da hepatite B (HBV) ou vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a presença de esteatose ou esteato-hepatite <sup>(26)</sup>. Os pacientes que adquiriram a infecção por transfusão sanguínea parecem ter uma progressão mais rápida da fibrose quando comparados aos pacientes infectados por outras vias <sup>(25)</sup>. A idade da contaminação pelo HCV demonstrou ser o maior preditor de evolução da doença. Em indivíduos mais velhos, o incremento da taxa de progressão da fibrose pode estar relacionado com estresse oxidativo, redução do fluxo sanguíneo hepático, redução da atividade imunológica ou toxicidade mitocondrial <sup>(27)</sup>.

Estudos recentes apontam a apoptose hepatocitária como outro fator que contribui para progressão da fibrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo

HCV <sup>(4,6)</sup>. Essa relação direta é bem definida na literatura em pacientes com DHGNA <sup>(1,5-8,28-30)</sup>.

### 2.3 MECANISMO DE MORTE CELULAR PROGRAMADA

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental <sup>(31)</sup>. Observou-se que esta diferia das outras formas de morte celular (autofagia, necrose, mitose catastrófica) por suas características morfológicas e bioquímicas. Em 1972, foi sugerido o termo "apoptose" para indicar esse tipo de morte <sup>(32)</sup>.

A necrose e a apoptose são fenômenos que contribuem consideravelmente para a morte celular nas doenças hepatobiliares, e a opção da célula por uma dessas formas de morte é influenciada pelo seu estado energético. Como processo ativo, a apoptose requer reservas de energia (ATP), ao passo que a necrose se instala quando há depleção total do ATP <sup>(31)</sup>. A apoptose difere da necrose basicamente por ser um processo controlado e por manter a integridade da membrana celular. É uma forma precisamente regulada de morte celular e, juntamente com a mitose, contribui para a homeostase do organismo através de fenômenos precisos de renovação celular.

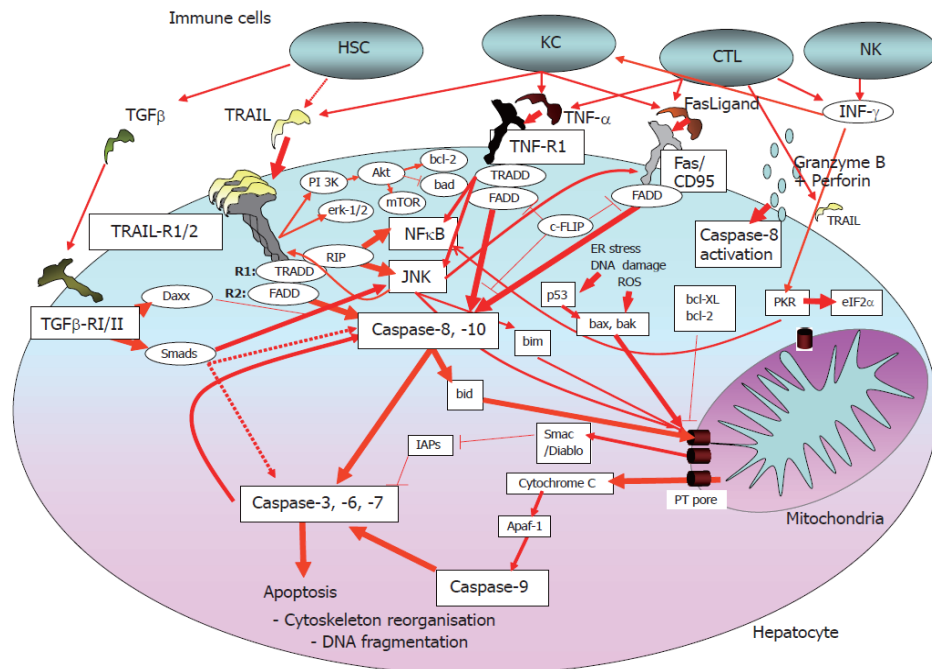
Na apoptose, ocorre retração da célula, que causa perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e concentra-se junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos, e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem-se, dessa forma, originando estruturas que englobam o conteúdo celular. Essas porções da célula envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos (no caso do fígado, as células de Kupffer, que são os macrófagos residentes) e removidos, sem causar um processo inflamatório <sup>(33)</sup>.

A apoptose pode ser deflagrada por duas vias: a via extrínseca (citoplasmática) e a via intrínseca (mitocondrial). A primeira é ativada por estímulos externos através da conexão de receptores específicos na superfície celular, chamados receptores de

morte. Esses receptores incluem o Fas (CD95), o TNF e o fator de necrose tumoral induzindo apoptose por ligantes nos receptores 1 e 2 (TRAIL R1 e R2). Além de induzir apoptose por essa via, esses receptores de morte podem iniciar de forma independente a sinalização intracelular da cascata da apoptose e, assim, amplificar a lesão hepática <sup>(34)</sup>. A segunda via é ativada por estímulos internos de estresse celular, tais como lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Essas diferentes vias culminam com a ativação de uma cascata de enzimas proteolíticas conhecidas como caspases, que são enzimas intracelulares (zimogênios) e desempenham papel fundamental no processo de morte celular programada <sup>(35)</sup>. A figura 1 ilustra o mecanismo de funcionamento dessas enzimas no processo de apoptose celular.

Especialmente no fígado, uma das proteínas que é clivada pelas caspases, durante o processo de apoptose, é a CK-18. Por ser uma das proteínas mais importantes do citoesqueleto do hepatócito, representando cerca de 5% do total de proteínas do fígado, sua divisão indica que o hepatócito não está íntegro. Essa proteína gera um neoepítipo que é liberado no soro como um índice de apoptose dos hepatócitos <sup>(36)</sup>, e também identificado por técnicas de imuno-histoquímica em amostras de tecido hepático <sup>(4,37)</sup>. É um filamento do citoesqueleto de células endoteliais que assume importante papel durante o processo de apoptose hepatocitária. Iniciada a cascata das caspases, a caspase 3 desintegra a CK-18 em duas posições diferentes: a Asp238 e Asp396, que são moléculas de aspartato <sup>(28)</sup>. Este padrão de clivagem seletivo é altamente específico para a apoptose. Esses fragmentos são estáveis à proteólise e liberados na corrente sanguínea <sup>(29)</sup>, sendo o objetivo deste estudo estudar esse processo. O anticorpo de detecção M30 reconhece um neoepítipo mapeado para posições 387-396 da CK-18, chamado CK-18-Asp396, que só é revelado após clivagem da proteína pelas caspases — postulada como um biomarcador seletivo da apoptose hepatocitária.

**Figura 1 - Mecanismos de Apoptose\* adaptado<sup>(38)</sup>**



Fonte: Fischer R, Baumert T, Blum HE. (2007, p. 4865-72).

## 2.4 RELAÇÃO ENTRE APOPTOSE, INFLAMAÇÃO E O VÍRUS C

Wieckowska et al. <sup>(5)</sup> foram os primeiros a mensurar os níveis de CK-18 em pacientes com DHGNA e concluíram que estes eram significativamente maiores nos pacientes com esteato-hepatite não alcoólica do que nos controles. Sugeriu-se, assim, a utilidade da CK-18 na distinção de pacientes com esteatose daqueles com esteato-hepatite, bem como seu uso como marcador não invasivo de fibrose neste grupo de pacientes. Esses resultados foram posteriormente confirmados em pacientes obesos <sup>(29)</sup> e em população pediátrica <sup>(31,39)</sup>.

\* Existem 11 subtipos de caspases que se dividem em caspases iniciadoras e efetoras. As iniciadoras (caspases 8 e 9) clivam formas inativas de caspases efetoras, ativando-as. As efetoras (caspases 3 e 7), por sua vez, clivam outras proteínas da célula, resultando no processo apoptótico. A mitocôndria desempenha papel fundamental nesse mecanismo, guardando, no espaço intermembranoso, substâncias letais, capazes de deflagrar o processo de morte celular, entre as quais o citocromo C. Quando liberado, o citocromo C se associa a duas proteínas presentes no citosol e, na presença de ATP, ativa a caspase 9. A caspase 9, por sua vez, ativa as pró-caspases 3 e 7, que executam o processo de apoptose. A caspase 3 pode amplificar a cascata de proteólise pela ativação da caspase 8 e pela clivagem da uma proteína antiapoptótica, chamada Bcl-2, que, em situações normais, garante a integridade da membrana mitocondrial <sup>(38)</sup>.



Embasados nos achados anteriores, Younossi et al. <sup>(30)</sup> desenvolveram um teste diagnóstico para esteato-hepatite, utilizando sorologias por ELISA (CK-18, adiponectina e resistina), e Feldstein et al. <sup>(1)</sup> validaram os níveis circulantes de CK-18 no diagnóstico de esteato-hepatite não alcoólica. Há certo consenso na literatura sobre a utilidade da CK-18 na população de pacientes com DHGNA e identificação daqueles com doença mais grave.

Na busca de marcadores não invasivos de fibrose hepática, Bantel et al. <sup>(4)</sup> demonstraram que o aumento dos níveis séricos de CK-18 esteve relacionado a um maior grau de fibrose hepática em pacientes portadores de HCV, independente da elevação das transaminases. Esse estudo não excluiu pacientes com DHGNA, obesos ou cirróticos. Estudos posteriores seguiram mostrando esta relação, mas, como no estudo anterior, os pacientes com DHGNA não foram excluídos das amostras <sup>(7-8, 39)</sup>. Estudo publicado em 2012, incluindo 267 pacientes com HCV, virgens de tratamento, observou relação direta entre CK-18 e grau de fibrose hepática, porém os autores não encontraram associação entre CK-18 e grau de esteatose hepática nestes pacientes <sup>(40)</sup>.

Estudos recentes também apontam a importância da CK-18 no acompanhamento da terapêutica de pacientes portadores de HCV, tratados com Interferon e Ribavirina <sup>(41-42)</sup>, sugerindo o papel da apoptose durante o clareamento desse vírus. Estudo incluindo 23 pacientes tratados com interferon convencional revelou que indivíduos que responderam ao tratamento apresentaram aumento dos níveis séricos de CK-18 <sup>(41)</sup>. Outro estudo, incluindo 315 pacientes tratados com interferon peguilado e ribavirina, concluiu que houve uma diminuição significativa nos níveis circulantes de CK-18 no grupo que obteve resposta virológica sustentada (RVS). O contrário foi observado nos pacientes que tiveram recaída <sup>(42)</sup>. Foi apontada como uma das limitações deste estudo que a evolução da apoptose no tempo é desconhecida e não sabemos se esse marcador se comporta de maneira flutuante no HCV como a ALT. Apesar dos resultados promissores, ainda não há consenso na literatura sobre o papel da apoptose, mensurado através da CK-18, e a resposta ao tratamento. Ainda sobre o tratamento, estudo publicado em 2011, incluindo 164 pacientes acompanhados durante e após o tratamento com interferon peguilado e ribavirina, indicou que os pacientes que obtiveram RVS apresentaram maiores níveis circulantes de Fas e Fas-L <sup>(43)</sup>. Os dados sobre a evolução das concentrações desse marcador durante o tratamento ainda são escassos e os resultados não foram

confirmados por estudos posteriores. Dando sequência a esses achados, foi publicado, em 2012, estudo de coorte francês e suíço, envolvendo mais de mil pacientes, que investigou a susceptibilidade genética à fibrose hepática em pacientes com HCC. Esse estudo concluiu que a progressão da fibrose hepática está intimamente ligada à variantes genômicas associadas à apoptose hepatocitária <sup>(44)</sup>.

Sobre os marcadores inflamatórios em estudo, sVCAM-I e o sICAM-I desempenham papel na adesão leucocitária, induzindo fibrose via ativação das células estreladas hepáticas. Estudos vêm apontando o papel do VCAM, ICAM e PAI na angiogênese, inflamação e progressão da doença hepática crônica<sup>(45-49)</sup>. Em 2013, estudo <sup>(49)</sup> incluiu 134 pacientes com doença hepática crônica, destes, 58 apresentavam carcinoma hepatocelular (CHC). Foi avaliada a associação entre os níveis séricos e teciduais hepáticos de VCAM, estágio da doença hepática e influência sobre o tratamento do CHC. Concluiu-se que o VCAM está relacionado com o estágio da doença hepática (pacientes com CHILD C apresentaram maiores níveis de VCAM que os com CHILD A). Neste estudo, essa molécula de adesão foi relacionada com a gravidade da doença hepática, e não com o CHC. Alguns autores apontaram que os níveis circulantes dessas substâncias se relacionam com a atividade inflamatória hepática e escore de fibrose <sup>(45,46)</sup>. Ainda indicaram que pacientes com HCC, tratados com interferon e com RVS, diminuíram os níveis circulantes de ICAM-I em relação aos não respondedores <sup>(46)</sup>, enquanto o sVCAM-I não diferiu entre os dois grupos. Em contraponto, estudo de 2009 que avaliou os níveis desse marcador, em pacientes com HCC, antes e após o tratamento antiviral, concluiu que níveis de sVCAM-I foram maiores em estágios mais avançados de fibrose, sem predizer resposta ao tratamento <sup>(50)</sup>. Dando sequência a esses achados, estudo de coorte apontou que o sVCAM-I, em conjunto com outros marcadores séricos, é capaz de identificar pacientes com cirrose hepática compensada e gradiente de pressão na veia hepática inferior a 12 mmHg <sup>(51)</sup>.

No que diz respeito ao tPAI e fibrose hepática, a literatura dispõe de poucos estudos. Sabe-se que há hiperfibrinólise na doença hepática crônica com redução dos níveis de plasminogênio e elevação dos níveis de PAI, havendo um desequilíbrio do sistema pró-coagulante <sup>(52)</sup>. Duas hipóteses são aceitas envolvendo a coagulação e progressão da fibrose hepática. Uma delas é que há a formação de microtrombos no sistema porta, levando à isquemia tecidual, morte e fibrose do parênquima hepático <sup>(53)</sup>. A outra sugere que a ativação da coagulação no sistema vascular pode desempenhar papel na progressão da doença hepática, através da sinalização das

células estreladas hepáticas pela trombina <sup>(54)</sup>. Estudo recente sugeriu associação de RVS com níveis elevados de tPAI. Nesse estudo, também, houve uma correlação inversa entre o tPAI-1 e o estágio de fibrose hepática <sup>(48)</sup>.

O MIF é outro marcador que foi bastante estudado em diversas doenças inflamatórias, como sepse <sup>(55,56)</sup>, artrite reumatoide <sup>(57,58)</sup>, obesidade <sup>(59)</sup>, aterosclerose <sup>(60,61)</sup>. Nesses estudos experimentais, houve melhora da doença com a neutralização dessa citocina inflamatória. Começou-se, então, a considerar o potencial valor clínico das terapias anti-MIF <sup>(62)</sup>. Um estudo *in vitro* sobre doença hepática aguda, publicado em 2006, sugeriu que ratos deficientes em MIF foram protegidos de lesão hepática aguda, com modelo de hepatite aguda mediada por células T <sup>(63)</sup>. Em contraste, foram publicados estudos com efeitos benéficos do MIF na isquemia e reperfusão miocárdica <sup>(64,65)</sup>. O papel do MIF nas doenças inflamatórias crônicas do fígado, atuando no recrutamento leucocitário e interferindo na ativação das células estreladas hepáticas, ainda, é pouco explorado. O estudo mais representativo foi publicado em 2011, no qual os autores documentaram, em modelo murino, que o MIF tem papel antifibrótico através da inibição da ativação das células estreladas hepáticas, via receptor CD74 <sup>(10)</sup>. Sugeriu-se, assim, seu papel na terapêutica de doenças hepáticas crônicas. Esse estudo não foi confirmado por experimentos sequenciais.

No que diz respeito ao HCV, apoptose e inflamação, a literatura dispõe de estudos que incluem população heterogênea, e não fica claro se excluem pacientes que possam ter atividade apoptótica e inflamatória por outras causas.

### **3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

A infecção crônica pelo HCV representa a principal causa de doença hepática avançada e indicação de transplante de fígado no Ocidente. A apoptose e inflamação hepatocitárias pode ter relação com a gravidade da doença, como já demonstrado em pacientes com DHGNA. O clareamento da infecção pelo HCV está relacionado com apoptose e inflamação. Não se conhece, entretanto, qual a influência direta do vírus nesse contexto. Ademais, a população incluída nos estudos publicados habitualmente permite que fatores de confusão como a presença de SM, DM e DHGNA interfiram na ocorrência dos desfechos.

#### **4 QUESTÃO DE PESQUISA**

Como é o comportamento de marcadores de apoptose e inflamação em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C?

## **5 HIPÓTESE**

Existe relação direta entre os marcadores de apoptose e inflamação e o grau de fibrose hepática em pacientes com HCC.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis séricos de marcadores de apoptose e inflamação em pacientes selecionados, portadores de infecção crônica pelo vírus da hepatite C, experimentados ou virgens de tratamento e verificar se há correlação com fibrose hepática.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis séricos de CK-18, Fas e Fas-L em uma população de portadores crônicos do vírus da hepatite C e verificar se existe correlação com inflamação sistêmica aferida pelos níveis circulantes de ICAM, VCAM, MIF e PAI.

- Verificar se existe correlação entre os marcadores séricos de apoptose e inflamação e os valores de ALT, perfil lipídico, perfil glicêmico.

- Verificar se existe correlação entre os marcadores séricos de apoptose e inflamação e a resposta obtida ao tratamento antiviral.

## **7 TARGET JOURNAL**

- EUROPEAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY**
- ANNALS OF HEPATOLOGY**



## 8 ARTIGO CIENTÍFICO

### **Serum markers of apoptosis and inflammation in patients with chronic hepatitis C virus**

Maria da Graça Ferronato<sup>1</sup>, Ari Ben-Hur Leão<sup>1</sup>, Fernando Schacher<sup>2</sup>, Matheus Michalczuk<sup>2</sup>, Mario Reis Alvares-da-Silva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology - Federal University of Rio Grande do Sul - Brazil; <sup>2</sup> Division of Gastroenterology, Hepatology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brazil

**Maria da Graça Ferronato**

**Dr. Dario de Bittencourt, 300 – 1201A**

**91360-390 – Porto Alegre - Brazil**

**Conflicts of Interest and Source of Funding:** None declared.

## ABSTRACT

**Aims:** Our study aimed to elucidate the possible relationship between apoptosis, inflammation, and fibrosis in HCV patients.

**Methods:** Patients aged 18 to 60 years with HCV were included and underwent clinical and pathological examinations. Patients with chronic renal failure, malignancies, alcohol abuse, or pregnancy and/or those who were taking immunosuppressant agents were excluded. Body mass index, glucose, insulin, HOMA-IR, lipid profile, and the extent of fibrosis (METAVIR) were determined, as were the serum levels of CK-18 (M30-Apoptosense, ELISA - Lausen, Switzerland), Fas, Fas-L, I-CAM, V-CAM, MIF, and PAI (HSEP-63k, Milliplex, Millipore, Copenhagen, Denmark).

**Results:** Of the 55 patients, 23 were treatment-naïve, 15 demonstrated a sustained virological response (SVR) and 17 were non-responders (NR). The levels of CK-18 did not differ between the groups. Inflammation, as assessed by sVCAM, was directly associated with advanced fibrosis ( $p = 0.009$ ). sFas-L and sVCAM were increased in the SVR group compared with the treatment-naïve group ( $p = 0.006$  and  $0.019$ , respectively). sVCAM was associated with both sFas-L ( $r_s = 0.778$ ,  $p < 0.001$ ) and MIF ( $r_s = 0.621$ ,  $p < 0.001$ ). MIF and sFas-L were also correlated ( $r_s = 0.526$ ,  $p = 0.001$ ).

**Conclusion:** Advanced fibrosis was positively correlated with inflammation according to the levels of sVCAM. Furthermore, apoptosis, as assessed by the levels of sFas-L, and inflammation, as determined by sVCAM, were increased in the patients who achieved viral clearance compared with the treatment-naïve patients. The patients with advanced fibrosis were also more likely to present with higher levels of MIF.

**Keywords:** hepatitis C, apoptosis, inflammation, fibrosis.

## INTRODUCTION

It is estimated that approximately 170 million people are chronically infected with hepatitis C virus (HCV) [1], which represents approximately 2-3% of the world population. In Brazil, few studies have assessed the prevalence of HCV. A recent population-based study conducted by the Brazilian Ministry of Health, which included 19,634 individuals, revealed that the prevalence of anti-HCV antibodies was 1.38% [2]. Several factors may influence the natural history of hepatitis C with respect to its progression to liver cirrhosis. Approximately 5% to 20% of patients with moderate to severe liver inflammation will develop cirrhosis after 20-30 years of disease [3]. Some of the factors that are related to the accelerated progression of fibrosis are male gender, age at infection, alcoholism, co-infection with hepatitis B virus (HBV) or human immunodeficiency virus (HIV), and the presence of steatosis or steatohepatitis [4]. The age at which patients are infected with HCV has proven to be the best predictor of disease progression. In older individuals, increased rates of fibrosis progression may be related to oxidative stress, decreased hepatic blood flow, reduced immune activity, or mitochondrial toxicity [5].

The most significant features associated with fibrosis and liver regeneration are hepatocellular apoptosis and cytokine-induced inflammation. It has recently been suggested that the susceptibility to liver fibrosis induced by HCV is related to genes that regulate apoptosis. The most representative study involved a French and Swiss cohort of more than 1000 patients, which investigated the genetic susceptibility of patients with chronic hepatitis C (HCC) to liver fibrosis. This study concluded that the progression of liver fibrosis is closely linked to genomic variants that are associated with the apoptosis of hepatocytes [6]. With regard to the processes of inflammation and liver fibrosis, hepatic stellate cells (HSCs) are responsible for the recruitment of

inflammatory cells into the liver parenchyma, along with intercellular and vascular adhesion molecules. HSCs are also responsible for the recruitment of inflammatory cytokines and are essential in the initialisation of the process of fibrosis. The adhesion molecules, which belong to the immunoglobulin family, precede the recruitment of inflammatory cells to extravascular sites of inflammation and are essential for the initiation of this process [7]. Our study aimed to elucidate the possible interaction between apoptosis, inflammation, and fibrosis in patients with chronic HCV. We measured the serum levels of markers of apoptosis and inflammation in selected patients with chronic HCV infection who were either treatment-experienced or treatment-naïve, and we correlated these markers with hepatic fibrosis.

## **METHODS**

This was a cross-sectional study of patients from the Department of Gastroenterology/Viral Hepatitis of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA, Porto Alegre, Brazil). Patients with HCV, determined by the presence of anti-HCV antibodies (ELISA 3) and confirmed by the presence of HCV RNA ( $> 50$  IU/ml) by polymerase chain reaction (PCR), were evaluated for inclusion in this study. Patients with HCV mono-infections who were aged from 18 to 60 years underwent both clinical and pathological examinations. Patients with chronic renal failure, malignancies, alcohol abuse, or pregnancy and/or those who were taking immunosuppressant agents were excluded. Body mass index, the levels of glucose and insulin, HOMA-IR, lipid profile, and the extent of fibrosis (METAVIR) were determined, as were the serum levels of CK-18 (M30-Apoptosense, ELISA - Lausen, Switzerland), Fas, Fas-L, I-CAM, V-CAM, MIF, and PAI (HSEP-63k, Milliplex, Millipore, Copenhagen, Denmark). Fifty-five patients were included and divided into three groups: treatment-naïve, those with

a sustained virologic response (SVR), and non-responders (NR). The measurements were performed in duplicate according to the manufacturers' guidelines. The study was approved by the Ethical Committee of the HCPA and conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all included patients.

### **Histological Analysis**

Liver biopsies were evaluated irrespective of the presence of other markers. Histological features were analysed with the METAVIR group scoring system. Fibrosis was staged on a scale of F0 to F4 as follows: F0 = no fibrosis, F1 = portal fibrosis without septa, F2 = few septa, F3 = numerous septa without cirrhosis, and F4 = cirrhosis. Scores of F0, F1, or F2 indicated initial fibrosis, while scores of F3 or F4 indicated advanced fibrosis.

### **Statistical Analysis**

The data were entered into Excel and then exported to SPSS version 18.0 for statistical analysis. The frequencies and percentages of the categorical variables were obtained. Quantitative variables with normal distributions were described by the mean and standard deviation, and variables with asymmetric distributions were described by the median and interquartile range (25th and 75th percentiles). Categorical variables were compared by Fisher's exact test or the chi-square test. Quantitative variables with normal distributions were compared by Student's t test for independent samples or by analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Tukey test. Quantitative variables with skewed distributions were compared by the Mann-Whitney U test or the Kruskal-Wallis test. A significance level of 5% was considered for established comparisons.

## RESULTS

### Patient Characteristics

Fifty-five patients with a mean age of 47.3 years were included. These patients were predominantly female (65.5%), and most were infected with HCV genotype 1 (75.6%) and presented with grade 2 fibrosis according to the METAVIR index (41.8%). The percentage of steatosis according to the liver biopsies was less than 5% in all samples. Table 1 shows the demographic and clinical characteristics of the patients who were included in this study. The age of the patients was similar in the 3 groups. With regard to the METAVIR index, the majority of patients presented early fibrosis (F0 to F2) ( $p = 0.055$ ).

Table 2 presents the results of the laboratory tests that were conducted and evaluated in the study population. Higher levels of triglycerides were observed in the non-responders compared with the SVR patients ( $p = 0.009$ ). Although obese individuals were excluded, BMI values were higher in the naïve group compared with the SVR group ( $p = 0.020$ ). No differences were observed in the levels of aminotransferases, cholesterol, glucose, and insulin or in the HOMA-IR.

Table 3 shows the levels of inflammatory and apoptotic markers in the different groups. The levels of Fas and sVCAM-I were higher in patients with SVR compared with treatment-naïve patients ( $p = 0.006$  and  $p = 0.019$ , respectively). No significant differences were found in the levels of CK-18, MIF, sICAM-1, sFas, or tPAI.

The level of sVCAM-I demonstrated a direct and statistically significant correlation with the level of sFas-L ( $r_s = 0.778$ ,  $p < 0.001$ ) and with the level of MIF ( $r_s = 0.621$ ,  $p < 0.001$ ). The levels of sFas-L and MIF were also directly correlated ( $r_s = 0.526$ ,  $p < 0.001$ ).

The distribution of hepatic fibrosis was evaluated and is shown in Figure 1.

The frequency of METAVIR scores of F0 and F1 was higher in the naïve group ( $p = 0.001$ ).

Table 4 shows the levels of inflammatory and apoptotic markers in the different groups. The level of the inflammatory marker sVCAM-I was higher in patients with advanced fibrosis compared with patients with early fibrosis ( $p = 0.009$ ). No significant differences were found in any of the other variables (i.e., CK-18, MIF, sICAM-1, sFas-L, sFas, and tPAI).

Additionally, we compared 41 patients with fibrosis (METAVIR score of F1 to F4) and 13 patients without fibrosis (METAVIR F0), and the following medians were obtained (Mann-Whitney test): CK-18 = 350.81 vs. 182.00,  $p = 0.716$ ; MIF = 1148.47 vs. 536.47,  $p = 0.731$ ; s-ICAM-1 = 126179.80 vs. 117042.66,  $p = 0.664$ ; sFas-L = 32.99 vs. 21.49,  $p = 0.310$ ; sFas = 3863.5 vs. 2925.0;  $p = 0.911$ , sVCAM-1 = 318904.04 vs. 300785.66,  $p = 0.407$ ; and tPAI-1 = 59567.60 vs. 54266.96,  $p = 0.237$ .

## DISCUSSION

The progression of HCV-induced liver disease and the response to therapy are strongly influenced by viral and host genetic factors, including the genotype of the virus and genetic polymorphisms, such as those in the IL28B gene [8]. Several authors have suggested an association between apoptosis and the progression of hepatic fibrosis. Initially, patients with hepatic steatosis and steatohepatitis were studied, and apoptotic markers were used to differentiate these two groups [9–11]. These studies were able to distinguish patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) from those with more advanced fibrosis, but they included heterogeneous populations, such as patients with cirrhosis, diabetes, or cancer or those who had received some type of

immunosuppressive therapy. These markers were assessed in patients with HCV and demonstrated, in addition to their usefulness in the assessment of liver fibrosis progression, utility in the monitoring of the treatment of patients with interferon and ribavirin [12–14]. Some studies included low numbers of patients and did not exclude patients with NASH and with possible apoptotic activity from other causes. In 2012, a cohort study highlighted the genomic variants that are associated with hepatocyte apoptosis, and this study revealed a correlation between these genomic variants and the progression of liver fibrosis [6]. Our study included 55 patients with HCV. We found higher serum levels of apoptotic markers (CK-18, sFas, and sFas-L) in the population with more advanced fibrosis. This finding is consistent with results in the literature but was not significant. Maybe increasing the size of the sample studied the results were significant.

HCV infection leads to inflammatory processes of different grades that involve the activation of adhesion molecules and cytokines that facilitate the recruitment of leukocytes to areas of inflammation [15]. Liver fibrosis follows hepatic inflammation as a result of hepatocyte injury [16]. The interactions between membrane receptors on HSCs and extracellular matrix proteins are regulated by adhesion molecules [17,18]. sVCAM-I and sICAM-I play a role in leukocyte adhesion via the activation of HSCs and the propagation of liver fibrosis. Some authors have reported that the circulating levels of these molecules are related to hepatic inflammatory activity and fibrosis score [19,20]. Other authors have indicated that patients with HCV infection who were treated with interferon had decreased circulating levels of ICAM-I if they attained a SVR [21,22]. In contrast, a 2009 study assessed the levels of this marker in patients with HCV before and after antiviral treatment and revealed that sVCAM-I levels were higher in patients with more advanced stages of fibrosis, but the levels did not predict



treatment response [15]. Subsequently, another study [23] including 134 patients with chronic liver disease concluded that the VCAM level is related to a Child-Pugh C. Our study shows that patients with advanced fibrosis have higher levels of sVCAM-1 compared with patients with early fibrosis; in addition, the serum levels of sVCAM-1 were higher in patients with SVR compared with treatment-naïve patients.

The role of MIF in leukocyte recruitment and in the interference of the activation of HSCs in chronic inflammatory diseases of the liver has not been well studied. The most representative study was published in 2011. The authors reported that in a murine model, MIF has an antifibrotic role and inhibits the activation of HSCs via the CD74 receptor [24]. Thus, the use of MIF as a target for therapy for chronic liver disease was suggested. Our study shows that patients with advanced fibrosis ( $p = 0.053$ ) and those with SVR ( $p = 0.058$ ) are more likely to have higher levels of MIF. We also found a strong correlation between the levels of MIF and sVCAM-I ( $r_s = 0.621$ ,  $p < 0.001$ ) and between the levels of MIF and sFas-L ( $r_s = 0.526$ ,  $p < 0.001$ ). In our study, patients with viral clearance presented with higher levels of sVCM-1 and sFas-L, which may justify the higher MIF levels found.

Few studies on tPAI-1 and hepatic fibrosis are present in the literature. It is known that hyperfibrinolysis occurs in chronic liver disease along with reduced levels of plasminogen, increased levels of PAI, and an imbalance of the procoagulant system [25]. Two main hypotheses have been presented with regard coagulation and the progression of liver fibrosis. One hypothesis involves the formation of microthrombi in the portal system, which leads to tissue ischaemia, death, and fibrosis of the liver parenchyma [26]. The other hypothesis suggests that the activation of coagulation in the vascular system may play a role in the progression of liver disease by thrombin signalling of HSCs [27]. A recent study suggested an association between elevated

levels of tPAI and SVR and showed an inverse correlation between tPAI and liver fibrosis [28]. Our study found no significant difference in the population studied.

This study has some strengths that should be emphasised. We evaluated the relationship of markers of fibrosis, apoptosis, and inflammation in a homogeneous sample. We excluded obese patients as well as those with diabetes and steatohepatitis, as these are important confounding factors in HCV-induced liver damage. Additionally, we included treated and untreated patients and aimed to understand the behaviour of these markers in the process of viral clearance. However, our study was limited by the small sample size and the inclusion of only a few patients with advanced fibrosis.

## **Conclusion**

We conclude that patients with advanced fibrosis have higher levels of inflammation as measured by the level of sVCAM-1. Additionally, patients who achieved SVR had higher levels of serum markers of apoptosis and inflammation, as determined by the levels of sFas-L and sVCAM-1, compared with treatment-naïve patients.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

## REFERENCES

1. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011;**17**:107-115.
2. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico das hepatites virais 2011. Available from: [http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/boletim\\_epidemiologico\\_hepatites\\_virais\\_2011](http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/boletim_epidemiologico_hepatites_virais_2011).
3. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;**36**(5 Suppl 1):S35-S46.
4. Massard J, Ratziu V, Thabut D, Moussalli J, Lebray P, Benhamou Y, et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;**44**(1 Suppl):S19-S24.
5. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002;**36**(5 Suppl 1):S21-S29.
6. Patin E, Kutalik Z, Guergnon J, Bibert S, Nalpas B, Jouanguy E, et al. Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from HCV infection. *Gastroenterology* 2012;**143**:1244-1252.e1-12.
7. Knittel T, Dinter C, Kobold D, Neubauer K, Mehde M, Eichhorst S, et al. Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1999;**154**:153–167.
8. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance *Nature* 2009;**461**:399–401.

9. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease *Hepatology*. 2006;**44**:27–33.
10. Vos MB, Barve S, Joshi-Barve S, Carew JD, Whittington PF, McClain CJ. Cytokeratin 18, a marker of cell death, is increased in children with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;**47**:481-485.
11. Valva P, De Matteo E, Galoppo M, Pedreira A, Giacove G, Lezama C, et al. Apoptosis markers in liver biopsy of nonalcoholic steatohepatitis in pediatric patients. *Hum Pathol* 2008;**39**:1816–1822.
12. Volkmann X, Cornberg M, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Schulze-Osthoff K, et al. Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2006;**43**:1311-1316.
13. Sgier C, Müllhaupt B, Gerlach T, Moradpour D, Negro F, Malé PJ, et al. Effect of antiviral therapy on circulating cytokeratin-18 fragments in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2010;**17**:845–850.
14. Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL, Carvalho-Filho RJ, Sampaio JP, El Batah PN, Silva GA, et al. Evidence of a significant role for Fas-mediated apoptosis in HCV clearance during pegylated interferon plus ribavirin combination therapy. *Antivir Ther* 2011;**16**:291-298.
15. Kukla M, Zwirska-Korczala K, Gabriel A, Janczewska-Kazek E, Berdowska A, Wiczowski A, et al. sPECAM-1 and sVCAM-1: role in pathogenesis and diagnosis of chronic hepatitis C and association with response to antiviral therapy. *Therap Adv Gastroenterol* 2009;**2**:79-90.

16. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets *J Cell Mol Med* 2006;**10**:76–99.
17. Friedman H, Newton C, Klein TW. Microbial infections, immunomodulation, and drugs of abuse *Clin Microbiol Rev* 2003;**16**:209–219.
18. Rachfal AW, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis *Hepatol Res* 2003;**26**:1–9.
19. Douds AC, Lim AG, Jazrawi RP, Finlayson C, Maxwell JD. Serum intercellular adhesion molecule-1 in alcoholic liver disease and its relationship with histological disease severity. *J Hepatol* 1997;**26**:280-286.
20. Lo Iacono O, García-Monzón C, Almasio P, García-Buey L, Craxí A, Moreno-Otero R. Soluble adhesion molecules correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C treated with interferon-alpha *Aliment Pharmacol Ther* 1998;**12**:1091–1099.
21. Dejica D, Grigorescu M, Dejica V, Radu C, Neculoiu D. Serum levels of soluble intercellular-1 and vascular cell-1 adhesion molecules in chronic hepatitis C and the influence of interferon-alpha + ribavirin therapy. *Rom J Gastroenterol* 2002;**11**:277-283.
22. Radu C, Dejica D, Grigorescu M, Zaharie T, Neculoiu D. Correlation of sICAM-1 and sVCAM-1 level with biochemical, histological and viral findings in chronic hepatitis C after interferon-alpha + ribavirin therapy. *Rom J Gastroenterol* 2003;**12**:91-95.
23. Diaz-Sanchez A, Matilla A, Nuñez O, Rincon D, Lorente R, Lo Iacono O, et al. Serum level of soluble vascular cell adhesion molecule in patients with

- hepatocellular carcinoma and its association with severity of liver disease. *Ann Hepatol* 2013;**12**:236-247.
24. Heinrichs D, Knauel M, Offermanns C, Berres ML, Nellen A, Leng L, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) exerts antifibrotic effects in experimental liver fibrosis via CD74. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:17444-17449.
25. Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med* 2011;**365**:147-156.
26. Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension *Hepatology* 1995;**21**:1238–1247.
27. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Severino B, Fiorentina R, Baldoni M, et al. PAR1 antagonism protects against experimental liver fibrosis. Role of proteinase receptors in stellate cell activation. *Hepatology* 2004;**39**:365-375.
28. Miki D, Ohishi W, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Tsuge M, et al. Serum PAI-1 is a novel predictor for response to pegylated interferon- $\alpha$  (Peg-IFN- $\alpha$ ) in stellate cell activation and portal hypertension of liver disease. *J Viral Hepat* 2012;**19**:126-133.

**Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study population**

Characteristics	Naïve n = 23	SVR n = 15	NR n = 17	p
Age (average/SD)	45 (8)	48 (9)	51 (8)	0.090
Female (%)	65.2	66.7	64.7	0.993
Genotype 1 (%)	71.4	66.7	100	0.154
METAVIR F0 - F2 (%)	95.5	66.7	70.6	0.055

Naïve= untreated patients, SVR = sustained virologic response, NR = non-responders, SD = standard deviation.

Variables with a symmetric distribution were described by the mean (standard deviation) and were compared by analysis of variance (ANOVA). Categorical variables were described by percentages and were compared by the chi-square test.

**Table 2. Laboratory tests conducted in the study population**

Variables	Naïve n = 23	SVR n = 15	NR n = 17	p
AST	42 (24 – 79)	43 (20 – 200)	38 (12 – 107)	0.843
ALT	47 (22 – 223)	62 (22 – 407)	44 (18 - 77)	0.471
Total cholesterol	161 (32)	166 (29)	171 (24)	0.577
HDL cholesterol	48 (12)	47 (16)	48 (16)	0.994
Triglycerides	114 (50 – 576)a, b	88 (56 – 201)a	122 (71 – 294)b	0.009
Glycaemia	95 (10)	97 (6)	103 (17)	0.105
BMI	29 (4)a	25 (3)b	25 (3)a, b	0.020
Insulin	15 (5 – 90)	12 (6 – 35)	13 (6 – 22)	0.535
HOMA-IR	3 (1 – 10)	3 (2 – 8)	3 (1 – 6)	0.567



Naïve = untreated patients, SVR = sustained virologic response, NR = non-responders, AST = aspartate aminotransferase, ALT = alanine aminotransferase, HDL = high-density lipoprotein, BMI = body mass index, HOMA-IR = homeostatic model assessment insulin resistance.

Variables with asymmetric distributions were described by the median (minimum-maximum) and were compared by the Kruskal-Wallis test. Variables with symmetric distributions were described by the mean (standard deviation) and were compared by analysis of variance (ANOVA).

a, b: The different letters represent significantly different distributions.

**Table 3. Inflammatory and apoptotic markers in the study population**

	Naïve n = 23	SVR n = 15	NR n = 17	p
CK-18 (UI/L)	214 (66 – 2435)	141 (74 – 1146)	204 (74 – 655)	0.497
MIF (pg/mL)	440 (85 – 8129)	1070 (263 – 5636)	646 (184 – 4098)	0.058
sICAM-I (pg/mL)	78449 (21113– 615688)	87247 (33478 – 688432)	92949 (23924 - 380726)	0.326
sFas-L (pg/mL)	17 (13 – 82) <sup>a</sup>	32 (16 – 121) <sup>b</sup>	27 (13 - 93) <sup>a, b</sup>	0.006
sFas (pg/mL)	2475 (671 – 18928)	3737 (1614 - 9814)	3499 (1160 - 6541)	0.197
sVCAM-I (pg/mL)	183606 (61422 – 525642) <sup>a</sup>	356023 (94693 – 777287) <sup>b</sup>	331118 (105247 - 757969) <sup>a, b</sup>	0.019
tPAI (pg/mL)	54267 (18589 - 200570)	53884 (18878 - 149866)	42570 (14211 - 135330)	0.459

Naïve = untreated patients, SVR = sustained virologic response, NR = non-responders, CK-18 = cytokeratin 18, MIF = migration inhibitory factor of macrophages, sICAM-I = soluble intercellular adhesion molecule type 1, sFas = soluble protein associated with apoptosis, sFas- L = binding protein soluble, sVCAM-I = soluble vascular adhesion molecule type 1, tPAI = plasminogen activator inhibitor

Variables with asymmetric distributions were described by the median (minimum-maximum) and were compared by the Kruskal-Wallis test.

a, b Different letters represent different statistical distributions.

**Table 4. The levels of inflammatory and apoptotic markers with respect to the degree of fibrosis**

	Initial fibrosis (n = 44)	Advanced fibrosis (n = 11)	p
CK-18 (U/ml)	182.14 (139.28 – 360.57)	214.55 (88.23 – 655.17)	0.430
MIF (pg/mL)	618.47 (216.51 – 1393.70)	1272.37 (645.73 – 2458.90)	0.053
sICAM-1 (pg/mL)	79015.87 (40960.01 – 173696.93)	117405.30 (83212.45 – 156393.60)	0.178
sFas-L (pg/mL)	24.83 (14.72 – 36.06)	27.11 (20.41 – 70.65)	0.180
sFas (pg/mL)	2966.85 (1643.65 – 5081.11)	3737.01 (3378.28 – 5116.80)	0.132
sVCAM-1 (pg/mL)	209039.08 (133962.45 – 366003.85)	400044.70 (246807.05 – 656279.56)	0.009
tPAI (pg/mL)	45961.60 (34618.25 – 102330.36)	51563.88 (40697.07 – 66589.07)	0.866

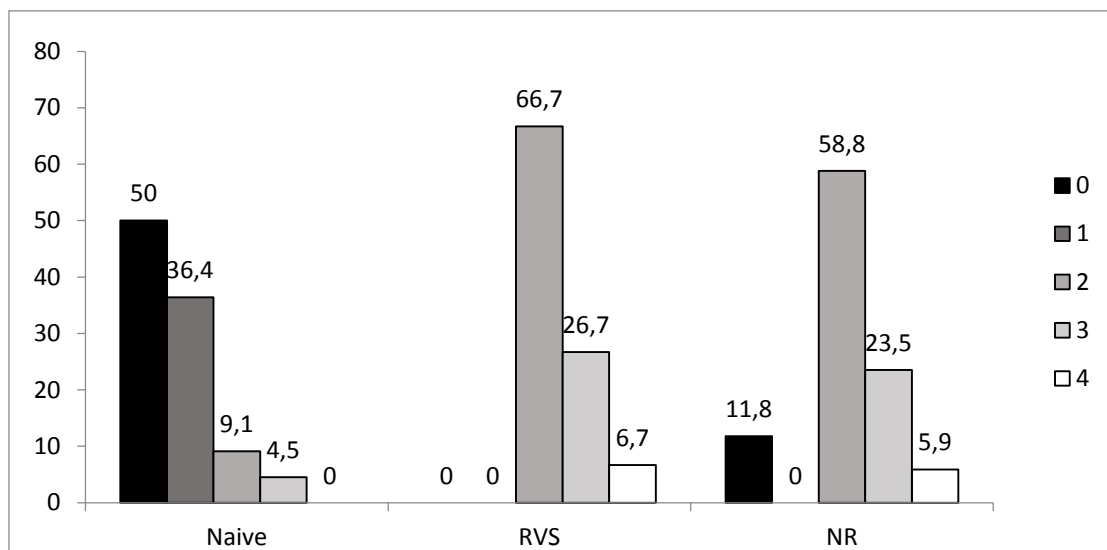
CK-18 = cytokeratin 18, MIF = inhibitor of macrophage migration factor, sICAM-I = soluble intercellular adhesion molecule type 1, sFASL = soluble binding protein, sFAS = soluble protein

associated with apoptosis, sVCAM-I = soluble vascular cell adhesion molecule type 1, tPAI = plasminogen activator inhibitor

Variables were described by the median (interquartile range: P25 to P75) and were compared with the Mann-Whitney test.

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1. Distribution of different degrees of fibrosis according to the METAVIR classification in the studied groups.**



## 9 ORÇAMENTO

Os recursos foram solicitados ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE) e ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG), distribuídos em:

1 Kit HSEP-63k, Milliplex, Millipore, Copenhagen, Denmark, no valor de R\$ 5.600,00

2 Kits M30-Apoptosense Elisa 96 wells, PEVIVA, no valor total de R\$ 10.000,00.

**TOTAL: R\$ 15.600,00**

## 10 CONCLUSÕES

De acordo com os propósitos do estudo, conclui-se que:

- Pacientes com fibrose avançada apresentaram maiores níveis de inflamação, mensurada através do sVCAM-1.

- Os pacientes tratados que obtiveram RVS apresentaram maiores níveis de marcadores séricos de apoptose e inflamação, mensurados através do sFas-L e sVCAM-1, em relação aos não tratados.

- Na população estudada não se observou diferença entre os grupos analisando a apoptose via CK-18.

## **11 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **A. PONTOS FRACOS DO ESTUDO**

Estudo pequeno, incluindo poucos pacientes com fibrose avançada.

O tipo de delineamento escolhido foi o transversal, considerando os desfechos de fibrose e RVS, que são de certo modo a longo prazo e multifatoriais.

### **B. PONTOS FORTES DO ESTUDO**

Avaliou-se a interferência entre os marcadores de fibrose, apoptose e inflamação em uma amostra homogênea, excluindo diabéticos, obesos e pacientes com esteatose hepática, uma vez que esses são importantes fatores de confusão com o dano hepático induzido pelo HCV. Além disso, foram incluídos pacientes tratados e não tratados com o objetivo de entender o comportamento desses marcadores na depuração viral.

## REFERÊNCIAS

1. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as non-invasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology*. 2009; 50(4):1072-8.
2. Masuoka HC, Guicciardi ME, Gores GJ. Caspase Inhibitors for the Treatment of Hepatitis C. *Clin Liver Dis*. 2009; 13(3):467-75.
3. Panasiuk A, Parfieniuk A, Zak J, Flisiak R. Association among Fas expression in leucocytes, serum Fas and Fas-ligand concentrations and hepatic inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2010; 30(3):472-8.
4. Bantel H, Lügering A, Heidemann J, Volkmann X, Poremba C, Strassburg CP et al. Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology*. 2004; 40(5):1078-87.
5. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2006; 44(1):27-33.
6. Yilmaz Y, Ulukaya E, Dolar E. Serum M30 levels: a potential biomarker of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease and normal aminotransferase levels. *Hepatology*. 2009; 49(2):697.
7. Tarantino G, Conca P, Coppola A, Vecchione R, Di Minno G. Serum concentrations of the tissue polypeptide specific antigen in patients suffering from non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Clin Invest*. 2007; 37:48-53.
8. Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, Akgoz S, Keskin M, Kiyici M et al. Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(6):837-44.
9. Knittel T, Dinter C, Kobold D, Neubauer K, Mehde M, Eichhorst S, Ramadori G. Expression and Regulation of Cell Adhesion Molecules by Hepatic Stellate Cells (HSC) of Rat Liver Involvement of HSC in Recruitment of Inflammatory Cells during Hepatic Tissue Repair. *Am J Pathol*. 1999; 154(1):153-167.
10. Heinrichsa D, Knauelb M, Offermannsa C, Berresa ML, Nellena A, Lengc L et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) exerts antifibrotic effects in experimental liver fibrosis via CD74. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(42):17444-9.

11. von Montfort C, Beier JI, Kaiser JP, Guo L, Joshi-Barve S, Pritchard MT, States JC et al. PAI-1 plays a protective role in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in mice: role of hepatocyte division. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 May;298(5):G657-66.
12. Bergheim I, Guo L, Davis MA, DuvEAU I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Feb;316(2):592-600. Epub 2005 Oct 12.
13. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a c DNA clone derived from a blood-borne non-A, non B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
14. Fang JW, Chow V, Lau JY. Virology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis*. 1997 Nov;1(3):493-514.
15. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol*. 1994 May;75(Pt 5):1053-61.
16. Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):39-47.
17. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004;12(2):96-102
18. Li K, Lemon SM. Innate immune responses in hepatitis C virus infection. *Semin Immunopathol*. 2013 Jan;35(1):53-72.
19. Lee HC, Narayanan S, Park SJ, Seong SY, Hahn, YS. Transcriptional regulation of IFN- $\lambda$  genes in Hepatitis C virus-infected hepatocytes via IRF-3, IRF-7, NF- $\kappa$ B complex. *J Biol Chem*. 2014 Feb 21 289(8):5310-9.
20. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461(7265):798-801.
21. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;461(7262):399-401.
22. Chen M, Sällberg M, Sönnnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L et al. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 1999 Jan;116(1):135-43.
23. Schulze Zur Wiesch J, Ciuffreda D, Lewis-Ximenez L, KasproWicz V, Nolan BE, Streeck H et al. Broadly directed virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses are primed



- during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med.* 2012 Jan 16;209(1):61-75.
24. Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Mercham-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR et al. Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2013 Feb 1;13:60.
  25. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36(5 Suppl 1):S35-46.
  26. Massard J, Ratzu V, Thabut D, Moussalli J, Lebray P, Benhamou Y et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2006;44(1 Suppl):S19-24.
  27. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36(5 Suppl 1):S21-9.
  28. Diab DL, Yerian L, Schauer P, Kashyap SR, Lopez R, Hazen SL. Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(11):1249-54.
  29. Vos MB, Barve S, Joshi-Barve S, Carew JD, Whittington PF, McClain CJ. Cytokeratin 18, a marker of cell death, is increased in children with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47(4):481-5.
  30. Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, Randhawa M, Afendy M, Stepanova M. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg.* 2008;18(11):1430-7.
  31. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut.* 2005;54(7):1024-33.
  32. Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, Nap M, Mauermann J, Steiner G. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res.* 2004;64(5):1751-6.
  33. Luft T, Conzelmann M, Benner, Rieger M, Hess M, Strohmaecker U. Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease. *Blood.* 2007;110(13):4535-42.
  34. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 2004;39(2):273-8.
  35. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999;6(11):1028-42.

36. Bantel H. Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. *Eur J Cell Biol.* 2001;80(3):230-9.
37. Yilmaz Y. Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18 - the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;30(11-12):1103-9.
38. Fischer R, Baumert T, Blum HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2007;13(36):4865-72.
39. Valva P, De Matteo E, Galoppo M, Pedreira A, Giacove G, Lezama C. Apoptosis markers in liver biopsy of non- alcoholic steatohepatitis in pediatric patients. *Hum Pathol.* 2008;39(12):1816-22.
40. Jazwinski AB, Thompson AJ, Clark PJ, Naggie S, Tillmann HL, Patel K. Elevated serum CK18 levels in chronic hepatitis C patients are associated with advanced fibrosis but not steatosis. *Journal of Viral Hepatitis* 2012;19(4):278-82.
41. Volkman X, Cornberg M, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Schulze-Osthoff K et al. Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2006;43(6):1311-6.
42. Sgier C, Müllhaupt B, Gerlach T, Moradpour D, Negro F, Malé PJ et al. Effect of antiviral therapy on circulating cytokeratin-18 fragments in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* 2010;17(12):845-850.
43. Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL, Carvalho RJ, Sampaio JP, El Batah PN, Silva GA et al. Evidence of a significant role for Fas-mediated apoptosis in HCV clearance during pegylated interferon plus ribavirin combination therapy. *Antivir Ther.* 2011;16(3):291-8.
44. Patin E, Kutalik Z, Guergnon J, Bibert S, Nalpas B, Jouanguy E et al. Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from HCV infection. *Gastroenterology.* 2012 Nov;143(5):1244-52.e1-12
45. Bruno CM, Sciacca C, Cilio D, Bertino G, Marchese AE, Politi G et al. Circulating adhesion molecules in patients with virus-related chronic diseases of the liver. *World J Gastroenterol.* 2005;11(29):4566-9.
46. Lo Iacono O, Rincón D, Hernando A, Ripoll C, Catalina MV, Salcedo M et al. Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule are related to hyperdynamic circulation in patients with liver cirrhosis. *Liver Int.* 2008;28(8):1129-35.

47. Béland K, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Liver restores immune homeostasis after local inflammation despite the presence of autoreactive T cells. *PloS One*. 2012;7(10):e48192.
48. Miki D, Ohishi W, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Tsuge M et al. Serum PAI-1 is a novel predictor for response to pegylated interferon- $\alpha$ -2b plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*. 2012;19(2):126-33.
49. Diaz-Sanchez A, Matilla A, Nuñez O, Rincon D, Lorente R, Iacono OL et al. Serum level of soluble vascular cell adhesion molecule in patients with hepatocellular carcinoma and its association with severity of liver disease. *Ann Hepatol*. 2013;12(2):236-47.
50. Kukla M, Zwirska-Korczala K, Gabriel A, Janczewska-Kazek E, Berdowska A, Wiczowski A et al. sPECAM-1 and sVCAM-1: Role in Pathogenesis and Diagnosis of Chronic Hepatitis C and Association with Response to Antiviral Therapy. *Therap Adv Gastroenterol*. 2009 Mar;2(2):79-90.
51. Buck M, Garcia-Tsao G, Groszmann Rj, Stalling C, Grace ND, Burroughs AK. Novel Inflammatory Biomarkers Of Portal Pressure in Compensated Cirrhosis Patients. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):1052-9.
52. Tripodi A, Mannucci PM. The Coagulopathy Of Chronic Liver Disease. *N Engl J Med*. 2011 Jul 14;365(2):147-56.
53. Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic And Portal Vein Thrombosis in Cirrhosis: Possible Role in Development of Parenchymal Extinction and Portal Hypertension. *Hepatology*. 1995 May;21(5):1238-47.
54. Fiorucci S, Antonielli E, Distrutti E, Severino B, Fiorentina R, Baldoni M et al. Par1 Antagonism Protects Against Experimental Liver Fibrosis. Role of Proteinase Receptors in Stellate Cell Activation. *Hepatology*. 2004 Feb;39(2):365-75.
55. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelker W. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*. 1993 Oct 21;365(6448):756-9.
56. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hültner L. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*. 2000 Feb;6(2):164-70.
57. Baugh JA, Chitnis S, Donnelly SC, Monteiro J, Lin X, Plant BJ. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene

- associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2002 May;3(3):170-6.
58. Morand EF, Hall P, Hutchinson P, Yang YH. Regulation of annexin I in rheumatoid synovial cells by glucocorticoids and interleukin-1. *Mediators Inflamm.* 2006;2006(2):73835
59. Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, Voshol PJ, Ouwens DM, van Erk M, de Vries-van der Weij J. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res.* 2009 Jul 2;105(1):99-107
60. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med.* 2007 May;13(5):587-96. Epub 2007 Apr 15.
61. Zerneck A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Nov;28(11):1897-908.
62. Hoi AY, Iskander Mn, Morand EF. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Therapeutic Target Across Inflammatory Diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2007 Sep;6(3):183-90.
63. Nakajima H, Takagi H, Horiguchi N, Toyoda M, Kanda D, Otsuka T. Lack of macrophage migration inhibitory factor protects mice against concanavalin A-induced liver injury. *Liver Int.* 2006 Apr;26(3):346-51.
64. Miller EJ, Li J, Leng L, McDonald C, Atsumi T, Bucala R, Young LH. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature.* 2008 Jan 31;451(7178):578-82.
65. Qi D, Hu X, Wu X, Merk M, Leng L, Bucala R. Cardiac macrophage migration inhibitory factor inhibits JNK pathway activation and injury during ischemia/reperfusion. *J Clin Invest.* 2009 Dec;119(12):3807-16.

## **APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Paciente: \_\_\_\_\_

### **Protocolo: MARCADORES DE APOPTOSE E INFLAMAÇÃO EM PACIENTES PORTADORES DE INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C SUBMETIDOS OU NÃO A TRATAMENTO ANTIVIRAL**

Investigadores responsáveis: Maria da Graça Ferronato/Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva.

#### **OBJETIVOS**

Convidamos o(a) senhor(a) para participar de projeto de pesquisa com objetivo de identificar exames de sangue para avaliação do comprometimento do fígado pelas doenças virais descritas anteriormente. Espera-se encontrar resultados que possibilitem diagnosticar gravidade da doença do fígado através de exame sanguíneo que é de fácil realização e de menor risco considerando-se como comparativo a biópsia hepática, que é o exame de uso atual para essa finalidade. Este estudo irá estimar a frequência e evolução de apoptose hepática em pacientes portadores de infecção crônica pelo vírus da hepatite C, não obesos, em comparação a indivíduos não infectados, não obesos e a correlacionará com fatores que indicam pior progressão da doença, como resistência insulínica, síndrome metabólica e dosagem de algumas substâncias. A apoptose é uma forma de morte celular que pode ser considerada um marcador de lesão nos órgãos e tecidos. Sua avaliação pode auxiliar na quantificação do dano hepático causado pela infecção pelo vírus da hepatite C. Será também comparada a frequência de diabetes melito, resistência insulínica e síndrome metabólica em controles com relação aos pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

#### **PROCEDIMENTOS**

A rotina de atendimento no Ambulatório GHE continuará a mesma, através de consultas médicas e exames feitos na rotina habitual para acompanhamento e tratamento da hepatite C. Pedimos a permissão para utilização dessas informações

no estudo em questão, através da utilização dos resultados dos exames, porém mantendo em sigilo a identificação do paciente. Além dos exames habituais, será necessária a coleta de sangue para dosagem de CK-18 (que estima a apoptose). Será feito aproveitamento do material biológico utilizado para exame anatomopatológico rotineiro (biópsia de fígado), para proceder a avaliação da apoptose tecidual através de coloração especial (imuno-histoquímica) e aproveitamento de amostra de sangue coletada para exames rotineiros para dosagem sérica de insulina, colesterol, triglicerídeos e glicose.

### RISCOS

Serão decorrentes da coleta de sangue em veia periférica, como sangramento, hematoma, equimose, dor local.

### BENEFÍCIOS

A avaliação da apoptose poderá trazer informações importantes no que se refere ao prognóstico da sua doença e, assim, auxiliar em uma estratégia de tratamento futuro. Estimativa de alterações metabólicas como resistência à insulina, síndrome metabólica ou diabetes melito, possibilitando diagnóstico precoce dessas condições com expectativa de antecipar seu tratamento. Além do mais, não haverá nenhum custo extra para o(a) senhor(a) pela sua participação nessa pesquisa.

### SIGILO E ANONIMATO DAS INFORMAÇÕES

As informações médicas geradas por esta pesquisa farão parte do seu prontuário hospitalar. Aquelas informações que não constarem no seu prontuário serão mantidas no arquivo dos pesquisadores e identificadas apenas por um número. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em uma revista ou livro texto da área médica com a finalidade de ensino.

### SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

O(a) senhor(a) poderá solicitar mais informações a respeito do estudo a qualquer momento. No caso de dúvidas relativas ao estudo em questão, os investigadores estão à disposição para esclarecimento através dos seguintes contatos: Dra Maria da Graça Ferronato ou Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva, telefones

(51) 8149-0024 e (51) 9965-2322 respectivamente, ou pessoalmente no Ambulatório GHE, na Zona 15 do HCPA, segundas-feiras, das 16 às 19 horas.

O(a) senhor(a) será informado sobre novas descobertas que possam influenciar a continuidade da sua participação na pesquisa.

#### RECUSA OU ABANDONO DO ESTUDO

O(a) senhor(a) está livre a recusar-se de participar ou abandonar o referido projeto em qualquer momento. Este fato não irá interferir, em absoluto, no seu atendimento habitual no Ambulatório GHE.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada, conforme especificados no termo de consentimento livre e esclarecido. Recebi informações específicas sobre os procedimentos aos quais serei submetido(a), bem como da utilização de material biológico para estudo.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

O profissional \_\_\_\_\_ certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informado(a) que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Assinatura dos participantes:

PACIENTE

\_\_\_\_\_

TESTEMUNHA (nos casos especiais)

\_\_\_\_\_

INVESTIGADOR

\_\_\_\_\_

ORIENTADOR/COORDENADOR DO PROJETO

---

**APÊNDICE B - RESUMO SELECIONADO PARA APRESENTAÇÃO ORAL NO  
CONGRESSO BRASILEIRO DE HEPATOLOGIA 2013**

**MARCADORES DE APOPTOSE E INFLAMAÇÃO EM PACIENTES PORTADORES  
DE INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C SUBMETIDOS OU NÃO  
A TRATAMENTO ANTIVIRAL**

**INTRODUÇÃO:** Foi recentemente sugerido que a suscetibilidade à fibrose hepática, induzida pelo HCV, está relacionada a genes que regulam a apoptose.

**OBJETIVOS:** Nosso trabalho visa elucidar a possível interação entre apoptose, inflamação e fibrose em pacientes com hepatite crônica C (HCC).

**MATERIAL E MÉTODOS:** Pacientes com HCC, mono infectados, com idade entre 18 a 60 anos foram incluídos e submetidos a exames clínico e histopatológico. Aqueles com insuficiência renal crônica, neoplasias malignas, abuso de álcool, gravidez e/ou uso de imunossupressores foram excluídos. Foram determinados o índice de massa corporal, glicose, insulina, HOMA-IR, perfil lipídico, fibrose (METAVIR), níveis séricos de CK-18 (M30-Apoptosense), Fas, Fas-L, I-CAM, V-CAM, MIF, PAI (HSEP-63k, Milliplex, Millipore, Copenhagen, Denmark).

**RESULTADOS:** Cinquenta e cinco pacientes foram incluídos, 23 deles não tinham recebido tratamento antiviral. Dos demais, 15 tinham resposta virológica sustentada (RVS) e 17 eram não respondedores (NR) ao tratamento. A fibrose foi diretamente associada ao METAVIR, sendo que os pacientes com fibrose avançada (F3/F4) apresentaram maior sVCAM em comparação com os pacientes F0/F2 ( $p = 0,016$ ). Os níveis séricos do sFas-L e sVCAM aumentaram no grupo RVS em relação aos não tratados ( $p = 0,006$  e  $p = 0,019$ , respectivamente), conforme tabela 1.



Tabela 1 - Tabela da comparação dos marcadores entre os grupos

	<i>NAIVE</i> n = 23	<i>RVS</i> n = 15	<i>NR</i> n = 17	p
CK-18 (UI/L)	214 (66 - 2435)	141 (74 - 1146)	204 (74 - 655)	0,497
MIF (pg/mL)	440 (85 - 8129)	1070 (263 - 5636)	646 (184 - 4098)	0,058
sICAM (pg/mL)	78449 (21113 - 615688)	87247 (33478 - 688432)	92949 (23924 - 380726)	0,326
sFasL (pg/mL)	17 (13 - 82) <sup>a</sup>	32 (16 - 121) <sup>b</sup>	27 (13 - 93) <sup>a,b</sup>	0,006*
sFas (pg/mL)	2475 (671 - 18928)	3737 (1614 - 9814)	3499 (1160 - 6541)	0,197
sVCAM- I (pg/mL)	183606 (61422 - 525642) <sup>a</sup>	356023 (94693 - 777287) <sup>b</sup>	331118 (105247- 757969) <sup>a,b</sup>	0,019*
tPAI (pg/mL)	54267 (18589 - 200570)	53884 (18878 - 149866)	42570 (14211 - 135330)	0,459

Variáveis com distribuição assimétrica descritas pela mediana (mínimo-máximo) e comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis

a,b letras diferentes representam distribuições diferentes estatisticamente

**CONCLUSÃO:** Apoptose através sFas-L e inflamação, avaliada pelo aumento dos níveis de sVCAM, foram maiores em pacientes que eliminaram o vírus quando comparados com os não tratados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hepatite C, apoptose, inflamação, fibrose.